

Respuesta proliferativa de linfocitos murinos por acción de moléculas anfífilas de *Propionibacterium acnes*

M. M. Melgar, G. Pérez-Silva, I. Gil, E. Gómez y A. Portolés *

Instituto de Inmunología y Biología Microbiana
C.S.I.C. Velázquez, 144
28006 Madrid

(Recibido el 18 de noviembre de 1984)

M. M. MELGAR, G. PEREZ-SILVA, I. GIL, E. GOMEZ and A. PORTOLES. *Proliferative Responsiveness of Murine Lymphocytes under Action of Propionibacterium acnes Amphiphilic Molecules*. Rev. esp. Fisiol., 41, 225-234. 1985.

Splenic lymphocytes from mice treated with *Propionibacterium acnes* cells as well as with their cell walls were found to be variably active on the lymphoproliferative responsiveness. Furthermore, the effect of these bacterial agents on the *ex vivo* Con A response of the lymphocytes showed a certain stimulation that was higher with oral treatments. In the same conditions the influence of these agents on the LPS lymphocytes stimulation was almost without any statistical significance. *In vitro* blastogenesis experiments were undertaken in order to elucidate the influence of different amphiphilic molecules from peripheric bacterial structures on the lymphoproliferative response of murine splenocytes. Stimulation rates were also determined as a function of the (³H) thymidine incorporation. Combined effects of mitogens (Con A and LPS) with bacterial amphiphilic molecules were also evaluated as a function of the DNA synthesis variations. All cases resulted in a variable inhibition of the mitogenic response which appeared dose-dependent and more active for associations of Con A and amphiphilic molecules. The most effective intrinsic mitogenic activities were detected with teichoic acids and intracellular polysaccharides. These last molecules without purification, assayed as cytoplasmic fractions, appeared modified in the intensity of their action, depending on their glycidic/proteid rates.

Key words: Amphiphilics, Mitogenesis, *Propionibacterium acnes*.

La transformación linfoblástica inducida por mitógenos *in vitro* se utiliza con frecuencia para el conocimiento de la respuesta inmune *in vivo* por su correlación en las fases previas de la mis-

ma (25). Esta respuesta proliferativa, que se inicia por una interacción a nivel de los receptores de membrana linfocitaria (35) de naturaleza glicopeptídica (23), se caracteriza por incrementos en la síntesis de ADN, ARN y proteínas y va acompañada de otras modificaciones en el metabolismo celular (17, 29). Bajo ciertas condiciones, son varios los com-

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

ponentes bacterianos que pueden funcionar como mitógenos de células linfoides y modificar sus patrones de comportamiento por enmascarar o bloquear, posiblemente, los sitios receptores (10, 32).

Según datos previos, distintas especies de *Corynebacterium parvum*, clasificadas posteriormente como *Propionibacterium acnes* (5, 8) mostraron capacidad para modificar la respuesta inmune (12), estimulando el sistema reticuloendotelial (9, 11, 26), aumentando la producción de anticuerpos (1, 7, 16, 22, 24) y la hipersensibilidad retardada (22) a través de la estimulación de respuestas célula-mediadas; según otros resultados, también puede disminuir la hipersensibilidad retardada (15, 31), el rechazo de injertos (7) e incluso llegar a producir autoinmunidad (20). Estas propiedades inmunobiológicas variables, junto con los resultados discrepantes en relación con su efecto mitogénico sobre linfocitos T y B (11, 18, 30) inducen a estudiar el efecto inmunomodificador de distintas moléculas de *P. acnes* sobre la blastogénesis de linfocitos murinos, intentando dilucidar la influencia de la naturaleza molecular de los distintos agentes en el fenómeno de activación policlonal.

Material y métodos

Bacterias y moléculas bacterianas. Sobre un medio glicerinado (medio GG2) previamente descrito (6), se ha cultivado *Propionibacterium acnes*, cepa «Vogel» La 2039, procedente del Centro de Colecciones Microbianas de Lausana (Suiza); las células se incubaron durante 60 h (a 37°C) en fermentador de 2 l, en anaerobiosis producida por una corriente de CO₂ (20 l/h) y con agitación magnética.

La biomasa bacteriana recogida por centrifugación durante 15 min a 8 000 g, en una centrifuga Sorvall mod. RC-5B, se lavó tres veces con agua destilada. La suspensión bacteriana, ajustada a una concentración de 50 mg de peso seco/ml,

se rompió con «Ballotini III» (Sigma) en un homogeneizador Sorvall Omnimixer durante 15 períodos de 2 min cada uno, centrifugándose a continuación a 1 500 g/15 min. El sobrenadante, conteniendo el extracto citoplásmico (EC) y paredes celulares (PC) se centrifugó a 15 000 g/30 min; el sedimento, que contiene las paredes, se lavó tres veces con agua destilada, se resuspendió en un pequeño volumen y se liofilizó posteriormente. Los extractos citoplásmicos se dializaron frente a agua destilada, se concentraron en rotavapor y se liofilizaron. Estos extractos, previa precipitación fraccionada con alcohol o sulfato amónico (80 % de saturación), dieron lugar a fracciones citoplásmicas con distinto contenido de proteína y de glúcidos (EC₂, EC₃, EC₄).

Los peptidoglicanos (PGC) y los ácidos teicoicos (TCA), se obtuvieron a partir de paredes celulares previamente digeridas por tripsina 1:250 (Difco) en tampón fosfato y sucesivos tratamientos con ribonucleasa B y desoxirribonucleasa I (Sigma), según el método de AMSTRONG *et al.* modificado por RÄSÄNEN y ARVILOMMI (27). Por otra parte, se obtuvieron ácidos lipoteicoicos (LTA) a partir de membrana siguiendo el método de WICKEN *et al.* (37).

A partir del líquido metabólico separado en la primera centrifugación del cultivo bacteriano, después de haberlo concentrado 20 veces en un rotavapor Büchi a 35°C y dializado frente a agua destilada, se han obtenido polisacáridos extracelulares (EPS) por precipitación con alcohol a 4° (3). De igual manera se obtuvieron los polisacáridos intracelulares (IPS), a partir de los extractos citoplásmicos; seguidamente se rehidrataron, recogiendo los en un pequeño volumen de agua destilada y se liofilizaron.

En algunos experimentos *in vivo* se utilizaron células completas de *P. acnes* inactivadas por tratamientos térmicos a 65°C durante 1 h.

Mitógenos. Concanavalina A (Con A; Calbiochem, Grade A) y lipopolisacárido de *Escherichia coli* 055: BS (LPS; Difco) fueron utilizados como mitógenos de linfocitos T y B, respectivamente. Estas sustancias, al igual que los metabolitos bacterianos, fueron esterilizados en solución por calentamiento a 100°C durante 60 min en baño maría.

Controles analíticos. La homogeneidad de las muestras se comprobó por comparación de espectros IR (2, 21) y determinación de sustancias reductoras (34) y de proteínas por el método de BRADFORD (4) para evitar las interferencias producidas por la presencia de polisacáridos.

Cultivos celulares. A partir de bazos de ratones Balb/c se obtuvieron suspensiones de células linfoides (28) en medios MBSS y RPMI sin suero fetal de ternera. Se determinó la viabilidad celular por la prueba de exclusión del azul tripan (19) y se prepararon las suspensiones celulares con $2,5 - 3 \times 10^6$ linfocitos/ml.

Ensayos de transformación linfoblástica. Las suspensiones de linfocitos de bazo murino en medio RPMI, distribuidas en alícuotas de 1 ml/tubo, recibieron los mitógenos Con A y LPS y las muestras bacterianas, asociadas o no, a las concentraciones que se indican en los resultados. Previamente se hicieron pruebas de blastogénesis con distintas concentraciones de Con A y LPS para conocer las dosis óptimas de estimulación. Los cultivos, por triplicado, se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y, al cabo de 48 h, se añadió un pulso de 10 µl (1 µCi) de timidina tritiada (H³-TdR)/tubo con una actividad específica de 103 mCi/mg (Amersham). A las 24 horas se determinó la síntesis de ADN en función de la cantidad de H³-TdR incorporada (13).

Interpretación de resultados. Los resultados se expresan en cpm ± DS, aplicando la significación estadística según la *t* de Student (28), para la comparación entre las diversas series. Excepto en los casos no significativos, donde se indican los valores de P, todos los demás dieron una significación estadística aceptable en la que siempre era: $P \leq 0,02$.

En aquellos casos en que se mide la interacción mitógeno-agente bacteriano, se aplica el criterio de evaluación de asociaciones farmacológicas según el índice de interacción: $I.I. = \frac{A + B}{A \cdot B'}$. En estos casos se representan los incrementos (Δ) de la incorporación de H³-TdR en los cultivos con el mitógeno (A) y el agente (B), aislados, o en asociación (A · B). Según el índice sea = 1, > 1 o < 1 la interacción será indiferente, antagonica o sinérgica, respectivamente.

Resultados

Efecto mitogénico ex vivo en ratones tratados con P. acnes. En la figura 1 se muestra la respuesta blastogénica ensayada *ex vivo*, sobre linfocitos de bazo murino, obtenidos después de someter a los ratones a los siguientes tratamientos: a) administración oral de células enteras de *P. acnes* a razón de 5×10^8 células/ratón/día durante 8 días; b) una inyección intraperitoneal de 8×10^{10} células/ratón; c) inyección de una dosis intraperitoneal de paredes celulares de *P. acnes* (500 µg/ratón); y d) inyección de dos dosis intraperitoneales de paredes celulares (500 µg/ratón/dosis) con un intervalo de ocho días. Como puede observarse, en células de bazo obtenidas a las 48 h de finalizados los tratamientos, tanto la bacteria entera como sus paredes producen un efecto mitogénico intrínseco que es más intenso para la bacteria completa, administrada intraperitonealmente. La respuesta frente a paredes ce-

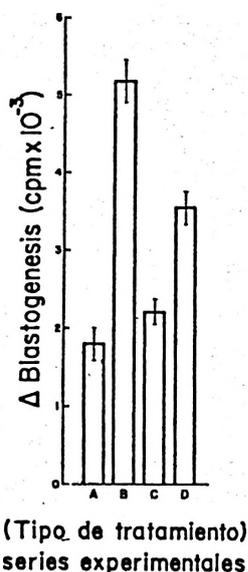


Fig. 1. Activación policlonal *ex vivo* de linfocitos de bazo murino, procedentes de animales tratados con células de *P. acnes* muertas por calor y administradas por vía oral (A) o intraperitoneal (B).

Se hicieron tratamientos intraperitoneales administrando una (C) o dos (D) dosis de las paredes celulares aisladas. Los datos representan valor medio de 5 animales (3 determinaciones/animal) ($X \pm S.D.$). Las respuestas en células testigo sin tratamiento varían de 345 a 875 cpm.

lulares parece guardar relación con la intensidad del tratamiento.

Este efecto blastogénico intrínseco es comparado con el de los mitógenos específicos (Con A) y (LPS) a sus dosis óptimas de estimulación policlonal *ex vivo*. En la figura 2 se representa la influencia de los tratamientos anteriores con células y paredes de *P. acnes* sobre linfocitos de bazo sometidos a activación policlonal con 1 μg de Con A o 50 μg de LPS. Se observa una potenciación del efecto mitogénico de Con A, principalmente en los tratamientos orales con células enteras de *P. acnes*. Sin embargo, con la administración intraperitoneal, ya sea de células o paredes celulares, el

efecto es menor, sobre todo para aquellos tratamientos con dos dosis; los resultados obtenidos del efecto combinado carecen de significación estadística ($P > 0,5$); lo mismo sucede con las células estimuladas con LPS. En estos casos, se aprecia una ligera disminución de la mitogénesis en las poblaciones de células B, cuando se inyecta intraperitonealmente a los ratones dos dosis de paredes celulares.

Efectos mitogénicos de fracciones citoplásmicas y metabolitos de P. acnes. A la vista de las interacciones lectina-bacteria, administradas por vía oral, en cuanto a respuesta policlonal, se han ensayado *in vitro* distintas fracciones citoplásmicas en las que se ha variado la relación prótido-glucídica mediante pre-

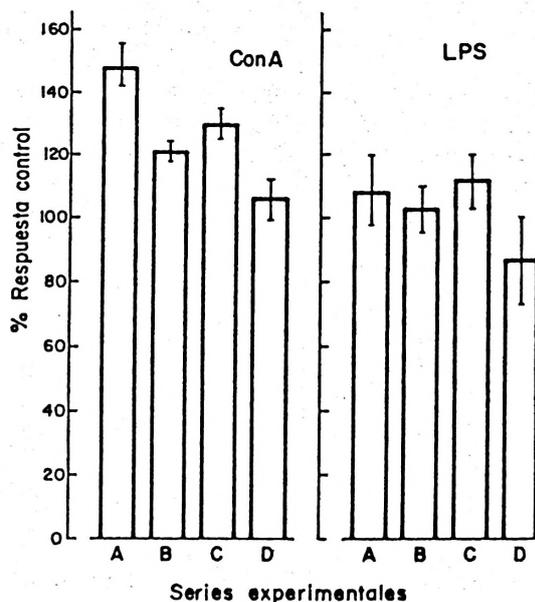


Fig. 2. Respuesta policlonal *ex vivo* de linfocitos esplénicos de animales (5 por grupo) tratados con *P. acnes*, en presencia de Con A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Los tratamientos A, B, C y D son análogos a los utilizados en la figura anterior. Las medias de las respuestas patrón fueron: 110.212 ± 1.034 cpm para Con A y 51.004 ± 218 cpm para LPS.

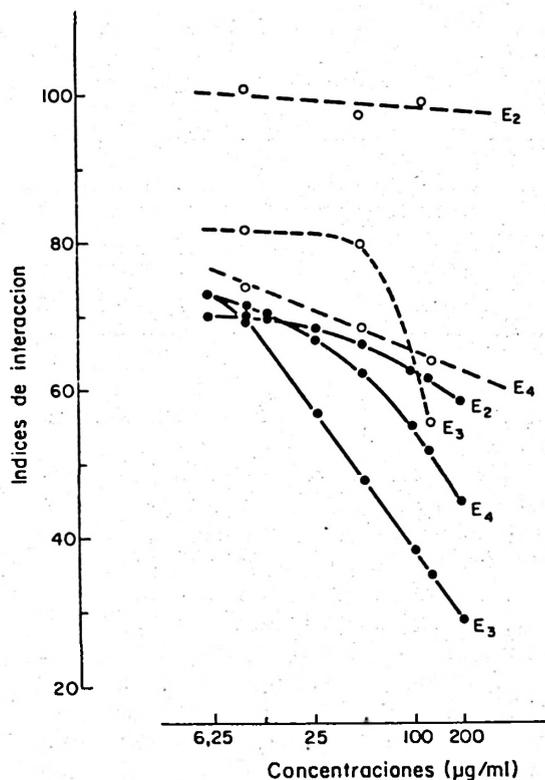


Fig. 3. Respuesta policlonal frente a concentraciones variables de extractos citoplásmicos de *P. acnes* (E_2 , E_3 , E_4) en presencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de Con A (—) o $50 \mu\text{g/ml}$ de LPS (----) medidos en % de respuesta control frente a los mitógenos aislados.

Las medidas de las respuestas patrón fueron: 256.371 ± 3.825 cpm para Con A y 70.564 ± 2.187 cpm para LPS. Se realizaron tres determinaciones por ensayo y tres ensayos en cada grupo.

cipitaciones seriadas con alcohol en frío o con sulfato amónico. De este modo se han obtenido varias fracciones de las que se han utilizado en concentraciones crecientes, las denominadas EC_2 , EC_3 y EC_4 , cuya actividad mitogénica intrínseca se indica en la tabla I.

También en estos casos se estudia el efecto combinado *in vitro* de las asociaciones mitógeno-extracto de *P. acnes*. Las curvas de interacción para distintas

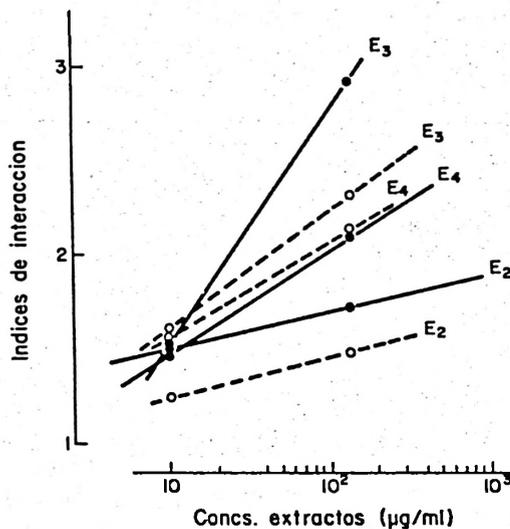


Fig. 4. Curvas dosis-respuesta blastogénica de los índices de interacción mitógeno/extractos de *P. acnes* (E_2 , E_3 , E_4) en presencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de Con A (—) o $50 \mu\text{g/ml}$ de LPS (----). Se realizaron las mismas determinaciones indicadas en la figura anterior.

concentraciones de extractos bacterianos y para la dosis óptima de cada mitógeno, muestran una inhibición variable en la estimulación por mitógenos, que es más acusada para Con A (fig. 3). Este efecto combinado es dosis-dependiente e inverso al comprobado en tratamientos *in vivo*; según parece, la mayor interacción antagónica resulta ser la correspondiente a la fracción EC_3 como se aprecia al comparar las curvas de dosis-respuesta en función de los índices de interacción (fig. 4).

Respuestas linfoproliferativas en presencia de moléculas anfifílicas de P. acnes. La capacidad inmunomodificadora de las distintas moléculas anfifílicas obtenidas a partir de células de *P. acnes* (EPS, IPS, TCA, LTA y PGC) ha sido estudiada al igual que la de los extractos bacterianos (EC_2 , EC_3 y EC_4). Se produce un efecto mitogénico de carácter

Tabla 1. Incorporación de H^3 -TdR en presencia de distintas concentraciones de extractos citoplásmicos de *P. acnes*. Valores netos de cpm/cultivo de $\approx 2,5-3 \times 10^6$ /ml de linfocitos. Pr/Ps representa la relación proteínas/polisacáridos en cada fracción citoplásmica.

Muestras	Índice Pr/Ps	10 μ g	50 μ g	125 μ g
EC ₂	0,21	3.489 \pm 483	6.628 \pm 605	11.178 \pm 1.069
EC ₃	0,85	19.319 \pm 564	22.944 \pm 996	22.985 \pm 973
EC ₄	0,05	6.981 \pm 608	17.583 \pm 1.546	27.554 \pm 2.926

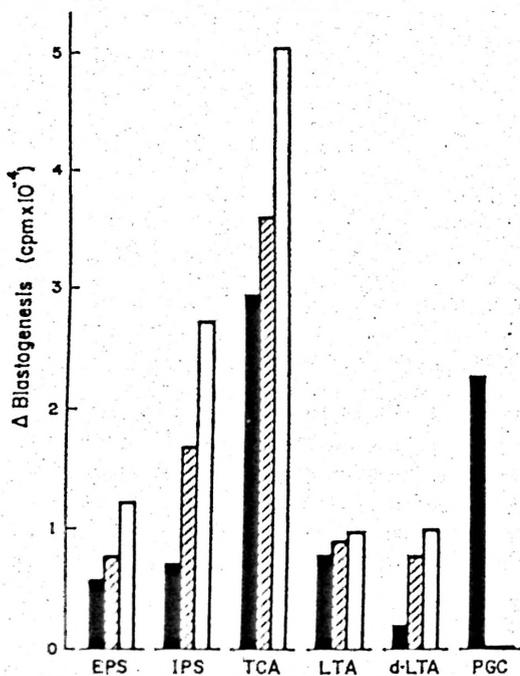


Fig. 5. Activación linfoproliferativa *in vitro* en presencia de EPS, IPS, TCA, LTA, d-LTA y PGC, a las concentraciones de 10 (■), 50 (▨) y 125 μ g/ml (□) respectivamente. Se realizaron tres determinaciones por ensayo y tres ensayos para cada grupo.

intrínseco y dosis-dependiente mayor en presencia de moléculas de TCA que el obtenido con moléculas de IPS (fig. 5). Las dosis más bajas de PGC también mostraron activación policlonal; a dosis

superiores (50 y 125 μ g respectivamente) el efecto fue de total inhibición.

Los LTA ensayados tenían una actividad semejante al EPS, aunque su desacetilación (d-LTA), a través de columnas de Dowex 50 H⁺, disminuye el efecto a la dosis inferior, mientras que existe una diferencia poco significativa ($P > 0,2$) para concentraciones de 50 y 125 μ g/ml.

Al comparar mediante representación tridimensional el efecto combinado de los mitógenos (Con A, LPS) con moléculas de polisacárido (B, C y D) y de un extracto citoplásmico (A) (fig. 6), se ve que la interacción es antagónica, variando en función de su concentración y de su grado de pureza; el intrapolisacárido (IPS) es ligeramente más activo que el polisacárido exocelular (EPS).

Finalmente, se representan comparativamente las distintas curvas de interacción mitógeno-molécula anfifílica (fig. 7), comprobándose que la mayor inhibición se obtiene en presencia del mitógeno (Con A) asociado a las moléculas de d-LTA y EPS respectivamente.

Discusión

Aunque algunos autores (18, 30) mantienen que tratamientos con *C. parvum* inducen diferentes respuestas inhibitorias de la proliferación, GODAL *et al.* (11) encuentran un efecto mitogénico *in vitro* con células de *C. parvum* inactivadas por

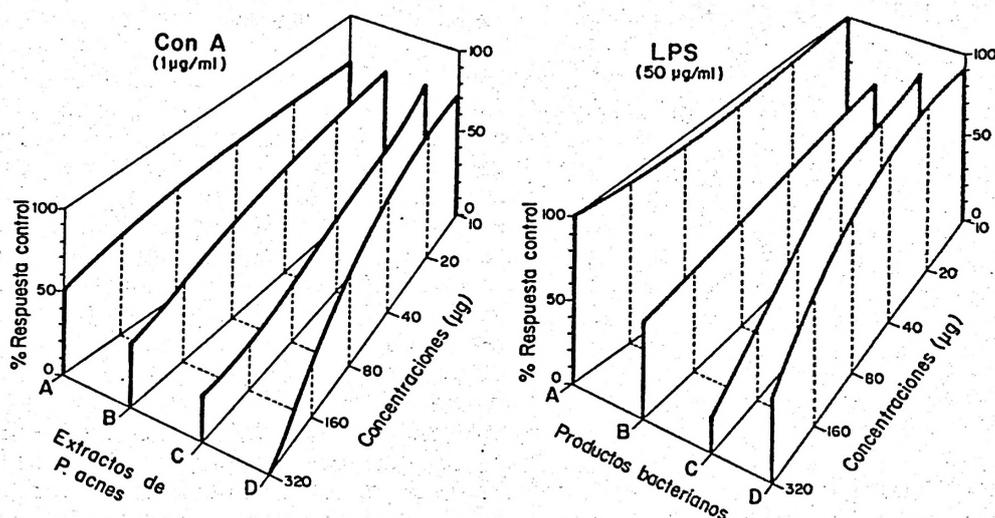


Fig. 6. Perfiles de activación mitogénica de linfocitos en presencia de distintas moléculas de *P. acnes*.

Extracto citoplásmico (A), polisacárido intracelular crudo (B) o exopolisacárido purificado (D). Las respuestas mitogénicas patrón fueron: 256.671 ± 3.700 cpm para Con A y 70.886 ± 2.155 para LPS.

calor, al actuar sobre linfocitos T de sangre periférica de individuos normales y suponen que estas células han adquirido dicha sensibilidad por exposición del huésped a corinebacterias del medio ambiente u otros antígenos con los que mantienen reacciones cruzadas. Sin embargo, ZOLA (38) no encuentra efectos mitogénicos de *C. parvum* para los linfocitos T murinos y sí algún grado de activación frente a los linfocitos B. Estas discrepancias pueden ser explicadas por intervención del GMPC en las células B murinas (36). Los resultados presentados en este trabajo indican claramente que tanto las células enteras de *P. acnes*, inactivadas por calor, como sus paredes celulares aisladas, son capaces de modificar *ex vivo* la respuesta linfoproliferativa de células de bazo murino. Este efecto se manifiesta particularmente en las poblaciones T dependientes, estimu-

ladas por Con A, mientras que las respuestas a LPS apenas aparecen modificadas. Es significativo el hecho de que, aunque los tratamientos *in vivo* con células de *P. acnes* y sus paredes, producen efectos mitogénicos semejantes a los alcanzados *in vitro* con las fracciones citoplásmicas y las moléculas anfífilas, sus interacciones en presencia de mitógenos como Con A y LPS son de signos totalmente opuestos en ambos casos. Cuando las células esplénicas de ratones tratados con *P. acnes* o sus paredes son estimuladas por Con A *ex vivo*, se produce un efecto potenciador de la mitogénesis, mientras que la estimulación con LPS apenas sufre modificaciones estadísticamente significativas ($P > 5$). Por el contrario, cuando los linfocitos de bazo se tratan *in vitro* con extractos o metabolitos de *P. acnes* y, sucesivamente, se estimulan con las mismas dosis de Con A

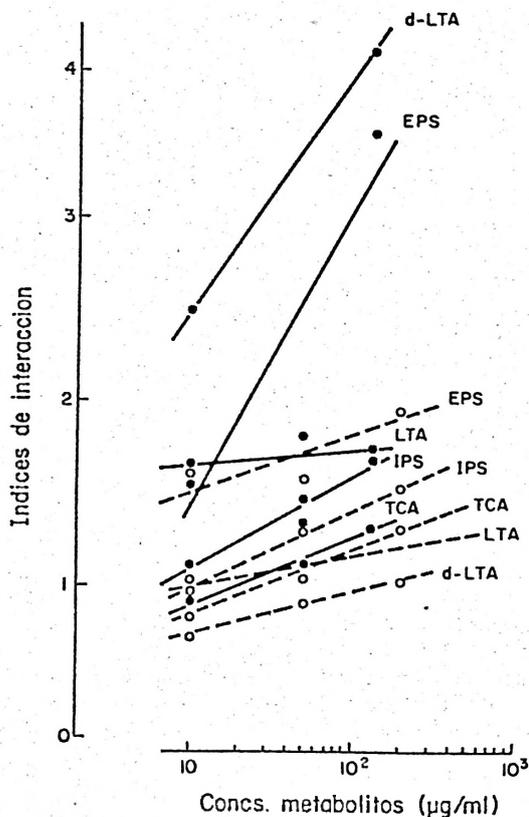


Fig. 7. Curvas dosis-respuesta blastogénica según los índices de interacción mitógeno-agente bacteriano (EPS, IPS, TCA, LTA y d-LTA) en presencia de 1 µg/ml de Con A (—) o 50 µg/ml de LPS (----).

y LPS que en el caso anterior, se obtiene un efecto claramente antagónico dosis-dependiente, que también resulta más marcado para las células sensibles a Con A. Es probable que en estos efectos exista intervención de mecanismos alquilantes de fosfolípidos, ya que al igual que HIRATA *et al.* (14, 33) encontraron una señal moduladora de la mitogénesis por metilación de fosfolípidos de membrana, también aquí se muestra una variación del efecto (para la concentración de 10 µg/ml) cuando las moléculas de

LTA son desaciladas por paso a través de columnas de Dowex.

Aunque GODAL *et al.* (11) sugieren que las bacterias tienen una acción mitogénica análoga a la fitohemaglutinina o Con A, no se tienen datos todavía para afirmar si hay una competición a nivel de receptores o si se puede tratar de modificaciones a nivel del metabolismo de ácidos nucleicos. En cualquier caso, han resultado con un efecto mitogénico más acentuado (a las dosis utilizadas), las moléculas de TCA e IPS, ya que los PGC resultaron tóxicos a dosis superiores a 10 µg/ml, por lo que la acción inmunomodificadora de estas moléculas debe ser estudiada con más detenimiento. Se está pendiente de conseguir el marcado isotópico de estas moléculas para estudiar las interacciones receptor-ligando a nivel de membrana en distintas condiciones experimentales.

Agradecimientos

Trabajo subvencionado parcialmente por la CAICYT (número 0034-C05-81) y por los Laboratorios Abelló, S. A. Los autores agradecen la asistencia técnica de D.^a Rosa Martínez-Dalmau y D.^a María Luisa del Pozo, así como la colaboración de D. A. Hurtado en el dibujo de gráficas y figuras.

Resumen

La respuesta blastogénica de linfocitos esplénicos de ratón varía en función del tratamiento aplicado: a) células muertas de *Propionibacterium acnes*, o b) sus paredes celulares. El efecto de ambos agentes sobre la respuesta de linfocitos tratados *ex vivo* con Con A produce una estimulación variable, que es mayor en los tratamientos orales. En las mismas condiciones, la influencia de estos agentes sobre la estimulación por LPS de linfocitos apenas tiene efecto significativo. En experimentos análogos *in vitro*, empleando las mismas moléculas antifilicas y midiendo la respuesta en función de la incorporación de H³-timidina, se produce una inhibición variable de la respuesta mitogénica de carácter dosis-dependiente y con ma-

por intensidad para asociaciones de Con A y molécula anfífilica. Las actividades mitogénicas intrínsecas más efectivas corresponden a los ácidos teicoicos y polisacáridos intracelulares. Moléculas de este tipo no purificadas y ensayadas como fracciones citoplásmicas, presentan variaciones en la intensidad de su acción, que depende de la relación glúcido-prótido.

Bibliografía

1. ADLAM, C. y SCOTT, M. T.: *J. Med. Microbiol.*, **6**, 261-274, 1973.
2. ALONSO, E.: *Téc. Lab.*, **111**, 1042-1053, 1983.
3. AZUMA, I., SUGIMURA, K., TANIYAMA, T., ALADIN, A. A. y YAMAMURA, Y.: *Japan J. Microbiol.*, **19**, 265-275, 1975.
4. BRADFORD, M. M.: *Analyt. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
5. BUCHANAN, R. E., GIBBONS, M. E., ed.: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (8th ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, 1974, pp. 1-1246.
6. CABRERA, M., GIL, I. y RODRÍGUEZ, D.: *Zbl. Mikrobiol.*, **138**, 391-395, 1983.
7. CASTRO, J. E.: *Eur. J. Cancer*, **10**, 115-120, 1974.
8. CUMMINS, C. S. y JOHNSON, J. L.: *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 433-442, 1974.
9. CUMMINS, C. S. y LINN, D. M.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1697-1707, 1977.
10. FERNE, M., BERGNER-RABINOWITZ, S. y GINSBURG, I.: *Inflammation*, **1**, 247-254, 1976.
11. GODAL, T., KLEPP, O., ONSRUD, M.: *Cancer Immunol. Immunother.*, **3**, 69-71, 1977.
12. HALPERN, B.: *Corynebacterium parvum*. Plenum Press, Nueva York, 1975.
13. HARTZMAN, R. J., BACH, M. L., BACH, F. H., THURMAN, G. B., SELL, K. W.: *Cell Immunol.*, **4**, 182-186, 1972.
14. HIRATA, F., TOYOSHIMA, S., AXELROD, J., WAXDAL, M. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1718-1734, 1980.
15. HOLDEMAN, L. V., MOORE, W. E. C.: *Anaerobe laboratory manual* (3rd ed.). Virginia Polytechnic Inst. and State Univ. Blacksburg, Virginia, 1980, p. 124.
16. HOWARD, J. G., CHISTIE, G. H., SCOTT, M. T.: *Cell. Immunol.*, **7**, 290-301, 1973.
17. HUME, D. A., WEIDEMANN, M. J.: *Mitogenic lymphocyte transformation Research monographs in Immunology*, vol. 2. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1980.
18. KIRCHNER, H., HOLDEN, H. T. y HERBERMAN, R. B.: *J. Immunol.*, **115**, 1212-1216, 1975.
19. KRUSE, P. F. Jr., y PATTERSON, M. K., Jr.: *Tissue culture, methods and applications*. Academic Press, Nueva York, 1973.
20. MCCRACKEN, A., MCBRIDGE, W. H. y WEIR, A. M.: *Clin. Exp. Immunol.*, **8**, 949-957, 1971.
21. NAUMAN, D., BARNICKEL, G., BRADACZER, H., LABISCHINS, K. H. y GIESBRECHT, P.: *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505-515, 1982.
22. NEVEU, T., BRANELLEC, Z. y BIOZZI, G.: *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **106**, 771-777, 1964.
23. NILSSON, S. F. y WAXDAL, M. J.: *Biochemistry*, **17**, 903-910, 1978.
24. O'NEIL, G. J., HENDERSON, D. C. y WHITE, R. G.: *Immunology*, **24**, 977-995, 1973.
25. OPPENHEIM, J. J.: *Fed. Proc.*, **27**, 21-32, 1968.
26. PREVOT, A. R., NGUYEN-DANG, T. y THOUVENOT, H.: *C.R. Acad. Sci. Paris, serie D*, **267**, 1061-1066, 1968.
27. RÄSÄNEN, L. y ARVILOMMI, H.: *Infect. Immunity*, **34**, 712-717, 1981.
28. ROJO, J. M., OJEDA, G., PORTOLÉS, M. P. y PORTOLÉS, A.: *Chemotherapy*, **29**, 345-351, 1983.
29. ROOS, D. y LOOS, J. A.: *Biochem. Biophys. Acta*, **222**, 565-582, 1970.
30. SCOTT, M. T.: *Cell. Immunol.*, **5**, 459-468, 1972.
31. SCOTT, M. T.: *Cell. Immunol.*, **13**, 251-263, 1974.
32. SELA, M. N., LAHAV, M. y GINSBURG, I.: *Inflammation*, **2**, 151-157, 1977.
33. TOYOSHIMA, S., HIRATA, F., IWATA, M., AXELROD, J., OSAWA, T. y WAXDAL, M. J.: *Molec. Immunol.*, **19**, 467-475, 1982.
34. TREVELYAN, W. E. y HARRISON, J. S.: *J. Biochem.*, **50**, 298-300, 1952.
35. VISCHER, T. L.: *Clin. Exp. Immunol.*, **11**, 523-000, 1972.
36. WEINSTEIN, Y., SEGAL, S. y MELMON, K. L.: *J. Immunol.*, **115**, 112-000, 1975.
37. WICKEN, A. J., GIBENS, J. W. y KNOX, K. W.: *J. Bacteriol.*, **113**, 365-372, 1973.
38. ZOLA, H.: *Clin. Exp. Immunol.*, **22**, 514-521, 1975.

