

LINFOKINAS: MOLECULAS DETERMINANTES DE INMUNIDAD. REVISION

Helman Serrano

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo. Venezuela.

RESUMEN

Existe muy poca información en relación a la naturaleza química de la mayoría de las linfokinas, así como respecto a su mecanismo de acción. Existe por lo tanto, una urgente necesidad de idear más técnicas bioquímicas e inmunoquímicas que permitan estudiar mejor estas sustancias a fin de precisar las funciones biológicas de cada linfokina. Además de la importancia diagnóstica que ello pueda tener, está el potencial de tipo terapéutico que ellas podrían ofrecer tal como está ocurriendo con la revolución que ha causado el interferón en los dos últimos años.

Cuando la Fundación Ciba organizó un simposio sobre Aspectos Celulares de la Inmunidad en Chantilly en 1959, allí se reunieron los pioneros de la inmunología actual: Sir Mac Farlane Burnet, Frank Dixon, Robert Good, Pierre Grabar, JH Humphrey, H. Sherwood Lawrence, Peter Medawar y P. Miescher entre otros, solo se conocía una linfokina, el factor de transferencia, y en ese entonces el profesor Lawrence hacía la similitud de que el factor de transferencia de los linfo-

citos era algo así como la maquinaria microsomal para los anticuerpos y que el factor de transferencia era algo liberado de los microsomas. Fué en realidad, otro pionero de la biología molecular como lo fué también de la inmunología actual.

Veintinún años después hoy conocemos 29-30 efectos diferentes producidos por linfokinas, es decir, se han identificado o descubierto mas de 1 linfokina por año en los últimos 20 años, y una de ellas se ha convertido en una probable mina de oro, provocando además una revolución en la Medicina y en la Biología, mayor que la producida por la penicilina. No es de extrañar que alguna otra de las 30 linfokinas se convierta pronto en una mina de diamantes.

INTRODUCCION

El vocablo de "linfokina" fué acuñado en la literatura médica y biológica por Dumonde y cols. en 1969 (10) para integrar en esa definición a todos los mediadores biológicos que no siendo anticuerpos son liberados después de la activación de linfocitos. Esta definición es utilizada en forma muy generalizada en la literatura médica, pero presenta ciertos inconvenientes en cuanto al valor semántico de la palabra que vale la pena mencionar.

En primer lugar, algunos de los factores incluidos dentro de la denominación de linfokinas pueden en realidad ser productos de monocitos, ya que es completamente o casi imposible obtener una suspensión de células mononucleares compuesta solamente por linfocitos. En segundo lugar, las sustancias que se aislan de los sobrenadantes de linfocitos estimulados o activados, puede que también sean producidas por otro tipo de células hasta ahora no investigadas cabalmente (monocitos, macrófagos, mastocitos, etc.). En tercer lugar, la definición de linfokinas es probable que agrupe un rango muy amplio y variable de moléculas biológicamente activas que pueden ser tan distintas como fragmentos de DNA ó RNA, o proteínas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, interferón tipo I, prostaglandinas y nucleótidos cíclicos. Finalmente, las linfokinas pueden ser liberadas de los linfocitos que sean activados por la interacción de receptores de membrana con antígenos específicos para ellos, o bien por la interacción con antígenos de membranas de otros linfocitos, como ocurre al mezclarse linfocitos poseedores de antígenos de histocompatibilidad diferentes; o bien por la activación de linfocitos mediante sustancias mitogénicas como son la Concavalina A y la Fito-

hemaglutinina. Así por ejemplo, el factor de transferencia, y los factores de cooperación y de supresión de la respuesta humoral son liberados exclusivamente mediante la interacción específica entre antígeno y receptor de membrana linfocitaria.

En esta revisión vamos a agrupar dentro de la definición de linfokinas, todas las sustancias biológicamente activas, que no siendo anticuerpos, son liberadas de los linfocitos T, activados en forma específica por antígenos o en forma inespecífica por mitógenos. Pero antes de continuar hablando en particular de las linfokinas, vamos a retroceder un poco sobre la génesis y mecanismo de la reacción.

Reacción de inmunidad celular. Ante un primer encuentro con el antígeno para el cual cada linfocito T está predestinado, queda sensibilizado para ese antígeno en particular, y desde ese momento, todo encuentro sucesivo con el mismo antígeno va a traer como consecuencia el desarrollo de una reacción celular de inmunidad, en la cual el linfocito T sensibilizado, al ponerse en contacto con su antígeno a través de sus receptores de membrana, elabora y libera al medio tisular que lo rodea una serie de sustancias o moléculas con propiedades biológicas particulares, y que tienen como función iniciar los eventos destinados a retirar o eliminar el antígeno o los microorganismos que lo contienen.

La reacción primaria del antígeno con el linfocito sensibilizado, es el evento básico y consiste en la interacción del antígeno y el receptor que se encuentra en la superficie del linfocito T. La reacción secundaria viene dada por la liberación de las linfokinas. La reacción terciaria está dada por los efectos que las linfokinas o moléculas ejecutoras, ocasionan sobre otras células o tejidos. Estas manifestaciones terciarias pueden ser beneficiosas o dañinas. En el primer caso hablamos de un estado de inmunidad protectora; en el segundo hablamos de un estado de hipersensibilidad.

CLASIFICACION DE LAS LINFOKINAS

Debido a que no poseemos datos suficientes y precisos sobre la estructura química de las linfokinas, es necesario recurrir a una clasificación hecha en base a los efectos biológicos que provocan tanto "in vivo" como "in vitro". Debemos advertir además, que es muy posible que a medida que progresen los estudios sobre estas moléculas ejecutoras, nos consigamos con que algunas de las propiedades biológicas son propias de más de una linfokina, o que, dos linfokinas clasificadas en base a esas propiedades, sean en realidad una sola linfokina.

La tabla I las clasifica de acuerdo a las células que afectan.

La tabla II clasifica las linfokinas que afectan otros linfocitos T ó B.

La tabla III clasifica las linfokinas que afectan a los macrófagos.

La tabla IV las clasifica por su efecto sobre neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

La tabla V agrupa factores misceláneos que afectan diferentes tipos de células.

La tabla VI muestra las actividades biológicas producidas por los dos tipos de Interferón: I y II.

TABLA I

CLASIFICACION DE LAS LINFOKINAS DE ACUERDO A LAS CELULAS QUE AFECTAN

-
- 1- LINFOCITOS
 - 2- MACROFAGOS
 - 3- NEUTROFILOS
 - 4- EOSINOFILOS
 - 5- BASOFILOS
 - 6- OTRO TIPO DE CELULAS
-

A continuación vamos a describir con mas detalle las características y propiedades biológicas de algunas linfokinas.

Factor de reemplazo de células T (TRF)

Este factor es capaz de reemplazar a células T cooperadoras ausentes, tanto en una respuesta humoral de IgG como de IgM. Este factor es producido por el linfocito T clasificado como ayudante o cooperador de la respuesta humoral. El factor TRF actúa sobre linfocitos B que ya han proliferado después del contacto con el antígeno. Su constitución química es de naturaleza proteica principalmente, y posee 4 fracciones activas cuyo peso molecular varía de 25.000 a 35.000 daltones. Sin embargo, las preparaciones mas puras son todavía activas aún después de haber perdido sus características de proteína (46). El linfocito que lo produce posee los marcadores Thy +, Ly + sobre su membrana (34). La célula que es afectada por esta linfokina es el linfocito B ya en fase de multiplicación como se dijo antes. Esta linfokina puede ser producida en forma específica (es decir, por linfocitos T sensibilizados, y en presencia de su antígeno) o en forma inespecífica (es decir, inducida por mitógenos o en cultivos mixtos de linfocitos). Debido a que fragmentos Fc solubles aislados son capaces de bloquear el efecto de esta linfokina, Schimplé y cols. (46) han emitido

TABLA II
LINFOKINAS QUE AFECTAN LINFOCITOS

A. En la función de cooperación		
Linfokina	Abreviatura (Literatura inglesa)	Actividad biológica
1a. Factor mitogénico ó Factor blastogénico	MF BF	Induce la transformación blastiforme y aumenta la incorporación de timidina en linfocitos normales
1b. Factor mitogénico o especificidad		Requiere la activación del linfocito por su antígeno específico
2a. Factor de reemplazo de células T ó factor de cooperación con células B	TRF HF	Permite la diferenciación de linfocitos B a plasmocitos productores de anticuerpos
3. Factor responsable del efecto alogénico	AEF	Posee moléculas que interaccionan con linfocitos B para producir anticuerpos de diferentes especificidades
4. Factor de transferencia	TF	Convierte los linfocitos no reactivos en linfocitos capaces de reaccionar ante antígenos de diversa especificidad
5. Factor de potencialidad	PF	Aumenta la transformación blastiforme ya iniciada en cultivos de linfocitos estimulados
B. En la función de supresión		
1. Factor soluble supresor de la respuesta inmune	SIRS	Inhibe la activación de linfocitos B y la síntesis de sus anticuerpos
2. Factor inhibidor de la síntesis de DNA	IDS	
3. Factor de supresión de células B	SF	SF = SIRS?

TABLA III

LINFOKINAS QUE AFECTAN A LOS MACROFAGOS

Linfokina	Abreviatura (Literatura inglesa)	Actividad biológica
1. Factor de inhibición de la migración de macrófagos	MIF	Imposibilita la migración de macrófagos normales
2. Factor activador de macrófagos	MAF	Estimula la fagocitosis y la oxidación metabólica de los macrófagos MAF = MIF?
3. Factor de expansión de macrófagos	MEF	Aumenta la capacidad de adherencia y área de superficie de contacto de los macrófagos. MAF = MEF?
4. Factor quimiotáctico de macrófagos	MCF	Estimula la migración de macrófagos en forma dirigida
5. Factor aglutinante de macrófagos		Aglutina macrófagos en suspensión
6. Factor citofílico		Confiere a los macrófagos cierto grado de reactividad específica con antígenos

la hipótesis de que el factor TRF puede interaccionar con el receptor de Fc sobre la membrana de las células B y desencadena un signo o aviso a nivel de la membrana que inicia los efectos provocados por esta linfokina.

Factor de transferencia (TF)

El factor de transferencia es una molécula de pequeño peso molecular (10.000), estable a 37°C, y es resistente a las enzimas NDasa y RNasa, y tripsina. Es un mediador específico de la inmunidad celular y es liberado solamente por linfocitos T sensibilizados cuando son estimulados en forma específica por el antígeno para el cual son sensibles. Su efecto se traduce en que transfiere a otros linfocitos T esa sensibilidad específica de cada antígeno a través de un mecanismo hasta ahora desconocido. Esta sensibilización así transferida puede durar hasta meses y aún años. Su papel biológico pues es reclutar linfocitos T para hacerlos específicamente sensibles a un antígeno y así convertirlos en células ejecutoras de inmunidad

TABLA IV

**LINFOKINAS QUE AFECTAN A NEUTROFILOS,
EOSINOFILOS Y BASOFILOS**

Linfokina	Abreviatura (Literatura inglesa)	Actividad biológica
1. Factor de inhibición de leucocitos	LIF	Inhibe la migración de leucocitos neutrófilos
2. Factor estimulador de migración leucocitaria	LMEF	Quimiotaxia sobre leucocitos neutrófilos
3. Factor estimulador de fagocitos de granulocitos	GPEF	Incrementa la capacidad fagocítica de neutrófilos
4. Factor quimiotáctico de eosinófilos	ECF	Estimula la migración de eosinófilos
5. Factor de promoción de eosinófilos	EPF	EPF = ECF?
6. Factor quimiotáctico de basófilos	BCF	Estimula la migración de basófilos

celular. Durante los últimos cinco años han aparecido en la literatura médica diversos reportes de investigadores que han utilizado el factor de transferencia aislado de leucocitos humanos en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas crónicas como la lepra lepromatosa (18), coccidioidomicosis (6), candidiasis mucocutánea crónica con inmunidad celular defectuosa (28), histoplasmosis diseminada (16) con resultados clínicos bastante favorables y alentadores. Esto no quiere decir que este tipo de inmunoterapia se ha de convertir en la panacea de todas las enfermedades infecciosas crónicas ya que el uso de este material como agente de inmunoterapia conlleva ciertos riesgos que deben tenerse en cuenta: a) primeramente, es posible transmitir al receptor del TF alguna otra enfermedad infecciosa que el donante pudiera tener en forma silente o inaparente (como por ejemplo, sífilis, hepatitis, etc.); b) la preparación de TF pudiera contaminarse durante el proceso de aislamiento y concentración a partir de sangre total; c) existen reportes en la literatura médica que indican que sí se pueden producir efectos indeseables con la administración del factor de transferencia tales como, anemias hemolíticas, infiltrados pulmonares en forma de neumonitis, síndrome nefrótico, linfocitosis, gamopatía policlonal de IgM, pérdida temporal de la reactividad inmunológica y reacciones inflamatorias localmente en el sitio de las inyecciones (26, 33); d) la administración del TF a pacientes con una infección crónica como lo es la lepra lepromatosa, pudiera provocar una reacción de inmunidad celular asociada a una de hipersensibilidad retardada hacia los tejidos

TABLA V

FACTORES MISCELANEOS QUE AFECTAN DIFERENTES TIPOS DE CELULAS

Linfokina	Abreviatura (Literatura inglesa)	Actividad biológica
1. Factores citotóxicos y citostáticos:		
a. Linfotóxina-alfa	LT	Citotóxica para células blanco o de choque
b. Linfotóxina-beta	LT	Inhibe la multiplicación celular sin matar la célula
c. Factor inhibidor de proliferación	PIF	CIIF = PIF?
d. Factor inhibidor clonal	CIIF	
2. Factor estimulador de colonias	CSF	Estimula la diferenciación de células madres de médula ósea a granulocitos y/o monocitos
3. Factor activador de osteoclastos	OAF	Ocasiona la liberación de calcio de cultivos de hueso embrionario
4. Factor de permeabilidad de ganglio linfático		Facilita la migración de linfocitos fuera de las venas post-capilares del ganglio linfático
5. Factor de reactividad cutánea	SRF	Provoca reacciones en piel que asemejan a una reacción de hipersensibilidad retardada
6. Interferon Tipo I		Ver Tabla VI
7. Interferon Tipo II		Ver Tabla VI

conteniendo el antígeno o antígenos del bacilo y producir con ello daño funcional y orgánico a esos tejidos (piel, nervios periféricos, ganglios linfáticos, cámara anterior del ojo), y en efecto así ha sido descrito en algunos de los casos de lepra lepromatosa tratados por Hastings y cols. (18). Otros grupos de investigadores clínicos están haciendo ensayos terapéuticos con factor de transferencia en pacientes padeciendo de diferentes tipos de cáncer con resultados muy variables como para sacar conclusiones (51), y en otros grupos con resultados muy desalentadores (5). Por otra parte los reportes referentes al uso del TF en pacientes con sarcoma osteogénico parecen mas promisorios (2). También ha sido utilizado el TF en pacientes con artritis reumatoidea (7) y esclerosis múltiple o en placas (36), sin resultados concluyentes en su beneficio.

TABLA VI

PROPIEDADES Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS DOS TIPOS DE INTERFERON

Interferon Tipo	Producido por	Liberado por	Actividad biológica
II	Linfocitos T y B	Estimulación con PHA, con A, Ag, Ac anti-L	Inhibición de multipli- cación viral; inhibición de síntesis de anticuer- pos "in vivo" e "in vitro"
I	Linfocitos T y B	Infección viral	Inhibición de multipli- cación viral; inhibe la división celular de célu- las tumorales "in vivo" e "in vitro"

Otras actividades biológicas del Interferon Tipo I:

- a- Inhibe la síntesis de DNA por linfocitos estimulados con mitógenos o células alogénicas
- b- Inhibe la síntesis de inmunoglobulinas por células B "in vivo" e "in vitro"
- c- Inhibe las reacciones de injerto contra huésped
- d- Inhibe la respuesta celular inmune a ciertos antígenos
- e- Aumenta la citotoxicidad específica de linfocitos sensibilizados
- f- Aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos
- g- Aumenta la liberación de histamina de basófilos sensibilizados con IgE

PHA = Mitógeno Fitohemaglutinina. Con A = Mitógeno Concavalina A. Ag = Antígeno específico para linfocitos sensibilizados. Ac anti-L = Anticuerpo antilinfocítico.

Factor soluble supresor de la respuesta inmunológica (SIRS)

Algunas células T supresoras, activadas por su antígeno, suprimen la respuesta inmune a una serie de antígenos no relacionados entre sí, y este fenómeno está relacionado con el hallazgo de anergia coexistente con hipersensibilidad retardada. De igual manera, las células T supresoras, activadas por mitógenos como la Concavalina A, provocan supresión de la respuesta tanto humoral como celular. Este efecto lo logran mediante la liberación de un factor soluble supresor denominado en forma abreviada con las letras SIRS en la literatura inglesa. Pero SIRS a diferencia de la supresión provocada por células T supresoras, solo afecta la producción de anticuerpos contra antígenos (timo-dependientes y timo-no dependientes), pero no tiene ningún efecto sobre la proliferación de células T y la respuesta de linfocitos T ante sus correspondientes antígenos.

Por otra parte (4, 35), en los líquidos de cultivos de linfocitos que se aíslan conteniendo actividad de SIRS, también se detecta actividad de MIF (factor de inhibición de la migración de macrófagos), y si se comparan las propiedades de estos dos factores, se puede concluir que son casi idénticos en sus propiedades.

La célula que parece ser el blanco o sitio de acción intermediario del factor SIRS es el macrófago, el cual se cree afecta en forma directa a la célula B productora de anticuerpos, a través de una sustancia mediadora de bajo peso molecular.

SIRS, por otra parte, es diferente del Interferón tipo II ya que aunque permanece estable a 56°C, es inestable a un pH 2.0. Además, la célula blanco directo del Interferón tipo II es el linfocito B y no el macrófago.

No se ha identificado el receptor para SIRS en los macrófagos. El efecto de SIRS sobre los macrófagos es reversible en el sentido de que si se cultivan juntos macrófagos tratados con SIRS y linfocitos B, estos linfocitos B pueden todavía responder normalmente en presencia de macrófagos normales (35).

El factor SIRS es independiente de una especificidad antigénica, es decir, puede ser liberado por un mitógeno inespecífico. Existe un fenómeno que es común en todos los experimentos donde se observa supresión de la producción de anticuerpos, y es el de la inhibición de la proliferación celular de la célula blanco, ya sea el linfocito B o el macrófago (35). Así que un mecanismo de acción común en ambos casos podría ser mediante el aumento del AMP cíclico intracelular, lo cual inhibe la proliferación o multiplicación celular.

Factor mitógeno (MF)

Esta linfokina fué descrita por primera vez por Gordon y McLean (14), quienes demostraron que los sobrenadantes obtenidos de cultivos mixtos de linfocitos contenían una sustancia que era mitogénica para cultivos de linfocitos diferentes a los usados en el cultivo original. Posteriormente, Valentine y Lawrence (50) se hallaron con el hecho de que linfocitos de individuos tuberculino-positivos, liberaban una sustancia, con iguales propiedades, al ser incubadas con PPD. Parece ser que tanto los linfocitos T como los linfocitos B pueden ser estimulados por ese factor mitogénico e incorporan mayores cantidades de timidina en su DNA.

El factor MF puede ser detectado después de las primeras 6 horas de cultivo, pero su máxima actividad se detecta entre las 48 y 72 horas. Pa-

rece ser que se necesita en la célula que lo produce, una capacidad intacta para sintetizar proteínas. Se observa que la respuesta proliferativa ante el factor MF es más efectivo sobre linfocitos T (29), y esta observación se da exclusivamente cuando el factor MF es liberado por estimulación antigénica, y en este caso se habla de "factor mitogénico dependiente de antígeno".

El MF actúa como factor de ampliación, tanto de la respuesta inmune humoral como en la respuesta inmune celular. El factor MF es producido por linfocitos T, pero no por linfocitos B. Este factor, junto con el factor de transferencia, forman un sistema de reclutamiento de linfocitos normales no sensibilizados, los cuales, al ser activados pueden a su vez liberar otras linfocinas, y de esta forma se amplifica la reacción humana.

Factor inhibidor de la síntesis de DNA (IDS)

El factor IDS humano fué descrito por primera vez en 1970 por Smith y cols. (47). Este factor puede ser liberado por estimulación antigénica o por mitógenos o por mezcla de células linfoides alogénicas. Su máxima actividad se detecta entre el tercero y quinto día después de iniciada la estimulación. El factor IDS no es específico de especies pero sí es específico de células ya que solo se ha comprobado su efecto sobre linfocitos. Su mecanismo de acción no está del todo claro, pero parece ser que lo hace provocando un aumento de los niveles de AMP cíclico intracelular e inhibiendo la polimerasa del DNA (24).

Factor de inhibición de la migración leucocitaria (MIF)

El factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) fué descrito por primera vez por Svejcar y Johanovsky en 1963 (49). El factor MIF inhibe la migración de macrófagos y monocitos y puede ser liberado por estímulo antigénico o por estímulo mitogénico, y actúa en forma inespecífica sobre macrófagos y monocitos provenientes de individuos no inmunes o sensibles; tampoco es específico de especies, ya que puede actuar sobre células de diferentes especies animales.

La célula que produce el factor MIF es el linfocito T, pero es posible también que el linfocito B sea capaz de producir MIF, pero solo en presencia de unas pocas células T. La producción del MIF requiere de un aparato de síntesis proteica intacto, pero no necesita que el linfocito entre en fase de proliferación para que lo produzca. Su máxima concentración se detecta a los dos días de cultivo, pero ya a la sexta hora de actividades los linfocitos puede detectarse su actividad en el medio sobrenadante. Se ha postulado (38) la existencia de un receptor específico para el MIF en la membrana del macrófago ya que el MIF desaparece del medio líquido

sobrenadante después de incubarse con macrófagos. Es posible que ese receptor esté constituido en parte por un radical α -L-fucosa ya que puede ser eliminada la susceptibilidad de los macrófagos al MIF mediante el tratamiento con una enzima que hidroliza los residuos de fucosa de oligosacáridos (38).

La inhibición de la migración de macrófagos no necesita de contacto prolongado con el MIF con los macrófagos (con solo dos horas de incubación es suficiente), y su mecanismo de acción parece ser a través de una alteración del transporte de calcio en la membrana, además de variaciones de los niveles intracelulares de AMP y GMP cíclicos.

El MIF humano es una proteína con un peso molecular de 23.000 (43). Se ha podido demostrar que tanto los linfocitos T como los linfocitos B son capaces de producir MIF (42) y es por ello que la producción de MIF no puede ser tomada como un fenómeno singular que mide la función o actividad de un tipo particular de célula (T ó B). El uso de la prueba que detecta la producción de MIF por linfocitos ha permitido obtener ciertos datos que podrían ser interpretados en el sentido de que el MIF pudiera estar involucrado en mecanismos de autoinmunidad. Así por ejemplo, solamente los linfocitos de pacientes que padecen de ciertos tipos de glomerulonefritis producen MIF en respuesta a antígenos de membrana basal glomerular (39), y solamente los linfocitos de pacientes con polineuritis del síndrome de Guillian-Barre producen MIF ante antígenos de nervio periférico (40).

Factor de inhibición de la migración leucocitaria (LIF)

Esta linfokina fué descrita por Rocklin (41) quien demostró su actividad exclusivamente sobre leucocitos polinucleados o neutrófilos. Es bastante probable que el tipo de linfocito que produce esta linfokina sea los llamados linfocitos "nulos" o células "K" ("killers") (4). También parece existir un receptor de membrana para el LIF en los leucocitos neutrófilos al igual que el receptor para MIF en los macrófagos. Esta linfokina posee propiedades de proteasa y esterasa (3, 44).

Factor activador de macrófagos (MAF)

El factor MAF y sus efectos biológicos fueron demostrados por primera vez por Mooney y Waksman en 1970 (30), quienes observaron que el sobrenadante de linfocitos activados provoca los siguientes efectos sobre los macrófagos: mayor capacidad de adherencia y expansión sobre superficies lisas como el vidrio; mayor capacidad fagocitaria de ingestión y mayor capacidad bacteriana; aumento de oxidación de la glucosa a través del

cortocircuito del hexosamonofosfato; aumento de la formación de repliegues y movilización de los pliegues membranosos. Posteriormente Nathan, Karnovsky y David demostraron en 1971⁽³¹⁾, que los sobrenadantes enriquecidos con el MIF provocaban resultados similares, y posteriormente, Nathan, Remold y David⁽³²⁾, demostraron las actividades o efectos biológicos de MIF y del MAF son efectos de una misma linfocina. El MAF o MIF también es capaz de producir otros efectos como son, el aumento de la actividad lisosomal y la liberación de enzimas lisosomales por parte de los macrófagos, aumento de la actividad de la adenil-ciclase en la membrana de esas células, aumento de la síntesis de ARN y de la capacidad tumoricida de los macrófagos, coincidiendo esta actividad con un aumento de la liberación de activadores del plasminógeno. Después que los macrófagos han estado en contacto con el factor MIF, su migración es inhibida durante 3-4 días, pero después de ese período de tiempo, las células empiezan a migrar y a mostrar signos de su actividad fagocitaria; de modo que todo esto sugiere dos tipos de efectos consecutivos de una misma linfocina (8).

Linfocinas de quimiotaxis

Ramsier demostró en 1967⁽³⁷⁾ una linfocina con efectos quimiotácticos específicos sobre los leucocitos polinucleados. En 1969, Remold y David⁽⁵²⁾ demostraron una linfocina de quimiotaxis específica para los macrófagos, la cual es producida tanto por linfocitos T como por linfocitos B. Esta linfocina posee propiedades similares a una proteína. Desde esa fecha ya se han encontrado también linfocinas que son quimiotácticas específicamente para eosinófilos o para basófilos.

El factor de quimiotaxis para los macrófagos al igual que el MIF, no es un buen parámetro para diferenciar o evaluar la función particular de cada célula T ó B, ya que puede ser sintetizada por ambos.

En 1973, Snyderman y cols.⁽⁴⁸⁾ demostraron que los linfocitos de un paciente con candidiasis mucocutánea crónica no producían linfocinas de quimiotaxis para los macrófagos; pero además observaron que los monocitos de ese paciente tampoco eran susceptibles a linfocinas quimiotácticas de un individuo normal. En ese caso el paciente es incapaz de producir las siguientes linfocinas: MIF y la linfocina de quimiotaxis para macrófagos, presentando además un defecto intrínseco de los monocitos y macrófagos quienes eran insensibles a factores de quimiotaxis normales.

Linfotoxinas (LT)

Los linfocitos activados por un estímulo antigenético producen una linfocina que es tóxica para otras células, y la primera descripción de este

fenómeno fué hecha por Ruddle y Waksman en 1968 (45). En forma similar, Granger y Williams demostraron en 1968 (15), que los linfocitos activados por mitógenos también producen ese tipo de sustancia. De los mitógenos usados, la fitohemaglutinina (PHA) es capaz de estimular la producción de linfocinas tóxicas (linfotoxinas) y los linfocitos la continúan produciendo aún después de retirada la PHA del medio de cultivo. Por el contrario, los linfocitos estimulados con el mitógeno Concanavalina A, necesitan de la continua presencia de mitógeno para seguir produciendo la linfocina. La LT tiene las propiedades de una proteína y de acuerdo con su peso molecular se ha podido determinar que existen dos fracciones con la propiedad de linfotoxina y se les ha denominado α LT y β LT a cada una de las fracciones. La α LT es producida principalmente por linfocitos B y tiene un peso molecular de 75.000-90.000, y es bastante estable y mantiene su actividad aún después de calentamiento a 56°C durante 30'. La β LT parece ser producida por un pequeño porcentaje de los linfocitos T y por linfocitos B, pero que requieren de la presencia de linfocitos T, y este hecho fué muy bien explicado por Bendtzen (4). Las actividades biológicas de los factores de inhibición clonal (LIF) y de inhibición de la proliferación (PIF), parecen ser manifestaciones de las mismas linfotoxinas. La β LT tiene un peso molecular de 45.000 y es muy inestable al guardarse a 4°C durante semanas o si se calienta a 56°C durante 30'. Ninguna de las dos fracciones, α o β , poseen especificidad de especie. Se desconoce el mecanismo molecular por el cual las linfotoxinas ejercen su efecto tóxico, pero sí se sabe que necesitan adherirse a la membrana celular de la célula blanco o de choque.

También ha sido propuesto por Hiserodot y Granger (19), que también es preciso que el linfocito que produce citotoxicidad por contacto directo con membrana de las células de choque produzca la LT, y que ésta se deposite sobre la membrana. De modo que el efecto de la citotoxicidad directa por el linfocito no es tan directa como lo parece y requiere de la linfotoxina para que se lleve a cabo.

En cuanto a la función natural que la linfotoxina desempeña "in vivo" no está completamente esclarecido, pero es fácil suponer que está muy relacionada con la vigilancia anti-tumoral que lleva a cabo el sistema inmunológico. Quizás la falta de producción de LT en pacientes con inmunodeficiencias pueda explicar la alta incidencia de neoplasias en esos pacientes. Así por ejemplo, ya ha sido demostrado que pacientes que sufren de la enfermedad de Hodgkin y del síndrome de Wiskott Aldrich, poseen linfocitos que no son capaces de producir la linfotoxina después de ser estimulados por antígenos o por mitógenos.

INTERFERON

El interferón fué descrito por primera vez por Isaacs y Linderman en 1957 (22) al observar que las células de muchas especies de animales al ser invadidas por un virus sintetizaban moléculas capaces de interferir en la replicación viral. Muy pronto fué posible observar que la actividad antiviral del interferón no se limitaba al virus que inducía su síntesis si no que, dentro de la misma especie animal se extendía su acción de interferencia a todos los virus con RNA y DNA conocidos.

También se ha demostrado que los linfocitos pueden producir el interferón ante estímulos virales y otros estímulos no relacionados con los virus, pero a diferencia de las otras linfokinas la producción del interferón por linfocitos requiere la presencia del suero.

El interferón que producen los linfocitos ante un estímulo antigénico específico se le denomina "Interferón Inmune", pero igualmente lo producen los linfocitos T y B ante estímulos mitogénicos como la Fitohemaglutinina y la Conavalina A. A este tipo de interferón se le denomina tipo II para diferenciarlo del que sintetizan los linfocitos T y B, como resultado de una infección viral el cual es denominado tipo I. Esta diferenciación fué propuesta por primera vez por Youngner y Salvin en 1973 (54).

La mayoría de los estudios realizados con interferón se han hecho con el producido por fibroblastos de la piel del prepucio del niño recién nacido a los que se les practicaba la circuncisión, y luego de cultivados "in vitro" son infectados por el virus de la estomatitis vesicular bovina.

Para determinar la actividad del interferón se acostumbra tomar porciones diluidas de sobrenadantes que contienen interferón y de sobrenadantes que sirven de control y se vierten sobre la superficie de los cultivos de fibroblastos en monocapas, y se incuban a 37°C durante 24 horas.

Luego de lavarse las monocapas son inoculadas con el virus, y luego son recubiertas con agar durante 48 horas de incubación para permitir el desarrollo de placas. Se toma como índice o título de la actividad del interferón la dilución del sobrenadante que origina una reducción del 50% del número de placas virales en el cultivo de fibroblastos.

El interferón tipo I es estable a pH 4-10, y estable durante almacenamiento de 4°C durante 24 horas; es resistente a las enzimas de DNasa y RNasa, pero es destruído por la tripsina. Su efecto biológico es específico, es decir, el interferón humano no protege células de otras especies animales contra una infección viral.

Epstein y cols. demostraron en 1974⁽¹¹⁾, que tanto los linfocitos humanos T y B son capaces de sintetizar interferón tipo II ante estímulos con mitógenos como la fitohemaglutinina y la fitolaca.

Además de las propiedades de protección anti-viral del interferón, se le han atribuido propiedades antiprotozoarias por Jahiehl en 1970⁽²³⁾.

De Maeyer y cols.⁽⁹⁾ encontraron en el interferón la propiedad de inhibir la síntesis de DNA en células normales.

Ion Gresser, un norteamericano, trabajando en el Institut de Recherches Scientifiques Sur Le Cancer en Villejuif, Francia, demostró por primera vez el efecto anti-tumoral del interferón al proteger ratones contra un virus causante de leucemia en ratones en 1971⁽¹⁷⁾. En su experimento, el interferón inhibía la multiplicación de las células leucémicas. El interferón inmune de los linfocitos es 20 veces más potente que el tipo I como agente anti-tumoral.

Podría el interferón emplearse en terapia contra el cáncer?. La respuesta parece ser sí. A diferencia de los tratamientos comúnmente usados en la terapia del cáncer el interferón no produce aparentes daños a las células normales, pero desde el punto de vista práctico las cantidades de interferón que se pueden aislar son tan pequeñas que su uso como agente de inmunoterapia lo hace sumamente costoso.

El interferón se ha de convertir en una mina de oro. La mayoría del interferón disponible en la actualidad proviene de la Cruz Roja Finlandesa y de los Laboratorios Centrales de Salud Pública en Helsinki, en donde se está extrayendo el interferón a partir de leucocitos separados de la sangre de donantes del Banco de Sangre en Helsinki. Para 1979 la producción de interferón fué apenas de 400 miligramos obtenidos después de procesar 45.000 litros de sangre humana. El esfuerzo es tan inmenso que se estima que el costo de esos 400 miligramos fué aproximadamente 90.000 dólares; y de acuerdo a los datos suministrados a la prensa por Frank Rausche, Director de Investigaciones de la Sociedad Americana de Cáncer, hoy en día el costo de tratamientos con interferón en pacientes ubicados dentro de los grupos tratados experimentalmente, es de 150 dólares por día, y un tratamiento completo puede llegar a 30.000 dólares y más.

Sin embargo existe la esperanza de que ocurra algo similar a lo sucedido con la penicilina, después de su descubrimiento, la cual llegó a ser contrabandeada como oro durante la Segunda Guerra Mundial, y ahora cuesta apenas unos centavos. A diferencia de la penicilina para la cual tardaron muchos años antes de averiguar su mecanismo de acción, me atrevo a pre-

decir que con el interferón no se tardarán ni una cuarta parte de ese período de años para averiguar su forma de actuar.

La mayoría del crédito de que contemos aunque sea con unos miligramos del producto, se debe al virólogo finlandés Kari Cantell, quien orgullosamente confiesa que "el interferón ha sido su pasatiempo y principal interés en los últimos 20 años". Las facilidades para la obtención del interferón en sus laboratorios son verdaderamente impresionantes. El Dr. Cantell dirige un piso completo en los Laboratorios Centrales de Salud Pública en Helsinki. Allí, Cantell trabaja con leucocitos separados de unos 400 litros de sangre diariamente obtenidos a través de la Cruz Roja Finlandesa en Helsinki y de otras ciudades finlandesas. Después de separar los leucocitos y regresar el plasma, eritrocitos y plaquetas al Banco de Sangre, cultiva los leucocitos para luego infectarlos con el virus Sendai, de la familia de los virus Influenza, pero que no es patógeno para el humano, y después de incubarlos por 24 horas a 37,5°C, obtiene los sobrenadantes ricos en interferón. Pero en ese sobrenadante, el interferón solo representa el 0.1% de las sustancias allí presentes, de modo que el proceso de purificación del interferón es lo que hace costoso su obtención. Sin embargo, el año pasado, sus laboratorios fueron capaces de producir 400 billones de unidades de interferón (1 unidad equivale a la cantidad de interferón que dá un 50% de protección a las células cultivadas en placas e infectadas con virus).

Los trabajos de Gresser en Francia, inspiraron al Dr. Hans Strander del Instituto Karolinska de Estocolmo, quien en 1968 había estado trabajando con Cantell en Helsinki, y utilizando interferón de los laboratorios de Cantell, empezó a usarlo en niños con osteosarcoma después que eran amputados, y obtuvo una sobrevivencia de más del 50% en los niños tratados, a diferencia de los no tratados que no alcanzaban a un 20% de sobrevivencia.

Los resultados obtenidos por Strander entusiasmaron al Dr. Jordan Gutterman del Instituto de Tumores y Hospital Anderson en Houston, quien después de observar de cerca los trabajos de Strander se hizo converso y creyente del interferón, considerándolo como arma potente contra el cáncer. El Dr. Gutterman a su vez logró convencer al Dr. Frank Rauscher, Director de Investigación de la Sociedad Americana del Cáncer en USA, y éste envió un equipo de investigadores a Suecia a observar los trabajos de Strander, y después de obtener los reportes documentados de la gran potencialidad del interferón como armamento de inmunoterapia logró que los Institutos Nacionales de Cáncer aumentaran el financiamiento para la investigación sobre interferón a un millón de dólares anuales.

En 1978, la Sociedad Americana del Cáncer empezó el financiamiento de un ambicioso proyecto de investigación, por la cantidad de 2 millones de dólares distribuídos entre 10 grandes centros de investigación, siendo el Anderson Hospital and Tumor Institute en Houston, el centro piloto de operaciones. Sin embargo, solo un número escaso de pacientes pueden llenar los requisitos exigidos estrictamente en el protocolo de investigación. Por ejemplo, los pacientes con cáncer de mama pueden entrar en el programa de tratamiento con interferón, solamente si la cirugía y la radioterapia no han podido detener la enfermedad.

Los pacientes con mieloma y con algunos tipos de linfoma también son aceptados en el programa, solamente después que la terapia convencional anticancerosa ha fallado.

En el mes de Marzo de 1980 ya se empezaron a filtrar noticias a través de congresos médicos, de que los primeros resultados son muy prometedores. Y después que la Sociedad Americana del Cáncer dejó conocer algunos de los resultados, la compañía Searle & Co. anunció la construcción de una planta de 12 millones de dólares para producir interferón, y cuando la firma suiza Biogen, SA, anunció haber logrado éxito con técnicas de recombinación genética con ADN de la bacteria *E. Coli* con las cuales se lograba sintetizar interferón por la bacteria misma, otras firmas farmacéuticas anunciaron que se iban a montar en el tren del interferón; así que después del éxito obtenido por el biólogo molecular suizo Charles Weissmann con las técnicas de recombinación genética, los laboratorios Abbott, Warner-Lambert Co. y Merck & Co., empezaron los preparativos para aplicar la técnica a una escala industrial. Parece pues, que el interferón, al igual que la penicilina, ha de producir una revolución en la industria farmacéutica.

MONOKINAS

En la introducción de esta revisión, hacíamos la observación de que existían otras sustancias mediadoras que eran secretadas por otras células diferentes a los linfocitos. A ese tipo de sustancias liberadas por monocitos y macrófagos vamos a denominarlas monokinas. Diversos autores, Bach y cols. en 1970⁽¹⁾, Hoffman y Dutton en 1971⁽²⁰⁾, Gery y cols. en 1971⁽¹³⁾, Erb y Feldman en 1975⁽¹²⁾, Wood y Cameron en 1975⁽⁵³⁾, han descrito la existencia de sustancias que pueden reemplazar en forma efectiva la función de los macrófagos. Recientemente, Hoessli y cols. en 1977⁽²¹⁾, lograron identificar la actividad de una sustancia que había sido identificada previamente por Gery y cols. en 1971⁽¹³⁾ como factor activador de linfocitos (LAF) en sobrenadantes de macrófagos peritoneales. Este factor LAF no tiene poder mitógeno, pero es capaz de hacer aumen-

tar la síntesis de DNA por linfocitos previamente estimulados por antígenos o mitógenos. La acción del factor LAF de los macrófagos parece ser mediatizada por la entrada de Ca^{++} y un aumento de GMP cíclico en linfocitos estimulados por fitohemaglutinina, como lo demostró Katz en 1978 (25).

ABSTRACT

Lymphokines: determining molecules of immunity. *Serrano H. (Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado Postal 526. Maracaibo 4001-A. Venezuela). Invest Clín 21(3): 211-234, 1980.*— There is very little information regarding the chemical nature of the majority of the lymphokines. Therefore, there is an urgent need to develop more biochemical and immunochemical techniques that allow a better study of these substances in order to determine more precisely the biological function of each lymphokine. Besides the diagnostic importance that it might lead to, there is the therapeutic potential that they might offer such as it is happening with the revolution interferon has caused during the last two years. When the CIBA Foundation organized a symposium on Cellular Aspects of Immunity in Chantilly in 1959, the pioneers of the present immunology met there: Sir MacFarlane Burnet, Frank Dixon, Robert Good, Pierre Grabar, J.H. Humphrey, H. Sherwood Lawrence, Peter Medawar and P. Miescher among others; only one lymphokine was known, transfer factor, and at that moment, professor Lawrence spoke of lymphocytes transfer factor as a microsomal machinery for antibodies and that transfer factor was released from the microsomal structure. He was then another pioneer of molecular biology as well as a pioneer of present immunology. Twenty one years later, we know 29-30 different effects provoked by lymphokines. In other words, more than one lymphokine each year has been identified or discovered, and one of them, has turn into a possible gold mine, bringing about a revolution in Medicine and Biology, greater than the one produced by penicillin. It will be no surprise that any of the other 30 lymphokines becomes soon a diamond mine.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— BACH FH, ALTER S, SOLLIDAY S, ZOSHKE DC, JANIS M: Lymphocyte reactivity in vitro. III. Soluble reconstituting factor permitting response of purified lymphocytes. *Cell Immunol* 1: 219-227, 1970.
- 2— BEARDER JD, III, THOR DE, COLTMAN CA, Jr: Adjunctive transfer factor in osteogenic sarcoma: I. Clinical implications of chemotherapy and immunotherapy. In: *Transfer factor. Basic properties*

and clinical applications. p 553-561. Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. Academic Press, Inc., New York, 1976.

- 3- BENDTZEN K : Some physicochemical properties of human leucocyte migration inhibitory factor (LIF). Evidence for the participation of a reactive serine in the LIF molecule. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect C* 84: 471-476, 1976.
- 4- BENDTZEN K: Biological properties of lymphokines. *Allergy* 33: 105-119, 1978.
- 5- BUKOWSKY RM, DEODHAR S, HEWLETT JS: Immunotherapy of human neoplasias with transfer factor. In: *Transfer factor. Basic properties and clinical applications.* Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. p 543-551. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 6- GATANZARO A, SPITTER L: Clinical and immunological results of transfer factor therapy in coccidioidomycosis. In: *Transfer factor. Basic properties and clinical applications.* Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. p 477-491. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 7- COZINE WS, STANFIELDS AB, STEPHENS CAL, PARSONS JL, HOLBROOK JP, STRONG JS, WONGSRI C, MAZUR MT, RAYMOND LN: Transfer factor immunotherapy of rheumatoid arthritis. In: *Transfer factor. Basic properties and clinical applications.* Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds, p 617-622. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 8- DAVID JR: A brief review of macrophage activation by lymphocyte mediators. p 143-153. Raven press, New York, 1975.
- 9- DE MAEYER E, DE MAEYER-GUIGNARD J, MONTAGNIER I: Double-stranded RNA from rat liver induces interferon in rat cells. *Nature* 229: 109-110, 1971.
- 10- DUMONDE DC, WOLSTENCROFT RA, PANAYI GS, MATTHEW M, MORLEY J, HOWSON WT: Lymphokines: non antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* 224: 38-42, 1969.
- 11- EPSTEIN LB, KRETH HW, HERZENBERG LA: Fluorescence activated cell sorting of human T and B lymphocytes. II. Identification of the cell type responsible for interferon production and cell proliferation on the response to mitogens. *Cell Immunol* 12: 407-421, 1974.

- 12- ERB P, FELDMANN M: The role of macrophages in the generation of T-helper cells. I. The requirement for macrophage in helper cell induction and characteristics of the macrophage-T cell interaction. *Cell Immunol* 19: 356-367, 1975.
- 13- GERY I, GERSHON RK, WAKSMAN BH: Potentiation of cultured mouse thymocytes responses by factor released by perypheral leucocytes. *J Immunol* 107: 1778-1780, 1971.
- 14- GORDON J, MACLEAN LD: A Lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. *Nature* 208: 795-796, 1965.
- 15- GRANGER GA, WILLIAMS TW: Lymphocyte cytotoxicity in vitro : activation and release of cytotoxic factor. *Nature* 218: 1253-1254, 1968.
- 16- GRAYBILL JR, ELLENBOGEN C, DROSSMAN D, KAPLAN P, THOR D: Transfer factor therapy of disseminated histoplasmosis. In: Transfer factor. Basic properties and clinical applications. Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. p 509-514. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 17- GRESSER I, THOMAS MT, BROUTY-BOYE D: Effect of interferon treatment of L1210 cells in vitro on tumour and colony formation. *Nature* 231: 20-21, 1971.
- 18- HASTINGS RC, MORALES MJ, SHARMON EJ, JACOBSON RR: Preliminary results on the safety and efficacy of transfer factor in leprosy. In: Transfer factor. Basic properties and clinical applications. Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. p 465-474. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 19- HISERODOT JC, GRANGER GA: Inhibition of human lymphocyte-mediated mitogen-induced cytotoxicity of murine L-929 cells by heterologous anti human lymphotoxin antisera in vitro. *J Immunol* 119: 374-380, 1977.
- 20- HOFFMANN M, DUTTON RW: Immune response restoration with macrophage culture supernatants. *Science* 172: 1047-1048, 1971.
- 21- HOESSLI DC, JONES AP, WAKSMAN BH: Potentiation of the T lymphocyte response to mitogen. IV. Serum-free production and testing of macrophage soluble products. *Cell Immunol* 30: 310-320, 1977.
- 22- ISAACS A, LINDERMAN J: Virus interference. I. The Interferon. *Proc Roy Soc (London) Ser B* 147: 258-267, 1957.

- 23- JAHIEL RI, VILCEK J, NUSSENZWEIG RR: Exogenous interferon protects mice against *Plasmodium berghei* malaria. *Nature* (London) 227: 1350-1351, 1970.
- 24- JEGASOTHY BV, PACHNER AR, WAKSMAN BH: Cytotoxin inhibition of DNA synthesis: effect of cyclic adenosine monophosphate in lymphocytes. *Science* 193: 1260-1262, 1976.
- 25- KATZ SP, KIERSZENBAUM F, WAKSMAN BH: Mechanisms of action of "lymphocyte-activating factor" (LAF). III. Evidence that LAF acts on stimulated lymphocytes by raising cyclic GMP in G₁. *J Immunol* 121: 2386-2391, 1978.
- 26- KIRKPATRICK CH, GALLIN JI: Suppression of cellular immune responses following transfer factor: report of a case. *Cell Immunol* 15: 470-474, 1975.
- 27- LAWRENCE HS: Some biological and immunological properties of transfer factor. In: *CIBA Symposium on Cellular Aspects of Immunity*. Wolstenholme GEW, O'Connor M, eds. p 243-279. Little, Brown and Company, Boston, 1959.
- 28- LITTMAN BH, ROCKLIN RE, PARKMAN R, DAVID JR: Combination transfer factor-Amphotericin B therapy in a case of chronic mucocutaneous candidiasis: a controlled study. In: *Transfer factor. Basic properties and clinical applications*. Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. p 495-501. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 29- LITTMAN BH: Human lymphocyte mitogen factor (LMF): Cooperation between lymphocytes subpopulations. *Fed Proc* 36: 1307-1308, 1977.
- 30- MOONEY JJ, WAKSMAN BH: Activation of normal rabbit macrophage monolayers by supernatants of antigen stimulated lymphocytes. *J Immunol* 105: 1138-1145, 1970.
- 31- NATHAN CF, KARNOVSKY ML, DAVID JR: Alterations of macrophage function by mediators from lymphocytes. *J Exp Med* 133: 1356-1376, 1971.
- 32- NATHAN CF, REMOLD HG, DAVID JR: Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J Exp Med* 137: 275-290, 1973.
- 33- O'BRIEN FF, GALDABIN JJ: Case records of the Massachusetts General Hospital. *N Engl J Med* 293: 443-448, 1975.

- 34- PICKEL K, HÄMMERLING O, HOFFMAN MK: Ly phenotype of T-cells releasing T-cell replacing factor. *Nature* 264: 72, 1976.
- 35- PIERCE CW, TADEKUMA T: Non-antigen specific suppressor T-cell factors: an overview? In: *Progress in Immunology*. III. Mandel TE, Cheers C, Hoskings CS, McKenzie IFC, Nossal GJV, eds. p 405-412. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1977.
- 36- PLATZ P, JERSLID C, THOMSEN M, SVEJGAARD A: Transfer factor treatment of patients with multiple sclerosis. II. Immunological parameters in long-term clinical trial. In: *Transfer factor. Basic properties and clinical applications*. Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds. p 649-662. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 37- RAMSIER H; Leucotactic factor elaborated by mixtures of genetically dissimilar cells. *Science* 157: 554-556, 1967.
- 38- REMOLD HG: Requirement for a α -L-fucose on the macrophage membrane receptor for MIF. *J Exp Med* 138: 1065-1076, 1973.
- 39- ROCKLIN RE, LEWIS EL, DAVID JR: In vitro evidence for cellular hypersensitivity to glomerular-basement membrane antigens in human glomerulonephritis. *N Engl J Med* 283: 497-501, 1970.
- 40- ROCKLIN RE, SHEREMATA W, FELDMAN R, KIES MW, DAVID JR: The Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. In vitro responses to nervous-tissue antigens. *N Engl J Med* 284: 803-808, 1971.
- 41- ROCKLIN RE: Product of activated lymphocytes: Leukocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF). *J Immunol* 112: 1461-1466, 1974.
- 42- ROCKLIN RE, MACDERMOTT RP, CHESS L, SCHLOSSMAN SF, DAVID JR: Studies on mediator production by highly purified human T and B lymphocytes. *J Exp Med* 140: 1303-1316, 1974.
- 43- ROCKLIN RE: Products of activated lymphocytes. In: *Clinical Immunobiology*. Bach FH, Good RA, eds. p 195-220. Academic Press, Inc., New York, 1976.
- 44- ROCKLIN RE, ROSENTHAL AS: Evidence that human leukocyte inhibitory factor (LIF) is an esterase. *J Immunol* 119: 249-252, 1977.
- 45- RUDDLE NH, WAKSMAN BH: Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. I. Characterization of the phenomenon. *J Exp Med* 128: 1237-1254, 1968.

- 46- SCHIMPLE A, WECKER E, HUBNER L, HUNING T, MÜLLER G: Properties and mode of action of T-cell replacing factor (TRF). In: Progress in Immunology. III. Mandel TE, Cheers C, Hosking CS, McKenzie IFC, Nossal GJV, eds., p 397-404. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1977.
 - 47- SMITH RT, BAUSCHER JAC, ADLER WM: Studies of an inhibitor of DNA synthesis and a non specific mitogen elaborated by human lymphoblasts. Amer J Pathol 60: 495-504, 1970.
 - 48- SNYDERMAN R, ALTMAN LC, FRANKEL A, BLAESE RM: Defective mononuclear leukocyte chemotaxis: a previously unrecognized immune dysfunction. Studies in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. Ann Intern Med 78: 509-513, 1973.
 - 49- SVEJCAR J, JOHANOVSKY J: Study of the mechanism of delayed type hypersensitivity in tissue culture. Proc Fifth Europ Congress Allergy. p 375-376. Scwabe & Co., eds. Basel, 1963.
 - 50- VALENTINE FT, LAWRENCE HS: Lymphocyte stimulation: transfer of cellular hypersensitivity to antigen in vitro. Science 165: 1014-1016, 1969.
 - 51- VETTO RM, BURGER DR, NOLTE JE, VANDENBARK AA: Transfer factor immunotherapy in cancer. In: Transfer factor. Basic properties and clinical applications. Ascher MS, Gottlieb AA, Kirkpatrick CH, eds., p 523-535. Academic Press, Inc., New York, 1976.
 - 52- WARD PA, REMOLD HG, DAVID JR: Leukotactic factor produced by sensitized lymphocytes. Science 163: 1079-1081, 1969.
 - 53- WOOD DD, CAMERON PM: Studies on the mechanism of the humoral response of murine spleen cultures by culture fluids from human monocytes. J Immunol 114: 1094-1100, 1975.
 - 54- YOUNGNER JS, SALVIN SB: Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. J Immunol 111: 1914-1922, 1973.
-

- 29- SHULMAN J, BEN-HUR N, NEUMAN Z: Surgical complications of circumcision. Am J Dis Child 107: 149-154, 1964.
 - 30- TALARICO RD, JASAITIS JE: Concealed penis, a complication of neonatal circumcision. J Urol 110: 732-733, 1973.
 - 31- TRIER WC, DRACH GW: Concealed penis, another complication of circumcision. Am J Dis Child 125: 276-277, 1973.
 - 32- WEISS CH: Routine non-ritual circumcision in infancy. Clin Pediat 3: 560-563, 1964.
 - 33- YELLEN HS: Bloodless circumcision of the newborn. Amer J Obstet 30: 146, 1935.
 - 34- ZAVALETA DE, MARINO E: Prepuce plastic operation (Enrique Finochietto's method for phimosis. Int Surg 46: 97-100, 1966.
-