

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pelo candidato Sérgio
Sélos Moreira, aprovada pela Comissão
Julgadora.

12/02/92 *feri*



SÉRGIO SÉLOS MOREIRA

**ESTUDO DE INTERLEUCINA 1 E
INTERLEUCINA 2 EM PACIENTES COM
CÂNCER**

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
título de Mestre.

- Campinas -

1992

120499 - BC
M813e

16042/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ORIENTADOR

Professor Dr. Fawzi Ahmed Moustafa Dawood 

À meus pais
com carinho

A G R A D E C I M E N T O S

Ao meu orientador Professor Dr. Fawzi A.M. Dawood pela orientação e palavras de incentivo que me conduziram ao término deste estudo aqui apresentado.

Aos Docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela assistência a mim prestada no decorrer deste curso de pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia que muito colaboraram para a realização deste trabalho.

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos meus colegas pela amizade que solidificou durante o nosso convívio.

À Bióloga Elizabeth Christina M. Fischer Amoroso Santos pela colaboração durante nossa estadia no Laboratório de Tumores deste Departamento de Microbiologia Imunologia.

Ao Professor Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona, Professora Dra. Marlene Braide Serafim, Professora Dra. Julia Keiko Sakurada e Professora Dra. Dagmar Ruth Stach Machado pela contribuição quando da análise crítica do presente estudo.

A B R E V I A T U R A S

LPS	-	Lipopolissacarídeo
PHA	-	Fito hemaglutinina
LAF	-	Fator ativador de linfócitos
EP	-	Pirrogênio endógeno
MP	-	Proteína mitogênica
HP-1	-	Pico auxiliar-1
TRF III	-	Fator III de restituição de célula T
TRFm	-	Fator do macrófago de restituição da célula T
BAF	-	Fator ativador de célula B
BDF	-	Fator de diferenciação da célula B
G-CSF	-	Fator estimulador de colônia dos granulócitos
M-CSF	-	Fator estimulador de colônia de macrófagos
GM-CSF	-	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófa gos
MHC	-	Complexo principal de histocompatibilidade
Con-A	-	Concanavalina A
LAK	-	Lymphokine activated killer
CFU-SA	-	Colony Forming Unit-Stimulating Activity
PSF	-	Fator estimulador de células P
PSH	-	Hematopoietina Pan-específica
PMA	-	Acetato de forbol miristato
BCGF	-	Fator de crescimento de linfócito B
BSF1	-	Fator-1 estimulador de linfócito B
TCGF ₂	-	Fator-2 do crescimento de linfócitos T

MC GF_2 - Fator-2 de crescimento de mastócitos
CTL - Linfócito T citotóxico
EDF - Fator de diferenciação do eosinófilo
IgA-EF - Fator indutor de IgA-EF
O-CSF - Fator estimulador de colônia de eosinófilos
KHF - Killer-helper factor
PCT-GF - Fator de crescimento de plasmocitoma
HSF - Fator estimulador de hepatócitos

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Pacientes.....	26
2.2. Linhagens celulares.....	26
2.3. Preparação padrão de IL-2.....	29
2.4. Produção e quantificação da IL-1.....	29
2.5. Produção e quantificação da IL-2.....	31
2.6. Remoção de monócitos das células mononucleares do sangue periférico.....	32
2.7. Análise dos marcadores celulares com anticorpos monoclonais.....	33
2.8. Indução de receptor de IL-2 e absorção da IL-2.....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1. Produção de IL-1 por monócitos de pacientes com câncer.....	35
3.2. Produção de IL-2 por células mononucleares circulantes de pacientes e indivíduos normais.....	39
3.3. Análise das subpopulações de linfócitos T.....	42
3.4. Efeito de IL-1 sobre produção de IL-2.....	46
3.5. Efeito dos receptores de IL-2 sobre sua produção.....	47
3.6. Produção de IL-2 por PBM depletadas de monócitos.....	49

4.DISSCUSSÃO.....	51
5.RESUMO E CONCLUSÕES.....	56
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. I N T R O D U Ç Ã O

Câncer em estado avançado é uma doença que se caracteriza por imunossupressão, principalmente das funções de células derivadas do timo (T), incluindo sua atividade mitogênica (Catalona et al., 1974 ; Elhilali et al., 1976 ; Kopersztych et al., 1976). Ainda não estão bem esclarecidos os eventos iniciais responsáveis por essas deficiências imunológicas. Fatores bloqueadores séricos, como globulina alfa, complexos de antígenos tumorais e seus anticorpos com atividade inespecífica (Hsu e Longerfo, 1972; Sample et al., 1971 ; Ford et al., 1973) e anomalias celulares intrínsecas dos linfócitos tem sido sugeridas (Al-Sarraf et al., 1972) como causas de supressão da resposta imune em pacientes com câncer. Recentemente, citocinas com ações específicas sobre a regulação imunológica tem sido caracterizadas

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina liberada essencialmente por monócitos ou macrófagos ativados, foi identificada pela primeira vez em 1972, pela observação de que as células aderentes estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) liberam fatores que ampliam a resposta proliferativa de timócitos estimulados com fitohemaglutinina "PHA" (Gery et. al., 1972). Embora denominada originalmente como fator ativador de linfócitos (LAF), a IL-1 é também conhecida na literatura por muitos outros nomes que descrevem suas atividades evidenciadas

em diferentes pesquisas. Alguns sinônimos de IL-1 são: Pirogênio endógeno (EP), Proteína mitogênica (MP), Pico-auxiliar-1 (HP-1), Fator III de restituição de células T (TRF III), Fator do macrófago de restituição de célula T (TRFm), fator ativador da célula B (BAF) e fator de diferenciação da célula B "BDF" (Garden et. al., 1979)

Duas formas de IL-1 tem sido isoladas: IL-1 alfa e IL-1 beta. Ambos os polipeptídeos tem sido encontrados em todas as espécies estudadas incluindo humanos, suínos, coelhos, ratos e camundongos. A interleucina-1 dessas espécies exibem muita semelhança estrutural entre si a níveis dos aminoácidos. Por exemplo, há 62% de homologia entre IL-1 alfa humana e de camundongo. Ambas as interleucinas alfa e beta são polipeptídeos com peso molecular ao redor de 17 KD. As diferenças significativas entre esses dois polipeptídeos são a heterogeneidade em seu conteúdo de glicose e em seus pontos isoelétricos (PI): 5,0 para IL-1 alfa e 7,0 para IL-1 beta (Oppenheim et.al., 1986 e Dower et al., 1987).

As IL-1- alfa e IL-1- beta são produtos de dois genes diferentes e ambas são inicialmente sintetizadas como propeptídeos de 30-32 KD com 270 e 269 aminoácidos respectivamente. As formas finais de IL-1 alfa e IL-1 beta são produtos de clivagem C-terminal das proteínas precursoras, anteriormente mencionadas, resultando em dois fragmentos de 159 e 153 aminoácidos respectivamente.

Curiosamente, ambas as proteínas precursoras de IL-1 "alfa e beta" faltam-lhes o peptídeo hidrofóbico conhecido como necessário no transporte extracelular das proteínas geradas no interior da célula. Evidências recentes sugerem que a fosforilação das proteínas precursoras de IL-1 "alfa e beta" pode desempenhar perfeitamente o papel do seu processamento e transporte via lisossoma (Beuscher et al., 1988 e Kobayashi et al., 1988). Dados bioquímicos sugerem a existência de uma terceira versão de IL-1 associada a membrana celular (Kurt-Jones et al., 1985 e Matsushima et al., 1986). Embora os dados imunoquímicos indicam que a IL-1 se encontra apenas associada a substância matriz do citoplasma dos monócitos ativados (Singer et al., 1988), o mecanismo responsável pela sua secreção permanece um mistério.

As IL-1 alfa e IL-1 beta exercem seus efeitos pela reação específica com receptores de 80 - 82 KD localizados na membrana das células alvo. Esses receptores tem sido descobertos em linfócitos humanos e de camundongos e possuem características semelhantes nas duas espécies com relação da sua quantidade e sua afinidade de ligação com IL-1 (Dower et al., 1987). Ademais, esses autores tem demonstrado que a IL-1 alfa e a IL-1 beta possuem a mesma afinidade de ligação com receptores de IL-1 e competem entre si e com o precursor de IL-1 alfa para este tipo de reação, o que sugere que essas moléculas podem ter a mesma atividade biológica (Wood et al., 1985).

Embora a atividade de IL-1 tem sido demonstrada essencialmente em monócitos e macrófagos, outras células tem demonstrado a mesma atividade, como por exemplo: células de Langerhans, células NK "Natural Killer", linfócitos B, linfoblastos B, células endoteliais, células dendríticas, algumas linhagens de melanoma, astrócitos, células microgliais, neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais, algumas linhagens de leucemia tipo T em adultos, algumas linhagens de células T murinas (Oppenheim et al., 1986).

Vários autores tem demonstrado atividade de IL-1 como: quimiotaxia para células polimorfonucleares (PMN) e macrófagos (Luger et al., 1983 e Sauder et al., 1984); indução da proliferação em células endoteliais (Byers et al., 1984); exibição de atividade procoagulante (Bevilacqua et al., 1984), estimulação da produção de colágeno tipo IV das células epidérmicas (Matsushima et al., 1985), indução de proliferação de osteoblastos (Gower et al., 1983), indução de resorção do osso por osteoclastos (Rifas et al., 1984) e modulação das funções reparativas após a danificação tecidual (Postlethwaite et al., 1988).

As atividades de IL-1 relacionadas com o sistema imune e a resposta inflamatória, segundo revisão de Durum et al., (1985) e Le et al., (1987) podem ser resumidas como segue:

1-Auxilia a liberação de linfocinas por linfócitos T.

- 2-Co-estimula a diferenciação e proliferação dos linfócitos B.
- 3-Amplia a citotoxicidade mediada por células "Natural Killer"
- 4-Induz a quimiotaxia, degranulação e liberação dos neutrófilos da medula óssea.
- 5-Induz a liberação de prostaglandinas, quimiotaxia, lise das células tumorais por macrófagos.
- 6-Secreção das proteínas da fase aguda da inflamação pelos hepatócitos.
- 7-Indução da febre.

Recentemente, Castelli et al., (1988) tem demonstrado que a IL-1 é capaz de estimular "in vitro" culturas de linhagens tumorais mielóides e linfóides a liberarem fatores que exibem atividade protetora em animais expostos a irradiação gama ou injetados com ciclofosfamida. A IL-1 pode também induzir: a- células da medula óssea humana a produzirem o fator estimulador de colônia dos granulócitos "G-CSF" e o fator estimulador de colônia dos macrófagos "M-CSF" (Fibbe et al., 1988); b- os fibroblastos da derme humana a produzirem o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos "GM-CSF" e "G-CSF" (Kaushansky et al., 1988); e c- os linfócitos do sangue periférico humano a produzirem "GM-CSF" (Hermann et al., 1988). Ademais a IL-1, pode ter um papel importante em regulação e transcrição de genes, em certas linhagens de linfomas das células T, que codificam para produção de Interleucina 2 (IL-2), receptor de IL-2 (IL-2R), e interleucina 3 (Hagiwara et al., 1987). Greenbaum et al., (1988), tem demonstrado que a IL-2

exibe também efeitos importantes sobre a diferenciação e expansão clonal das células T auxiliaadoras "Th" favorecendo deste modo a proliferação da população T auxiliadora/indutora "Th2" sobre a população T inflamatória/supressora "Th1"

Frente estes dados e a demonstração de Williams et al., (1985) que a IL-1 representa um sinal acessório importante para ativação de linfócitos T purificados "in vitro", os efeitos de IL-1 sobre ativação dessas células permanecem um ponto de controvérsia na literatura. Evidências dos estudos feitos em linhagens de células tumorais sugerem que a IL-1 pode induzir ou acelerar a produção de fatores "como IL-2, IL-6 e IL-2R" necessários para ativação e proliferação dos linfócitos T (Hagiwara et al., 1987; Lowenthal et al., 1986 e Garman et al., 1987). Por outro lado, algumas evidências sugerem o contrário: isto é a IL-1 não é essencial para ativação de linfócitos T mas acelera apenas a função estimuladora das células acessórias envolvidas neste mecanismo (Hagiwara et al., 1987; Heufler et al., 1988 e Koide et al., 1987). Entretanto, Shirakawa et al., (1987) tem demonstrado que as populações de monócitos cuja função é restrita por MHC ou Con A induzem receptores para IL-1 em linfócitos do sangue periférico. Estes dados implicam em que as funções mediadas diretamente com IL-1 podem ser associadas a eventos tardios necessários em mecanismos de ativação do linfócito T

A interleucina-2 (IL-2) é uma glicoproteína de peso molecular ao redor de 15500 daltons, foi descoberta pela primeira vez devido ao seu importante papel em expansão clonal de linfócitos T (Morgan et al., 1976 e Gillis et al., 1977). Sabe-se que as funções imunes; tanto protetoras quanto autoreativas, são consequências de ativação e expansão clonal de linfócitos efetores. A proliferação de linfócito T é direcionada a pelo menos dois eventos principais; o reconhecimento do antígeno e a interação com seu receptor (IL-2R).

Embora os linfócitos T em repouso, faltam-lhes a capacidade de produzir IL-2 e expressar em sua membrana o IL-2R, a exposição dessas células "in vitro" a lectinas ou antígenos na presença de células acessórias induz rapidamente a produção de IL-2 (Meuer et al., 1984 e Cantrell et al., 1988) e desenvolvimento dos receptores IL-2R reativos (Cotner et al., 1983 e Williams et al., 1984). A interação de IL-2 com IL-2R promove o rápido crescimento dos linfócitos T até a fase S do ciclo celular (Gillis et al., 1977; Coutinho et al., 1979; Bonnard et al., 1979 e Farrar et al., 1982). Estudos de Williams et al., (1985); Meuer et al., (1986) e Garman et al. (1987) sobre ativação de linfócitos T tem evidenciado a necessidade de alguns estímulos para indução de IL-2 e IL-2R e que a transcrição de mRNA de IL-2, produção da proteína de IL-2, e a expressão de IL-2R em sua forma ligada a membrana são etapas dependentes de sinais emitidos pelo antígeno associado à

membrana das células acessórias junto com monocinas "IL-1 e/ou IL-6".

Além da atividade tradicional de IL-2 em promoção do crescimento dos linfócitos T que permite a manutenção de diferentes linhagens dessas células, a IL-2 tem demonstrado também as seguinte funções

1-participa em ativação, crescimento e estímulo da função tumoricida das células NK "Natural Killer" e células LAK "lymphokine activated killer" (Grimm et al., 1983; Henney et al., 1981 e Dempsey et al., 1982).

2-amplia o crescimento dos linfócitos B e produção de imunoglobulinas dessas células (Ceuppens et al., 1985)

3-amplia a produção de interferon-gama (Weigent et al.1983 e Ortaldo et al., 1984)

4-modula a expressão dos receptores IL-2R em células alvo (Smith et al., 1985 e Williams et al.,1985)

A IL-2 tem sido usada em tentativas clínicas como um agente terapêutico contra câncer junto com células LAK "lymphokine activated killer" (Rosenberg et al., 1985). Entretanto, alguns estudos tem associado anormalidades em produção de IL-2, seu nível e expressão de seus receptores IL-2R com algumas patologias conhecidas. Por exemplo; AIDS "aquaired immunodeficiency syndrome". Outras doenças autoimunes incluindo a esclerose múltipla (Troter et al.,1988), artrite reumatóide (Phadke et al., 1986, e Combe et al., 1985), lupus eritematoso

sistêmico (Murakawa et al., 1985), diabetes tipo I (Kaye et al., 1986) e casos de rejeição de transplantes (Kirkman et al., 1985 e Cornaby et al., 1988)

Tradicionalmente, a concentração de IL-2 tem sido determinada através de ensaios biológicos, utilizando-se linhagens celulares de CTLL-2, HT-2, linfoblastos T, etc. como indicadores dependentes de IL-2. Estas linhagens proliferam na presença de IL-2 e permanecem estáticas em sua ausência (Gillis et al., 1987). Este método é muito sensível, sendo capaz de detectar 50-200 pg de IL-2/ml (Wang et al. 1986). Entretanto, este ensaio depende essencialmente da manutenção das células indicadoras IL-2 sensíveis livre de qualquer patógeno. Este método é criticado geralmente pela sua sensibilidade a outros componentes presentes nos sobrenadantes a serem testados que não sejam IL-2. Por exemplo, as linhagens CTLL-2 e HT-2 podem demonstrar resposta significativa a interleucina-4 "IL-4" (Grabstein et al., 1986 e Hu Li et al., 1987).

A Interleucina 3 foi descrita pela primeira vez como um fator liberado por linfócitos T estimulados com fitohemaglutina "PHA" e conhecido como CFU-SA "Colony Forming Unit-Stimulating Activity" (Cerny et al., 1974). Mais tarde, este fator foi denominado de interleucina-3, porquanto o tratamento de linfócitos esplênicos normais com o sobrenadante de linfócitos estimulados com antígeno ou aloantígeno induziu a

liberação de alfa-hidroxisteróide dehidrogenase, um marcador das células T imunologicamente maduras, resistente a cortisona (Ihle et al., 1982). A interleucina-3 também é conhecida na literatura por outros nomes que descrevem suas funções. Por exemplo; fator ativador de crescimento de neutrófilo-eritrócito, fator estimulador de histamina, interleucina-3, fator de crescimento do mastócito, fator estimulador multicolonial e fator WEHI-3 (uma linhagem melanocítica). Todas essas funções são atribuídas a um único produto de apenas um gene (Schrader et al., 1986)

De acordo com os estudos realizados por eletroforese em gel de acrilamida "SDS-PAGE", a IL-3 murina um polipeptídeo de 134 aminoácidos com peso molecular ao redor de 30-40 KD (Bazill et al., 1983 e Ihle et al., 1982). A variação observada no peso molecular foi atribuída a diferenças em glicosilação do peptídeo (Ihle et al., 1982). Parece que duas formas de IL-3 são geradas de um único peptídeo precursor formado por 166 aminoácidos. Uma delas um peptídeo C-terminal de 140 resíduos de aminoácidos chamado fator estimulador de células P "PSF", e a outra forma é um peptídeo C-terminal de 134 aminoácidos conhecida como hematopoietina Pan-específica "PSH" (Schrader et al., 1986). Presumivelmente, as duas formas resultam de clivagem da sequência N-terminal da proteína precursora durante sua secreção.

A IL-3 exerce seu efeito através da ligação com receptor específico nas células alvo (Whitton et al.

,1983). Os estudos da inibição do metabolismo celular sugerem que a IL-3 se internaliza nas células após sua ligação com o receptor (Schrader et al., 1986), promove a tomada de glicose pela célula (Whitton et al., 1985), e assim causa um desvio no balanço energético das células (Whitton et al., 1985). Farrar et al.,(1985) tem demonstrado que a IL-3 induz a translocação da proteína quinase C "PKC" de citosol na membrana plasmática, um evento geralmente associado com hidrólise fosfoinositídica e geração de diacilglicerol.

Embora bem caracterizado no camundongo , o homólogo humano de IL-3 foi encontrado recentemente. A homologia a nível de DNA entre IL-3 murina e humana é aproximadamente 45%. Otsuka et al.,(1988) encontraram um clone de cDNA para IL-3 a partir de células auxiliadoras "Th" ativadas com con A. Em base de dados obtidos pelo emprego de células COS transfectadas com cDNA de IL-3, este clone codifica para um peptídeo de 152 aminoácidos que exibe atividades semelhantes às do produto de COS IL-3 murino.

Com excessão da linhagem WEHI-3 melanocítica e células epidérmicas , a IL-3 é produzida exclusivamente com linfócitos T ativados (Luger et al.,1985). As atividades biológicas de IL-3 evidenciadas na literatura são:

- 1-estimula a proliferação das linhagens de mastócitos.
- 2-estimula a formação de neutrófilos, macrófagos, megacariócitos e mastócitos a partir de células progenitoras hematopoiéticas

(Ihle et al., 1983).

3-promove o crescimento de colônias de megacariócitos, mastócitos, neutrófilos e macrófagos a partir de células da medula óssea suspensas em ágar (Schrader et al., 1983).

Evidências recentes sugerem que a IL-3 exibe sua maior habilidade em formação de multicolônias no início de desenvolvimento das células progenitoras multipotentes (Sonoda et al., 1988). Assim sendo, parece que a IL-3 promove apenas poucas divisões celulares para liberar neutrófilos ou células eritróides "Burst" (BFU-E) pela mistura de fator estimulador de colônia Granulócito/Macrófago ou Eritropoietina respectivamente com células progenitoras "in vitro". Essas observações estão de acordo com dados que sugerem que as multicolônias se tornam menos sensíveis a ação de IL-3 quando se tornam mais desenvolvidas (Koike et al., 1986).

A interleucina-4 foi descrita pela primeira vez em 1982 por Williams, Paul e seus colaboradores, quando observaram que sobrenadantes obtidos de culturas de timoma EL-4 estimuladas com PMA foram capazes de promover o crescimento de linfócitos B estimulados com anti-Igs. O fator descoberto nesses sobrenadantes, conhecido como fator de crescimento de linfócitos B "BCGF", era distinto de IL-2 e capaz de promover linfócitos B estimulados com IgM a entrarem rapidamente em fase-S do ciclo celular (Howard et al., 1982).

Este fator "L-4", conhecido também como fator-1 estimulador de linfócito B "BSF-1", fator-2 do crescimento de linfócito T "TCGF-2", e fator de crescimento de mastócito "MCGF-2" (Howard et al., 1982) é uma glicoproteína de peso molecular em torno de 18-20 KD, conforme determinado pela filtração em gel ou de 12-15 KD, conforme determinado por eletroforése "SDS-PAGE". A IL-4 murina purificada por filtração em gel exibe dois produtos que correspondem ao PI 6,4 - 6,6 e 7,4 - 7,6. Por outro lado, a IL-4 humana exibe apenas um produto que corresponde ao PI de 6,5 - 6,9 (Howard et al., 1984)

O tratamento de IL-4 murina com endoglicosidase F produz um polipeptídeo com peso molecular de 15-16000 daltons que retém a mesma atividade biológica original. O tratamento com endoglicosidase H não tem efeito algum sobre a estrutura e a atividade de IL-4, o que indica que as cadeias glicosídicas em sua molécula não são do tipo manose. Entretanto, a redução de IL-4 induz a perda de sua atividade, o que sugere que as pontes dissulfeto possuem papel funcional extremamente importante na molécula de IL-4 murina (Paul et al., 1987).

As sequências nucleotídicas de cDNA humanas e murinas codificam para um peptídeo de 140 aminoácidos aproximadamente, os primeiros vinte desses, são hidrofóbicos e representam sinal indicativo da sequência peptídica inteira associada às proteínas secretadas (Paul et al., 1987 e Yokota et

al., 1986). Ademais, a IL-4 murina contém três sítios de glicosilação e seis resíduos de cisteína (Sideras et al., 1988). Dos estudos de sequências nucleotídicas foi evidenciado também 50% de homologia entre IL-4 humana e murina a nível dos seus aminoácidos. Embora ambas as interleucinas "humana e murina" exibem atividades semelhantes, não mostram reatividade cruzada entre as duas espécies.

A IL-4 é definitivamente um produto de uma subpopulação dos linfócitos T ativados. Esta interleucina exerce sua atividade biológica através da ligação com receptor específico, de alta afinidade, expresso em células hematopoiéticas como linfócitos T em repouso, linfócitos B e uma variedade de linhagens celulares como macrófagos (P388 D1), mastócitos (ABFTL-2) e células progenitoras mielóides (Park et al., 1987 e Ohara et al., 1987). Lowenthal et al., (1988), demonstraram a presença deste receptor de alta afinidade ($KD = 2-6 \times 10^{-11}$ M) para IL-4 também em células não hematopoiéticas como células de estroma da medula óssea, baço, timo, cérebro e em células normais de músculo, cérebro, fígado, melanoma e fibroblastos.

À semelhança de IL-4 murina, a IL-4 humana também se liga a um receptor de alta afinidade, com KD de $1-2 \times 10^{-10}$ M, e possui a mesma distribuição nos tecidos. O tratamento de IL-4 humana (P.M = 60 KD) com N- glicanase produz uma forma de IL-4 de baixo peso molecular (15 KD) sem alteração

alguma em sua atividade ou afinidade para com o receptor. Assim sendo, a glicosilação de IL-4 não tem efeito sobre sua atividade biológica (Park et al., 1987).

Os estudos de Hu Li et al., (1987), demonstraram que a IL-4 aumenta a expressão das moléculas da classe II de MHC em linfócitos B e produção de IgG1 e IgE com essas células após sua estimulação com LPS. A IL-4 promove também o crescimento de linfócitos T normais em repouso, algumas linhagens de células T e mastócitos (Sideras et al., 1988 e Hu Li et al., 1987). Estudos recentes (Kupper et al., 1987 e Zlotnik et al., 1987), sugerem que a IL-4 age como fator de crescimento de células T antígeno-específicas junto com a IL-1 e estimula ao mesmo tempo a apresentação do antígeno pelos macrófagos derivados da medula óssea.

Estudos de Lowenthal et al., (1988) e Cardig et al., (1988), demonstraram que a IL-4 desempenha papel importante em manutenção das células primordiais "Lyt2-/L3T4-" no timo e em maturação dos timócitos de modo geral neste órgão. Ademais, parece que a IL-4 está envolvida em citotoxicidade mediada por células. Por exemplo, essa interleucina tem demonstrado tanto estímulo em desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos "CTL", população T murina em repouso, quanto indução de células LAK "lymphokine activated killer" (Trenn et al., 1988, e Peace et al., 1989). Esta última atividade é induzida também com interleucina-2 "IL-2". Entretanto, parece que a IL-4

converte proporções maiores de células T, LAK-semelhantes (NK-1.1+ , Lyl-2+) em células NK, LAK-semelhantes (NK-1.1+ , Lyl-2-).

No início da década de 1970, duas observações levaram a descoberta da interleucina- 5 "IL-5" : primeira; a eosinofilia resultante de infecções parasitárias tem sido demonstrada como fenômeno dependente de linfócitos e a segunda ; os sobrenadantes de células esplênicas murinas eram capazes de estimular a colônia formadora de eosinófilos (Basten et al., 1970 e Metcalf et al., 1974). Este fator de diferenciação de eosinófilos (EDF) foi isolado originalmente de sobrenadantes de culturas de linfócitos T de camundongos infectados com *Nesocestoides corti*, e estimulados com antígeno específico do parasita. Com estudos de cromatografia de filtração em gel, a atividade de EDF foi separada em um produto de peso molecular de 45 KD. Estas observações evidenciaram a existência de uma linfocina distinta de IL-3 e GM-CSF (Sanderson et al., 1984)

Shimple et al., (1975) e Swain et al., (1982) descreveram um fator de restituição de linfócitos T "TRF" encontrado em sobrenadantes de linfócitos T ativados, capaz de induzir a proliferação de células B estimuladas com sulfato de dextran e promover a síntese de imunoglobulinas . A atividade deste fator de crescimento da célula B "BCGF" junto

com suas ações associadas a EDF, TRF, fator indutor de IgA "IgA-EF" e fator estimulador da colônia de eosinófilos "O-CSF" tem sido recentemente atribuída a apenas uma linfocina conhecida como IL-5 (Sanderson et al., 1985; Sanderson et al., 1986; Haradan et al. 1985 e Yokota et al., 1987).

Dados sobre cDNA que codifica para IL-5 murina sugerem que esta interleucina é sintetizada como um polipeptídeo de 133 aminoácidos contendo três possíveis sítios de glicosilação e três resíduos de cisteína. Este polipeptídeo apresenta um peso molecular ao redor de 12400 daltons. A comparação dos produtos de transdução de cDNA murino pelo uso do sistema de lisado de reticulócitos de coelho "in vitro" ou de *Xenopus oocyte* "in vivo" sugere que a IL-5 é processada e secretada como um dímero com peso molecular de 45-50 KD (Takatsu et al., 1988; McKenzie et al., 1987 e Tominaga et al., 1988). A co-injeção de tunicamicina e mRNA de rIL-5 em *Xenopus oocyte* promove a formação de um dímero de IL-5 (27 KD), o que sugere que a glicosilação não é envolvida na atividade biológica de IL-5.

Do mesmo modo, o cDNA de rIL-5 humana codifica para um peptídeo de 134 aminoácidos, contendo uma sequência hidrofóbica de 19 aminoácidos que funciona como líder na síntese dessa linfocina. O principal polipeptídeo apresenta pelo menos dois sítios de glicosilação e exibe 77 e 70% de homologia com o polipeptídeo murino a nível de nucleotídeos e

aminoácidos respectivamente (Azuma et al., 1986). À semelhança da linfocina de camundongo, a IL-5 humana sintetizada como dímero de peso molecular ao redor de 45 KD e exibe um alto grau de reatividade cruzada entre as duas espécies (Yokota et al., 1987). Por exemplo, a IL-5 murina é capaz de induzir colônias de eosinófilos em culturas de medula óssea humana, lise de células tumorais mediada por anticorpos e eosinófilos do sangue periférico, e estimular eosinófilos a fagocitar células de levedura opsonizadas. Entretanto, a IL-5 murina não exibe atividade de BCGF-II sobre células-B humanas (Sanderson et al. 1988).

Presumivelmente, a IL-5 exerce sua atividade biológica através de sua interação com receptores específicos em células alvo. Tal receptor de IL-5 tem sido encontrado em células murinas da linhagem BCL1-B20. Essas células leucêmicas tipo-B expressam duas classes de receptores; um de alta afinidade ($KD = 4 \times 10^{-10}$ M) e outro de baixa afinidade ($KD = 1,1 \times 10^{-9}$ M). Estes receptores não são detectáveis em células-T ou outras células hematopoiéticas. Entretanto, Takatsu et al., (1988), tem demonstrado que os linfócitos B normais também exibem o receptor TRF/IL-5, sugerindo que sua afinidade e desenvolvimento aumentam nas respostas a estímulos com LPS.

Então, a IL-5 é produto de linfócitos T ativados e exerce sua atividade em eosinófilos, células-B e

timócitos. Esta linfocina é diretamente relacionada com a eosinofilia resultante da infecção parasitária e capaz de produzir aumento específico e significativo dos eosinófilos na medula óssea do camundongo parasitado com *N.corti* (Sanderson et al., 1985 e Warren et al., 1985). Entretanto, Strath et al. (1986) tem detectado o alto nível sérico de IL-5, logo antes da observação de eosinofilia. Os linfócitos B murinos também se proliferam e se diferenciam em resposta a IL-5. Estas atividades biológicas da IL-5 podem ser indiretas devido a liberação de IL-2 (Nakanishi et al., 1987 e 1988), tem demonstrado que a IL-5 recombinante murina e TRF derivado de células B 15 induzem a resposta de IL-2 em células BCL1.

Outros autores tem demonstrado também que IL-5 é capaz de estimular a diferenciação e secreção de imunoglobulinas em culturas de células-B esplênicas murinas normais ou células tumorais CH-12 (Rasmussen et al., 1988 e Swain et al., 1988). Evidências recentes sugerem que a IL-5 pode estimular expressão de Ig-A em linfócitos B esplênicos. Entretanto, este fenômeno pode ter ocorrido devido a efeito específico em linfócitos-B, Ig-A+ que já terminaram de liberar esta classe de imunoglobulina (Murray et al., 1987 e Harriman et al., 1988). A IL-5, também mostra atividade auxiliadora de citotoxicidade "KHF; Killer-helper factor", exercida por timócitos capazes de se ligarem à aglutinina de amendoim "PNA; Peanut aglutinnin binding", na presença de células estimuladoras junto com IL-2. Esta atividade resulta em seleção de CTL

"Linfócito T citotóxico" entre células da população de timócitos, talvez pela capacidade de IL-5 de promover expressão de receptores para IL-2 em timócitos alvo (Takatsu et al., 1987).

A IL-6 foi descrita como proteína de peso molecular de 26 KD, derivada de células fibroblastóides estimuladas com RNA de dupla hélice, ciclohexamida ou vírus e que desenvolve atividade anti-viral fraca (Billiau et al., 1987). Esta interleucina tem sido descrita por uma variedade de nomes que refletem sua atividade biológica. Sinônimos de IL-6 são: fator de crescimento de linfócito B liberado por monócito, interferon beta 2 "IFN-beta2", fator estimulador do linfócito B "BSF-2" (Tosato et al., 1988), fator de crescimento de plasmocitoma "PCT-GF" (Nordan et al., 1987), interleucina de hibridoma/plasmocitoma-1 "IL-HP1" (Van Damme et al., 1987), e fator estimulador de hepatócitos "HSF" (Gauldie et al., 1987). Vários autores tem demonstrado que a IL-6 é produzida por monócitos ou macrófagos ativados, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos T ativados e apresenta sua ação em diferentes alvos celulares como: células-T, células-B, fibroblastos, progenitoras mielóides e hepatócitos (Gauldie et al., 1987, Wong et al., 1988, Walther et al., 1988).

Dados de sequenciamento de cDNA que codifica para IL-6 indicaram que RNA mensageiro humano e murino

codificam para produtos de 213 e 212 aminoácidos respectivamente (Wong et al.,1988). Embora esses dois polipeptídeos humano e murino apresentem apenas 41% de homologia a nível de seus aminoácidos, a IL-6 altamente reativa com alvos murinos. As duas interleucinas apresentam peso molecular de 19 a 26 KD conforme determinado com eletroforése em gel de acrilamida "SDS-Page". Esta variação de peso molecular de ambas as interleucinas humana e murina depende do grau de sua glicosilação e a sua origem celular.

Estudos com isoeletrofocalização demonstraram que a IL-6 murina possui P.I. entre 6.2 - 6.4. A redução de IL-6 murina com DTT "ditiotreitól" seguida por alquilação resulta em perda total da sua atividade biológica, o que sugere a importância das pontes dissulfeto na molécula ativa (Nordan et al.,1987). Diferentemente das outras interleucinas, a glicosilação variável pode afetar a atividade de IL-6, conforme demonstrado que a interleucina-6 de diferentes origens exibe diferentes atividades quando testada em sistemas idênticos (Wong et al.,1988).

Aparentemente, a IL-6 exerce sua atividade biológica pela interação com receptor específico (Taga et al.,1987). Os linfócitos T humanos em repouso isolados de tonsilas desenvolvem aproximadamente de 100-1000 receptores de IL-6 por célula, com $KD = 1,3 - 6,4 \times 10^{-10}$ M. Ao contrário, linfócitos B em repouso de tonsilas quase não desenvolvem

receptores para IL-6 isto é; menos de 30 por célula . Entretanto, a ativação com *Staphilococcus aureus* promove o desenvolvimento de receptores em linfócitos B com características semelhantes às observadas em linfócitos T.

A IL-6 pode desempenhar atividades biológicas múltiplas como: atividade antiviral, razão da sua designação IFN-beta2 (Seghal et al.,1980); promoção de crescimento de hibridoma/plasmocitoma (Nordan et al.,1987; Van Damme et al.,1987, Van Snick et al.,1986) e de linfócitos B transplantados com EBV "Epstein Barr Virus" (Tosato et al.,1988); e indução de diferenciação de linfócitos B e secreção de IgG (Hirano et al.,1986). Ademais, tem sido demonstrado que a IL-6 age sobre timócitos murinos afim de induzir a diferenciação de linfócitos T citotóxicos "CTL; Lyt2+" na presença de IL-2 (Takai et al.,1988) e promove indiretamente a proliferação "in vitro" de linfócitos T estimulados com concanavalina A (Garman et al.,1987). Este último efeito parece ser atribuído a capacidade de IL-6 de agir como segundo sinal na produção de IL-2 , promovendo deste modo a proliferação de linfócitos T dependentes de IL-2. Este mecanismo ou seja o papel de IL-6 em ativação de linfócitos T carece de maior exploração

Vários autores tem demonstrado também que a IL-6 estimula a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas multipotenciais (Ikebuchi et al., 1987) e promove a proliferação de progenitoras granulócito/macrófago

(Wong et al., 1987) Finalmente, algumas atividades de IL-6 são idênticas das atribuídas anteriormente a IL-1. Por exemplo: à semelhança de IL-1, a IL-6 co-estimula a proliferação de timócitos (Wong et al., 1988) e também induz a liberação de substâncias da fase aguda da inflamação pelos hepatócitos (Gauldie et al., 1987).

A interleucina-7 (IL-7), cuja descoberta é a mais recente das demais interleucinas, é uma citocina com 25 KD, liberada originalmente por células matrizes derivadas da medula óssea, capaz de promover o crescimento das células precursoras dos linfócitos B (Namen et al., 1988). Entretanto, a IL-7 não tem efeito algum sobre linfócitos B maduros. Células produtoras de IL-7 tem sido também detectadas no timo e no baço. Recentemente, Lee et al., (1989) tem sido demonstrado que a IL-7 se envolve no crescimento primário, e não na diferenciação, das células precursoras dos linfócitos B.

Ademais, a semelhança das células progenitoras dos linfócitos B, as células T podem responder a estímulos com a IL-7. Isto é, parece que a IL-7 é um fator mitogênico para timócitos murinos. No homem, a IL-7 é capaz de estimular o crescimento das células CD4 e CD8 negativas (CD4⁺ CD8⁻), uma população pré-T no timo que dá origem a uma distinta subpopulação de células T maduras.

A IL-7 pode funcionar também como um co-mitógeno na proliferação das células T purificadas, induzida com Con-A. Entretanto, as subpopulações CD4+ e CD8+ respondem do mesmo modo a atividade co-mitogênica de IL-7. A ação de IL-7 sobre o crescimento dos linfócitos T pode ser atribuída, em parte, à sua habilidade de induzir a produção de IL-2 e IL-2R nestas células (Morrissey et al., 1989). Em vista da descoberta muito recente de IL-7, outros estudos são necessários a fim de determinar o grau da sua contribuição em ativação das células T tanto na resposta imune quanto na resposta inflamatória.

Santos et al., (1985) tem demonstrado a produção reduzida de IL-1 em pacientes com câncer. Contudo, a IL-2 tem sido usada em imunoterapia contra câncer (Rosenberg et al., 1985; Mulé et al., 1986 e McMannis et al., 1988). Entretanto, tem sido demonstrado que a resposta linfoproliferativa e subsequente diferenciação dos linfócitos T efetores requerem interação das subpopulações de células T e células aderentes. Assim sendo, os linfócitos T auxiliares "Th", após ligação de mitógeno ou antígeno em sua membrana, liberam IL-2 em resposta a IL-1 produzida por células aderentes. As demais subpopulações T efetoras adquirem a habilidade de proliferação em resposta a IL-2 (Ruscetti e Gallo, 1981 e Robb, 1984). Visto que a resposta linfoproliferativa deficiente poderia ocorrer devido a falha de uma ou mais etapas em ativação de linfócitos-T, casos clínicos caracterizados pela disfunção linfoproliferativa devem ser

reinvestigados.

Em base das considerações anteriormente expostas, foi sugerida a necessidade de determinar a produção de IL-1 e IL-2 por células de pacientes com câncer em estado adiantado. O presente trabalho tem sido focalizado principalmente sobre fatores envolvidos na produção desses mediadores. As células mononucleares dos pacientes foram estimuladas a fim de produzir IL-1 e IL-2. Em seguida, os níveis dessas citocinas foram determinadas com auxílio de ensaios biológicos, utilizando linhagens celulares estabelecidas em cultura e desenvolvidas para este fim.

2. C A S U Í S T I C A, M A T E R I A L E M É T O D O S

2.1. Pacientes

Este estudo foi realizado em pacientes com neoplasias sólidas em estado avançado, admitidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Detalhes sobre a população estudada estão apresentadas na Tabela 1. Amostras do sangue periférico foram obtidas antes do início de qualquer terapia.

2.2. Linhagens celulares

2.2.1. Células Daudi: uma linhagem de células B linfoblastóides, mantidas em cultura com meio completo de RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FCS), 2 mM de L-Glutamina, 10mM de HEPES (N-2-Hidroxietilpiperazine-N-2-ácido etanosulfônico) e 10 ng/ml de gentamicina.

2.2.2. Células CTLL: uma linhagem de células T citotóxicas murinas, IL-2 dependentes, mantida também em cultura com meio completo de RPMI 1640 contendo 5% de FCS e 5×10^{-5} M de 2-ME (Mercaptoetanol).

2.2.3. Células LBRM-33-1A5 : uma linhagem de células de linfoma, mantida também em cultura com meio completo de RPMI contendo 10% de FCS e 5×10^{-5} M de 2-ME. Ambas as linhagens CTLL e LBRM-33-1A5 foram fornecidas pela Companhia Immunex, Seattle, WA., USA.

Tabela 1 - PACIENTES ESTUDADOS

Pacientes	Idade/Sexo	Diagnóstico
1.	41/F	Carcinoma renal
2.	54/F	Carcinoma renal
3.	48/M	Carcinoma renal
4.	53/M	Carcinoma renal
5.	43/F	Carcinoma renal
6.	48/F	Carcinoma cervical
7.	56/F	Carcinoma cervical
8.	52/M	Carcinoma bronquiogênico
9.	56/M	Carcinoma bromquiogênico
10.	59/F	Carcinoma bronquiogênico
11.	54/M	Carcinoma bronquiogênico
12.	51/M	Carcinoma bronquiogênico
13.	48/M	Carcinoma de colon
14.	52/M	Carcinoma de colon
15.	53/F	Carcinoma de colon
16.	49/F	Carcinoma de bexiga
17.	33/F	Carcinoma da mama
18.	41/F	Carcinoma da mama
19.	43/F	Carcinoma da mama

2.3. PREPARAÇÃO PADRÃO DE IL-2

Preparações brutas de IL-2 foram usadas como padrão nos ensaios de IL-2 e também para manutenção de linhagem de CTLL. Estas preparações de IL-2 foram feitas conforme descrito por Gillis et al., (1978), a partir de células esplênicas de rato estimuladas com 20ug/ml de Concanavalina A "Con-A", mantidas em meio de RPMI contendo 10% FCS, e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

As células estimuladas foram centrifugadas a 400xG durante 15 minutos e os sobrenadantes filtrados em membranas de 0,22 µm (milipore), sendo então guardados a 4°C. A estimulação máxima da CTLL foi obtida com essas preparações de IL-2 em diluições de 1:4 a 1:16.

2.4 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IL-1

As células mononucleares foram preparadas por centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll/Hypaque a partir de alíquotas de 50 ml de sangue heparinizado e de acordo com instruções de Boyum (1968). As células foram contadas nas amostras antes e após sua centrifugação.

As células aderentes foram preparadas através de incubação de quantias de 4×10^6 /ml de células mononucleares periféricas (PBM), anteriormente isoladas, suspensas em meio completo de RPMI

contendo 20% FCS, em placas de plástico de 96 pocinhos de fundo chato, a 37°C durante 1 hora.

As células não aderentes foram então removidas e as células aderentes foram lavadas cinco vezes com meio de cultura pré-aquecido. Nessa etapa mais que 90% das células aderidas demonstraram fagocitose de partículas de látex.

As células aderentes, assim preparadas, foram incubadas em solução de acetato de forbol miristato numa concentração de 10 ng/ml e 1 ng/ml, em meio de RPMI contendo 5% FCS, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 e 48 horas. Após este intervalo de tempo, o sobrenadante foi coletado e as células foram resuspensas e então contadas.

A IL-1 foi determinada nos sobrenadantes através de ensaio em duas etapas conforme descrito por Gillis e Mizel (1981).

A primeira etapa consistiu da incubação das amostras do sobrenadante das células aderentes junto com células LBRM-33-1A5, células de linfoma murino tipo-T, em placas de 96 pocinhos. Em respostas a IL-1, esta linhagem de células produz IL-2 em meio contendo também fitohemaglutinina (PHA). Deste modo, misturas de 90 µl de meio de cultura, contendo 10⁵ células de LBRM-33-1A5, 90 µl de sobrenadante das células aderentes e 20 µl de PHA numa diluição de 1:10, em cada pocinho de placas de cultura, foram incubadas a 37°C durante 24 horas e os sobrenadantes coletados.

Em segunda etapa deste ensaio, estes sobrenadantes foram submetidos a ensaio biológico da IL-2 com células CTLL conforme descrito no próximo item (2.5). A quantidade de IL-1 na amostra dos sobrenadantes das células aderentes foi expressa como U/ml ou corrigida para $U/10^5$ células aderentes estimuladas, utilizando curva padrão preparada para este fim. Este cálculo foi feito porquanto a suspensão de células provenientes dos pacientes contenha mais monócitos do que nas células provenientes de indivíduos controles normais, o que resultaria relativamente em maior número de células aderentes nos pocinhos das placas de cultura.

2.5.PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IL-2

Alíquotas de 2×10^6 PBM/ml preparadas conforme item 2.4, foram estimuladas com 2×10^5 /ml de células Daudi alogênicas ou com PHA numa concentração final de 1:100 e 1:1000 ou com ambas. As células foram acrescidas em volumes de 200 μ l de meio RPMI, contendo 5% de soro fetal bovino (FCS) em placas de cultura de células de 96 pocinhos. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 ou 48 horas. Os sobrenadantes foram coletados e examinados para quantificar a produção de IL-2, pelo método de Gillis et. al., (1978)

Resumidamente, cada amostra de sobrenadante foi distribuída em duas diluições em placas de 96 cavidades em volume de 100 μ l

/cavidade, usando meio RPMI. Em seguida, foram adicionadas células CTLL (4×10^3 /cavidade), em volumes de 100 μ l e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e irradiadas durante 4 horas com 0,5 μ Ci de [H³]-timidina com atividade específica de 30 Ci/mMol. As células foram coletadas sobre filtros de fibra de vidro (Titertek, Flow Laboratories), e a contagem realizada em Contador beta (Beckman Liquid Scintillation Counter).

Em cada ensaio de IL-2 a incorporação de [H³] por células CTll em resposta a adição dos sobrenadantes de células mononucleares periféricas do sangue (PBM) foi comparada aos controles de uma resposta contra preparação de IL-2, utilizando análise de probitos. Kopersztych et al., 1976)

Os resultados foram expressos em unidade de IL-2/ml (U/ml). Em ambas as determinações de IL-1 e IL-2, as células PBM de indivíduos normais foram usadas como controle para determinar a variabilidade intra-experimental. Tanto o PMA como o PHA por si só não induz resposta proliferativa das células CTLL.

2.6.REMOÇÃO DE MONÓCITOS DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO.

Os monócitos foram removidos pela sua aderência em placas de cultura de células em três estágios consecutivos. Aliquotas de 2 ml das células PBM (4×10^6 /cavidade) em meio RPMI contendo 20% FCS, foram incubadas numa placa

(Costar, 24 cavidades) a 37°C durante 1 hora. As células não aderentes foram removidas e em seguida incubadas em uma nova cavidade durante 45 minutos. Finalmente, as células não aderentes foram removidas e incubadas em uma nova cavidade durante 30 minutos. As células não aderentes foram removidas, lavadas, e contadas para serem usadas em diferentes ensaios. Essas células demonstraram apenas 1% de monócitos fagocíticos de partículas de látex.

2.7. ANÁLISE DOS MARCADORES CELULARES COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Com este objetivo foram usados reagentes de (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ) OKT3: anticorpo monoclonal que reconhece linfócitos T maduros em células PBM; OKT4: anticorpo monoclonal que reconhece sub-população de linfócitos T auxiliares/indutores e OKT8: anticorpo monoclonal que reconhece a sub-população de linfócitos citotóxicos/supressores.

Alíquotas de 5×10^5 - 5×10^6 células PBM, foram incubadas junto com 20 µl de anticorpo monoclonal diluído 1:10, a 4°C durante 30 minutos. Após 3 lavagens as células foram misturadas com imunoglobulinas de cabra anti-Ig de camundongo marcada com isotiocianato de fluoresceína (Cappel Laboratories), a 4°C durante 30 minutos, lavado 6 vezes e analisados em microscópio de fluoresceína.

2.8.INDUÇÃO DE RECEPTOR DE IL-2 E ABSORÇÃO DA IL-2.

Alíquotas de 10^6 linfócitos/ml foram estimulados com PHA numa diluição final de 1:100 durante 24 horas a 37°C . Após 2 lavagens, as células foram fixadas com 0,25% de glutaraldeído e lavadas exaustivamente.

Um mililitro de IL-2 contendo 10 U/ml (IL-2 purificada de células da linhagem Jurkat), foi incubada durante 4h. a 4°C com 10^7 linfócitos recém colhidos ou anteriormente estimulados agitando a mistura ocasionalmente.

Terminada a incubação, as células foram removidas por centrifugação e a IL-2 foi determinada no sobrenadante pelo método de células CTLL, conforme descrito anteriormente.

3. R E S U L T A D O S

3.1. PRODUÇÃO DE IL-1 POR MONÓCITOS DE PACIENTES E INDIVÍDUOS NORMAIS.

Com objetivo de medir a concentração de IL-1 produzida por células aderentes de PBM dos pacientes com câncer ou de indivíduos normais, estas células foram estimuladas em cultura com 10 ng/ml ou 1 ng/ml de PMA, durante 24 ou 48 horas conforme descrito em material e métodos. Em seguida o sobrenadante foi coletado e submetido a técnica de dosagem de IL-1.

Em titulações preliminares de IL-1 foi verificado que o uso de concentrações de 50 a 100 ng/ml de PMA para estimular as células, resultaria em inibição na produção de interleucina-1, tanto em células de pacientes com câncer quanto em células de indivíduos normais.

Do mesmo modo, houve diminuição na produção de IL-1 quando a concentração de 0,1 ng/ml de PMA foi utilizada para estimular as células aderentes. Portanto, as concentrações de 1 ng/ml e 10 ng/ml de PMA foram utilizadas pela produção de resultados ótimos e constantes, tanto em células de pacientes como em células de doadores normais. De qualquer modo, seja que for a concentração usada de PMA, a produção de células aderentes de pacientes era de 2 a 10 vezes menos do que em indivíduos normais.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 2 e na Figura 1. Esses resultados indicam a baixa

atividade de IL-1 em pacientes com câncer quando comparadas com valores obtidos em indivíduos normais. Pela análise dos resultados, foi observado que após 24 horas de estimulação das células, os monócitos de todos os indivíduos de ambos os grupos, pacientes e normais, mostraram produção de IL-1. Decorridos 48 horas de estimulação das células, foi também verificado que os monócitos de apenas 50% dos pacientes mostraram produção detectável de IL-1 enquanto células de 90% de indivíduos normais produzem IL-1.

Os valores apresentados na tabela 2 demonstraram que os níveis de IL-1, produzidos por monócitos de pacientes com câncer, foram significativamente menores que os produzidos com controles saudáveis ($P=0,01$) nos dois intervalos de estimulação estudados (24 e 48 horas) e nas duas concentrações de PMA usadas (1 e 10 ng). Essas diferenças foram mais pronunciadas quando os valores de IL-1 produzidos eram expressos como unidades/ 10^5 células aderentes do que unidades/ml

Tabela. 2 - PRODUÇÃO DE IL-1 POR MONÓCITOS DE PACIENTES E INDIVÍDUOS NORMAIS ESTIMULADOS COM PMA.

Valores apresentados como média da concentração de IL-1/indivíduo.

* $P < 0,01$; AD: Células aderentes ; ND: não determinado.

Concen- tração de PMA (ng/ml)	IL-1 (Unida des)	24 h		48 h	
		Normais (N = 8)	Pacientes (N = 12)	Normais (N = 7)	Pacientes (N = 10)
0	U/ml	11,2±4,7	11,3±3,9	ND	ND
	U/10 ⁵ AD	10,8±4,5	4,1±1,7	ND	ND
1	U/ml	29,2±7,5*	10,3±4,1	11,5±3,1*	4,1±1,9
	U/10 ⁵ AD	29,2±8,2*	4,1±1,7	11,7±3,5*	2,2±0,8
10	U/ml	48,5±12,2*	24,3±5,2	22,8±6,1*	7,9±3,1
	U/10 ⁵ AD	45,7±11,5*	11,9±2,5	22,2±5,9*	3,0±1,5

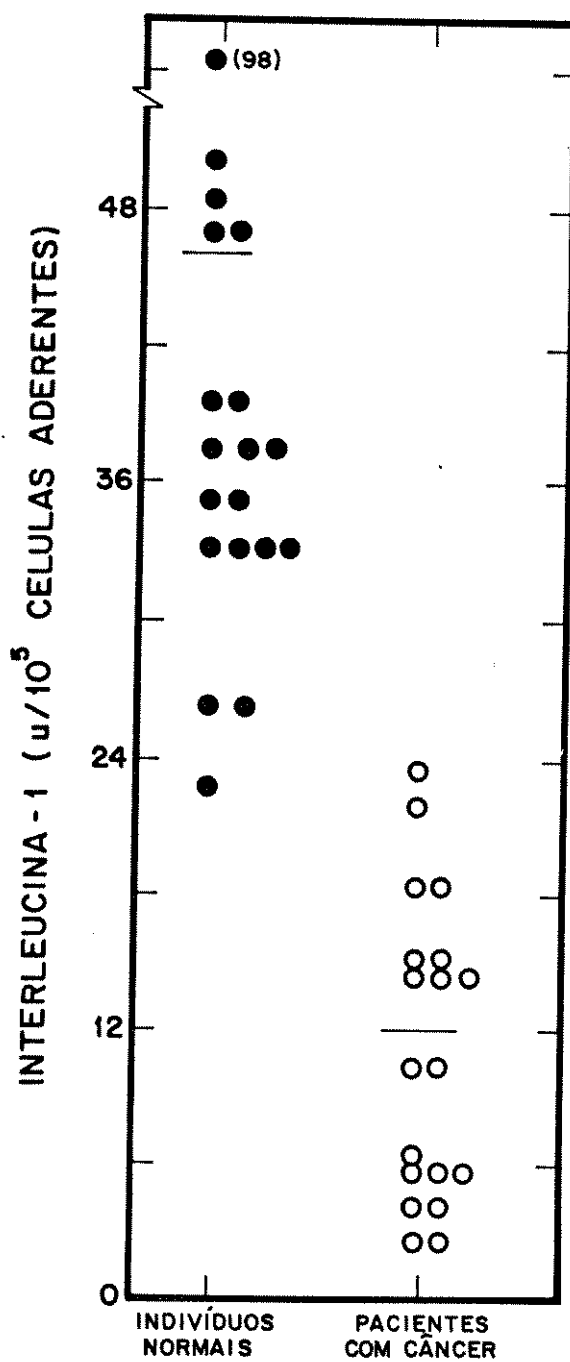


Figura 1 - Produção de IL-1 "in vitro" com PBM de pacientes com câncer e de indivíduos normais. As células foram estimuladas com 10 ng/ml de PMA durante 24 horas.

3.2.PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES DE PACIENTES E INDIVÍDUOS NORMAIS

Com objetivo de determinar a concentração de IL-2 produzida por células mononucleares do sangue periférico (PBM) de pacientes ou de indivíduos normais, estas células foram estimuladas, em culturas, com apenas células Daudi alogênicas, com células Daudi junto com PHA, ou com apenas PHA. A concentração de IL-2 produzida no sobrenadante das culturas foi determinada pelo uso da linhagem CTLL, dependente de IL-2, conforme indicado em material e métodos.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2 e Tabela 3. A análise dos resultados permite observar a baixa produção de IL-2 por PBM de pacientes, quando comparadas com indivíduos saudáveis, independentemente das combinações de estimulantes usados.

Podemos também observar que os níveis individuais de IL-2 apresentados na Figura 2 evidenciaram do mesmo modo a baixa produção de IL-2 em pacientes com câncer avançado quando comparados com indivíduos normais.

Tabela 3 - PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBM) DE PACIENTES E DE INDIVÍDUOS NORMAIS

Valores apresentados como média da concentração de IL-2/indivíduo

* $P < 0,01$

Estímulo	24 hs		48 hs	
	Normais (N = 12)	Pacientes (N = 12)	Normais (N = 7)	Pacientes (N = 7)
Nenhum	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$
Cél.alogênicas	$9,1 \pm 4,8^*$	$4,3 \pm 2,1$	$3,1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,5$
PHA 0,1%	$11,5 \pm 4,9^*$	$4,2 \pm 2,6$	$7,1 \pm 1,1$	$1,7 \pm 0,9$
PHA 1%	$26,4 \pm 9,2^*$	$9,2 \pm 3,0$	$16,2 \pm 2,8$	$3,2 \pm 1,6$
Cél.alogênicas +				
PHA 0,1%	$33,6 \pm 9,0^*$	$15,1 \pm 1,9$	$7,8 \pm 1,7^*$	$3,0 \pm 1,6$
Cél.alogênicas +				
PHA 1%	$58,3 \pm 5,4^*$	$23,4 \pm 3,2$	$42,3 \pm 7,5^*$	$10,2 \pm 3,2$

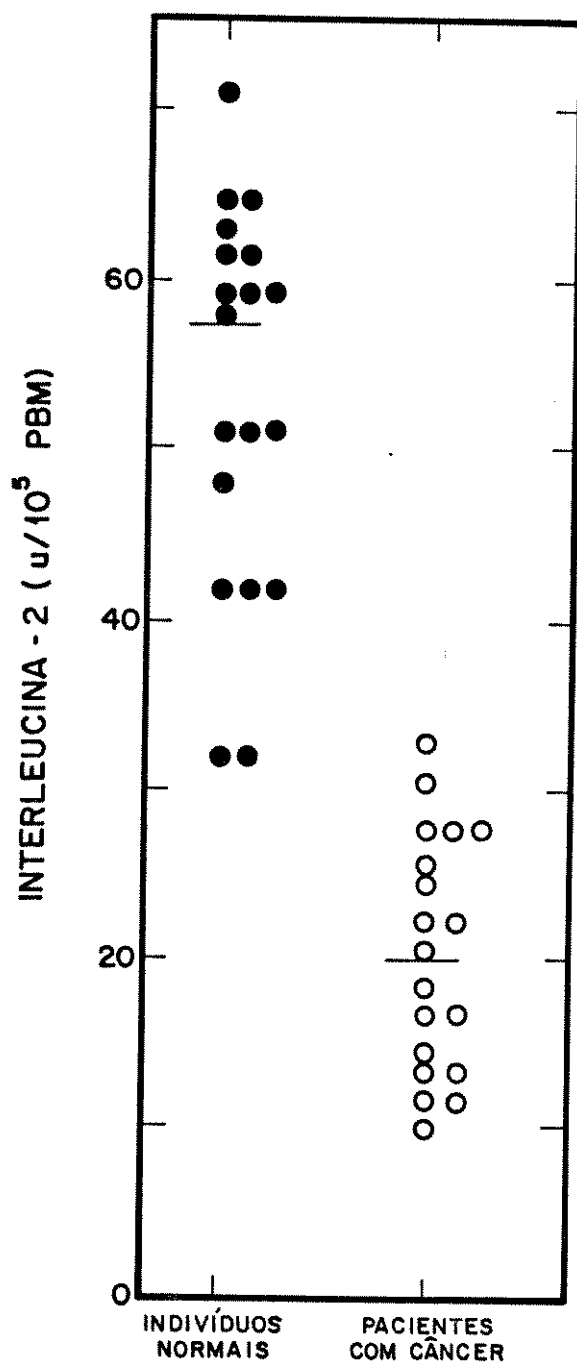


Figura 2 - Produção de IL-2 "in vitro" por células PBM de pacientes e indivíduos normais. As células foram estimuladas com células Daudi junto com PHA a 1% durante 24 horas.

A diminuição da produção de IL-2 com PBM de pacientes não poderia ser atribuída a um atraso no início da sua síntese, porquanto as diferenças de seus níveis entre pacientes e controles não tem sido alteradas pela modificação de tempo de estimulação das células em cultura (Tabela.3). Por exemplo, a concentração de IL-2 após 24 horas de estimulação das células era de 15,1 U/ml em pacientes e de 33,6 U/ml em indivíduos controles e, após 48 horas, era de 3,0 U/ml em pacientes e 7,8 U/ml em controles. Entretanto, a pré-incubação das células PBM com o estimulante durante 1 hora ou 18 horas não alterou as diferenças de produção de IL-2 entre pacientes e indivíduos controles.

3.3. ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T

Em alguns experimentos, números equivalentes de linfócitos T de pacientes e controles foram preparados através de formação de rosetas (E-rosetting) e estimuladas como descrito anteriormente. A produção de IL-2 por células de pacientes era muito suprimida, com 3,1 U/ml comparada com 10,5 U/ml em células de indivíduos normais.

O baixo nível de IL-2 produzido por células de pacientes com câncer observado neste trabalho poderia ser explicado pela diminuição de número de linfócitos T produtores de IL-2. Os estudos de Wagner e Rollinghoff (1978) em camundongos indicaram que a célula produtora de IL-2 possui o

fenótipo de T auxiliadora (Th). No homem, células T (OKT4+) produzem um fator mitogênico semelhante (Palacios e Moller, 1981a). A análise das subpopulações de células T em pacientes com câncer aqui estudados revela proporções diminuídas de células OKT4+, pelo menos em dois terços dos pacientes estudados, conforme demonstrado pela relação Th/Ts (Tabela 4). Esta observação por si só não explica a baixa atividade de IL-2, porquanto pacientes que exibem números normais de células OKT4+ também tem demonstrado baixa atividade de IL-2.

Tabela 4 - PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS PBM DE PACIENTES COM T
AUXILIARES DIMINUÍDAS OU NORMAIS

Valores apresentados como média/indivíduo

Doadores	Relação de	IL-2 (U/ml)	
	Células		
	OKT4/OKT8	Média	Limites
	Média $\pm$ DP		
Pacientes com	(Diminuída)	22,8	12-38
câncer (N= 10)	(< 1,6)		
Pacientes com	Normal	21,6	17-23
câncer (N= 5)	(1,6 $\pm$ 2,8)		
Controles normais	(1,7 $\pm$ 2,5)	60,1	43-69
(N= 8)			

3.4.EFEITO DE IL-1 SOBRE PRODUÇÃO DE IL-2

A IL-1 é um fator amplificador importante em eventos que levam à proliferação dependente de IL-2. A produção deficiente de IL-2 em pacientes com câncer poderia causar a baixa atividade de IL-2. Com objetivo de verificar o efeito de IL-1 sobre produção de IL-2, as culturas anteriormente preparadas de células PBM receberam IL-1 humana purificada e depois da incubação, a IL-2 foi determinada conforme descrito em material e métodos.

Os resultados obtidos e apresentados na tabela 5 indicaram que a IL-1 adicionada às células de pacientes aumentou ligeiramente a produção de IL-2 apenas em 2 dos 6 doadores testados. Em dois desses pacientes a IL-1 aumentou a IL-2 a níveis semelhantes aos observados em controles que demonstraram a mais baixa produção de IL-2 normalmente. Entretanto, a IL-1 ampliou a produção de IL-2 em 2 entre 3 indivíduos normais conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - EFEITO DA IL-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS PBM DE PACIENTES COM CÂNCER E DE INDIVÍDUOS NORMAIS. A IL-1 humana purificada foi adicionada nas culturas numa concentração de 10 U/ml; células PBM foram co-cultivadas com células (Daudi) alogênicas e PHA durante 24 horas; cada valor apresentado indica resultados em doadores diferentes.

IL-2(U/ml)				
Experimento Número	Indivíduos normais		Pacientes com câncer	
	-IL-1	+IL-1	-IL-1	+IL-1
1	62,5	457,4	33,2	71,5
			17,3	17,3
			15,2	18,4
2	59,8	81,3	19,5	19,5
			11,1	8,4
3	102,4	211,6	12,5	12,5

3.5. EFEITO DOS RECEPTORES DE IL-2 SOBRE SUA PRODUÇÃO

Teoricamente, a atividade de IL-2 encontrada nesses estudos, nos sobrenadantes das culturas de PBM, representa a diferença entre a quantidade produzida pelas células respondedoras ao estímulo e a quantidade removida pelas células que desenvolvem receptores para IL-2.

Com objetivo de pesquisar a possibilidade da baixa atividade de IL-2 em pacientes com câncer ter sido ocorrida pela remoção acelerada de IL-2 e não da sua baixa produção, experimentos de absorção de IL-2 foram realizados. Células PBM dos pacientes com produção diminuída de IL-2 e de controles foram ativadas com PHA em culturas. Alíquotas conhecidas de IL-2 purificada foram adicionadas nessas culturas. Após um período apropriado da incubação a IL-2 não absorvida foi determinada, conforme descrito em material e métodos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6. Pode ser verificado que as células dos pacientes ativadas com PHA não absorveram IL-2 mais que células controles. Ao contrário, o oposto têm sido ocorrido. Estes resultados indicam que a atividade reduzida de IL-2 nos sobrenadantes de células dos pacientes é causada pela sua baixa produção.

Tabela. 6 - COMPARAÇÃO DE RECEPTORES PARA IL-2 EM LINFÓCITOS ATIVADOS COM PHA EM PACIENTES COM CÂNCER E DOADORES NORMAIS

Linfócitos recém-colhidos de pacientes com câncer e de doadores não absorvem IL-2; linfócitos quando tratados com PHA, no final da sua ativação também não absorvem IL-2; no experimento 2, foram realizados duas absorções em série sendo usadas células PBM provenientes de dois pacientes.

Alteração no percentual de IL-2 adicionada		
Experimento	Absorção com lin-	Absorção com linfó-
Número	fócitos normais.	citos de pacientes.
1	-73	+15
2	-67	-20
		-49

3.6 - PRODUÇÃO DE IL-2 POR PBM DEPLETADAS DE MONÓCITOS

Com o objetivo de pesquisar a possibilidade da baixa atividade de IL-2 em pacientes com câncer ter sido ocorrida pela presença de células supressoras aderentes ativas, a produção de IL-2 com PBM depletadas de monócitos foi determinada. As células aderentes foram removidas das suspensões de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes (PBM) ou de indivíduos normais através de três passagens consecutivas em placas de plástico antes do estímulo usado para produzir IL-2. Células PBM e células PBM depletadas de monócitos foram co-cultivadas com células alogênicas junto com PHA, durante 24 horas. Os sobrenadantes dessas culturas foram submetidos a teste de IL-2 conforme indicado em material e métodos.

Resultados de três experimentos estão apresentados na tabela 7. Pode ser observado que a remoção das células aderentes de PBM dos pacientes causou em torno de 39% de acréscimo na atividade de IL-2 produzida. Entretanto, este mesmo procedimento dobrou praticamente a produção de IL-2 por células de indivíduos normais. Em uma outra série de experimentos (Resultados não demonstrados), o adicionamento de 1 mg/ml de indometacina às células PBM dos pacientes não poderia restaurar a produção de IL-2 aos níveis observados em indivíduos controles. Portanto, a deficiência observada na produção de IL-2 em pacientes com câncer não pode ser atribuída exclusivamente a células supressoras aderentes.

Tabela- 7 PRODUÇÃO DE IL-2 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBM), DEPLETADAS DE MONÓCITOS.

As células PBM, foram estimuladas com células alogênicas junto com PHA (1:100) durante 24 horas

IL-2 (U/ml)				
Experimento	Controles normais		Pacientes com câncer	
	Número	PBM depletadas de monócitos	PBM depletadas de monócitos	PBM depletadas de monócitos
1	76,2	129,8	9,2	12,9
2	29,3	45,4	25,8	33,4
3	45,3	129,5	37,6	55,8
Média	50,2	101,5	24,2	34,0

4. D I S C U S S Ã O

O presente estudo demonstra a determinação quantitativa das interleucinas 1 e 2 (IL-1) e (IL-2) produzidas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com câncer avançado. O que tornou essa investigação possível foi a disponibilidade das linhagens celulares murinas de linfoma T (LBRM-33-1A-5) e linfócitos T citotóxicos (CTLL). A atividade das interleucinas 1 e 2 ao que nos consta não foi, até o presente, quantificada em pacientes com câncer. Os resultados obtidos indicam acentuada deficiência de IL-1 e IL-2 nos pacientes estudados quando comparados com indivíduos normais

A interleucina 1 (IL-1) é normalmente produzida por macrófagos ativados, mas no presente estudo foi produzida por monócitos do sangue periférico estimulados com acetato de forbol miristato (PMA). A fração das células aderentes que secreta de fato a IL-1 não está bem conhecida. A baixa atividade desta interleucina em células de pacientes com câncer poderia ter sido causada por um defeito intrínseco a nível da interação com o agente estimulador. A baixa atividade de IL-1 poderia ser causada também com certas células aderentes ou fatores por elas produzidos que inibem as células produtoras desta monocina. Os mecanismos responsáveis pela produção anormal de IL-1 pelos monócitos obtidos de pacientes com câncer permanecem ainda desconhecidos. Uma das possibilidades poderia ser a redução em número de monócitos de sub-população produtora de IL-1. Whisler et al., (1981) demonstraram que as sub-

populações de monócitos humanos, reconhecidos por seus marcadores, diferem entre si em suas habilidades funcionais, tanto como células acessórias quanto como células produtoras de IL-1. Por exemplo, as sub-populações enriquecidas com receptores para o complemento funcionam efetivamente como células acessórias em manutenção do crescimento das células e produção de IL-1, enquanto as sub-populações destituídas de receptores para o complemento são 4 a 6 vezes menos efetivas para essas funções. Por outro lado Fischer et al., (1981) e Santos et al., (1985) tem demonstrado que as sub-populações de monócitos portadoras de receptores para o complemento se encontram em números bastantes diminuídos no sangue periférico de pacientes com câncer avançado. Assim sendo parece que a deficiência de IL-2 poderia ser atribuída a vários mecanismos e não apenas um.

Semelhantemente, não poderíamos atribuir a único mecanismo a deficiência da produção de IL-2. A produção de IL-2 é geralmente induzida através de estimulação das células com fitohemaglutinina (PHA) ou com células alogênicas (Ruscetti e Gallo, 1981). Estes dois estimuladores, cada uma por si ou combinados, foram incapazes de produzir uma resposta apropriada nas células PBM dos pacientes. A interleucina -1 é considerada como um segundo sinal na ativação e amplificação da produção de IL-2. Assim sendo, em vista da baixa produção de IL-1 encontrada em pacientes com câncer, pode ocorrer também produção diminuída de IL-2. Embora a IL-1 purificada poderia elevar o nível de produção de IL-2 em alguns pacientes (Tabela 5) em outros pacientes os defeitos encontrados não poderiam ser corrigidos.

Portanto, outros mecanismos devem ser envolvidos.

Algumas das possíveis explicações da diminuição de produção de IL-2, encontrada em pacientes com câncer, poderiam ser resumidas como segue:

- 1) a ausência relativa de células competentes no sangue, causada pela falta de amadurecimento ou de migração acelerada das células produtoras de IL-2 para órgãos linfóides periféricos.
- 2) a incapacidade dos linfócitos em desenvolver receptores para IL-1 em resposta ao estímulo.
- 3) a incapacidade dos linfócitos em responder a IL-1 após sua ligação nos receptores.
- 4) inibição das células produtoras de IL-2 através de células supressoras (Ts) ou fatores inibitórios.

Sabe-se que em camundongos a célula T auxiliadora (Th:LYt+) são produtoras de IL-2 (Wagner and Rollingshoff, 1978) e em humanos as células auxiliaadoras (Th:OKT4+) são produtoras de linfocinas (Palacios and Moeller, 1981a).

Por outro lado, temos observado no presente trabalho que 50% aproximadamente dos pacientes demonstraram diminuição relativadas células OKT4+ conforme encontrada nas baixas relação das células OKT4+:OKT8+ (relação Th/Ts).

Ademais, pacientes com a relação Th/Ts normal tem demonstrado também produção diminuída de IL-2. A falta de correlação entre a proporcionalidade Th/Ts e a produção de IL-2 em pacientes com câncer esta de acordo com dados que indicam que ambos os linfócitos T4 e T8 são provavelmente produtores de IL-2 (Luger

et. al.,1982).

A possibilidade da existência de células supressoras ativas em pacientes com câncer, que poderiam diminuir a produção de IL-2 nestes pacientes, deve ser analisada. Algumas evidências de que prostaglandinas podem inibir a produção de IL-2 foram relatadas (Rappaport e Dodge, 1982). Entretanto, tem sido demonstrado que os pacientes com câncer possuem monócitos circulantes produtores de quantidades elevadas de prostaglandinas junto com as células supressoras que produzem também prostaglandinas (Godwin et. al.,1977a,b, Santos et.al. 1985). Embora tenha sido relatado que a eliminação de monócitos de células mononucleares de pacientes com câncer aumente sua atividade mitogênica (Santos et.al. 1985), nossos resultados indicam que os valores de IL-2 obtidos neste tipo de paciente não podem ser restauradas a níveis normais pela eliminação dos monócitos das células PBM ou mesmo pelo tratamento dessas células com indometacina.

A possibilidade que a diminuição de IL-2 em pacientes com câncer poderia ser causada pela sua absorção passiva com receptores desenvolvidos em demasia nos linfócitos (Palacios e Moller, 1981 b) e não simplesmente sua produção deficitária, foi também investigada. Nossos resultados, demonstraram que os linfócitos dos pacientes ativados ou não, não possuem capacidade de absorção de IL-2, conforme exposto na tabela 6.

As deficiências na produção de IL-1 e IL-2 descritas no presente estudo foram observadas em todos os pacientes. Essas deficiências, portanto, poderiam participar na patogênese das respostas imunes suprimidas, observadas nos pacientes com tumores progressivos.

Os estudos aqui presente visam de fato obter informações sobre os mecanismos de controle da produção de IL-1 e IL-2, o que permitiria o uso de abordagem terapêuticas específicas em casos de câncer caracterizados pela imunossupressão dos linfócitos T. Estudos recentes (Lopes-Botet et al., 1982; Paganelli et al., 1983; Flomenberg et al., 1983; Farnen et al., 1986; McMannis et al., 1988) tem demonstrado que a adição de IL-2 em culturas de linfócitos de pacientes, com deficiência nas respostas mediadas por células, poderia restaurar a resposta linfoproliferativa aos níveis normais. Os dados descritos por esses autores à semelhança dos resultados por nós obtidos sugerem que a deficiência na síntese de IL-2 nos pacientes com câncer podem ser superadas com o uso de IL-2 exógena em imunoterapia.

Nabholz e Macdonald (1983) evidenciaram que as células T citotóxicas necessitam IL-2 para se tornarem funcionalmente competentes em eliminação de células cancerosas. Este fato poderia nos levar a sugerir que, em determinadas condições, quantidades reduzidas dessas linfocinas poderiam resultar em falha da expansão clonal dos linfócitos T citotóxicos e um desequilíbrio na vigilância imunológica contra células cancerosas. Estudos ulteriores são necessários a fim de esclarecer esta questão.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

- 1 - As concentrações de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 2 (IL-2), produzidas nos sobrenadantes do sangue periférico dos pacientes com câncer avançado, foram determinadas afim de identificar as causas de imunossupressão característica da doença oncológica.
- 2 - As células mononucleares obtidas de 19 pacientes foram estimuladas em cultura para produzir IL-1 e IL-2 e comparadas com células de indivíduos normais. Uma queda acentuada na atividade de IL-1 e IL-2 foi observada nos pacientes com câncer.
- 3 - Os números de células T auxiliaadoras (Th:OKT4+) e T supressoras (Ts:OKT8+) foram determinados pelo uso de anticorpos monoclonais e o método de imunofluorescência indireta. Não houve correlação nenhuma entre o baixo número de células OKT4+ encontrado nos pacientes com câncer e os níveis de produção de IL-2.
- 4 - Os monócitos foram removidos das células estudadas (PBM) pela sua aderência em placas de plástico. A remoção dos monócitos deste modo não retornou os níveis de IL-2 ao seu teor normal. Entretanto, a adição de IL-1 exógena às culturas de PBM não restaurou a produção normal de IL-2.
- 5 - Os resultados aqui apresentados sugerem que IL-1 e IL-2 exógena poderiam ser usadas na imunoterapia de câncer.

9. R E F E R Ê N C I A S

B I B L I O G R A F I C A S

- AARDEN,L.A.; BRUNNER,K.T.; & CEROTTINI,J.C. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factor. *The Journal of Immunology*, 123:2928-2929, 1979
- AL-SARRAF,M.; SARDESI,S. & VALTKEVICIUS. Clinical immunologic in malignant disease: II. In vitro lymphocyte response to phyto hemagglutinin and the effect of cytotoxic drugs. *Oncology*, 26:2657-358, 1972
- AZUMA,C.; TANABE,T.; KONISHI,M.; KINASHI,T.; NOMA,T.; MATSUDA,F.; YADITA,Y.; TAKATSU,F.; HAMMERSTRON,L.; SMITH,C.; SEVERINSON,E. & HONJO,T. Cloning of cDNA for human Tcell replacing fator (Interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Research*, 14:9149, 1986
- BASTEN,A.; & BEESON,P.B.; Mechanism of eosinophilia. II Role of the lymphocyte. *The Journal of Experimental Medicine*, 131: 1288-1305, 1970
- BAZILL,G.W.; GARLAND J,H.M.; & DEXTER,T.M. Characterization and partial purification of a haemapoietic cell growth factor in WEHI-3 cell conditioned medium. *Biochemical Journal*, 210:747-759, 1983

- BEUSCHER,H,U.; NICKELLS,W.M. & COLTEN,R.H. The precursor of Interleukin-1 alfa Is Phosphorylated at Residue Serine 90. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:4023-4028, 1988
- BEVILACQUA,M.P. POHER,J.S.; MAJEAN,G.R.; COTRAN,R.S.& GIMBRONE, M.A. Interleukin-1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of proagulant activity in human vascular endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 160: 618-623 (1984).
- BILLIAU,A. Interferon beta₂ as a promoter of growth and differentiation of B cells. *Immunology Today*, 3:84-86, 1987
- BONNARD,G.D.; YASAKA,K. & JACOBEN,D. Ligand activated T cell growth factor-induced proliferation: absorption of T cell growth by activated T cells. *The Journal of Immunology*, 123: 2704, 1979.
- BOYUM,A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical Investigation*, 21 (Suppl 97):7, 1968
- BYERS,N.;SCHUBER,A.B.; ALLINSON,A.C.; & MODABER,F. Interleukin-1 containing media stimulate the proliferation of capillary endothelial cells. *Federation Proceedings*, 43:462, 1984

CANTRELL,A.D. & KENDALL,A.S. Transient expression of interleukin 2 receptors.Consequences for T cell growth. *The Experimental Journal of Medicine*, 158: 1985-1911, 1983

CARDING,R.S. & BOTTOMLY,K. IL-4 (B-cell stimulatory factor 1) exhibits thymocyte growth factor activity in the presence of IL-2. *The Journal of Immunology*. 140:1519-1526, 1988

CASTELLI,M.P.; BLACK,L.P.; SCHNEIDER,M.; PENNYNGTON,R.; ABE,F & TALMADGE,J.E. Protective, Restorative, and therapeutic properties of recombinant human IL-1 in rodent models. *The Journal of Immunology*, 140:3830-3837, 1988

CATALONA,W.J.; CHRETIEN,P.D. & Trahan E.E. Abnormalities of cell-mediated immunocompetence in genitourinary cancer. *Journal of Urology*, 111:229, 1974.

CERNY,J. Stimulation of bone-marrow haemopoietic stem cells by a factor from activated cells. *Nature*, 249:63-65,.1977

CEUPPENS,J.L.; BLOENNEN,F.J. & VAN WAUVE,J.P. T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT₃ antibody results from a deficiency of monocyte Fc gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the t3-Ti complex. *The Journal of Immunology*, 135:3882-3886, 1985

COMBE,B.; POPE,R.M.; FISCHBACK,M.; DARNELL,B.; S,BARON,S. & Talal. Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production of and response to interleukin-2 in reumathoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clinical and Experimental Immunology*, 59: 520-528, 1985

CORNABY,M.A.S.; VANN RICE,R.; DEMPSEY,R.A.; MADRAS,P.N. & MONACO,A.P. Interleukin-2 Production in Plasma and Urine, Plasma Interleukin-2 Receptor Levels, and Urine Cytology as a Means of Monitoring Renal Allograft Recipients. *Transplantation Proceedings Suppl.* 1:108-110, 1988

COTNER,T.; WILLIAM,J.M.; CHRISTENSON,L.; SHAPIRO,H.M.; STROM, T.B. & STROMINGERS,K. Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *The Jornal of Experimental Medicine*, 157:461-472 1983

COUTINHO,A.; LARSSON,E.L.; GROMICK,K.O. & ANDERSSON,J. Studies on T-lymphocytes activation. II. The target cell for concanavalin-A induced growth factors. *European Journal of Immunology*, 9: 587, 1979

DEMPSEY,A.R.; DINARELLO,C.A.; MIER,J.W.; ROSENWASSER,L.J.; ALLEGRETTA,M.; BROWN,T.E.; & PARKINSON,D.R. The diferential effects of human leukocytic pyrogen/lymphocyte activating factor, T cell growth factor and interferon on human

natural killer activity. *The Journal of Immunology*, 129:2504-2510, 1982

DOWER, F.S.; & URDAL, L.D. The interleukin 1 receptor. *Immunology Today*, 2:46-51, 1987

DURUM, K.S.; SCHIMIDT, J.A. & OPPENHEIM, J.J. Interleukin I: an immunological perspective. *Annual Reviews of Immunology*, 3:263-287, 1985

ELHILALI, M.M.; BRITTON, S.; BRASSMAN, S & FAHEY, J.L. Critical evaluation of lymphocyte function in urological cancer patients. *Cancer Research*, 36:132-137, 1976

FAHEY, J.L. Critical evaluation of lymphocyte function in urological cancer patients. *Cancer research*, 36: 132-137, 1976

FARMER, J.L.; GOTTLIEB, A.A. & NISHIHARA, T. Inhibition of interleukin 2 production and expression of interleukin 2 receptor by plasma from acquired immune deficiency syndrome patients. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 38: 235-245, 1986

FARRAR, J.J.; WILLIAM, B.R.; HILFIKER, M.L.; HOWARD, M.; FARRAR, W.L. & FARRAR, J. The Biochemistry, Biology, and Role of Interleukin 2 in the Induction of Cytotoxic T cell and

Antibody-Forming B cell responses. *Immunological Reviews*, 3: 129-166, 1982

FIBBE, W.E.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, A.; GOVINK, H.M.; VOOGT, P.I.; EERDN, G.; RALPH, P.; ALTROCK, B.W. & FALKENBURG, J.H.F. Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulation factor and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 71: 430-435, 1988

FISHER, A; DURANDY, A & GRISELLI, C. Role of prostaglandin E₂ in induction of non-specific T lymphocyte suppressor activity. *The Journal of Immunology*, 126: 1452-1455, 1981

FLOMENBERG, N.; WELTE, K.; MERTELSMAN, R.; KERNAN, N.; CIOHANU, N.; VENUTA, S.; FELDMAN, S.; KRUGER, G.; KIRKPATRICK, D.; DUPONT, B & OREILLEY, R. Immunologic effects of interleukin 2 in primary immunodeficiency diseases. *The Journal of Immunology*, 130:2644-2650, 1981

FORD, W.H.; CASPARY, E.A & SHENTON, B. Purification and properties of a lymphocyte inhibition factor from human serum. *Clinical and experimental Immunology*, 15: 169-179, 1973

GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D.; LANDSCORP, P.; & BAUMAN, H. Interferon beta₂/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor

and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:7251-7255, 1987

GARMAN,R.D.; JACOBS,K.A.; CLARK,S.C.; RAULET,D.H. B-cell-stimulatory factors 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:7629-7633, 1987

GERY,I ; GERSHON,R.K. & WASKINIAN B.H. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. *The Journal of Experimental Medicine*, 136: 128-142, 1972

GILLIS,S. & KENDALL,A.S. Long term culture of tumour specific cytotoxic T cells. *Nature* 268:154-156, 1977.

GILLIS,S. & MIZEL,S.B. T cell lymphoma model for the analysis of interleucin-1 mediated T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78:1133-1137, 1981

GILLIS,S.; MUCHIZUKI,D.Y.; CONLON,P.J.; HEFENEIDER,S.H.; RAMTHUM,C.A.; GILLIS,A.E.; FRANK,M.B.; HENNEY,C.S.; & WATSON,J. D. Molecular characterization of interleukin 2. *Immunological Reviews* 63:167-209, 1982

GOODWIN, J.S.; BANKHURT, A.D. & MESSNER, R.P. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin producing suppressor cell. *The Journal of Experimental Medicine*, 146: 1719-1743 (1977a)

GOODWIN, J.S.; MESSNER, R.P.; PEAKE, G.T.; SAIKI, J.H. & WILLIAM JR, R.C. Prostaglandin producing suppressor cells in Hodgkins disease. *New England Journal of Medicine*, 297:963-968.

GOWEN, M.; WOOD, D.D.; IHRIE, E.J.; MCGUIRE, M.K.B. & RUSSEL, G.G. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*, 303: 378-380, 1983

GRABSTEIN, K.; EISENMAN, J.; MOCHIZUKI, D.; SHANEDECK, K.; COULON, P.; HOPP, T.; MARCH, C. & GILLIS, S. Purification to homogeneity of B cells stimulatory factor. A molecule that stimulates proliferation of multiple lymphokine dependent cell lines. *Journal of Experimental Medicine*, 16: 1405-1414, 1986

GREENBAUM, A.L.; HOROWITZ, J.B.; WOODS, A.; PASQUALINI, T.; REICH, E.P. & ANTONINE, B.K. Growth of CD4+ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *The Journal of Immunology*, 140:1555-1560, 1988

GRIMM, A.E.; ROBB, R.J.; ROTH, J.A.; NECKERS, L.M.; LACHMAN, L.B.; WILSON, D.J. & ROSENBERG, S.A. Lymphokine-activated killer

cell phenomenon II. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 158:1356-1361, 1983

GRIMM, E.A.; RAMSEY, K.M.; MAZUNDER, A.; WILSON, D.J.; DJEN, J.Y. & ROSENBERG, S.A. Lymphokine-activated killer cell phenomenon II, Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes and natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 157:884, 1983

HAGIWARA, H.; HUANG, H.J.S.; ARAI, N.; HERZENBER, L.A.; ARAI, K.I. & ZLOTNIK, A. Interleukin 1 modulates messenger RNA levels of lymphokines and of molecules associated with T cell activated in the T cell lymphoma LBRM 33-1A5. *The Journal of Immunology*, 138:2514, 1987

HARADAN, N.; KIKUCHI, Y.; TOMINAGA, A.; TAKAKI, S.; & TAKATSU, K. BCGF-II activity on activated B cells of a purified murine T cell replacing factor (TRF) from a T cell hybridoma (B 15 K 12). *The Journal of Immunology*, 134: 3944, 1985

HARRIMAN, R.G.; KUNIMOTO, D.Y.; ELLIOT, J.F.; PAETKAU, V. & STROBER, W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 140: 3033-3039, 1988

HENNEY,C.S.; KURYBAYASHI,K.; KERN,D.E. & GILLIS,S. Interleukin-2 augment natural killer cell activity. *Nature* 291:335-338, 1985

HERMAN,J.; DINARELLO,C.A.; KEW,M.C. & ROBSON,A.R. The role of interleukin-1 (IL-1) in tumor-NK cell interactions: correction of defective NK cell activity in cancer patients by treating target cells with IL-1. *The Journal of Immunology*, 135:2882-2886, 1985

HEUFLER,C; KOCH,F.; SCHELER,G. Granulocyte/Macrophage colony= stimulated factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 167:700-705, 1988

HIRANO,T.;ET.AL. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324:73-76, 1986

HOWARD,M.; FARRAR,J.; HILFKER,M.; JOHNSON,B.; TAKATSU,K.; HAMAOKA,T. & PAUL,W.E. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *Journal of Experimental Medicine*, 15:914-923, 1982

HOWARD,M.; NAKANISHI,K. & PAUL,E.W. B cell growth and differentiation factors. *Immunological Reviews*, 78:185-210,

1984

HSU,C. & LONGERFO,P. Correlation between serum alpha- globulin and plasma inhibitory effect of PHA stimulated lymphocytes in colon cancer patients. *Proceedings of the Society of Experimental Biology Medicine*, 139: 575-578, 1972

HU-LI,J.; SHEVACH,E.M.; MIZUGUCHI,J.; OHARA,J.; MOSMAM,T. & PAUL,E.W. B cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocyte. *The Journal of Experimental Medicine*, 165:157-162, 1982

IKEBUCHI,K.; WONG,G.G.; CLARK,S.C.; IHLE,J.N.; HIRAI,Y. & OGAWA, M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:9035-9039, 1987

IHLE,J.N. Biochemical and biological properties of interleukin-3: a lymphokine mediating the differentiation of a lineage of cells that includes prothymocytes and mastlikes cells. *Contemporary Topics in Molecular Immunology*, 10:93-119, 1985

IHLE,J.N.; HENDERSON,K.L.; KLEIN,F. & PALASZYNSKI,E. Procedure for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *The Journal of Immunology*, 129:2431, 1982

- IHLE, J.N.; KELLER, J.; DROSZLAN, S.; HENDERSON, L.E.; COPELAND, T.D.; FICH, F.; PRYSTOWISKY, M.B.; GOLDWASSER, E.; SCHRADER, J.W.; PALASZYNSKY, E.; DI, M. & LEBEL, B. Biological properties of hemogenous interleukin-3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity. B cell stimulating factor activity, colony stimulin factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *The Journal of Immunology*, 131:282-287, 1983
- IHLE, N.J.; PEPERSACK, L; & REDAR, L.; Regulation of T cell differetiation: in vitro induction of 20 alfa-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *the Journal of Immunology*, 126:2184-2189, 1981
- JORDAN, G.W. Basic for the probit analysis of an interferon plaque reduction assay. *Journal of General Virology*, 14:49, 1972
- KIRKMANN, R.L.; BARRET, V.L.; GAULTON, G.N.; KELLEY, E.V.; YTHIEN, A.; & STROM, T.B.; Administration of an-anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody prolongs cardiac allograft survival in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 162:358-362, 1985

KAUSHANSKY,K.; LIN,N.; & ADANSOM,J.W.; Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize Granulocyte-Macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. *The Journal of Clinical Investigation*, 81:91-97, 1988

KAYE,W.A.; ADRI,M.N.S.; SOELDNER,J.S.; RABINOWE, S.L.;KALDANY,A.; KAHN,R.C.; BISTRIAN,B.; SKIKANTA,S.; & EISENBARTH,G.S.; Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type I diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 315:920-924, 1986

KOBAYASHI,Y; APELLA,E.; YAMADA,T.; COPELAND,T.D.; OPPENHEIM,J.J.; & MATSUSHIMA,K.; Phosphorylation of intracellular precursor of human IL-1. *The Journal of Immunology*, 140:2279-2287, 1988

KOIDE,LS.; INABA,KAYO.; & STEIMANN,R.M.; Interleukin 1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *The Journal of experimental Medicine*, 165:515-530, 1987

KOIKE,K.; IHLE,J.N & OGAWA,M. Declining sensitivity to interleukin 3 of murine multipotential haematopoietic progenitors during their development-application to a culture system that favors blast cell colony formation. *The Journal of clinical Investigation*, 77:894-899, 1986

KOPERSZTYCH,S.; REKKALLAH,M.T.; MIKI,S.S.; NASPITZ,C.K & MENDES,N.F. Cell-mediated immunity in patient with carcinoma. *Cancer*, 38:1149-1154, 1976

KUPPER,T.; HOROWITZ,M.; LEE,F.; ROBB,R & FLOOD,P.M. Autocrine growth of T cells independent of interleukin 2: identification of interleukin 4 (IL-4, BSF-1),as an autocrine growth factor for a cloned antigen-specific helper T cell. *The Journal of Immunology*, 138:4280-4287, 1987

KURT-JONES,E.A.; BELLER,D.I.; MIZEL,S.B. & UNANUE,E.R. Identification of a membrane-associated form of interleukin 1 in macrophages. *Proccedings of the National Academy of Sciences USA* 82:1204-1206, 1984

LE,J. & VILCEK,J. Biology of Disease. Tumor Necrosis Factor and interleukin-1:Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Laboratory Investigations*, 56:234-238, 1987

LEE,G.; NAMEN,A.E.; GILLIS,S.; ELLINGSWORTH,L.R. & KINCADE,P.W. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by trnsforming growth factor-beta. *The Journal of Immunology*, 142:3875-3883, 1989

LOPEZ-BOTET,M.; FONTAN,G.; RODRIGUES,M.C.G.; & De Landazuri, M.O. Relantionship between IL-2 synthesis and the

proliferative response to PHA in different primary immunodeficiencies. *The Journal of Immunology*, 128:679-683, 1982

LOWENTHAL, J.W.; CASTLE, B.E.; CHRISTIANSEN, J.; SCHEURS, Y.; REMICK, D.; ARAI, N.; HOY, P.; TOKEBE, Y. & HOWARD, M. Expression of a high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *The Journal of Immunology*, 140:456-464, 1988

LOWENTHAL, J.W.; CEROTTINI, J.C; & MACDONAL, R.H. Interleukin 1 dependent induction of both interleukin 2 secretion and interleukin 2 receptor expression by thimona cells. *The Journal of Immunology*, 137:1226-1231, 1986

LOWENTHAL, J.W.; RANSOM, J.; HOWARD, W. & ZLOTNIK, A. Up-regulation of interleukin 4 receptor expression on immature (Lyt-2⁻/L3T4⁻) thymocytes. *The Journal of Immunology*, 140:414-478, 1988

LUGER, T.A.; CHARON, J.A.; COLOT, M.; MICKSCKE, M. & OPPENHEIM, J.J. Chemotatic properties of partially purified human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor (ETAF) for polymorphonuclear and mononuclear cells. *The Journal of Immunology*, 131:816-, 1983

LUGER, T.A.; SMOLNES, J.S.; CHSED, T.M.; STEINBERG, A.D.; & OPPENHEIM, J.J. Human lymphocytes with either OKT4 and OKT8 phenotype produce interleukin 2 in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 70:470-473, 1982

LUGER, T.A.; WIRTH, U. & KOCH, A. Epidermal cells synthesize A cytokine with interleukin 3-like properties. *The Journal of Immunology*, 134:915-919, 1985

MATSUSHIMA, K.; BANO, M.; KIDWELL, W.R. & OPPENHEIM, J.J. Interleukin 1 increases collagen type IV production by murine mammary epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 134:1904-909, 1985

MATSUSHIMA, K.; TAGUCHI, M.; KOVACS, E.J.; YOUNG, H.A. & OPPENHEIM, J.J. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL-1) activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin. *The Journal of Immunology*, 136:2883-2891, 1986

MCKENZIE, D.T.; FILUTOWICZ, H.I.; SWAIN, L.S. & DUTTON, R.W. Purification and partial sequence analysis of murine B cell growth factor II (Interleukin 5). *The Journal of Immunology*, 139:2661-2668, 1987

MCMANNIS, J.D. In vivo effects of recombinant IL-2. Isolation of circulating Leu-19+ lymphokine-activated killer effector

cells from cancer patients receiving recombinant IL-2. The
Journal of Immunology, 140:1335-1340, 1980

MIZEL, S.B. Interleukin 1 and T cell activation. *Immunological
 Reviews* 63:51-72, 1982

METCALF, D.; PARKER, J.; CHESTER, H.M.; & KINCADE, P.M. Formation of
 Eosinophilic like granulocytic colonies by mouse bone marrow
 cells "in vivo" *The Journal of Cellular Physiology*,
 84:275-290, 1974

MEUER, S.C. & BUCHENFELDE, M.K.H. T cell receptor triggering
 induces responsiveness to interleukin 1 and interleukin 2
 but does not lead to cell proliferation. *The Journal of
 Immunology*, 136:4106, 1986

MEUER, S.C.; HUSSEY, R.E.; CANTRELL, D.A.; HODGDON, J.C.;
 SCHLOSSMAN, S.F.; SMITH, K.A. & REINHERZ, E.L. Triggering of
 the T_3 - T_1 antigen-receptor complex results in clonal T-cell
 proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine
 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences
 USA*, 81:1509-1513, 1984

MORGAN, D.A.; RUSCETTI, F.W. & GALLO, R. Selective "in vitro"
 growth of T lymphocytes from normal bone marrow. *Science*,
 193:1007-1008, 1976

MORRISSEY, P.J.; GOODWIN, R.G.; NORDAN, R.P.; ANDERSON, D.; GRABSTEIN, K.H.; COSMAN, D.; SIENS, J.; LIPTON, S.; ACRES, B.; REED, S.G.; MOCHIZUKI, D.; EISENMAN, J.; CONLON, P.Y. & NAMEN, A. E. Recombinant interleukin 7 pre-B cell growth factor, has coestimulatory activity on purified mature T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 169:707-716, 1989

MOSMAN, T.R.; BOND, M.W.; COFFMAN, R.L. OHARA, J. & PAUL, W.E. T cell and mast cell lines respond to B cell stimulatory factor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83:5654, 1986a

MULÉ, J.J.; YANG, J.; SHU, S & ROSENBERG, S.A. The anti-tumor efficacy of lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo: Direct correlation between reduction of established metastases and cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *The Journal of Immunology*, 136:3899-3908, 1986

MURAKAWA, Y.; TAKADA, S.; UEDA, Y.; SUZUKI, N.; HOSHIRO, T. & SAKANE, T. Characterization of T lymphocyte subpopulations responsible for deficient interleukin 2 activity in patients with systemic "Lupus eritematosus". *The Journal of Immunology*, 134:187-195, 1985

MURRAY, P.D.; MCKENZIE, D.T.; SWAIN, S.L. & KAGNOFF, M.F. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's Patch T

cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *The Journal of Immunology*, 139:2669-2674, 1987

NABHOLZ, M & MACDONALD, H.R. Cytolytic T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 1:273-321, 1983

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; KATOH, Y.; ONO, S.; MATSU, K.; HIROISHI, K.; NOMA, T.; HONJO, T.; TAKATSU, K.; HIGASHIRO, K. & HAMAOKA, T. Both B/51-T-cell replacing factor 1 and IL-5 regulate Ig secretion and IL-2 receptor expression on a cloned B lymphoma line. *The Journal of Immunology*, 140:1168-1174, 1988

NAKANISHI, K.; HASHIMOTO, K.; HIROISHI, K.; MATSU, T.; YOSHIMOTO, T.; MORSE, C.; FURUYAMA, J.; HAMAOKA, T.; HIGASHIRO, K. & PAUL, W. E. Demonstration of up-regulated IL-2 receptor expression on an "in vitro" cloned BCL, subline. *The Journal of Immunology*, 138:1817, 1987

NAMEN, L.S.; SCHMERER, A.E.; MARCH, C.J.; OVERREL, R.W.; PARK, L.S.; URDAL, D.L. & MOCHIZUKI, D.Y. B cell precursor growth promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *The Journal of Experimental Medicine*, 167:988-1002, 1988

NORDAN, R.; PUMPHREY, J & RUDIKOFF, S. Purification and NH2 terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived

from the murine macrophage cell line P388 D1. *The Journal of Immunology*, 139:813-817, 1987

OFOSU-APPIAH, W.A.; MCKENNA, R.M.; WARRINGTON, R.J. & WILKINS, J.A.
 Characterization of synovial T lymphocytes in rheumatoid arthritis I. Production of IL-2 dependent T cell clones from synovial fluid and peripheral blood. *Clinical and Experimental Immunology*, 64:555-562, 1986

OHARA, J. & PAUL, W.E. Receptors for B-cell stimulatory factor 1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature*, 325:537-540, 1987

OPPENHEIM, J.J.; KOVACS, E.J.; MATSUSHIMA, K. & DURUN, S.K. There is more than one interleukin 1. *Immunology Today*, 7:45-56, 1986

ORTALDO, J.R.; MASON, A.T.; GERARD, J.P.; HENDERSON, L.E.; FARRAR, W.; HOPKINS, R.F.; HERBERMANN, R.B. & Robin, H. Effects of natural and recombinant IL-2 on regulation of IFN gamma production and natural killer activity: lack activity of involvement of the TAC antigen for these immunoregulatory effects. *The Journal of Immunology*, 133:779-783, 1984

OTSUKA, T.; MIYAJIMA, A.; BROWN, N.; OTSU, K.; ABRAMS, J.; SAELAND, S.; CAUX, C.; MALEFIJT, R.W.; VRIES, J.; MAYERSON, P.; YOKOTA, K.; GAMEL, L. REMICK, D.; LEE, F.; ARAI, N.; ARAI, K. & YOKOTA, T.
 Isolation and characterization of an expressible cDNA

encoding Human IL-3. Induction of Il-3 mRNA in Human T cell clones. *The Journal of Immunology* 140:2288-2295, 1988

PAGANELLI,R.; AINTII,F., BEVERLY,P.C.L & LEVINSKY,R.J. Impaired production of interleukin in patients with cell-mediated immunodeficiencies. *Clinical and Experimental Immunology*, 51: 338-344, 1983

PALACIOS,R & MOLLER,G. HLA DR, antigen render T cells sensitive to interleukin 2 and induce production of the growth factor in autologous mixed lymphocyte reaction. *Cellular Immunology*, 63:143-153, 1981a

PALACIOS,R. & MOELLER,G. T cell growth factor abrogates concanavalin-A induced suppressor cell function. *The Journal of Experimental Medicine*, 153:1360-1365, 1981b

PALASZYNSKI,E.W. & IHLE,J.N. Evidence for specific receptors for interleukin 3 on lymphokine-dependent cell lines established from long term bone marrow cultures. *The Journal of Immunology*, 132:1872-1878, 1984

PAUL,W.E. & DHARA,J. B-cell stimulatory factor-1/Interleukin 4. *Annual Review of Immunology*, 5:429-59,1987

PARK,L.S.; FRIEND,D.; SASSENFELD,H.M. & URDAL,D.L. Characterization of the human B cell stimulatory factor 1

receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 166:476-488, 1987

PARK, L.S.; FRIEND, D.; GRABSTEIN, K. & URDAL, D.L. Characterization of the high-affinity cell-surface receptor for murine B-cell-stimulating factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:1669-1673, 1987

PEACE, J.D.; KERN, D.E.; SCHULTZ, K.R.; GREENBERG, P.D.; & CHEEVER, M.A. IL-4 induced Lymphokine-activated killer cells lytic activity is mediated by phenotypically distinct natural killer-like and T cell-like large Granular lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 140:3679-3685, 1988

PHADKE, K.; CARLSON, D.G.; GITTER, B.D.; & BUTLER, L.D. Role of interleukin 1 and interleukin 2 in rat and mouse arthritis models. *The Journal of Immunology*, 136:4005-4091, 1986

POSTLETHWAITE, A.E.; RAGHOW, R.; STRICKLIN, G.P.; POPPLETON, H.; SEYER, J.M.; & KANG, A.H. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: Increased steady-state accumulation of type I Procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha e beta. *The Journal of Cell Biology*, 106:311-318, 1988.

RAPPAPORT,S.& DODGE,G.R. Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 155:943-948, 1982

RASMUSSEN,R.; TAKATSU,R.; HARADA,N.; TAKAHASHI,TAKED.; BOTTOMLY, K. T cell-dependent hapten-specific and polyclonal B cell responses require release of interleukin 5. *The Journal of Immunology*, 140:705-712, 1988

RIFAS,L.; SHEN,V.; MITCHELL,K. & PECK,W.A. Macrophage-derived growth factor for osteoblast-like cells and chondrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:4558-4562, 1984

ROBB,R.J. Interleukin 2: the molecule and its function. *Immunology Today*, 5:203-209, 1984

ROSENBERG,S.A.; MULE,J.J.; SPIESS,P.J.; REICHERT,C.M.; & SCHWARTZ,S.L. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor-mediated by systemic administration of high dose recombinant interleukin 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 161: 1169-1188, 1985

ROSENBERG,S.A.; LOTZE,M.T.; MUUL,L.M.; LEITMAN,S.; CHANG,A.E.; ETTINGHAUSEN,S.E.; MATORY,Y.L.; SHIBBER,J.M.; SHILONI, E.; VETTO,J.T.; SEIPP,C.A.; SIMPSON,C & REICHERT,C.M. Observation on the systemic administration of autologous lymphokine.

Activated killer cells and recombinant interleukin 2 to patients with metastatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 313N:1485-1492, 1985

RUSCETTI,F.W.; MORGAN,D.A & GALLO,R.C. Functional, and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *The Journal of Immunology*, 119:131, 1977

RUSCETTI,F.W & GALLO,R.C. Human T cell lymphocytes growth factor: regulation of growth and function of T lymphocytes (review) *Blood*, 57: 379-394, 1981

SAMPLE,W.F.; GERTNER,H.R & CHRETIEN,P.B. Inhibition of phytohemagglutinin-induced in vitro lymphocyte transformation by serum from patients carcinoma. *The Journal of the National Cancer Institute*, 46:1291-1297, 1971

SANDERSON,J.C.; CAMPBELL,H.D. & YOUNG,I. Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin 5)and its effects on human and mouse B cells. *Immunological Reviews*, 102:29-50, 1988

SANDERSON,J.C.; WARREN,D.J. & STRATH M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation "in vitro". Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures. *The Journal of Experimental Medicine*, 162:60-74, 1985

- SANDERSON, J.C.; STRATH, M.; WARREN, D.J.; GARRA, A.O & KIRKWOOD, T.B.L. The production of lymphokines by primary alloreactive T cell clones: a co-ordinate analysis of 233 clones in seven lymphokines assays. *Immunology*, 56:575-584, 1985
- SANDERSON, J.C.; DHARA, A.; WARREN, D.J & KLAUS, G.G.B. Eosinophil differentiation factor also has B cell growth factor activity : Proposed name Interleukin 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 437-440, 1986
- SANTOS, L.B.; YAMADA, Y.T & SCHEIBERG, M.A. Monocyte and lymphocyte interaction in patients with advanced cancer evidence for deficient IL-1 production. *Cancer*, 56: 1553-1558, 1985
- SAUDER, D.; MOUNESSA, N.L.; KATZ, S.I; DINARELLO, C.A. & GALLIN, J.I. Chemotactic cytokines: the role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 132:828-832, 1984
- SEHGAL, P.B. & SAGAR, A.D. Heterogeneity of poly(I)xpoli(C)-induced human fibroblast interferon mRNA species. *Nature*, 288:95-97, 1980
- SIDERAS, P.; NOMA, T.; & HONJO, T. Structure and Functions of interleukin 4 and 5. *Immunological Reviews*, 102:189-212, 1988

SINGER, I.I.; SCOTT, S.; HALL, G.L.; LIMJOCO, G.; CHIN, J. & SCHMIDT, J.A. Interleukin-1 beta is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membrane of stimulated human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 167: 389-407, 1988

SCHRADER, C.J. The panspecific hemopoietin of activated lymphocytes (interleukin-3). *Annual Reviews of Immunology*, 4:205-230, 1986

SCHRADER, J.W.; CLARK, L.I.; CRAPPER, R.M. & WONG, G.P. P-cell stimulating factor: characterization, action on multiple lineages of bone-marrow-derived cells and role in oncogenesis. *Immunological Reviews*, 76:79-104, 1983

SHIMPLE, A. & WECKER, E.; A third signal in B-cell activation given by TRF. *Transplantation Reviews*, 23:176, 1975

SHIRAKAWA, F.; TANAKA, Y.; OTA, T.; SUZUKI, H.; ETO, S. & YAMASHITA, U. Expression of interleukin 1 receptors on human peripheral T cells. *The Journal of Immunology*, 138:4243-4248, 1987

SNAPPER, M.C.; FINKELMAN, F.D. & PAUL, W.E. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunological Reviews*, 102:51-57, 1988

SONODA,Y ; YANG,C.Y., WONG,G.G., CLARK,S.C. & OGAWA,M. Analysis in serum-free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: Interleukin 3 and granulocyte/macrophage colony stimulating factor are specific for early developmental stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85: 4360-4364, 1988

STRATH,M & SANDERSON,C.J. Detection of eosinophil differentiation factor and its relationship to eosinophilia in *Mesocestoides corti*-infected mice. *Experimental hematology*, 14:16-20, 1986

SWAIN,S.L. & DUTTON,R.W. Production of B cell growth promotion activity.(DL) BCGF, from a cloned T cell line and its assay on the BCL1 B cell tumor. *The Journal of Experimental Medicine*, 156:1821-1834, 1982

SWAIN,S.L.; DUTTON,R.W.; MCKENZIE,D.; HELSTROM,H. & ENGLISH,N. Role of antigen in the B cell response. Specific antigen and the lymphokine IL-5 synergize to drive B cell lymphoma proliferation and differentiation to Ig secretion. *The Journal of Immunology*, 140:4224-4230, 1988

TAGA,T.; KAWANISHI,Y.; HARDY,R.R.; HIRANO,T.; & KISHIMOTO,T. Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantification, specificity, distribution and regulation of their

expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 166:967-981, 1987

TAKAI, Y.; YONG, G.G.; CLARK, S.C.; BURAKOFF, S.J. & HERRMANN, S.H. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 140: 508-512, 1988

TAKATSU, K.; KIKUCHI, Y.; TAKAHASHI, T.; HONYO, T.; MATSUMOTO, M.; HARADA, N.; YAMAGUCHI, N. & TOMINAGA, A. Interleukin 5, a t-cell derived B-cell differentiation factor also induces cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 84:4234-4238, 1987

TAKATSU, K.; TOMONAGA, A.; HARADA, N.; MITA, S.; MATSUMOTO, M.; TAKAHASHI, T.; KIKUCHI, Y. & YAMAGUCHI, N. T cell-replacing factor (TRF)/Interleukin 5 (IL-5): Molecular and Functional properties. *Immunological Reviews*, 102:107-135, 1988

TOMINAGA, A.; MATSUMOTO, M.; HARADA, N.; KIKUCHI, Y. & TAKATSU, K. Molecular properties and regulation of mRNA Expression for murine T cell-replacing factor/IL-5. *The Journal of Immunology*, 140:1175-1181, 1988

TOSATO, G.; SEAMON, K.B.; GOLDMAN, N.D.; SEHGAL, P.B.; MAY, L.T.; WASHINGTON, G.C.; JONES, K.D. & PIKE, S.E. Monocyte-derived human B-cell growth factor identification as interferon-beta

2 (BSF-2), IL-6. *Science*, 239:502-504, 1988

TRENN, G.; HAJIME, T.; HU-LI, J.; PAUL, W.E. & SITKOVSKY, M. B cell stimulatory factor 1 (IL-4) enhance the developments of cytotoxic T cells from Lyt.2 resting murine T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 140:1101-1106, 1988.

TROTTER, J.L.; CLIFFORD, D.B.; ANDERSON, C.B.; VAN DER VEEN, R.C.; HICKS, B.C. & BANKS, G. Elevated serum interleukin-2 levels in chronic progressive multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 318:1206, 1988

URDAL, L.; CALL, M.S.; JACKSON, J.L. & DOWER, S.K. Affinity purification and chemical analysis of the interleukin 1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:2870-2877, 1988

VAN DAMME, G.D.; SIMPSON, R.J.; RUBIRA, M.R.; CAYPHAS, S.; VINK, A.; BILLIAU, A. & VAN SNICK, J. Identification of the human 26-kd protein. Interferon beta₂ (IFN-beta₂), as a B cell hybridoma/plasmacitoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor Necrosis Factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 165:914-919, 1987

VAN SNICK, J.; CAYPHAS, S.; UYTENHOVE, A.V.C.; GOULIE, P.G.; RUBIRA, M.R. & SIMPSON, R.J. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with

growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 9679-9683, 1986

YOKOTA, T.; COFFMAN, R. L.; HAGIWARA, H.; REMICK, D. M.; YOKOTA, K.; GEMMEL, L.; SCHRADER, B.; YANG, G.; MEYERSON, P.; LUH, J.; HOY, P.; PENE, J.; BRIENE, F.; SPITS, H.; BUCHERAU, J.; DE VRIES, J.; LEE, F.; ARAI, N. & ARAI, K. Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding mouse and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony-stimulatory activities: relationship to interleukin 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:7388-7392, 1987

YOKOTA, T.; OTSUKA, T.; MOSMAN, T.; BAUCHEREAU, J.; DE VRIES, J.; LEE, F. & ARAI, K. I. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell and T-cell stimulating activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83:5894-5898, 1986

WAGNER, H & ROLLINGHOFF, M. T-T cell interaction during "in vitro" cytotoxic allograft response soluble products from activated Lyt+ T cells trigger autonomously antigen-primed Ly 2 3 + T cells to cellular proliferation and cytolytic activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 148:1532-1538, 1978

WALTHER, Z.; MAY, L. T. & SEHGAL, P. B.; Transcriptional regulation of the interferon beta-2/B cell differentiation factor BF-2/

hepatocyte-stimulation factor gene in human fibroblasts by other cytokines. *The Journal of Immunology*, 140:974-977, 1988.

WANG, H.M. & SMITH, K.A. the interleukin 2 receptor: functional consequences of its bimolecular structure. *The Journal of Experimental Medicine*, 166:1055-1069, 1987

WARREN, D.J. & SANDERSON, C.J. Preproduction of a T-cell hybrid producing a lymphokine stimulating eosinophil differentiation. *Immunobiology*, 54:613, 1985

WHISLER, R.L.; BALCERZAK, S.P. & MURRAY, J.L. Heterogenous mechanism of impaired lymphocyte response in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 57:1081-1087, 1981

WEIGENT, D.A.; STANTON, G.J. & JOHNSON, H.M. Interleukin enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon. *Infection and Immunity*, 41:992, 1983

WHETTON, A.D.; BAZILL, G.W. & DEXTER, T.M. Stimulation of Hexose Uptake by haematopoietic cell growth factor occurs in WEHI-3B myelomonocytic leukaemia cells: a possible mechanism for loss of growth control. *Journal of Cellular Physiology*, 123:73-78, 1985

WHETTON,A.D. & DEXTER,T.M. Effect of haematopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels. *Nature*, 303:629-631, 1983

WILKINS,J.A.; WARRINGTON,R.J.; SIGURDSON,L.S. & RUTHERFORD,J.W. The demonstration of interleukin-2 like activity in the synovial fluids of rheumatoids arthritis patients. *The Journal of Rheumatology*, 10:109-113, 1983

WILLIAMS,J.M.; LOERTSCHER,R.; COTNER,T.; REDDISH,M.; SHAPIRO,H. M. CARPENTE,C.B.; STRAMINGER,J,L. & STROM,T.B. Dual parameter flow cytometric analysis of DNA content, activation antigen expression, and T cell subset proliferation in the human mixed lymphocyte reaction. *The Journal of Immunology*, 132:2330, 1984

WILLIAMS,J.M.; DELORIA,D.; HANSEN,J.A.; DINARELLO,A.; LOERTSCHER,R.; SHAPIRO,H.M. & Strong,T.B. The events of primary T cell activation can be staged by use of sepharose-bound anti-T3.(64.1) monoclonal antibody and purified interleukin-1. *The Journal of Immunology*, 135:2249, 1985

WILLIAMS,J.M.; ABBUD FILHO,M.; KELLEY,V.E.; & STROM,T.B. Interleukin-2 apparently upregulates its receptor and induces proliferation of various resting mononuclear leukocytes in the absence of antigen. *Cellular Immunology*, 94:383-393, 1985

WOOD,D.D.; BAYNE,E.K.; GOLDRING,M.B.; GOWEN,M.; HAMMERMAN,D.;
HUNNES,J.L.; IHRIE,E.J.; LIPSKY,P.E. & STARRICK,M.J. The
four Biochemically distinct species of human interleukin 1
all exhibit similar biologic activities. The Journal of
Immunology, 134:895, 1985.

ZLOTNIK,A.; FISCHER,M.; ROCHM,N.; & ZIPORI,D. Evidence for
effects of interleucin 4 (B cell stimulatory factor 1) on
macrophages: enhancement of antigen presenting ability of
bone marrow-derives macrophages. The Journal of Immunology,
138:4275-4279, 1987