

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**ESTUDIO DEL EXTRACTO DIALIZABLE LEUCOCITARIO**

**(FACTOR DE TRANSFERENCIA)**

**EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE SALMONELOSIS MURINA**

**Fase 1**

TESIS QUE PRESENTA:

**DANIELA JAZMÍN LÓPEZ ORTIZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN**

**PEDIATRÍA MÉDICA**

**TUTOR DE TESIS:**

**DR VICTOR RAFAEL CORIA JIMÉNEZ**

**Laboratorio de Bacteriología Experimental, INP**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	3
2. Antecedentes.....	5
3. Justificación.....	16
4. Objetivo General.....	18
5. Objetivos Específicos.....	18
6. Hipótesis.....	18
7. Clasificación del Proyecto.....	18
8. Material y Métodos.....	19
9. Ética.....	21
10. Resultados.....	21
11. Discusión.....	22
12. Bibliografía.....	24

## **Resumen**

A pesar del empleo amplio del Factor de Transferencia (FT) en la terapéutica de enfermedades relacionadas con defectos en los mecanismos de modulación de la respuesta inmune, hasta la fecha no ha sido posible identificar con precisión a las moléculas responsables de su actividad como regulador y potenciador de los mecanismos inmunológicos. Esta falta de identificación se debe en buena medida a que no se tiene un modelo experimental sensible, reproducible, que permita el estudio, el análisis y la evaluación de cada una de las moléculas que se encuentran en los extractos dializables de leucocitos.

El modelo de Salmonelosis murina ha sido ampliamente utilizado para el análisis de la respuesta inmune frente a infecciones bacterianas pues permite estudiar los sistemas de modulación de la respuesta inmune frente a la agresión del parásito y se ha demostrado que puede ser utilizado para estudiar el evento de maduración del sistema inmunológico.

En el presente protocolo se empleó el modelo murino de infección por *Salmonella* B con el objetivo de determinar la posible actividad inmunomoduladora del FT, identificar los posibles blancos de acción y evaluar la utilidad de este modelo para la identificación de los principios activos del FT y el análisis de la maduración de la respuesta inmune murina.

### Objetivo general:

Estudiar la actividad inmunomoduladora de los Extractos Dializables de Leucocitos (DLEs por sus siglas en inglés) utilizando un modelo experimental de infección con *Salmonella* B en ratones neonatos.

Objetivo específico:

1. Establecer la infección experimental por *Salmonella B* en ratones neonatos.

Material y métodos. Utilizando cultivos puros de *Salmonella B* se inocularon ratones neonatos para determinar la dosis letal al 50% de la población (DL<sub>50%</sub>) mediante el método de Reed y Muench..

Lugar y fecha de realización.

El protocolo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, en el Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y en la Unidad de Producción y Experimentación en Animales de Laboratorio de la UAM-Xochimilco (UPEAL-UAMX).

## **Antecedentes**

### El Factor de Transferencia y los Extractos Dializables de Leucocitos

El Factor de Transferencia (FT) es un derivado de leucocitos descrito en los años 50 por su capacidad de transferir hipersensibilidad cutánea tardía o DTH (por sus siglas en inglés *Delayed - Type Hypersensitivity*) entre humanos sanos (1-2). El extracto dializable leucocitario tiene la habilidad de transferir inmunidad celular específica de un donador inmune a un receptor no inmune mediante varias moléculas que pueden actuar de forma específica o no específica ante un antígeno (2-3). En 1955 Lawrence y cols. demostraron que se podría transferir la DTH utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 mililitros de sangre total. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó “factor de transferencia” por su capacidad de transferir hipersensibilidad retardada hacia un antígeno específico.

Lawrence utilizó lisados de leucocitos de donadores que presentaban intradermorreacciones positivas a antígenos tales como coccidioidina, toxoide diftérico, proteína M del estreptococo y PPD (derivado proteico purificado de *Mycobacterium*). En todos los casos los receptores tenían intradermorreacciones negativas a estos antígenos; 24 horas después de haber recibido el FT, los receptores presentaron intradermorreacciones positivas a los antígenos que fueron reconocidos por los donadores cuyo efecto era específico al antígeno (4). Este descubrimiento llamó poco la atención pues en la época se creía que las únicas moléculas involucradas en el fenómeno inmunológico eran los anticuerpos.

Hoy sabemos que la preparación a la que originalmente se le conoció como Factor de Transferencia es en realidad una mezcla de moléculas denominada “Extracto Dializable de Leucocitos” o DLEs (*Dialyzable Leukocyte Extract*), que contiene al menos 200 moléculas diferentes con pesos moleculares de 1 a 20 kiloDaltones (kDa) (2, 5-8). Este factor se obtiene mediante diversos métodos a partir de fuentes linfoides de humano y animal, como células de

sangre periférica, bazo, ganglios linfáticos y calostro (8). La fuente de obtención de FT más difundida es la obtenida a partir de leucocitos de sangre periférica, que son lisados por congelación y descongelación, se colocan en una bolsa de diálisis excluyendo moléculas mayores a 10 o 12 kDa y el dializado es el factor de transferencia. El DLE puede conservarse a -20°C por varios años o si se liofiliza puede guardarse sin perder su actividad (9-10).

El descubrimiento del factor de transferencia y el factor inhibidor de migración leucocitaria dan lugar a la posibilidad de que las células inmunológicamente activas podrían comunicarse efectivamente entre sí mediante “mensajeros” solubles diferentes a las inmunoglobulinas (11).

Los DLEs contienen diversas especies moleculares y uno de los primeros en demostrarlo fue Sandler y cols., quienes en 1975 obtuvieron cuatro fracciones utilizando columnas de filtración en gel, dos con ascorbato, serotonina y un elemento no identificado con actividad colinérgica (12). Lo anterior confirmó lo que desde finales de los 60's suponía Kirkpatrick: existía en los DLEs una mezcla heterogénea de moléculas con actividad biológica diversa (13). Inicialmente se pensaba que las sustancias responsables de transferir la hipersensibilidad cutánea tardía en los extractos de leucocitos eran dializables, orcinol positivos, Biuret positivo, Dnasa – Rnasa – tripsina resistentes y podían ser eluidos como moléculas menores a 10 kDa (11).

El factor de transferencia se comporta como un conjunto de citocinas polipeptídicas, es dependiente y específico a un antígeno, presente en los extractos dializables de leucocitos y tejido linfoide secundario de individuos sensibilizados (1). Wilson y Fudenberg, a principios de los años 80s demostraron que los DLEs producían dos efectos; uno dependiente del antígeno, mediado por los FT, y otro independiente del antígeno (9, 14).

Se han dividido entonces, de manera general, a los componentes de los DLEs en dos fracciones principales:

- a) **Fracción específica o dependiente de antígeno:** Corresponde a moléculas de naturaleza peptídica con un peso molecular de 3.5 a 6 kDa, entre las que encontramos los factores de transferencia, identificados químicamente como péptidos pequeños con capacidad de transferir DTH. Esta fracción contiene diferentes FTs que corresponden a la suma de las experiencias inmunes del individuo de donde se ha obtenido el extracto y aumenta la respuesta contra un antígeno determinado. Algunas moléculas comprendidas en esta fracción ya han sido analizadas y secuenciadas parcialmente en algunas especies y son las responsables de conferir inmunidad de un sujeto sano sensibilizado a un enfermo con la misma enfermedad y tener efecto terapéutico favorable (2, 9, 10,12).
- b) **Fracción no específica o independiente de antígeno:** Comprende moléculas menores de 3.5 kDa y mayores de 6 kDa, incrementan las actividades del sistema inmunológico como coadyuvantes inespecíficos, por ejemplo, las prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, hipoxantina, serotonina, bradicinina, nucleótidos cíclicos, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocitos y factores inmovilizadores de neutrófilo (10-11, 14). Gottlieb definió en 1995 como IMREG a la fracción menor de 3.5 kDa, inmunomoduladora en diversos ensayos *in vitro*, identificando dentro de ella a una molécula inmunosupresora de 1 kDa denominada LSF por sus siglas en inglés *Lymphocytic Supresor Factor* (15-16).



Una prueba directa de inhibición en la migración leucocitaria con FT ha revelado dos actividades opuestas, ambas específicas a un antígeno, presentes en el mismo dializado. La primera, el “factor inductor”, tiene función “cooperadora”: convirtiendo células no inmunes a un estado de actividad específica a antígeno y dependiente de la dosis, inhibiendo la migración en presencia de un antígeno determinado. La segunda es el “factor supresor” que anula la respuesta de las células inmunes en presencia de un antígeno determinado e invalida la inhibición anticipada de la migración. (11, 17).

Se sugiere que la actividad de los DLEs específica para un antígeno se debe al factor inductor, presente en fracciones dializadas mayores de 3.5 kDa y menores de 12 kDa, confiriendo un estado de actividad inmune a las células por su capacidad de unirse a antígenos. La falla en la función de este factor por sí solo como superantígeno o en conjunto a anticuerpos específicos con títulos altos excluye la presencia de fragmentos antigénicos dializados como fuente de dicha especificidad. Puede considerarse que el factor consta de fragmentos proteolíticos dializables de un receptor de antígeno de células T cooperadoras (Tc) y confiere actividad inmune a poblaciones no inmunológicas de células T por su capacidad de unirse a antígenos. La selectividad del factor inductor a células T y macrófagos sugiere el incremento de inmunidad celular mediante una red inmunorreguladora, sin embargo aún no es del todo clara la secuencia de eventos siguientes a la unión del factor inductor a las células y macrófagos que desencadena la inducción o incremento de respuesta inmune celular *in vitro*. (11)

El factor supresor específico para un antígeno se encuentra en el mismo dializado de moléculas y existe otro no específico en fragmentos menores a 3.5 kDa. Estudios *in vitro* revelan que el factor supresor compite con antígenos específicos por los sitios de unión en las células T cooperadoras. Si las células inmunes se contactaran inicialmente con el factor supresor y posteriormente con el antígeno, la respuesta al mismo sería suprimida. Si por el contrario se unieran primero con el antígeno y posteriormente con el factor supresor no habría supresión alguna y las células se inhibirían en su migración. Sin embargo, si las células inmunes fueran

unidas simultáneamente con el antígeno y el factor supresor, entonces la respuesta al antígeno se vería suprimida en un grado menor a si el factor supresor se conjuntara antes que el antígeno. El inhibidor del factor inductor específico y el factor supresor antígeno específico pueden ser sólo manifestaciones diferentes de la misma actividad en los dializados, sin embargo su identidad no es del todo clara. El factor supresor podría inhibir la respuesta de células inmunes a un antígeno específico, probablemente por competencia por el receptor en células respondedoras bloqueando la respuesta sólo si se agrega antes o simultáneamente al antígeno, pero no después de que las células han sido expuestas al mismo (11).

Kirkpatrick demostró que el FT era capaz de unirse específicamente al antígeno que le daba origen; para ello empleó DLE obtenido de ratones sensibilizados con ferritina e incubó los dializados en superficies plásticas cubiertas con el antígeno observando que al recuperar el sobrenadante éste perdía su capacidad de transferencia de DTH (18). Esta actividad podía ser recuperada eliminando el sobrenadante anterior y adicionando urea 8M o acetonitrilo a las placas. El fundamento de esta técnica es utilizado hoy en día para la purificación de FT específico pero la técnica se dificulta pues se requieren lotes grandes de DLEs para el rendimiento de la purificación (9).

El bajo peso molecular del FT ha dificultado el conocimiento completo de su estructura. Se está progresando en la determinación de la naturaleza molecular del factor de transferencia. De acuerdo a una prueba de DTH en ratones, el factor de transferencia murino reactivo a antígeno tiene un peso molecular entre 4.9 y 5.5 kDa, compuesto por 40 a 50 aminoácidos con una secuencia de síntesis de decapeptidos que bloquean la adquisición de hipersensibilidad tardía en ratones inyectados con la molécula completa del factor de transferencia que no afecta la transferencia de hipersensibilidad tardía por si misma. Esta secuencia de decapeptidos (MXLLYAQDL/VEDN) está presente en todas las preparaciones de factor de transferencia estudiadas. Moléculas tan pequeñas como  $10^{-13}$  mol son capaces de conferir una reacción específica para un antígeno en el receptor murino. Kirkpatrick describió una secuencia

consensual de 14 aminoácidos en siete diferentes FT murinos purificados a partir de extractos dializables de leucocitos murinos y bovinos (13). Estos péptidos utilizados aisladamente no fueron capaces de transferir la DTH específica al antígeno original, pero en conjunto con los DLEs inhibieron la capacidad de transferencia de respuesta inmune celular que mostraron los DLEs crudos, probablemente porque los péptidos sintéticos se unen al receptor original del FT. Se están desarrollando métodos analíticos para especificar la potencia del factor de transferencia murino en términos de unidades de actividad específica, con la finalidad de que puedan ser aplicables en la caracterización del factor de transferencia humano y su uso en ensayos clínicos (1,9).

Se han desarrollado diversos ensayos para estudiar los efectos de los DLEs sobre células linfoides y para caracterizar a los componentes biológicamente activos de esta preparación. Según el modelo o el padecimiento en el que se apliquen, los DLEs ocasionan diversos efectos inmunológicos. Son pocos los trabajos que estudian de manera individual las moléculas de FT, su naturaleza y su mecanismo de acción, debido a la complejidad para obtenerlas y purificarlas en cantidades adecuadas, por lo que la mayoría de los ensayos emplean los extractos completos que incluyen moléculas de hasta 12 kDa. Asimismo se presenta como un obstáculo metodológico la falta de un modelo animal experimental, que sea reproducible *in vitro* y que permita aclarar los cuestionamientos que se han ido desplegando, sobre todo lo asociado a efectos adyuvantes específicos y no específicos a un antígeno de la administración de FT *in vivo* (11).

Además de la transferencia de DTH, los DLEs tienen actividad en la respuesta inmune innata y adaptativa, actividad específica y no específica sobre la inmunidad celular y regulan el proceso inflamatorio, por lo que pueden actuar como inmunoestimulantes o inmunosupresores, confiriéndoles características de un inmunorregulador (11,13, 19). El mecanismo de acción de los DLEs no es completamente conocido, hay ensayos que reportan liberación de citocinas cuando las células sensibilizadas por FT se ponen en contacto con el antígeno, principalmente el interferón gamma (*INF $\gamma$* ) (17), que muestra entre sus efectos activar macrófagos, células natural

killers (NK) y linfocitos T cooperadores, células fundamentales para mecanismos efectores de la respuesta inmune celular. Otros estudios analizan el suero de los receptores tras el tratamiento con FT observando incrementos en moléculas circulantes de antígenos leucocitarios humanos (HLA-I) y del factor inhibidor de migración de macrófago, interleucinas (IL) 2 y 6, mientras que la concentración de IL-15 disminuye. Un reporte relacionado describe incrementos en IL-6 e IL-8. Estudios con células mononucleares *in vitro* demuestran producción de IL-8 y RANTES tras la exposición a preparaciones de FT (1). Adicionalmente, se ha descrito la capacidad de los DLEs de disminuir la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), incrementar la síntesis de IL-8 e IL-6, inducir la expresión de receptores tipo toll (TLR por sus siglas en inglés Toll Like Receptors) TLR2 y TLR4, así como las concentraciones de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) en leucocitos estimulados por extractos bacterianos, inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) e incrementar la presencia de células CD2+, CD4+, CD8+, células NK e incrementar el número de células apoptóticas en modelos *in vivo* (2, 6, 20-21).

Cada vez son más los grupos de investigadores que estudian las aplicaciones preventivas y terapéuticas de estas preparaciones mostrando efectos positivos en los estados de inmunodeficiencia adquirida y genética, cáncer asociado a virus e infecciones crónicas, choque séptico, enfermedades virales, fúngicas, bacterianas, micobacterianas, afecciones resistentes a farmacoterapia actual como tuberculosis, VIH, entre otros. Son de gran interés las potenciales condiciones subyacentes en la inmunidad del receptor que puedan influir en una respuesta clínica favorable (1, 8, 22-24). Induce mejoría en pacientes con padecimientos como herpes, psoriasis vulgar, infección combinada de citomegalovirus y Epstein Barr, coccidioidomicosis, candidiasis mucocutánea, infecciones virales en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) , virus de la varicela zoster, virus de la estomatitis aftosa recurrente, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, carcinoma de pulmón, sarcome osteogénico no metastático,

papiloma laríngeo, *Mycoplasma pneumoniae*, meningitis supurativa, cistitis crónica, tuberculosis pulmonar, sarcoidosis y diversas alergias entre otros (8).

La inmunopatogenia de la dermatitis atópica involucra alteraciones en inmunidad humoral clásica de enfermedades alérgicas y alteraciones en inmunidad celular y fagocitosis bajo un sustrato genético importante que favorece su expresión. El efecto inmunomodulador del FT en la dermatitis atópica se debe a su capacidad para “desbloquear” a los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular y virar la respuesta de las células cooperadoras de Th2 a Th1, con disminución de IL-4 y aumento de células CD4 como parte de la inmunomodulación, disminución de la síntesis exagerada de IgE y mayor expresión de marcadores de apoptosis en eosinófilos con mejoría clínica significativa. Al aumentar las concentraciones de células CD4 y CD8 se regularía también la estimulación policlonal por algunos microorganismos que actúan como superantígenos y contribuyen a la reagudización e inflamación crónica persistente (2).

Otra aplicación sería en situaciones de rechazo en trasplante de órganos y las complicaciones que resultan de la terapia inmunosupresora actual, produciendo *in vitro* factor supresor dializable específico para los antígenos HLA del prospecto donador del trasplante, el cual tendría la capacidad selectiva de bloquear la función de sólo subpoblaciones de células Tc sensibilizadas y reactivas hacia las células blanco del órgano transplantado (11).

Será importante entonces desarrollar pruebas de calidad controladas de modo que se pueda detallar la integridad del sistema de factor de transferencia humano en estados patológicos comparados con la normalidad y así poder crear estándares de calidad, potencia y acuerdos en la dosis requerida de las preparaciones del FT, con las especificaciones necesarias sobre la función celular y técnicas que puedan convertirse en ensayos biológicos estandarizados (1). En todo paciente candidato al FT debe realizarse un “perfil inmunológico” para evaluar inmunidad celular, humoral, fagocitosis y complemento: determinación de linfocitos T y subpoblaciones para diferenciar de células cooperadoras y citotóxicas; intradermorreacciones como PPD (proteína purificada y dializada de *M. tuberculosis*), candidina, varidasa (enzima de *S.*

*pyogenes*) y tricofitina en las cuales si el paciente resulta negativo para la mayoría de los antígenos indicará una posible alteración en la respuesta inmune por linfocitos T; determinación de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), complemento y la prueba de nitroazul de tetrazolio para mecanismos de muerte mediados por metabolitos del oxígeno (fagocitosis). De ser posible también realizar pruebas para determinación de citocinas y evaluar a la IL-2 y su receptor, IL 1, 4, 6 y 10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  para evaluar entre la participación de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2) de cuyo equilibrio depende la adecuada función del sistema inmunológico (10). El modelo murino de infección con *Salmonella enterica* permitirá avanzar en ambas direcciones: el estudio de los procesos infecciosos relacionados con la inmadurez inmunológica y el papel del FT como modulador y potenciador de la respuesta inmune.

#### El modelo murino de Salmonelosis.

Uno de los modelos experimentales más ampliamente utilizados para el estudio de los mecanismos inmunes es el modelo murino el cual permite el análisis detallado de cada uno de los factores del huésped y del parásito que participan en el inicio, desarrollo y modulación de la respuesta inmunológica (25)

El modelo murino ha sido ampliamente utilizado en el campo de la inmunología, y ha permitido el desarrollo de aproximaciones conceptuales y experimentales que han sido base de avances fundamentales en la comprensión de la respuesta inmune de los humanos. Una de las ventajas del empleo de este modelo es que existen en el mercado reactivos que nos permiten la identificación y manipulación de la gran mayoría de las moléculas que participan en la respuesta inmune, se tienen cepas manipuladas genéticamente para el estudio del efecto de mutaciones o defectos particulares y se ha mapeado el genoma completo del ratón (26).

En el caso que nos interesa, el modelo murino permite definir el papel de distintos factores del parásito como moduladores de los mecanismos de defensa del huésped, identificar a los

genes asociados a la virulencia y desarrollar modelos de regulación de los factores de virulencia de *Salmonella sp* que le permiten la supervivencia y adaptación al huésped colonizado (27-31).

En el caso del huésped, se han identificado factores asociados a la respuesta frente a la infección y sus mecanismos de regulación y el modelo murino ha permitido valorar las posibilidades de manipulación del huésped, del parásito y de ambos, con el propósito de realizar un análisis que permita el desarrollo posterior de sistemas de inmunodetección, terapéuticos y de inmunoprolifaxis (26-29, 32-35).

#### El modelo murino de inmadurez inmunológica.

Muchas especies de mamíferos al iniciar su vida extrauterina tienen inmadurez inmune, principalmente de la respuesta inmune celular, y en un lapso corto logran alcanzar un nivel de eficiencia semejante al del adulto joven. El ratón tiene esa situación y se ha demostrado que la sensibilidad a la infección por *Salmonella sp* disminuye con la edad, lo que hace a este modelo un sistema de estudio para analizar los mecanismos involucrados en la maduración de la respuesta inmune (36-37).

#### El modelo murino y el estudio de los DLEs.

Utilizando el modelo murino de infección por *Mycobacterium*, Estrada-Parra y col. han demostrado que el empleo de DLEs modifica sustancialmente el desarrollo de la infección, permitiendo una mayor tasa de supervivencia de los ratones infectados, un mejoramiento de sus niveles de expresión de citocinas Th-1, TNF $\alpha$  e iNOS y una mejor respuesta a la quimioterapia, lo que permite suponer que el FT actúa como un regulador y estimulador de los mecanismos de la respuesta inmune en el ratón (38). Así también el modelo murino ha permitido establecer la dosis, la vía de inoculación y la respuesta del huésped a la aplicación del FT (39). A pesar de las experiencias con el modelo, su utilización presenta problemas de bioseguridad por el uso de

*Mycobacterium* y por lo mismo requiere de instalaciones especiales para el mantenimiento de los huéspedes infectados.

Un aspecto interesante es la actividad antibactericida de los DLEs frente a Gram negativos y Gram positivos, lo que implica la presencia de blancos bacterianos o celulares inespecíficos y evidencia las posibilidades terapéuticas de este grupo de biomoléculas (40). En el estudio de las actividades biológicas del DLE ha resultado importante la aportación del grupo de Nuevo León, México, utilizando modelos bacterianos y extractos bovinos para el estudio de las actividades inmunomodulares del DLE y las aportaciones del grupo de Cuba en el empleo terapéutico del DLE y sus mecanismos moduladores, ambos empleando modelos de estimulación con lipopolisacáridos, ácidos teicoicos y peptidoglicanos bacterianos (20, 41-42).

Una meta importante ha sido el desarrollo de terapias dirigidas a la inhibición de la producción de TNFa, considerando que no pueden removerse por completo las citocinas pudiendo ser esto más dañino que benéfico ya que usualmente permiten una respuesta compensatoria del huésped, la remoción del TNFa y la IL-1 dejaría al huésped inmunosuprimido. Franco-Molina y cols. analizaron el choque endotóxico en modelo murino inducido por lipopolisacáridos de membrana (*LPS*) y la utilización de un DLE bovino (*bDLE*). Los efectos de la sepsis por Gram negativos pueden ser imitados por una infusión de endotoxinas con liberación de citocinas proinflamatorias, mediadores del lípidos y radicales libres, citocinas antiinflamatorias. El pretratamiento con *bDLE* a diferentes momentos no afectó ni la morbilidad ni la mortalidad inducida por la administración del *LPS* pero el postratamiento tras inyectar *LPS* disminuyeron la mortalidad. El tratamiento con *LPS* indujo la expresión de genes de citocinas: IL-10, IL-6 y TNFa, IL-1B, IL-12p40. Los resultados muestran que el *bDLE* da lugar a mayor supervivencia en el choque endotóxico inducido por *LPS* en modelo murino, modulando la expresión génica de citocinas proinflamatorias y sugiriendo que el *bDLE* es un agente terapéutico efectivo para patologías inflamatorias asociadas a una expresión desbalanceada de citocinas inflamatorias con en el choque séptico, artritis reumatoide y otras (3).



En los ensayos clínicos y terapéuticos sobre el factor de transferencia deben considerarse si las preparaciones son relativamente impuras (1). Comparando con otros “modificadores de la respuesta inmune” o “inmunomoduladores” el factor de transferencia presenta ventajas como su relativa facilidad de preparación, el ser dializable lo deja libre de microorganismos o antígenos de histocompatibilidad y los efectos secundarios respectivos. (10). Tal vez las respuestas clínicas favorables se deban a componentes no reactivos a antígenos en la preparación, o que sean dependientes de antígeno o sólo un resultado casual, relacionándose a moléculas similares a citocinas independientes de antígenos que actúan por sí mismos o en conjunto con componentes realmente reactivos a ellos (1).

La estandarización de formas o manifestaciones de una enfermedad y su severidad son requeridas, así como la especificación microbiológica del estado de infección en patologías crónicas. También deben convenirse criterios de inclusión y exclusión, criterios de pronóstico y dosificación del FT para estudios clínicos. Lo anterior requiere de pruebas de laboratorio con valor predictivo en pacientes de ingreso para elección y durante su monitorización inmunológica de la respuesta al tratamiento. Comprendiendo más sobre el mecanismo de acción en la salud y la enfermedad ayudará a identificar los desórdenes y los pacientes que son más probables de beneficiarse de la terapia con dicho factor (1).

### **Justificación**

Ha surgido gran interés acerca de las características, naturaleza, reactividad del antígeno y función inmunológica del factor de transferencia, principalmente sus potenciales aplicaciones clínicas en inmunoterapia e inmunodiagnóstico (1).

El recién nacido y los niños son susceptibles a las infecciones por agentes gastrointestinales tales como *Salmonella sp.*, el curso de estas infecciones en adultos es usualmente autolimitado, pero en neonatos puede progresar a una enfermedad sistémica

diseminada. Los mecanismos exactos de la susceptibilidad neonatal incrementada y el proceso que conduce al desarrollo de un proceso infeccioso usualmente controlado en los adultos permanecen esencialmente desconocidos. Existen hipótesis de que los mediadores protectores claves que están presentes en adultos pueden estar ausentes en neonatos como resultado de una inmadurez inmunológica.

Debido a que la susceptibilidad relacionada con la edad no es un proceso bien entendido, un modelo animal neonatal de infección bacteriana podría ayudar a avanzar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en este proceso. Existen evidencias experimentales de una susceptibilidad diferente a la infección experimental con *S. typhimurium* entre ratones inmaduros y ratones adultos, mencionándose como factores asociados a ésta la inmadurez intestinal, la presencia de flora diferente y la inmadurez inmunológica conocida del ratón neonato.

La infección de los ratones con *S. enterica* serovar *typhimurium* que causa una enfermedad semejante a la tifoidea humana es un modelo ideal. Ambos, respuesta del huésped y patogenicidad han sido estudiados, resultando en un sistema bien definido que es fácilmente adaptado para evaluar los pasos de maduración en el desarrollo de defensa efectiva del huésped.

La falta de un modelo experimental para el estudio de los mecanismos de acción del FT que nos permita la identificación precisa de los componentes activos de los DLEs, el estudio de los mecanismos de acción de estos componentes, de su papel como inmunorreguladores y de sus posibilidades reales en el tratamiento de patologías asociadas a defectos en la respuesta celular del huésped es una de las principales limitantes.

La mayoría de los ensayos clínicos de la terapia con FT utilizan dializados leucocitarios en crudo, que contienen proporciones variables de factor inductor y supresor. La meta es el incremento de la inmunidad celular, que podría estimularse con el enriquecimiento del factor inductor y la remoción del supresor en las preparaciones administradas del FT. En patologías con respuesta hiperinmune deletérea o situaciones clínicas con respuesta inmune indeseable la

administración del factor supresor antígeno específico podría estar indicada, como las alérgicas o atópicas, y autoinmunes como lupus (2).

### **Objetivo general**

Estudiar la actividad inmunomoduladora de los Extractos Dializables de Leucocitos (DLEs) utilizando un modelo experimental de infección con *Salmonella B* en ratones neonatos

### **Objetivo específico**

1. Establecer la infección experimental por *Salmonella B* en ratones neonatos.

### **Hipótesis**

“El modelo de infección experimental en ratones neonatos permite evaluar la actividad inmunopotenciadora del Extracto Dializable Leucocitario (Factor de Transferencia)”

### **Clasificación del proyecto**

Este es un proyecto comparativo, longitudinal, experimental, dentro del área biomédica.

## **Material y Métodos**

### **Parte 1.- Obtención del modelo de infección experimental en ratones neonatos**

#### **A) Obtención de los cultivos de Salmonella B**

Se obtuvieron cultivos puros de *Salmonella B* a partir de viales mantenidos a -70 °C. La cepa fue adquirida en el laboratorio de Bacteriología Experimental del INP.

Una vez comprobada la identidad del microorganismo a través de pruebas bioquímicas y serológicas siguiendo los criterios de la *American Society for Microbiology (ASM)* (35), se procedió a obtener cultivos bacterianos líquidos para lo cual se inocularon matraces Erlenmeyer de 1,000 mL conteniendo 500mL de caldo soya tripticaseína (CST), con asadas de cultivos puros y se incubaron en agitación a 37 °C durante 24-36 horas.

Transcurrido el periodo de incubación se obtuvo la biomasa bacteriana por centrifugación a 9,000 x g en una centrífuga Sorvall RC-5B, a 4 °C. La biomasa se resuspendió en 2 mL de regulador PBS, pH=6.8, se midió su absorbancia a 540 nm y se ajustó a  $A_{540}=2.0$  utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-640, absorbancia equivalente a  $2 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colonias / ml (UFC/ml). Esta fue la solución inicial para ajustar las concentraciones necesarias para la determinación de la  $DL_{50\%}$ .

#### **B) Determinación de la $DL_{50\%}$**

Se determinó la dosis de *Salmonella B* que matara al 50% de la población ( $DL_{50\%}$ ) en ratones lactantes y adultos de acuerdo a la metodología sugerida por Reed y Muench, sin modificaciones (44-45) empleando ratones de la cepa BALB/c de las siguientes edades.

Tabla 1.- Definición de los grupos de edad

<b>Ratones</b>	<b>Edad</b>
Lactantes	2 semanas
Adultos	6 semanas

Se formaron 7 grupos de 6 ratones cada uno tanto para lactantes como para adultos (*total 42 individuos de cada tipo*) y se inocularon con diferentes cantidades de bacterias según tabla anexa:

Tabla 2.- Grupos de ratones para la determinación de la DL<sub>50%</sub>

Grupo	Bacterias (UFC/mL)
1	$1 \times 10^1$
2	$1 \times 10^2$
3	$1 \times 10^3$
4	$1 \times 10^4$
5	$1 \times 10^5$
6	$1 \times 10^6$
7	$1 \times 10^7$

El inóculo se preparó a partir de un cultivo puro de *Salmonella B* en CST incubado por 24hrs a 37°C, posteriormente se prepararon tubos a las concentraciones bacterianas requeridas ajustando la turbidez de las suspensiones a la de los tubos de 0.5 al 6 del Nefelómetro de Mac Farland. Las suspensiones ajustadas se administraron oralmente, colocando el volumen total del inóculo en 10µL debajo de la lengua del ratón.

Se analizó la sobrevivencia de cada grupo y se determinó la DL<sub>50%</sub> para *Salmonella B* en las poblaciones de ratones neonatos y adultos. La determinación de la DL<sub>50%</sub> se realizó en tres ocasiones distintas. Dicha dosis calculada fue la empleada en la Parte 3 de este protocolo.

## **Ética**

Ya que en este protocolo se utilizaron animales de laboratorio, se requirió la autorización del Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio del INP (CICUAL) (46) y de la Comisión Ética para el Manejo de Animales de Laboratorio de la UAM-X. Para el manejo de los animales de experimentación se siguieron los procedimientos y normas de Unidad de Producción y Experimentación en Animales de Laboratorio (UPEAL-UAMX).

En el caso de los desechos generados por los roedores en experimentación, se siguieron las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999 (47).

Los roedores se mantuvieron en los espacios específicos para la observación de animales en experimentación designados por la UPEAL alojándose de manera colectiva de acuerdo al grupo de experimentación al que correspondieron, se mantuvieron a temperatura controlada, en periodos de luz-oscuridad de 12/12 horas con agua y alimento *ad limitum* (Laboratory Rodent Diet 5001 PMI); en su caso, los animales de experimentación fueron sacrificados mediante una dosis de anestésico (Anestosal Reg. S.A.G.A.R. Q-0001-065).

## **Resultados**

### **A) Cálculo de la DL<sub>50%</sub>**

Se llevó a cabo el ensayo para la determinación de la DL<sub>50%</sub> en seis grupos de ratones: tres grupos de ratones lactantes y tres de ratones adultos. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 5. Determinación de la DL<sub>50%</sub> en poblaciones de ratones.

Población	DL <sub>50%</sub> *
Ratones lactantes	1.02 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
Ratones adultos	8.0 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL

\* La LD<sub>50%</sub> que se muestra es la media de 3 determinaciones.

## **Discusión**

Transferir la hipersensibilidad retardada con células lisadas fue descrito primeramente por Lawrence en la mitad de los años 50s. Esta observación fue hecha en humanos y los mecanismos de acción y la estructura completa de los factores de transferencia todavía no ha sido determinada. Una variedad de modelos moleculares han sido propuestos, existe controversia acerca de cómo información inmunológica específica puede ser transferida por moléculas con pesos menores a los 10 kDa. Este estudio intenta dirigir estos cuestionamientos.

Lo cierto es que existen estudios clínicos que han demostrado la concordancia entre la inducción de hipersensibilidad tipo retardada antígeno específica y resultados clínicos benéficos. Se han reportado estudios que apuntan hacia el interferón gamma y secuencias de aminoácidos (LLYAQDLEDN o LLYAQDVEDN) que se han obtenido mediante purificación del FT y que no se encuentran en estructuras primarias de ferritina, ovoalbúmina o glicoproteína D de herpes simple. Lo anterior provee evidencia directa en contra de que el FT sea un conjunto de fragmentos altamente inmunogénicos de antígenos. No sería sorprendente que los péptidos conservados y constantes en el FT no transfieran la habilidad de expresar la hipersensibilidad retardada. Se podría estar hablando de regiones constantes que sirven como un sitio de unión para células que son blancos primarios del factor de transferencia. Diferentes regiones de moléculas de FT se cree tienen secuencias de aminoácidos variable que determina la especificidad de epítipo de factores de transferencia individual. Las moléculas de bajo peso molecular del FT son diferentes de inmunoglobulinas, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y receptores de linfocito T. Es posible que el FT opere a través de un mecanismo único de presentación de antígeno y activación de células T (13).

En el caso de la determinación de la  $DL_{50\%}$  se encontró que la diferencia en la obtenida en ratones lactantes y la de ratones adultos ellas fue significativa, ya que con una dosis de sólo  $1 \times 10^6$  UFC/mL fuimos capaces de matar al 50 % de los ratones lactantes de cada grupo, mientras

que para el caso de los grupos de ratones adultos se requirió una dosis de  $800 \times 10^6$  UFC/mL para matar al 50% de la población, lo que pone de evidencia la elevada sensibilidad de los ratones lactantes a la *Salmonella typhimurium* y por lo mismo la posibilidad de utilizar estas diferencias en la sensibilidad a Salmonella para demostrar la capacidad del FT de transferir resistencia de manera específica, todo ello valida el modelo murino para el estudio del FT y nos permite avanzar en la caracterización e identificación de las biomoléculas responsables de su actividad.

La disponibilidad de este modelo de factor de transferencia propuesto por Lawrence como se describe nos permite vislumbrar las características biológicas y bioquímicas de estas moléculas de bajo peso molecular, materiales inmunológicamente activos (50).



## **Bibliografía**

1. D.C. Dumonde, C.H. Kirkpatrick, G. Pizza. Eleventh International Congress on Transfer Factors (Meeting Report). *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:439–441.
2. Flores SG, Gomez VJ, Orea SM, Lopez TJ, Serrano E, Rodríguez A. Factor de transferencia como inmunomodulador específico en el tratamiento de la dermatitis atópica moderada a severa. *Revista Alergia México* 2005; 52(6):215-20.
3. Franco Molina M, Mendoza Gamboa E, Castillo León L, Támez Guerra R, Rodríguez Padilla C. Bovine dializable leucocyte extract protects against LPS-induced. *International immunopharmacology* 2004;4:1577-1586.
4. Lawrence HS. The transfer in humans of delayed skin sensibility to *Streptococcus M* substance and tuberculin with disrupted leucocytes. *J Clin Inv.* 1955; 34:210-219.
5. Khan A, Bellars W, Greater W. The usefulness of transfer factor associated with frequent infections. *Ann Allergy* 1978;40:229-32.
6. Di Prisco MA, Jimenez JC, López-Saura P. Clinical and immunological evaluation of asthmatic patient in double blind treatment protocol with transfer factor. *Biología Aplicada* 1995;12(1):17-21.
7. García Martín M, Cruza Cáceros M, et al. Factor de transferencia y extractos bacterianos en asmáticos con infecciones respiratorias a recurrentes. *Alergia Inmunol Pediatr* 1998;17(4):124-7.
8. Gómez Flores RA, Tamez Guerra RS, Tamez Guerra P, Rodríguez Padilla C. Impacto de la biotecnología en la inmunología. Artículo de revisión. *Medicina Universitaria* 2008;10(39):92-101.
9. Kirkpatrick CH, Rozzo SJ. Purification of transfer factors. *Mol Immunol* 1992; 29:167-182.

10. Cabezas Quiroga R, Velasco Castrejón O, Correa Mesa B, Chávez Sánchez R, Estrada Parra S, Monges A, Ondarza R, Pérez de la Mora C, Serrano E. El Factor de Transferencia como Agente Terapéutico. Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México D.F., y Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, La Habana, Cuba.
11. Lawrence HS, Borkowsky W. A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor. An arcane dialect of cells. *Cell Immunol* 1983; 82:102-116.
12. Sandler JA, Smith TK, Manganiello VC, Kirkpatrick CH. Stimulation of monocyte cGMP by leukocyte dialysates. An antigen-independent property of dialyzable transfer factor. *J Clin Invest* 1975; 56: 1271-1279.
13. Kirkpatrick CH. Transfer factors: Identification of conserved sequences in transfer factors molecules. *Mol Med.* 2000; 6:332-341.
14. Wilson GB, Fudenberg HH. Effects of dialyzable leukocyte extracts with transfer factor activity on leukocyte migration in vitro II. Separation and Partial characterization of the components in DLE producing antigen-dependent and antigen-independent effects. *J Lab Clin Med.* 1979;93(5):819-37.
15. Gottlieb AA, Sizemore RC, Gottlieb MS, Kern CH. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. *Biotherapy* 1996;9:27-31.
16. Rozzo di San Secondo VE, Aniasi A, Piccolo G, Montecucchi PC, Sirchia G. Influence of DLE-extracted lymphocytic suppressor factor on CsA-induced immunosuppression. *Biotherapy* 1996;9:159-162.
17. Burger DR, Vanderbark AA, Daves D, Anderson WA Jr, Vitto RM, Finke P. Human: fractionation and biological activity. *J Immunol* 1976; 117: 789-796.
18. Kirkpatrick CH, Rozzo SJ, Mascali JJ. Murine transfer factor III. Specific Interactions between transfer factor antigen. *J Immunol* 1985; 135:4027-4033.

19. Alvarez T, Linda & Kirkpatrick CH Charles. Profiles of cytokines production in recipients of transfer factors. *Biotherapy* 1996; 9: 55-59.
20. Ojeda MO, van't Veer C, Fernández Ortega CB, Arana Rosainz J, Buurman WA. Dializable leukocyte extract differentially regulates the production of TNF alpha, IL 6, and IL 8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(3):1075-8.
21. Pineda B, Estrada-Parra S, Pedroza-Medina B, Rodríguez-Ropon A, Perez R, Arrieta O. Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 575-83.
22. Borkowsky W, Lawrence HS. Effects of human leucocyte dialysates containing transfer factor in the direct leucocyte migration inhibition (LMI) assay. *J Immunol* 1979;123:1741-7
23. Kirkpatrick HC. Transfer Factor. *J. Allergy Clin Immunol* 1998;81:803-13.
24. Kirkpatrick CH, McDermott MJ, Eisenberg SP. Characterization of transfer factors and methods of use. United States Patent No. 5,883,224, 1999.
25. Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ. The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J Immunol* 2002; 169: 4450-4459.
26. Mestas J, CCW Hughes. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; 172:2731-2738.
27. Rodríguez-Morales O, Fernández-Mora M, Hernández-Lucas I, Vázquez A, Puente JL, Calva E. *Salmonella enterica* serovar typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect Immun.* 2006; 74: 1398-1402.
28. Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrew-Polymenis H, Raffatellu M, Figueredo J, Nunes J, Tsolis RM, Adams LG, Bäumler AJ. Molecular pathogenesis of *Salmoellella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun.* 2003; 71: 1-12.

29. Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB. *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 2 is not necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun.* 2005; 73: 3219-3227
30. Rollenhagen C, Bumann D. *Salmonella enterica* highly expressed genes are disease specific. *Infect Immun.* 2006; 74: 1649-1660
31. Nilsson AI, Kugelberg E, Berg O, Andersson DI. Experimental adaptation of *Salmonella typhimurium* to mice. *Genetics.* 2004; 168: 1119-1130
32. Cheminay C, Chakravorty D, Hensel M. Role of neutrophils in murine *Salmonellosis*. *Infect Immun.* 2004; 72: 468-477.
33. Töttemeyer S, Kaiser P, Maskell DJ, Bryant CE. Sublethal infection of C57BL/6 mice with *Salmonella enterica* serovar typhimurium leads to an increase in levels of Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, and TLR9 mRNA as well as a decrease in levels of TLR6 mRNA in infected organs. *Infect Immun.* 2005; 73: 1873-1878.
34. Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Comparison of *Salmonella enterica* serovar typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun.* 2005; 73: 3228-3241
35. Feng P, Wilson QM, Meissler JJ, Adler MW, Eisenstein TK. Increased sensitivity to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice undergoing withdrawal from morphine is associated with suppression of Interleukin-12. *Infect Immun.* 2005; 73: 7953-7959
36. Burns-Guydish SM, Olomu IN, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK, Contag CH. Monitoring age-related susceptibility of young mice to oral *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection using an *in vivo* murine model. *Ped Res.* 2005; 58: 153-158
37. Santos RL, Tsolis RM, Bäumlér AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36: 3-12.

38. Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Rangel MJ, Estrada-García I, Hernández-Pando R, Estrada-Parra S. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2004; 136: 215-223.
39. Kirkpatrick CH, R Hamad, LC Morton. Murine transfer factors. Dose response relationships and routes of administration. *Cell Immunol* 1995; 164:203-206
40. Franco-Molina A, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Tamez-Guerra RS, Villarreal-Treviño L, Tijerina-Menchaca R, Castillo-León L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C. *In Vitro* antibacterial activity of bovine dialyzable leukocyte extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28: 471-483.
41. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brabdo C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. *In Vitro* antibacterial activity of bovine dialyzable leukocyte extract against cancer cells. *Cytotherapy* 2006; 8: 408-414.
42. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tella P, Isaza-Brando C, García MV, Castillo-León L, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric acid production in lipopolysaccharide-stimulated blood cells. *Cytotherapy* 2007; 9: 379-385.
43. Boyp CA, Brenner FC, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. En: Murray PR, Baron EG, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7<sup>th</sup> ed, ASM Press, Washington D.C. pp 459-474.
44. David BD, Dulbecco R, Eissen HN, Ginsberg HS. *Microbiology*, 3<sup>rd</sup> ed. Harper and Row Pub, Maryland USA 1980.
45. Reed J, Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. *Amer J Hyg* 1938; 27: 493.

46. García Cortés R, Hernández RJ. Manejo de los animales de laboratorio en el Bioterio de la Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría. México D. F.: INP, 1994.
47. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
48. Rifkind, D.J. et al. Delayed hypersensitivity to fungal antigens in mice. I. : Use of the intradermal skin and foot pad swelling test as assays of active and passive sensitization. J Infect Dis 1976; 133:50-56.
49. Crowle A.F. Delayed hypersensitivity in the mouse. Adv Immunol 1975; 20: 197-264.
50. Rifkind D.J. et al. Transfer of delayed hypersensitivity in mice to microbial antigens with dialyzable transfer factor. Infect Immun 1977; 16 (1): 258-62.