

Acción del factor de difusión (factor R) sobre la reacción cutánea a la tuberculina

Por PABLO NEGRONI

Desde que Duran-Reynals descubriera en 1929 que el extracto acuoso del testículo de los mamíferos (y particularmente el de la rata) aumenta la difusión del virus vacénico y del estafilococo en la piel, se ha acumulado hasta el presente una copiosa bibliografía, que no pretendemos analizar en detalle sino puntualizar las observaciones más importantes, sobre este interesante fenómeno.

Los extractos acuosos de los testículos de mamíferos contienen un factor que aumenta espectacularmente la permeabilidad de los tejidos a los líquidos inyectados. Esta propiedad se encuentra asociada al epitelio germinativo y se puede extraer, ese factor, de los espermatozoides.

Chain y Duthie (1939) demostraron que ese factor purificado posee, además, una notable acción mucolítica. El semen de los mamíferos tiene por consiguiente la propiedad de disolver el tapón mucoso que ocupa el cuello uterino y una acción difusora, circunstancias que facilitan la fertilización del huevo.

Se ha demostrado también la presencia de este factor en los extractos de los tumores malignos, en el veneno de serpiente, en el de araña y en la sanguijuela, así como en los cultivos de estafilococo, neumococos virulentos y en el de las bacterias anaerobias de la gangrena gaseosa (*Clostridium welchii*, *Cl. septique*).

Se ha comprobado que este factor purificado, es una enzima hidrolizante de un mucopolisacárido, el ácido hialurónico que se encuentra en la piel, el humor vítreo, la córnea, el cordón umbilical y el líquido sinovial. Que es un antígeno y capaz de producir un anticuerpo que lo neutraliza. Que toda preparación que contiene esta enzima, es también un factor difusor, aunque sobre este punto no están de acuerdo todos los autores.

Se idearon métodos precisos para medir la actividad de este fac-

tor mediante su acción enzimática sobre el humor vítreo o, mejor, sobre la mucoproteína purificada del cordón umbilical, produciendo, en pocos minutos, un descenso marcado de su viscosidad y liberación de sustancias reductoras (*n-acetilhexosamina*). También se han empleado métodos menos precisos, pero más prácticos, mediante la inoculación intradérmica en la piel del conejo simultáneamente con una sustancia indicadora (tinta china, azul de metileno, azul Tripan o, mejor, una solución isotónica de hemoglobina).

A establecer estos conocimientos han contribuido entre otros, Duran-Reynals y sus colaboradores, McClean y sus colaboradores, Claude, Favilli, Medinaveitia y colaboradores, Meyer y colaboradores.

Este factor es designado, particularmente por los autores italianos, como « factor R » y, por los de habla inglesa, como factor difusor « difusing » o « spreading factor ».

Reiss, H. (1930) había observado que las inyecciones de extracto de testículo tenían la propiedad de aumentar el área de reacción cutánea a diversos alérgenos en las personas sensibles y que en las que habían recibido, en cambio, extracto de glándula tiroidea, la reacción cutánea era más elevada. Las inyecciones de extractos fueron efectuadas (tal vez por vía subcutánea) antes de las pruebas cutáneas y en sitios alejados de las mismas.

McClean, en 1931, había demostrado que la acción difusora del factor R tenía igualmente lugar en los colgajos de piel, aislados, por consiguiente, de toda conexión nerviosa o vascular.

Favilli (1932) logró demostrar, experimentalmente, que el extracto de testículo de rata aumenta la permeabilidad, para el agua, del huevo no fecundado de *Abracia punctulata* y que disminuye la resistencia globular « in vitro ».

Cassuto, N. (1933) observó que inyectando extracto testicular en la dermis del conejo y, provocando, más tarde, allí, el fenómeno de Sanarelli-Schwartzman, éste no se producía o aparecía muy débilmente. Si, en cambio, el territorio cutáneo se prepara previamente con antiviral Besredka, caldo o una solución de uretano, que reducen la permeabilidad de los tejidos, el fenómeno de S. S. se produce reforzado, en contraposición al territorio cutáneo no preparado del mismo conejo.

Bier, O. G. (1933) obtuvo resultados opuestos a los precedentes con el extracto testicular, notando que el fenómeno de S. S. no solamente se acentúa, sino que aparece más precozmente.

Doerfler, A. E. (1935) observó que el fenómeno de Koch se ace-

lera en el cobayo tuberculoso por la acción del factor R y que, éste, inoculado simultáneamente o antes del antígeno, tiene acción inhibidora sobre el fenómeno de Arthus y la reacción cutánea a la tuberculina.

Fiocco, S. (1926) y Manganotti, G. (1938) hicieron comprobaciones semejantes. Caporale, G. (1939) inoculando bacilo tuberculoso aviarío del conejo, perro y gallina notó una mayor difusión por las vías linfáticas bajo la influencia del factor R, así como también, la ausencia del chancro de inoculación (complejo primario decapitado).

NUESTRAS EXPERIENCIAS

Por las observaciones expuestas parece establecido que el extracto testicular produce una difusión inmediata del líquido inyectado, como si una gota de agua cayera sobre un papel secante (Caporale, 1939). De ahí que, la mayoría de los autores, inyectando el factor R antes o simultáneamente con los microbios o antígenos observaran un debilitamiento o inhibición de los fenómenos cutáneos anafilácticos, alérgicos o de inmunidad. Por otra parte las experiencias de Favilli, confirmadas por otros investigadores demuestran que el extracto testicular aumenta la permeabilidad celular.

En un trabajo anterior expresamos la creencia de que la alergia cutánea, tipo tuberculina, es una reacción antígeno anticuerpo que tiene lugar, por lo menos en su primera fase, dentro de las células y nos planteamos, por consiguiente, la hipótesis que si encontráramos un elemento que aumentara la permeabilidad celular, la reacción cutánea tipo tuberculina aparecería más precozmente. Con este objeto inoculamos intradérmicamente a Cavia tuberculosos, extracto testicular, una o varias horas después, y en el mismo sitio, donde se había inoculado antes la tuberculina. Como se verá por los protocolos que exponemos a continuación hemos confirmado, plenamente, nuestra hipótesis. La inyección simultánea de tuberculina y de extracto testicular impide por su acción difusora, como los autores lo han demostrado, que este antígeno se fije, penetre en las células y revele la reactividad cutánea.

PROTOSCOLOS

Primera serie de experiencias efectuadas el 13 de Mayo de 1943 sobre 4 Cavia tuberculosos (números 538, 543, 544 y 461) inoculados dos meses antes por vía intramuscular con 0,1 de mg de un

cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* virulento, de origen humano. Esta es la cepa empleada en todas las experiencias y a la cual no haremos más alusión.

El extracto testicular fué obtenido mediante una cuidadosa trituración con alundum, en un mortero estéril, de testículos de rata recientemente extraídos acépticamente, desprovistos de su vaginal y adicionados del mismo volumen de líquido de Ringer. Centrifugamos media hora a 5.000 revol. p. m. y utilizamos el líquido sobrenadante.

Cortamos el pelo al ras, con máquina eléctrica, en ambos flancos de los Cavias e inoculamos, en uno, cuatro diluciones diferentes de tuberculina bruta al 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000 y 1/8.000 y en el flanco opuesto, y a la misma altura, una *mezcla extemporánea del extracto testicular y de tuberculina*, en volúmenes iguales y en forma tal que resultaran los mismos títulos de las diluciones de tuberculina. Para la mayor corrección de las lecturas hemos tenido cuidado de inocular a la misma altura de la piel, a cada lado de la columna vertebral, la misma dilución de tuberculina, una con extracto testicular y otra sin él.

La inoculación de la mezcla de extracto testicular + tuberculina en la dermis se borra inmediatamente, sin producir la pápula anémica por la acumulación de líquido como se observa en el lado opuesto, testigo. Además da lugar instantáneamente a la formación de una mancha eritematosa, congestiva, por dilatación de los capilares.

Resultados de las lecturas a las 24 y 48 hs: las intradermoreacciones con tuberculina fueron francamente positivas en todos los Cavias, originando una reacción eritematopapulosa de 1 a 1,5 cm de diámetro.

La inoculación de testículo de rata no produjo reacción demorada alguna.

Las inoculaciones de las mezclas, testículo de rata con tuberculina, dejaron un pequeño eritema sin infiltración alguna.

Los cobayos tuberculosos 918 y 983 inoculados en la misma forma, pero empleando la fracción proteica purificada (P. P. D.), gentilmente suministrada por el Dr. Sordelli, diluída al 1/2.000, 1/4.000, 1/8.000 y 1/16.000, dió el mismo resultado que en la serie precedente.

Cobayos tuberculosos N° 948 y Ne 959 inoculados por vía intradérmica con diferentes diluciones de P. P. D. en ambos flancos y, *una hora después, reinoculados* en uno de los flancos, en el mismo sitio donde habían recibido las inyecciones de P. P. D., *con 0,2 ml*

de extracto de testículo de rata. En otro punto alejado, se inoculó este último producto únicamente.

La lectura efectuada dos horas después arrojó reacciones positivas en las zonas reinoculadas y negativas en las restantes, pero los resultados fueron sensiblemente equivalentes en las lecturas efectuadas a las 24 y 48 hs.

Cobayos n° 917 y n° 914 tuberculosos inoculados en la misma forma que los anteriores, pero *reinoculados con extracto testicular dos horas después.* La lectura de las reacciones dió, sensiblemente, el mismo resultado que en el caso anterior.

Cobayos tuberculosos números 910, 893 y 896, inoculados con P. P. D. en la misma forma que los anteriores, con las tres diluciones más fuertes y *reinoculados con extracto testicular 3,30 horas después en el flanco izquierdo.*

Lectura a las 15 horas de la reinoculación: flanco derecho reacción con P. P. D. al 1/8.000 casi nula, al 1/4.000 + y al 1/2.000 ++. Flanco izquierdo: las mismas diluciones reinoculadas con factor R: + a ++. ++ a +++ y +++ a ++++, respectivamente, y con necrosis en un cavia.

Lectura a las 24 horas: las reacciones tienen, sensiblemente, el mismo aspecto y extensión en ambos lados, salvo en un cavia donde persiste el centro necrótico de las reacciones en el flanco izquierdo.

Cavias números 32 y 186, tuberculosos, de dos meses de evolución, inoculados en la misma forma que los anteriores, pero *reinoculados en el flanco izquierdo con extracto testicular, 4 horas después.*

Lectura de los resultados 19,30 horas más tarde: La reinoculación del extracto testicular refuerza marcadamente las reacciones a la tuberculina purificada.

Lectura a las 48 horas: Las reacciones tienen, sensiblemente, el mismo aspecto y extensión en ambos flancos.

Junio 2 de 1943. Cavias tuberculosos números 160, 174, 194, 808 y 888, inoculados con la misma técnica empleada en las experiencias anteriores y *reinoculados 5,30 horas después* en el flanco izquierdo con extracto testicular. La lectura de los resultados: 20 horas más tarde. A excepción del cavia 174, que presentaba reacciones aproximadamente de igual intensidad y extensión en ambos flancos, en los restantes, las reacciones en el lado izquierdo eran + o ++ más intensas que en el lado opuesto.

El sitio inoculado con extracto testicular solamente, que originó en el acto una mancha roja congestiva, no presentaba a las 20 horas vestigio alguno de reacción.

Cavias números 980 y 794 con tuberculosis de dos meses de evolución fueron inoculados con P. P. D. y *reinoculados 8 horas más tarde* en el flanco izquierdo con extracto de testículo de rata.

La lectura efectuada 20 horas después, acusó un refuerzo manifiesto de las reacciones en el flanco izquierdo. Estos resultados tendieron, en cambio, a equilibrarse al cabo de 48 horas.

Cavias tuberculosos de 8 meses de evolución números 804, 823 y 895 inoculados en la misma forma que los anteriores y *reinoculados 15 horas después con extracto testicular*.

La lectura efectuada 24 horas después reveló la existencia de reacciones algo más acentuadas en los sitios reinoculados de dos cavias, e iguales, en el restante. La lectura a las 48 horas acusó reacciones de una intensidad, aproximadamente equivalente, en ambos flancos. Como en los casos anteriores la inoculación de extracto testicular solo, no produjo reacción demorada alguna.

EXPERIENCIAS CON « FACTOR DIFUSOR » PURIFICADO

Hemos utilizado en esta serie de experiencias el testículo fresco o el desecado y pulverizado, de toro, y el método de purificación de Medinaveitia, J. (1941) que combina la purificación mediante la precipitación del factor R con sulfato de amonio a 70 % de saturación, con la del acetato básico de plomo en la forma siguiente: Se pesan 100 gr de testículo seco y pulverizado (ó 670 gr de testículos fresco desprovisto de la vaginal y triturado) se mezclan cuidadosamente en un mortero con 200 gr de arena fina y se le agrega, en cinco veces, 500 ml de una solución M/10 de ácido acético. Se filtra por papel y se lleva a pH 3,7, si fuera necesario; se le agrega entonces sulfato de amonio a 27 % de saturación. Se separa por filtración el precipitado inactivo y, al líquido filtrado, se le agrega c. s. de una solución saturada de sulfato de amonio para llevarlo a 70 % de saturación. El precipitado contiene la mayor parte del factor R (mucínasa), se lo separa por centrifugación, se lo disuelve en unos 40 ml de agua destilada y se lo dialisa en bolsa de celofán durante 24 horas, en agua corriente. Este líquido dializado se lo concentra en el vacío a 37° al 1/10 de su volumen y luego se lo congela y evapora a sequedad, estando congelado.

Se pesan 2 gr de este polvo (mucínasa purificada) y se lo disuelve en 50 ml de agua destilada, se le adiciona 20 ml de una solución acuosa al 10 % de acetato neutro de plomo, se lleva al pH 7,37 con una solución 2/N de amoníaco y se descarta, por filtración, el pre-

cipitado formado. El líquido se lleva, ahora, a pH. 8,55 agregándole la cantidad necesaria de la solución de amoníaco. Se recoge el precipitado, se lo disuelve en una solución M/10 de ácido acético (unos 10 ml) y se lo dializa en bolsa de celofán, en agua corriente, durante 18 horas. Se centrifuga y el líquido sobrenadante es congelado y desecado, en este estado.

Comprobamos la bondad de la mucinasa, así purificada, por el método de Bacharach y colaboradores (1940), utilizando conejos blancos albinos de unos dos kilos de peso e inoculándoles, intradérmicamente, 0,1 ml de diferentes diluciones de la mucinasa adicionada de 0,2 ml de una solución isotónica de hemoglobina, preparada de la siguiente manera: Se lava repetidas veces, con solución fisiológica, 10 ml de sangre defibrinada de carnero y, finalmente, se le agrega al sedimento cantidad suficiente de agua bidestilada para completar el volumen de 10 ml. El examen microscópico de la sangre, así lacada, debe revelar la ausencia de hematies.

La lectura se efectúa a los 20 minutos y el área de difusión, medida con compás, se calcula como si fuera una elipse, por la fórmula siguiente: $\frac{\pi D d}{4}$, siendo D el eje mayor y d el menor. La lectura se facilita untando con vaselina líquida la zona inyectada (Mc Clean y Hale).

PROTOCOLOS

Cavia tuberculoso n° 83 inoculado el 23 de julio de 1943, en un flanco, con las diversas diluciones de P. P. D. mencionadas más arriba y, en el opuesto, con las mismas adicionadas (*inoculación simultánea*) de la mucinasa al 1/200.

La lectura a las 24 horas permitió comprobar que la mucinasa inoculada simultáneamente a la tuberculina inhibe la reacción cutánea a este antígeno.

Cavias 983 y 66 inoculados en ambos flancos con tres diluciones diferentes de P. P. D. y *reinoculados en el flanco izquierdo 3 horas después*, con una solución al 1/200 de la mucinasa, 4 horas más tarde las reacciones eran francamente positivas a la tuberculina en el flanco izquierdo y negativas en el lado opuesto. La diferencia persistió a las 24 horas en el cavia n° 66 y desapareció en el n° 983 (J). A las 48 horas las reacciones eran, sensiblemente, iguales en extensión e intensidad en ambos flancos.

Cavias tuberculosos números 40, 194 y 823, inoculados en la mis-

ma forma que los anteriores, pero *reinoculados 5,30 horas más tarde con 0,2 ml de una solución al 1/200 de mucinasa.*

La lectura efectuada 4 horas más tarde acusó reacciones positivas +, ++ y +++ en el flanco izquierdo, en tanto que eran negativas en el lado opuesto y en el sitio inoculado con la mucinasa únicamente.

Lectura a las 20 horas: área con P. P. D. al 1/8.000, reinoculada con mucinasa 122 % de aumento en relación a la del lado opuesto, la reacción con 1/4.000: 43 % de aumento y la correspondiente a la dilución al 1/2.000: 69 % de aumento.

Estos datos corresponden al cavia n° 40, en el cual las reacciones se equilibraron a las 48 horas.

En el cavia n° 194 los resultados a las 20 horas fueron 50 % de aumento, 29 % y 58 % respectivamente. A las 48 horas, persistía, aún, una pequeña diferencia de las reacciones a favor del lado izquierdo, reinoculado.

En el cavia n° 823 ocurrió un fenómeno curioso, todas las reacciones eran, en el momento de la reinoculación, más acentuadas en el flanco izquierdo que en el derecho. La reinoculación con la mucinasa modificó el resultado, igualándolo, en la lectura efectuada a las 20 horas.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de testículo de rata inoculado simultáneamente con la tuberculina bruta o purificada (P. P. D.), diluida, en la dermis de los cavia tuberculosos, debilita o inhibe la reacción alérgica cutánea. Esta inyección no origina una pápula anémica por la acumulación del líquido, sino que se extiende, espectacularmente, como una gota de agua que cayera sobre el papel secante (Caporale), produciendo una mancha congestiva.

El extracto acuoso de testículo de rata inoculado intradérmicamente 1 ó 2 horas después de la tuberculina diluida y en el mismo sitio, no modifica o sólo refuerza en pequeño grado, la reacción alérgica cutánea. Las zonas reinoculadas 3,30 a 8 horas después mostraron, en cambio, un franco aumento en la extensión e intensidad de las reacciones, leídas a las 15 ó 20 horas. Estos resultados tienden a equilibrarse en el curso de las 24 horas subsiguientes.

Las experiencias efectuadas con la mucinasa purificada extraída del testículo de toro, condujeron a los mismos resultados, proporcionando un aumento del área de la reacción desde el 29 % hasta

el 122 % cuando se la inoculó 5.30 horas después de la tuberculina en las lecturas efectuadas a las 20 horas (la reacción aparece precozmente y alcanza antes, su « acmé »).

Por el resultado de estas experiencias creemos que la mucinasa es un factor difusor sobre vías preestablecidas, pero que inoculada en un tejido modificado (reacción inflamatoria apenas visible o microscópica) aumenta la permeabilidad celular y acelera la aparición de las reacciones alérgicas cutáneas, tipo tuberculina.

Estas observaciones afianzan nuestra creencia de que las reacciones alérgicas cutáneas, demoradas, se deben al contacto antigénico anticuerpo dentro de las células sensibles, por lo menos en la primera fase.

Agradezco al profesor Dr. A. Sordelli, quien ha tenido la gentileza de suministrarme la tuberculina purificada y al señor A. Acuña por haberme facilitado los caviares tuberculosos.

RÉSUMÉ

L'extrait aqueux de testicules de rat mélangé à différentes dilutions de tuberculine brute ou purifiée (PPD) injecté dans le derme des cobayes tuberculeux, produit, un affaiblissement ou l'inhibition de la réaction allergique cutanée.

L'extrait testiculaire (facteur R) inoculé 1 à 2 heures après l'injection intradermique de tuberculine, et dans le même endroit, augmente très peu ou pas du tout la réaction cutanée; tandis que les réinoculations effectuées 3,30 à 8 heures plus tard ont produit une frappante augmentation, en extension et intensité, des réactions cutanées, 4 à 20 heures après. Les réactions des zones réinoculées et celles du côté opposé, non réinoculées, ont tendance à s'égaliser au cours de 24 à 48 heures.

Les expériences effectuées avec la mucinase purifiée des testicules de taureau ont donné les mêmes résultats, produisant une augmentation de 29 % à 122 % de l'aire de réaction, 20 heures après les réinoculations faites 5,30 heures plus tard que celles de tuberculine (la réaction tuberculinique apparaît précocement et atteint plus tôt son acmé).

Les résultats de ces expériences affirment notre croyance que le facteur R augmente dans certaines circonstances la perméabilité cellulaire et que les réactions allergiques du type tuberculinique se produisent, au moins dans la première étape, par le contact antigène-anticorps à l'intérieur des cellules sensibles.

SUMMARY

The aqueous extract of rat's testicles mixed with different dilutions of crude or purified tuberculin (P. P. D.) and inoculated in the cutis of tuberculous guinea-pigs inhibits or reduces the cutaneous allergic reaction.

The cutaneous reaction is little or not modified by the inoculation of the diffusing factor 1 or 2 hours later in the same place where the tuberculin was injected. But if the reinoculations are performed 3,30 to 8 hours later, a noticeable enhancement in extension and intensity of tuberculin reactions takes place after 4 to 20 hours. The tuberculin reaction appears and reaches its «acmé» earlier.

The cutaneous reactions of the reinoculated zones and those of the opposite side not reinoculated show a tendency to be equal at the end of 24 to 48 hours.

We have obtained the same results with the purified mucinase from bull testicle (29 % to 122 % enhancement of the reaction zone).

These results seem to confirm our belief that the diffusing factor from testicles enhances, under certain conditions, the cell permeability and that the delayed type of cutaneous allergic reactions are produced, at least during its first stage, within the sensitive cells, by the contact antigen-antibody.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BACHARACH, A. L.; CHANGE, M. R. A., y MIDDLETON, T. R. — *The biochemical assay of testicular diffusing factor. The Bioch. J.*, vol. 34, 1940, pp. 1164-1471.
- (2) BIER, O. G. — *Influence de l'extrait testiculaire sur le phénomène de Shwartzman. C. R. Soc. Biol.*, vol. 112, 1933, pp. 407-410.
- (3) CAPORALE, G. — *L'influenza del fattore R sur l'implantation et la généralisation du bacille tuberculeux aviaire. Boll. Sez. Ital. Soc. Internat. Microb.*, vol. XI, 1939, fasc. XIV-, pp. 144-157.
- (4) CASSUTO, N. — *Modificazione della manifestazione del fenomeno di Sanarelli-Shwartzman in rapporto alle condizioni di permeabilità dei tessuti. Lo Sperimentale*, vol. 87, 1933, pp. 211-226.
- (5) CIARANFI, E. — *L'importanza del fattore permeabilità dei tessuti nel meccanismo dell'immunità locale verso lo stafilococo. Lo Sperimentale*, vol. 87, 1933, pp. 663-678.
- (6) CLAUDE, A., y DURAN-REYNAL, F. — *Chemical properties of the purified spreading factor from testicle. The J. of Exp. Med.*, vol. 65, 1937, pp. 661-670.
- (7) DOERFLES, A. E. — *Influenza del fattore R (estratto testicolare) sui fenomeni allergici. Boll. Ist. Sierot. Milanese*, vol. 14, 1935, pp. 219-226.

- (8) DURAN-REYNALS, F. — *The effects of antilesticular serum on the enhancement value of testicular extract. The J. of Exp. Med.*, vol. 155, 1932, pp. 703-712.
- (9) DURAN-REYNALS, F. — *Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. The J. of Exp. Med.*, vol. 58, 1933, pp. 161-181.
- (10) FAVILLI, G., y McCLEAN, D. — *The influence of tissue permeability on local immunity*, vol. 45, 1937, pp. 661-680. *The J. of Pathol. a. Bact.*
- (11) FAVILLI, G. — *Mucolytic effect of several diffusing agents and of diazotized compound. Nature*, vol. 145, n.º 3683, pp. 866-867, 1940.
- (12) FIOCCO, S. — *Permeabilizzazione cutanea e cutireazioni alla tuberculina. G. Ital. Dermat.*, vol. 77, 1936, pp. 741-750.
- (13) FROMMEL, ED.; SIERRO, AD., y BACHMANN, W. — *Anergie non spécifique à la tuberculine. Presse Med.*, 1933, n.º 61, pp. 1218-1221.
- (14) MADINAVEITIA, J. — *Studies on diffusing factors. The Bioch. J.*, vol. 32 (2), 1938, pp. 1806-1813; vol. 35, 1941, n.º 4, pp. 447-452, 453-455 y 456-460.
- (15) MANGANOTTI, C. — *Ricerche sperimentali sulla reattività della cute umana e sui fenomeni di diffusione. Il Policlinico*, vol. 45, pp. 544-552, 1938.
- (16) McCLEAN, D. — *A factor in cultures filtrates of certain pathogenic bacteria which increases the permeability of the tissues. The J. of Path. and Bact.*, vol. 42, 1936, pp. 477-512.
- (17) McCLEAN, D., y HALE, C. W. — *Mucinase and tissue permeability. Nature*, vol. 145, 1940, n.º 3683, pp. 867-868.
- (18) McCLEAN, D., y HALE, C. W. — *Studies on diffusing factors. The Bioch. J.*, vol. 35, 1941, n.º 1-2, pp. 159-183.
- McCLEAN, D., y HALE, C. W. — *Substance B of diptheria toxin and diffusing factor. The Lancet*, vol. CCXL, 1941, n.º 6141, pp. 595-596.
- (20) REISS, H. — *Über Veränderungen der Hautallergie unter Einwirkung von Drüsenextrakten und Vegetativen Giften. Arch. f. Derm. u. Syph.*, vol. 161, 1930, pp. 462-466.