



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACTIVACION DE LINFOCITOS B IN VITRO POR UN  
EXTRACTO DE NOCARDIA BRASILIENSIS

Tesis Profesional

José Sulivan López González

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

TESIS 1979  
M.T.  
196  
PROG  
S



	PRESIDENTE	Manuel Wong Chío
Jurado asignado	VOCAL	Rafael Santana Mondragón
originalmente	SECRETARIO	Librado Ortiz-Ortiz
según el tema.	1er SUPLENTE	Dolores Lastra Azpilicueta
	2do SUPLENTE	Beatriz Medina Jimenez

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Nombre del sustentante: JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ

Nombre del asesor del tema: LIBRADO ORTIZ-ORTIZ



Agradezco sinceramente al Dr. Librado Ortiz-Ortiz, su valiosa dirección y sugerencias en el desarrollo del presente trabajo. A la M. en C. Emma I. Melendro sus apreciables sugerencias y colaboración y a los compañeros del laboratorio su apoyo en la realización de esta tesis.

A MAMA CON  
CARIÑO Y GRATITUD

A MI PADRE Y HERMANOS

A MIS MAESTROS

A MIS GRANDES AMIGOS Y  
COMPAÑEROS POR SU AMISTAD

## I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	14
MATERIALES Y METODOS	20
RESULTADOS	28
DISCUSION	35
BIBLIOGRAFIA	39

## INTRODUCCION

La respuesta inmune en un contexto general consiste de una serie de eventos iniciados por la interacción de las células inmunocompetentes con el antígeno (Ag). En la última década ha sido esclarecido el papel de los linfocitos en la iniciación de este tipo de respuesta y se han clasificado en dos tipos: (i) Linfocitos T que derivan del timo y son los responsables de las reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío, inmunidad a trasplantes y tumores, resistencia celular a numerosos microorganismos y algunas formas de autoinmunidad y (ii) linfocitos B derivados de médula ósea, que producen moléculas de inmunoglobulinas (Ig) llamadas anticuerpos que son secretadas al suero.

Otros tipos de células tales como monocitos, macrófagos, granulocitos, etc., juegan también un papel importante en la respuesta inmune, aunque estas células no están involucradas al inicio en el reconocimiento específico del Ag, están relacionadas con la captura o manejo de éste. Cuando los linfocitos reaccionan con el antígeno, se diferencian y proliferan para producir una progenia de células efectoras, las cuales ejecutan la respuesta inmune y de células de memoria o comprometidas que son las responsables de una respuesta inmune aumentada (respuesta secundaria), que se origina cuando el organismo se pone por segunda vez en contacto con el Ag.

## RESPUESTA INMUNE CELULAR

Por estudios hechos in vitro se sabe que la inmunidad mediada por células (CMI) depende de la interacción entre los linfocitos T y los fagocitos mononucleares. Este tipo de respuesta se inicia cuando el Ag o el mitógeno es reconocido por la célula T, la cual lleva a cabo procesos de diferenciación y proliferación que se reflejan en una activación que induce la producción de varios factores con actividad biológica, denominados por Dumonde y col. ( 1 ) "mediadores", productos de linfocitos activados (PLAs) o "linfocinas".

Dentro de estos mediadores o linfocinas se encuentran: el factor inhibidor de la migración (MIF) descrito por George y Vaughan ( 2 ) y más directamente en 1966 por Bloom y Bennett ( 3 ) y David ( 4 ). Los factores quimiotácticos descritos por Ward y David ( 5 ), el factor estimulante de la función del macrófago (MAF) descrito por Mooney y Waksman ( 6 ), el factor blastogénico descrito por Valentine y Lawrence ( 7 ), el factor reactivo de la piel descrito por Bloom y Bennett ( 8 ), el factor linfotóxico de Granger y colaboradores ( 9 ), el factor de transferencia descrito por Lawrence ( 10, 11 ) y el factor tipo interferón ( 12 ). Todos estos factores reclutan y estimulan linfocitos y monocitos. Los monocitos que son transformados a macrófagos activos muestran un aumento en su actividad fagocítica y microbicida debido a

un incremento en su actividad enzimática (lisosomal).

Otra de las manifestaciones de la inmunidad celular es la de destruir células blanco (que pueden o no contener al antígeno en su superficie). Estas reacciones citotóxicas parecen estar en el umbral de una reacción específica entre un linfocito T y su Ag. Se han propuesto varios modelos para explicar como estas reacciones pueden llevarse a cabo: el primero indica que, las células blanco son destruidas por un contacto específico con el linfocito T (muerte por contacto); otro postula, que una sustancia tóxica, liberada por la célula T activada por el Ag, lisa a las células blanco y a células no relacionadas; un tercer modelo describe que, las células linfoides normales destruyen células blanco que están unidas a moléculas de anticuerpo (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) ( 13, 14 ). Cada uno de estos mecanismos han sido definidos por sistemas in vitro y se desconoce cual de ellos es más importante in vivo.

La CMI finalmente alcanza el nivel de inflamación alérgica, producida al menos en parte por la liberación de sustancias flogísticas derivadas del macrófago atraído y activado localmente, durante las etapas mencionadas anteriormente ( 15 ).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Este tipo de inmunidad está determinado por los linfocitos B que tienen receptores tipo inmunoglobulínico en su superficie y son los precursores de las células formadoras de anticuerpo ( 16, 17 ). Estas células B, bajo el estímulo antigénico, son activadas y diferenciadas a células plasmáticas (formadoras de anticuerpo), las que se caracterizan por presentar un retículo endoplásmico muy abundante, estructura celular fundamental para que la célula lleve a cabo la síntesis de inmunoglobulina.

Se han encontrado antígenos poliméricos como: polisacárido III del pneumococo, levanas, lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli, polivinil pirrolidona, flagelina polimerizada, etc., que actúan directamente sobre la célula B; estos antígenos se caracterizan no sólo por la presencia de determinantes repetitivos idénticos, sino también porque son lentamente metabolizados y producen en su mayoría respuestas de tipo IgM. Ya que inducen una respuesta normal de las células B en animales carentes de células T, se les han denominado antígenos timo-independientes.

En cambio, otros antígenos no presentan estas características y se les llama antígenos timo-dependientes, los cuales generalmente inducen en un individuo una respuesta de tipo IgM seguida de IgG. Es necesario mencionar que en un ratón deprimido de células T, la respuesta de tipo IgM es menor que la observada en animales normales y la de IgG está, la mayoría de las veces ausente ( 18 ). Se ha demostrado que



la unión de estos antígenos timo-dependientes con los receptores de la célula B se lleva a cabo, pero esto no parece ser suficiente para que la célula se diferencie, lo cual puede deberse a que estos antígenos sean rápidamente metabolizados y no persistan el tiempo requerido para los eventos de iniciación, además de que carecen de unidades repetitivas lo cual no les permite enlazarse en forma multivalente a los receptores inmunoglobulínicos. Miller y Mitchell ( 17 ) han demostrado que las células T son necesarias para que estos antígenos disparen a la célula B a formar anticuerpos. Por lo tanto, es necesario una cooperación de las células T y B para responder a esta clase de antígenos.

Actualmente se considera a la respuesta inmune no sólo como un mecanismo de defensa, sino también homeostático, el cual provee resistencia a infecciones como bacterias facultativas intracelulares, hongos, virus y además mantiene la integridad funcional del organismo eliminando células anormales y potencialmente malignas ( 15 ).

#### MITOGENOS

Desde el descubrimiento de Nowell ( 19 ) se sabe que la fitohemaglutinina (PHA), lectina de Phaseolus vulgaris, induce una transformación blastoide en linfocitos normales, por lo cual la estimulación mitogénica de estas células

ha sido estudiada extensamente como un modelo de activación antigénica y control de crecimiento.

Una amplia variedad de agentes químicos diversos, que varían desde iones metálicos hasta macromoléculas como anticuerpos y lectinas, han mostrado ser mitógenos ( 20 ); además los componentes celulares con los cuales estos mitógenos pueden interactuar son muy variados e incluyen inmunoglobulinas de superficie, beta<sub>2</sub>-microglobulinas, carbohidratos, glicoproteínas, glicolípidos y posiblemente enzimas de membrana tal como la adenil ciclasa y la guanidil ciclasa. También se ha demostrado que algunos compuestos tales como el metaperyodato de sodio ( 21, 22 ), Concanavalina A (Con A) ( 23 ) y PHA ( 24 ) estimulan específicamente linfocitos T, mientras que otras sustancias mitogénicas como LPS de bacterias Gram negativas ( 25 ), levanas, flagelina polimerizada ( 26 ) y anti beta<sub>2</sub>-microglobulina ( 27 ) estimulan solamente linfocitos B; en cambio, la Phytolacca americana (PWM) ( 28 ) puede estimular a ambas poblaciones.

Se ha demostrado en varios sistemas y especies de animales que los mitógenos de los linfocitos B activan adecuadamente a estas células en ausencia de células accesorias, linfocitos T ( 25, 29 ) y macrófagos ( 30 ); sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que estos ligandos puedan tener propiedades para activar a otras células tipo macrófago ( 31 ) y aún fibroblastos ( 32 ).

El hecho de que tanto los antígenos como mitógenos

de diferente especificidad y estructura puedan estimular a los linfocitos, sugiere que la inducción de la mitosis no es absolutamente dependiente de la especificidad de los receptores de membrana para varios ligandos y que el proceso de disparo por diferentes mitógenos pueden compartir una vía final común. Se asume que los eventos de superficie inducidos por la unión de los mitógenos a sus receptores específicos son los responsables de la iniciación de la estimulación de los linfocitos ( 23, 24 ).

Se ha demostrado que los linfocitos pueden ser activados por PHA o PWM covalentemente unidos a perlas de sepharosa ( 24 ) o también con Con A unida a cajas Petri ( 23 ) o a partículas poliméricas acrílicas ( 33 ), indicando que para la activación no es necesario que el estimulante penetre a la célula. Aunque hay evidencias de que algunos estimulantes pueden entrar al linfocito, se considera que este paso es irrelevante en la activación. Estudios más recientes muestran que mientras la unión del mitógeno ocurre inicialmente en muchos sitios alrededor de la periferia de la célula, subsecuentemente llega a concentrarse en un casquete de uno de los polos de la célula y es entonces interiorizado por pinocitosis ( 34, 35 ). Estos estudios indican que inicialmente los receptores están dispersos en la membrana celular y que pueden moverse bajo la influencia del estimulante, probablemente esto se deba a que el mitógeno sea multivalente y pueda unir a más de un receptor formando finalmente el casquete; una vez den-

tro de la célula parece que se concentra en las vacuolas citoplasmáticas las cuales son probablemente lisosomas ( 34 ), pudiendo ser degradado por las enzimas que contienen, aunque esto último solo se ha demostrado en el caso de anti-inmunoglobulina ( 36 ).

La unión del estimulante causa muchas alteraciones tempranas en las propiedades de la membrana celular, tales como un aumento en la incorporación de metabolitos y de iones, especialmente el calcio ( 29 ); un incremento del guanosin 3'5'-monofosfato (GMP cíclico) ( 37 ) así como del metabolismo de los fosfolípidos ( 38 ), particularmente en recambio de fosfatidil inositol ( 39 ). Aunque la secuencia de estos eventos no ha sido aún definida, hay evidencias de que la transformación linfocítica depende de la presencia de calcio extracelular ( 40, 41 ) y de que el recambio de fosfatidil inositol es un evento ubicuo en la activación de muchos tipos de células. Por lo que respecta al adenosin 3'5'-monofosfato (AMP cíclico) y al GMPc, éstos han sido implicados como reguladores intracelulares del crecimiento y diferenciación de las células ( 37, 42 ).

El AMPc es sintetizado a partir del ATP por la enzima adenil ciclase que se encuentra localizada en la membrana plasmática, en respuesta a la unión del mitógeno u hormona con su receptor. El rompimiento del AMPc a AMP es catalizado por una fosfodiesterasa localizada, al menos en los linfocitos, en la membrana nuclear ( 43 ). Se propone que la

interacción ligando-receptor induce un cambio en el receptor que resulta en un incremento en la actividad del sistema de la adenil ciclasa, la cual actúa como un segundo mensajero que transmite información desde la membrana hasta el interior de la célula ( 44 ). Sin embargo, ni el AMPc, ni ningún agente que cause un incremento de su concentración en los linfocitos, causa un aumento en la estimulación; más aún, parece que niveles altos de AMPc inhiben los estados proliferativos de la respuesta a mitógenos.

Recientemente, ha llamado la atención el otro nucleótido cíclico (GMPc). Su concentración en la célula es mucho más baja que la del AMPc, pero Hadden ( 37 ) encontró que se incrementaba entre 10 a 50 veces en los primeros 20 minutos después de adicionar Con A o PHA a los cultivos, lo que sugiere que este nucleótido actúe como un mediador intracelular por acción de los agentes mitogénicos.

Entre la secuencia de cambios bioquímicos que preceden a la síntesis de DNA, se encuentran: la síntesis acelerada de RNA ( 45, 46 ) y proteínas ( 47, 48 ), el incremento en la actividad de enzimas tales como la timidina cinasa, la desoxicitidina cinasa y la desoxicitidilato desaminasa ( 49 ).

#### ACTIVADORES POLICLONALES

Mientras que los mitógenos son sustancias que inducen solamente mitosis, los activadores policlonaes son

substancias que por sí mismas pueden activar directamente a los linfocitos B e inducir la síntesis de anticuerpos de varias especificidades inmunológicas. La lista de estos activadores incluyen varios polisacáridos bacterianos, como son: el LPS, los polisacáridos del pneumococo, el derivado proteico purificado (PPD), las dextranas, las levanas, el micoplasma y una gran variedad de otros productos bacterianos, así como también substancias de bajo peso molecular como polienos. La mayoría de los activadores que se conocen son polisacáridos, pero ésto no es necesariamente una característica primordial.

Estas substancias activan a las células B para llevar a cabo la función para la cual han sido genéticamente programadas y que pueden desempeñar de acuerdo a su estado de diferenciación; es decir, que un activador policlonal revela no sólo el repertorio genético del linfocito sino también su estado de diferenciación. La respuesta de una célula en particular, puede ser la inducción de síntesis de anticuerpo con poca o nula síntesis de DNA ( 26 ), mientras que otras células pueden activarse sólo a síntesis de DNA ( 50, 51 ); aunque se ha encontrado que después de la activación la mayoría de las células expresan ambos parámetros ( 52 ).

Se ha observado que estas substancias no se unen a los receptores inmunoglobulínicos del linfocito y sin embargo, tienen la habilidad de iniciar la síntesis de anticuerpo en estas células. Se piensa que al menos la región variable de estos receptores no es necesaria para que ocurra la

activación celular. Möller ( 53 ) ha propuesto que el papel de los receptores es unir al antígeno con la célula correcta, mientras que las señales de activación son proporcionadas por otras estructuras de la molécula antigénica.

Coutinho y Möller ( 26 ) han demostrado experimentalmente que todos los antígenos timo-independientes se comportan como activadores policlonales; por lo tanto, los activadores policlonales y los antígenos timo-independientes tienen la capacidad de activar directamente a las células B, sin necesidad de células accesorias y la diferencia entre ellos consiste en que los antígenos independientes de timo inducen una respuesta inmune específica, mientras que los activadores policlonales pueden activar las células B de todas las especificidades inmunológicas. Coutinho y Möller ( 54 ) propusieron que la diferencia depende de la unión específica del antígeno timo-independiente con el receptor inmunoglobulínico; es decir, a bajas concentraciones de antígeno, éste se concentra en las células correctas, las cuales serán activadas por las señales intrínsecas de este antígeno; a estas bajas concentraciones las otras células B no son capaces de unir suficiente cantidad de antígeno en su superficie para llegar a activarse. Sin embargo, a altas concentraciones de antígeno, las células no específicas son capaces de activarse ya que acumulan suficiente cantidad del mismo en su superficie, mientras que las células específicas se encuentran "paralizadas" por contener concentraciones superóptimas del

antígeno. Esta hipótesis de una señal no específica proporciona un papel totalmente pasivo a los receptores inmunoglobulínicos.

Se ha propuesto en el caso de los antígenos timo-dependientes, que la célula T y/o macrófagos son capaces de proporcionar señales para activar a la célula B respondedora; aquí los receptores servirían sólo como puente entre la célula B y T ( 53 ).

Gronowicz y Coutinho ( 55 ) han encontrado además que cada activador policlonal actúa sobre subpoblaciones de linfocitos B que pueden estar parcialmente interrelacionadas. También se ha observado que algunos activadores como el LPS actúa sobre una población comparativamente grande, mientras que otros actúan en poblaciones más pequeñas. Además se ha visto que cada subpoblación de células B estimulada difiere con respecto a su estado de diferenciación y que esto condiciona que cada una de ellas tenga su propio estereotipo de respuesta al ser estimulada por el activador correspondiente. Así, la dextrana sulfatada actúa sobre células inmaduras o precursoras; el LPS sobre células más maduras; el PPD sobre las más diferenciadas ( 51 ) y la polivinilpirrolidona (PVP) sobre las totalmente maduras ( 26, 56 ).

Primi y col. ( 57, 58 ) haciendo uso de los activadores policlonales, han demostrado la existencia en el organismo de células B autorreactivas, que existen en un estado de reposo y que al ser activadas por este tipo de sustancias



secretan sus productos genéticos en la misma forma que las demás células. Esto implica que la discriminación de lo propio y lo extraño está dada por la célula T y que la falta de respuesta a los antígenos propios no existe a nivel de la célula B. En condiciones normales, la prevención de la formación de autoanticuerpos se debe probablemente a la ausencia de células T reactivas a sí mismo, ya que todos los antígenos autólogos son timo-dependientes; consecuentemente la célula B que reconoce a los antígenos propios no puede ser activada debido a la falta de cooperación entre la célula T y B ( 59 )

Es importante mencionar que tanto en la mitogenicidad como en la potencia de estos activadores influyen: la cantidad de células en el cultivo, la afinidad de la unión de los activadores a los receptores celulares y la dosis. Por lo tanto, el común denominador de estas sustancias (mitógeno y activador policlonal) es el hecho de que pueden activar directamente a las células B sin importar la especificidad inmunoglobulínica de su superficie.

## ANTECEDENTES

En el orden de los Actinomicetales se encuentran agrupados aquellos microorganismos que poseen características que los semejan tanto a bacterias como a los hongos. Uno de los géneros incluidos dentro de este orden es Nocardia, el cual incluye a organismos pleomórficos que se caracterizan por ser: bacilos ácido-alcohol resistentes, aerobios, Gram positivos, no esporulados y por formar micelios aéreos rudimentarios que se fragmentan en cuerpos bacilares o cocoides. Debido a su heterogeneidad, su posición taxonómica ha sido objeto de estudios que van desde sus características morfológicas, bioquímicas, serológicas, hasta el conocimiento de sus requerimientos nutricionales, su composición química e hibridización de sus DNAs ( 60 ).

El género Nocardia fué descrito por Trevisan en 1889 ( 61 ), quien le dió este nombre en honor a Nocard primero en describir el agente etiológico de la enfermedad llamada farcinosis en el ganado bovino ( 62 ).

Dentro de los microorganismos que se encuentran en este género hay tres especies que son patógenas para el hombre y son: N. brasiliensis, N. caviae y N. asteroides. Las dos primeras producen micetomas que son tumoraciones fistulosas, en las que el agente causal se encuentra presente en forma de acumulos miceliales o microcolonias conocidos como gránulos, los cuales son irregulares, están rodeados por

l6bulos o clavos, en las que la hifa esta rodeada por material amorfo como fosfato de calcio y a veces por leucocitos polimorfonucleares del huésped ( 63, 64 ). En cambio, N. as-teoides es el agente causal de la nocardiosis pulmonar o pseudotuberculosis que se produce como consecuencia de la inhalación del microorganismo, el cual se establece en los pulmones originando un cuadro clínico muy semejante a la tuberculosis.

Se desconoce por completo la evolución de la infección causada por N. brasiliensis, que bien podría estar modulada por el tipo de respuesta inmune que se presente, ya que durante largos periodos después de la infección se han detectado niveles altos de anticuerpos y se ha demostrado la existencia de inmunidad celular ( 65, 66 ). La respuesta humoral que se presenta en individuos o animales infectados con N. brasiliensis ha sido estudiada por varios autores ( 67 ), así como también la presencia de hipersensibilidad de tipo tardío (DTH), que como se sabe es una de las manifestaciones de la inmunidad mediada por células ( 68, 69, 70 y 71 ).

Varios autores han demostrado la existencia de DTH a antígenos de Nocardia. El primero en demostrarlo fué Arêa Leão en 1928 ( 72 ), posteriormente Lacaz en 1945 ( 73 ), Glover y col. en 1948 ( 74 ), González-Ochoa y Baranda en 1953 ( 75 ), Magnusson en 1961 ( 76 ) y Bojalil y Magnusson en 1963 ( 77 ) trabajando con antígenos del medio de cultivo de Nocardia encontraron reacciones cruzadas con sueros de

pacientes tuberculosos. Posteriormente Ortiz-Ortiz, Contreras y Bojalil ( 68, 69, 70 y 71 ) utilizando diferentes antígenos obtenidos de material somático tales como un extracto citoplasmático purificado ( 68 ), una proteína ribosomal ( 69 ) y un polisacárido ( 70 ) demostraron la presencia de DTH en cobayos infectados con N. brasiliensis y N. asteroides; con estos antígenos se obtuvo una mayor especificidad tanto in vivo como in vitro, que con los preparados a partir del medio de cultivo.

Ortiz-Ortiz, Contreras y Melendro ( 78 ), llevaron a cabo estudios sobre la dinámica de la CMI en animales infectados con Nocardia. En este estudio se utilizó la prueba cutánea (PC) para medir DTH y se observó que la reacción era de mayor intensidad alrededor de los días 20 a 25 y que posteriormente disminuía. Por otro lado, Melendro y col. ( 79 ) midieron cambios en la resistencia del huésped infectado con N. brasiliensis, contra un organismo no relacionado Listeria monocytogenes y observaron un aumento en la fagocitosis únicamente en el día 20; la capacidad de digestión intracelular se vió incrementada en los animales infectados a partir del día 15 después de la infección.

#### COMPOSICION DE LA PARED DE LA NOCARDIA

Con el fin de determinar las relaciones taxonómi

cas existentes entre la Nocardia y otros actinomicetos relacionados, se ha tratado de estudiar la composición de la pared celular. La pared de los géneros clasificados como Nocardia esta formada por una estructura compleja que consiste de un peptidoglucano, constituyentes lipídicos y otros compuestos polisacáridos o peptídicos.

#### PEPTIDOGLUCANO

Llamado también mucopéptido o mureína, es un constituyente común de todas las bacterias. En el caso del género Nocardia, la parte glucano es lineal y consiste de unidades disacáridas de  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico unidas por enlaces  $\beta 1 \rightarrow 4$ . El ácido murámico está unido por su parte carboxílica a una cadena tetrapeptídica con la secuencia L-alanina-D-glucosamina-ácido meso-diaminopimélico-D-alanina. Dos subunidades peptídicas pueden estar unidas directamente por la unión ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) diaminopimélico-D-alanina para formar un complejo con estructura reticular ( 80, 81 y 82 ) (Fig. 1).

Lechevalier y Lechevalier ( 83 ) y otros investigadores ( 84, 85 y 86 ) basándose en la composición de la pared celular, han logrado clasificar a las paredes celulares de los actinomicetales en 7 tipos (Tabla 1); el género Nocardia quedo comprendido dentro del tipo IV el cual se

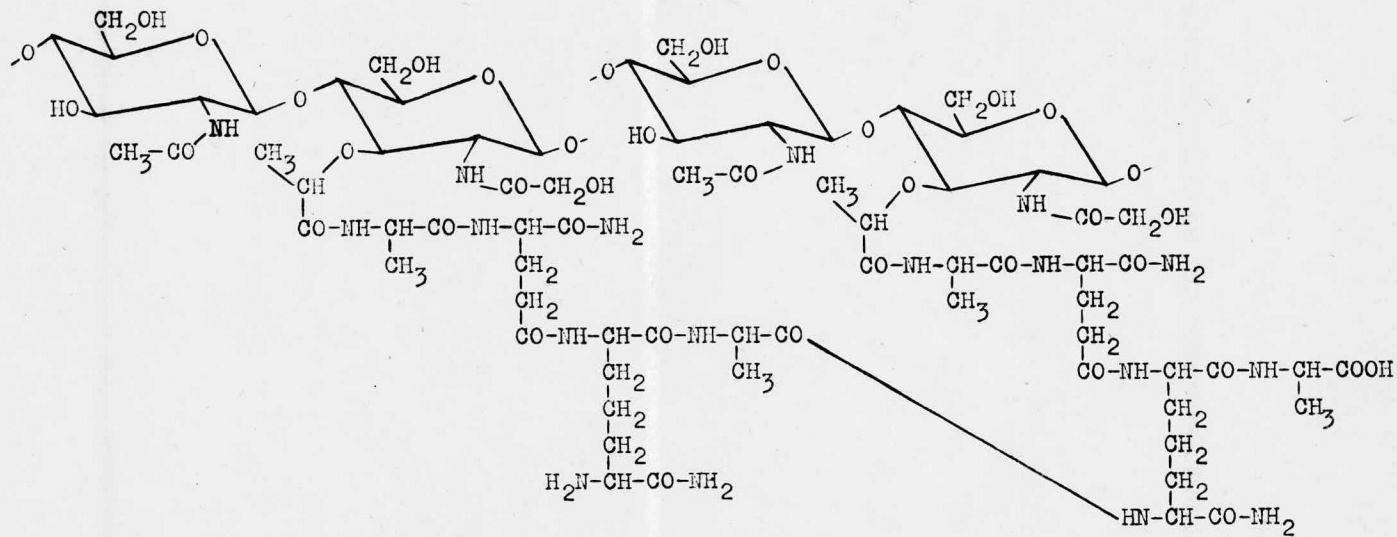


Fig. 1

PRINCIPALES CONSTITUYENTES DE LA PARED CELULAR DE LOS ACTINOMICETOS

Tipo de pared celular	Típico de:	Principales constituyentes:
I	Streptomyces	ácido L-2,6-diaminopimélico, glicina
II	Micromonospora	ácido Meso-2,6-diaminopimélico, glicina y algunas veces ácido hidroxiaminopimélico
III	Actinomadura	ácido Meso-2,6-diaminopimélico
IV	Nocardia Mycobacterium Corynebacterium (tipo-diphtheriae) Grupo rhodochrous	ácido Meso-2,6-diaminopimélico, arabinosa y galactosa
V	Actinomyces israelii	lisina, ornitina
VI	Rothia Actinomyces bovis	lisina, ácido aspártico
VI+Gal	Oerskovia	lisina, ácido aspártico, galactosa
VII	Agromyces	ácido 2,4-diaminobutírico, glicina
---	Mycoplasma	ácido Meso-2,6-diaminopimélico y numerosos aminoácidos

Tabla 1

caracteriza por contener ácido meso-2,6-diaminopimélico, arabinosa y galactosa.

Un efecto biológico común a los géneros Mycobacterium y Nocardia es su acción adyuvante. Freund y Walter ( 87 ) encontraron que la incorporación de un antígeno en fase acuosa y células muertas de Mycobacterium o Nocardia en fase oleosa, es un método efectivo para producir una intensa y prolongada respuesta de anticuerpos, así como una hipersensibilidad de tipo tardío. La naturaleza química del principio activo de estos microorganismos ha sido objeto de varias investigaciones que han llegado a determinar que el principal componente es el peptidoglucano, el cual incorporado en una emulsión agua-aceite produce un granuloma, incrementa el título de anticuerpos e induce un alto nivel de CMI en contra del antígeno. Se ha demostrado que, aún pequeñas fracciones del peptidoglucano, como el N-glucolil-muramil-L-alanina-D-isoglutamina (muramil dipéptido), conserva esta actividad adyuvante ( 88, 89 ).

Varios investigadores ( 90, 91, 92 y 93 ) encontraron que un extracto soluble obtenido a partir de la pared celular de varias cepas de Nocardia no patógenas (N. opaca, N. rubra y N. corallina) induce una fuerte activación mitogénica en las células B de conejos, de ratones y de humanos, además de que posee características de activador policlonal.

En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio ( 94 ) usando células de bazo de animales normales



cultivadas en presencia de un extracto de N. brasiliensis se encontró un aumento en la incorporación de timidina; esto nos sugirió que probablemente existiera en este microorganismo un componente celular mitogénico semejante en su función biológica al descrito en el caso de las cepas de Nocardia no patógenas, lo cual sería de interés para tratar de explicar las alteraciones que causa este organismo en el huésped.

En este reporte, se describe la actividad mitogénica y policlonal que ejerce un extracto de N. brasiliensis sobre los linfocitos murinos. Así mismo, se presenta un estudio del efecto adyuvante de este extracto en un sistema in vitro de formación de anticuerpos.

## MATERIALES Y METODOS

Animales. Se usaron ratones de cuando menos 6 semanas de nacidos de las cepas A/J; C3H/HeJ; A/St; BALB/c; C3H/St; AKR/J; C57BL/10Sn; B10.BR/SgSn y B10.D2/oSn, así como C3H/HeJ atímicos (nu/nu) y heterocigotos (nu/+). Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico con tapa de rejilla y se alimentaron con Purina (Purina de México, S. A. de C. V.) y agua ad libitum.

Nocardia brasiliensis. Se usó la cepa de N. brasiliensis UPHG-24 mantenida en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Medio de cultivo para la N. brasiliensis. La bacteria se cultivó a 37°C en medio de Proskauer-Beck, modificado por Youmans y Karlson (PBY) ( 95 ), con una concentración de 5% de glicerol que permite el máximo desarrollo del inóculo en 25 a 30 días de incubación y cuya fórmula por litro es la siguiente:

L-asparagina	5.0000 g
citrató de sodio . 2 H <sub>2</sub> O	0.6176 g
cloruro de magnesio . 6 H <sub>2</sub> O	0.1974 g
fosfato monobásico de potasio	5.0000 g
sulfato de potasio	0.5000 g
glicerol	50 ml

agua destilada c. b. p.

1000 ml

Se disuelven por separado cada una de las sales, se mezclan y por último se agrega el glicerol, se ajusta el pH a 6.8 con bicarbonato de sodio. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 min.

Obtención del extracto de Nocardia. El método de extracción previamente reportado para N. opaca ( 88, 90 ) se aplicó a N. brasiliensis. La bacteria se cosechó, secó con acetona y homogeneizó en mortero. Se deslipidó a temperatura ambiente 3 veces con acetona, alcohol-éter (1:1) y cloroformo. Las células se lavaron con acetona y se deslipidaron nuevamente en un extractor Soxhlet durante 12 a 15 horas continuas con cada uno de los siguientes solventes: acetona, éter, cloroformo, etanol y cloroformo-metanol (87:13). Las células deslipidadas se lavaron con éter y secaron a temperatura ambiente; 15 gramos de estas células secas se lavaron 3 veces con 100 veces su peso en agua y 2 veces con acetato de amonio 0.1 M pH 6.2 y se recuperaron por centrifugación a 27,000 X g por 60 min a 4°C. Finalmente, se resuspendieron en 100 veces su peso inicial seco de acetato de amonio 0.1 M pH 6.2 conteniendo 0.01% de lisozima; se incubó por 18 horas a 37°C con ligera agitación. Se recuperó el sobrenadante por filtración en un embudo poroso y las células se trataron nuevamente con lisozima. Los dos sobrenadantes se mezclaron y liofi-

lizaron varias veces hasta eliminar el acetato de amonio. A este filtrado se le llamó extracto de Nocardia.

Mitógenos. Se usaron el LPS de Escherichia coli serotipo O127:B8, el LPS de E. coli serotipo O111:B4 obtenidos de Difco Laboratories, Detroit, MI y la Concanavalina A obtenida de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Preparación del medio de cultivo para células esplénicas. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (cat. H-18, Gibco, Grand Island, NY) adicionando 2.2 g de bicarbonato de sodio por litro. Cada 100 ml de medio contienen:

- 1 ml de solución de aminoácidos no esenciales, 100 X (cat. 114, Gibco)
- 1 ml de piruvato de sodio, 100 X (cat. 136, Gibco)
- 1 ml de una mezcla de penicilina y estreptomycin con 10,000 U y 10,000 µg respectivamente.
- 0.1 ml de L-glutamina, 200 mM (cat. 503, Gibco)
- 5 ml de suero fetal de ternera (cat. 614, Gibco)

Preparación de la mezcla nutricional para el cultivo de células esplénicas. Esta mezcla contiene por cada 100 ml:

dextrosa	1.0 g
medio RPMI-1640	70 ml

aminoácidos esenciales, 50 X (cat. 113, Gibco)	10 ml
aminoácidos no esenciales, 100 X (cat. 114, Gibco)	5 ml
L-glutamina, 200 mM	5 ml
Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH	1.0 N
Adicionar $\text{NaHCO}_3$ al 7.5%	13 ml

Se filtra en forma estéril por membrana Millipore de 0.45 $\mu$  y se almacena congelado. Antes de adicionar a los cultivos, la mezcla se diluye 1:3 con suero fetal de ternera.

#### Preparación del cultivo de células de bazo.

1. Los bazos se removieron asépticamente y se colocaron en cajas de Petri de plástico estériles de 60 X 15 mm (cat. 5220, Lux Scientific Co., Newbury Park, CA) que contenían de 6 a 10 ml de solución salina balanceada de Hanks (BSS) estéril con 100 U de penicilina y 100  $\mu$ g de estreptomina por cada 100 ml de BSS.

2. Se obtuvo una suspensión celular del bazo, disgregándolo con pinzas de diente de ratón.

3. Las células se transfirieron a tubos de plástico estériles (cat. 2057, Falcon Plastics, Oxnard, CA). Se dejaron 5 min en hielo para que las partículas más gruesas sedimentaran y se transfirió el sobrenadante con una pipeta Pasteur a tubos de plástico cónicos estériles de 50 ml de capacidad ( cat. 2070, Falcon ).

4. Las células se lavaron 3 veces con BSS, recuperándolas por centrifugación a 750 X g por 10 min a 4°C y se resuspendieron finalmente en medio de cultivo.

5. Se contó el número de células viables por medio del método de exclusión del azul tripano ( 96 ).

6. Se ajustó el número de células con medio de cultivo a la cantidad requerida para cada experimento.

Efecto mitogénico. Los linfocitos fueron cultivados en placas Falcon para microcultivo (cat. 3040, Falcon), en un volumen final de 0.2 ml conteniendo  $5 \times 10^5$  células. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de 10% de CO<sub>2</sub> en aire y diariamente se adicionó una gota de la mezcla nutricional con una pipeta Pasteur (aprox. 30 µl). Para determinar el grado de estimulación de las células, se adicionó antes de finalizar las últimas 24 horas de cultivo 1 µCi de <sup>3</sup>H-TdR (NET-027, New England Nuclear, ILL, con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol.). Posteriormente las células se cosecharon colocándolas en filtros de papel Whatman No. 3, los que se colocaron por 1 hora en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10% conteniendo 20 mg de timidina fría por 100 ml de solución. Los filtros se lavaron 2 veces con TCA al 5% por 20 min y finalmente 2 veces más con metanol por 10 min. Los filtros se secaron, se colocaron en frascos viales que contenían 8 ml de líquido de centelleo y se contaron en un aparato Mark III (Amersham/Searle CO. ILL).

Determinación de células formadoras de anticuerpo (CFA). Se usó una modificación de la técnica de hemólisis localizada en gel, previamente descrita por Jerne y Nordin ( 97 ), de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Las células de 4 cultivos se mezclaron en tubos de 15 ml (cat. 2087, Falcon), las cajas se lavaron con medio de cultivo utilizando un gendarme para separar las células adherentes.

2. La suspensión celular se centrifugó a 750 X g por 10 min a 4°C, se resuspendió en 12 ml de medio de cultivo y se centrifugó nuevamente. Esta operación se repitió 2 veces más y finalmente las células se resuspendieron en 0.7 ml de medio.

3. Se adicionó 0.1 ml de la suspensión celular y 0.05 ml de eritrocitos ajustados al 10% a tubos de ensaye de 12 X 75 mm colocados en baño María a 45°C, que contenían 0.5 ml de agarosa al 0.5% y 0.2 ml de suero fetal de ternera.

4. Después de mezclarlos, se virtió su contenido en portaobjetos previamente barnizados con agarosa al 0.1%. Las preparaciones se colocaron en soportes especiales y se incubaron durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

5. Se cubrieron con complemento de cobayo previamente absorbido con los eritrocitos correspondientes y diluido 1:10 con BSS, incubándose nuevamente por 2 horas.

6. Finalmente se determinó el número de

placas hemolíticas en cada laminilla, usando un contador de colonias Quebec (American Optical Corporation, Buffalo, NY).

Las CFA contra trinitrofenil (TNP) se determinaron acoplando este hapteno a eritrocitos de burro ( 98 ), haciendo reaccionar una solución de 130 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzen sulfónico (Nutritional Biochemical Corp., Cleveland, OH) con 1 ml de paquete de eritrocitos por 30 min. La gamma globulina humana (HGG) se acopló a eritrocitos de burro usando 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil)carbodimida (Carbiochem, San Diego, CA) ( 99 ).

Activación policlonal. Para la determinación de la activación policlonal,  $10 \times 10^6$  linfocitos viables de bazo en un volumen de 1 ml se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 33% de  $\text{H}_2$ , 10% de  $\text{CO}_2$  y 7% de  $\text{O}_2$ ; a los cultivos se les adicionó diariamente 120  $\mu\text{l}$  de la mezcla nutricional sin suero fetal. Estas células se cosecharon a la 48, 72 y 120 horas y se determinó el número de CFA contra una variedad de antígenos.

Producción primaria de anticuerpos. Para observar este efecto se usó el método descrito por Mishell y Dutton ( 100 ). Las células de bazo de ratones se cultivaron a una concentración de  $10 \times 10^6$  células viables por ml de medio de cultivo, el cual contenía además 50  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol al 0.01 M (cat. 161-0710, Bio-Rad Lab.) por cada 100 ml. Los



cultivos se estimularon con una gota (aprox. 30  $\mu$ l) de una suspensión al 1% de eritrocitos de carnero, se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 10% de CO<sub>2</sub> en aire y diariamente se adicionó 120  $\mu$ l de la mezcla nutricional. Se determinó el número de CFA contra los eritrocitos de carnero.

Tratamiento con suero anti-timocito. Se trataron 10<sup>8</sup> células de bazo de ratones C3H/HeJ con 1 ml de suero anti-timocito (Lot. 15038, Microbiological Associates, Bethesda, MD) diluido 1:100 y previamente absorbido con células de mieloma de ratón XS-63 y eritrocitos de ratones C3H/HeJ por 30 min a 37°C ( 101 ). Después de la incubación, las células se centrifugaron y resuspendieron a la misma concentración en complemento diluido 1:6 con BSS; se incubaron nuevamente por 30 min a 37°C. Las células tratadas se lavaron y cultivaron como se describió anteriormente.

## RESULTADOS

Dosis respuesta de células normales, células normales tratadas con suero anti-timocito y células de ratones atímicos al extracto de Nocardia. Se estudió la capacidad del extracto de N. brasiliensis de producir una respuesta mitogénica en las células linfoides de bazo de ratones C3H/HeJ convencionales (+/+). Se cultivaron  $5 \times 10^5$  células durante 72 horas en presencia de varias concentraciones del extracto de Nocardia así como de LPS. Como se muestra en la Fig. 2, los cultivos que contenían el extracto de Nocardia mostraron una mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR a dosis entre 100 a 200  $\mu\text{g/ml}$ . En cambio, el LPS produjo una mayor respuesta mitogénica a dosis de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , las que se han reportado como óptimas (102). Esto nos indica que el extracto de Nocardia puede inducir una activación en las células de bazo de ratón.

Este extracto también produce un aumento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR en células esplénicas de ratones tratadas con suero anti-timocito (ATS) mas complemento y en células de ratones atímicos (nu/nu), es decir, en poblaciones constituidas sólo por linfocitos B. La Fig. 3 muestra que cultivos de 72 horas de estas células son estimulados óptimamente a concentraciones de 100  $\mu\text{g/ml}$  del extracto de Nocardia. El LPS que es un mitógeno de células B produce una buena respuesta a la dosis de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Estos datos indican que el extracto de Nocardia es un mitógeno para las células espléni-

cas y que la síntesis de DNA ocurre principalmente, si no exclusivamente, en los linfocitos B.

Cinética de la respuesta mitogénica del extracto de Nocardia. Con el fin de determinar la cinética de la respuesta mitogénica producida por el extracto de Nocardia, se cultivaron células de bazo a diferentes concentraciones del extracto y se determinó la incorporación de  $^3\text{H-TdR}$  a diferentes tiempos. En la Fig. 4 se observa que diferentes dosis del extracto de Nocardia inducen una activación de linfocitos tanto de ratones C3H/HeJ como de A/St a las 48 horas de cultivo. La mayor estimulación se obtuvo con 100 a 200  $\mu\text{g/ml}$  del extracto en estudio. En cambio, la respuesta mitogénica máxima del LPS siempre se observó a las 72 horas de cultivo (dato no incluido, pero citado en numerosas referencias, ver 102 y 103).

Estimulación de timocitos con LPS, Con A y extracto de Nocardia. Aunque el extracto de Nocardia estimula a las células de bazo depletadas de linfocitos T y a células de ratones atímicos, indicando que no es necesaria esta célula para llevar a cabo la activación, se hicieron estudios para determinar si este extracto estimulaba también a las células T. Esto se investigó usando timocitos de ratones A/St o BALB/c de 6 semanas de nacidos. Los cultivos se incubaron por 48 y 72 horas en presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, 100  $\mu\text{g/ml}$

de LPS ó 100 µg/ml del extracto de Nocardia.

Como se muestra en la Tabla II, el extracto de Nocardia no indujo una respuesta mitogénica en los timocitos a la dosis óptima de estimulación; en cambio, la Con A produjo una fuerte síntesis de DNA. La respuesta del LPS fué similar al control y a la obtenida en los cultivos que contenían el extracto de Nocardia.

Estudio de la respuesta mitogénica al extracto de Nocardia en varias cepas de ratones. Con el fin de determinar la capacidad del extracto de Nocardia de estimular a los linfocitos murinos, se usaron diferentes cepas de ratones. Con este propósito  $5 \times 10^6$  células murinas de bazo/ml de las cepas A/J, B10.A genotipo H-2<sup>a</sup>; C57BL/10 genotipo H-2<sup>b</sup>; BALB/c o B10.D2 genotipo H-2<sup>d</sup>; AKR, C3H/St o B10.BR genotipo H-2<sup>k</sup>, se cultivaron durante 48 horas en presencia de 100 µg/ml del extracto de Nocardia o de LPS. La Fig. 5 muestra que las células de las diferentes cepas de ratones responden al extracto, aunque la magnitud de esta respuesta varía grandemente. También puede observarse que, bajo las mismas condiciones de cultivo, la magnitud de la respuesta entre estas cepas no correlaciona con la respuesta al LPS.

Activación policlonal del extracto de Nocardia en ratones C3H/HeJ y C3H/St. Ya que la habilidad de algunas substancias que actúan como mitógenos de células B está in-

timamente relacionada con la capacidad de funcionar como activadores policlonales ( 103, 104 ), se investigó si este extracto podía también actuar como tal. Se cultivaron  $10 \times 10^6$  células de bazo de ratones C3H/HeJ o C3H/St por 2 días en presencia o ausencia de 100  $\mu\text{g/ml}$  del extracto de Nocardia o 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS. Como se observa en la Tabla III, el extracto de Nocardia causa una activación policlonal en ambas cepas de ratones, contra eritrocitos de carnero, cabra y el hapteno TNP, la cual es mayor que la respuesta obtenida con el LPS.

Activación policlonal por el extracto de Nocardia en células de ratones C3H/HeJ desnudos (nu/nu) y de ratones heterocigotos (nu/+). Se probó la capacidad del extracto de Nocardia de actuar como activador policlonal en células de bazo de ratones nu/nu o de ratones heterocigotos (nu/+). Primero se hizo una cinética de la respuesta, para lo cual se cultivaron  $10^7$  células de bazo de estos ratones por 48, 72 ó 120 horas en presencia o ausencia del extracto de Nocardia o LPS. La Tabla IV muestra que los cultivos obtenidos de ambas cepas de ratones que se estimulan con el extracto de Nocardia incrementan la presencia de anticuerpos contra eritrocitos de carnero, cabra, burro, TNP y HGG. Esta activación policlonal es similar a la inducida por LPS en ambas cepas. Sin embargo, es importante mencionar que mientras el extracto de Nocardia estimula la formación de anticuerpos contra

HGG, el LPS no induce CFA contra el mismo antígeno, a pesar de que la dosis ensayada ha sido reportada como óptima para la activación policlonal in vitro ( 103 ). La respuesta policlonal en ambas cepas tanto para el extracto de Nocardia como para el LPS parece ser máxima a las 72 horas de cultivo.

El extracto de Nocardia soslaya el requisito de linfocitos T en un sistema in vitro de formación de anticuerpos. Ya que el extracto de Nocardia mostró poseer una actividad policlonal, se llevó a cabo un experimento para determinar si este extracto podía suplir la necesidad de las células T en la respuesta a un antígeno timo-dependiente, el eritrocito de carnero. La Tabla V muestra que las células de bazo de ratones desprovistos de células T (nu/nu) en cultivos de 4 días, responden muy pobremente al eritrocito en comparación con los ratones heterocigotos; sin embargo, la adición del extracto de Nocardia a las células de ratones nu/nu incrementa aproximadamente 6 veces la respuesta anti-eritrocitos de carnero. Esta respuesta no puede atribuirse a una estimulación no específica, ya que la activación policlonal producida por el extracto en ausencia de eritrocitos es solamente del 57% de la respuesta dada por los cultivos que contienen el extracto y el antígeno. El LPS como se sabe, es capaz de reemplazar también el requerimiento de la célula T de ayuda en ratones desnudos ( 105 ); sin embargo, este efecto, así como la activación policlonal que produce es menor

que las obtenidas con el extracto de Nocardia.

Los cultivos de células de animales heterocigotos contienen células T y B y no requieren del extracto de Nocardia o de LPS para generar una respuesta específica contra los eritrocitos de carnero. Sin embargo, se observa que los cultivos que contienen estas sustancias desarrollan más CFA que los cultivos que sólo contienen el antígeno eritrocítico; este aumento parece deberse a un efecto adyuvante proporcionado por estas sustancias.

Efecto del extracto de Nocardia sobre la formación de anticuerpos in vitro contra eritrocitos de carnero. Con el fin de observar si este extracto de Nocardia posee un efecto adyuvante se realizaron cultivos de células de bazo de ratones A/St estimulados con eritrocitos de carnero en presencia o ausencia de diferentes concentraciones del extracto bacteriano. A diferentes intervalos se determinó el número de CFA contra este antígeno. La Fig. 6 muestra que el número de CFA contra el eritrocito se ve notablemente incrementado en todos los cultivos que contienen el extracto de Nocardia. Además con dosis entre 50 y 400  $\mu\text{g}$ /cultivo se observa un mayor efecto adyuvante que el mostrado por el LPS. La respuesta óptima producida por el extracto de Nocardia se presenta entre los días 3 y 4 de cultivo. Por otra parte, la respuesta contra los eritrocitos de carnero solos o en presencia de LPS, se encontró más elevada a los 4 días de cultivo.

Ya que la respuesta producida por el extracto de Nocardia en presencia de los eritrocitos puede deberse tanto a un efecto adyuvante como a la activación policlonal no específica que posee, se hizo otro experimento donde se probaron las mismas dosis del extracto de Nocardia en presencia o ausencia del eritrocito a los días 3 y 4 de cultivo, que resultaron ser óptimos para la formación de anticuerpos contra los eritrocitos. En la Tabla VI se muestra que el extracto de Nocardia es capaz de incrementar significativamente la respuesta contra el antígeno, la cual es varias veces mayor que la expansión policlonal obtenida a la misma concentración del extracto en ausencia del antígeno. Este aumento de la formación de anticuerpos es mayor que el inducido por el LPS y antígeno, particularmente a las dosis de 50 a 400 µg. Por lo tanto, el extracto de Nocardia posee también la característica de ser un adyuvante.



## DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el extracto de Nocardia induce mitogénesis y activación policlonal inespecífica de linfocitos B murinos. La activación de los linfocitos es máxima a las 48 horas de cultivo y a concentraciones que varían desde 100 hasta 200 µg/ml del extracto. Este tipo de cinética es similar a la que presenta el PPD ( 106 ); en contraste, tanto el LPS como la Con A muestran un máximo de activación a las 72 horas, lo cual sugiere que la respuesta obtenida por el extracto de Nocardia no se debe a contaminación con LPS y que probablemente estos mitógenos estimulen a diferentes subpoblaciones de linfocitos. En apoyo de lo anterior, un análisis de nuestro extracto para determinar la presencia de LPS por medio del Limulus polyphemus ( 107 ), mostró resultados negativos (dato no reportado).

Por otra parte, el extracto de Nocardia no es mitógeno para las células T, como lo demuestra la falta de estimulación de los timocitos, los cuales responden fuertemente a la Con A, pero no al LPS. Este mismo comportamiento lo muestran los extractos obtenidos de las diferentes cepas de Nocardia no patógenas ( 91, 103 ).

El extracto de Nocardia fué capaz de producir una respuesta mitogénica en todas las cepas de ratones examinadas, la cual difirió de cepa a cepa, debido probablemente a la variación en el número de células de la subpoblación que

responde al estímulo del extracto. Además, como ya se mencionó, esta respuesta no se correlaciona con la obtenida con el LPS debido posiblemente a que estimulan subpoblaciones de linfocitos B diferentes. Las células esplénicas de ratones que muestran el genotipo H-2<sup>a</sup> y H-2<sup>k</sup> parecen estimularse más eficientemente que las células de ratones con otros genotipos y aunque sus diferencias no son significativas, sugieren que la respuesta mitogénica a Nocardia pueda estar bajo la influencia de productos del complejo H-2; sin embargo, serán necesarios más estudios para determinar si ésto es válido.

La habilidad del extracto de Nocardia a inducir una activación policlonal de las células de bazo de ratones C3H/HeJ y C3H/St correlaciona con su capacidad mitogénica. La presencia de células T no parece ser requerida para esta respuesta clonal in vitro, ya que no se observan diferencias apreciables en la respuesta de ratones C3H/HeJ atímicos (nu/nu) y los heterocigotos (nu/+). Nuestros experimentos como los de otros ( 101, 109 ), concuerdan en que la célula T no parece ser relevante en la activación policlonal de las células de bazo murinas, como se ha implicado opuestamente en otros sistemas ( 110 ).

La capacidad de los mitógenos de células B, tales como el extracto de Nocardia, para activar a las células precursoras de las formadoras de anticuerpo y a estimular la división de células B, ocasiona un estímulo y un incremento en el número de células que sintetizan anticuerpo contra muchos

antígenos que no presentan características de reacción cruzada. Este fenómeno puede tener gran relevancia en ciertos padecimientos autoinmunes. El extracto de Nocardia adicionado a los cultivos de células esplénicas normales que se incubaron durante 72 horas, incrementó el número de CFA contra eritrocitos de carnero, cabra, burro y el hapteno TNP. Es importante hacer notar que en ratones C3H/HeJ el extracto de Nocardia induce una respuesta de anticuerpos a la HGG, mientras que ésta no se presenta con el LPS. La habilidad del extracto para activar más eficientemente que el LPS a las células B con receptores para HGG, sugiere que la estimulación por Nocardia en respuesta a la infección puede constituir un modelo de activación celular en la cual la célula B secretaría factores tipo reumatoide ( 111 ). Aunque bajo las condiciones experimentales empleadas aquí, el LPS no indujo una respuesta de anticuerpos contra HGG, se ha reportado que estimula la producción de anticuerpos IgM (19S) de baja afinidad a proteínas séricas del ratón ( 112 ).

Por otra parte, los datos que aquí se presentan indican que además de su actividad mitogénica y policlonal, el extracto de Nocardia puede substituir el requerimiento de células T en una respuesta a un antígeno dependiente de T como el eritrocito de carnero. Los resultados obtenidos demuestran que las células de bazo de ratones nu/nu no producen anticuerpo cuando se estimulan in vitro con los eritrocitos de carnero. Sin embargo, la adición del extracto de Nocardia

activa la producción del anticuerpo en contra de este antígeno, indicando que el extracto de Nocardia puede reemplazar in vitro la función de la célula T en la elaboración de una respuesta a antígenos dependientes de timo. Sjöberg y col. ( 105 ) han sugerido que el reemplazo de la función de la célula T se debe a un subproducto liberado por la célula B durante la activación inespecífica.

Finalmente, se encontró que la adición de este extracto de Nocardia a cultivos de células esplénicas estimuladas con eritrocitos de carnero, potencia la formación de anticuerpos específicos en contra del antígeno y que este efecto adyuvante no se debe a la acción policlonal que también posee este extracto, ya que como se observa en los cultivos estimulados durante 3 y 4 días, el efecto adyuvante es varias veces mayor que el efecto policlonal obtenido a las mismas concentraciones del extracto.

En resumen, un extracto del actinomiceto patógeno M. brasiliensis presenta: (i) efecto mitogénico para linfocitos B murinos; (ii) actividad de expansión policlonal B a diferentes antígenos; (iii) activación inespecífica de células B in vitro soslayando el requisito de la célula T en un sistema de formación de anticuerpos y (iv) efecto adyuvante en un sistema de formación de anticuerpos in vitro.

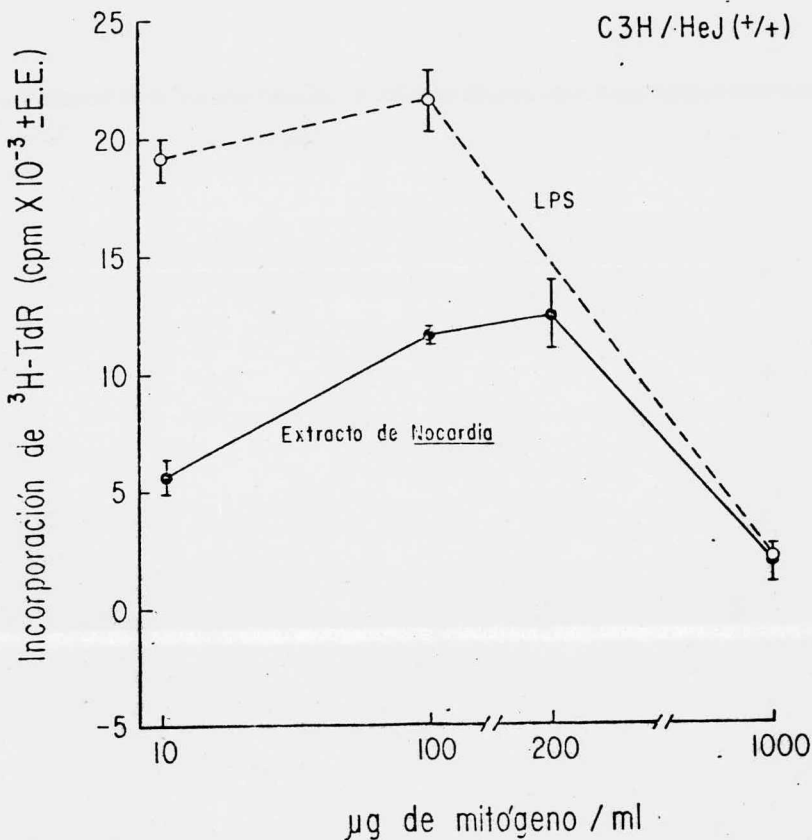


Fig. 2. Efecto mitogénico de diferentes concentraciones de un extracto de *Nocardia* (●—●) y de LPS (○---○) sobre células esplénicas de ratones C3H/HeJ (+/+). Se cultivaron  $5 \times 10^5$  células en un volumen de 0.2 ml de medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal de ternera en presencia del mitógeno durante 72 horas. Se adicionó 1  $\mu$ Ci de  $^3\text{H-TdR}$  durante las últimas 24 horas de cultivo. Promedio  $\pm$  E. E. de 4 cultivos.

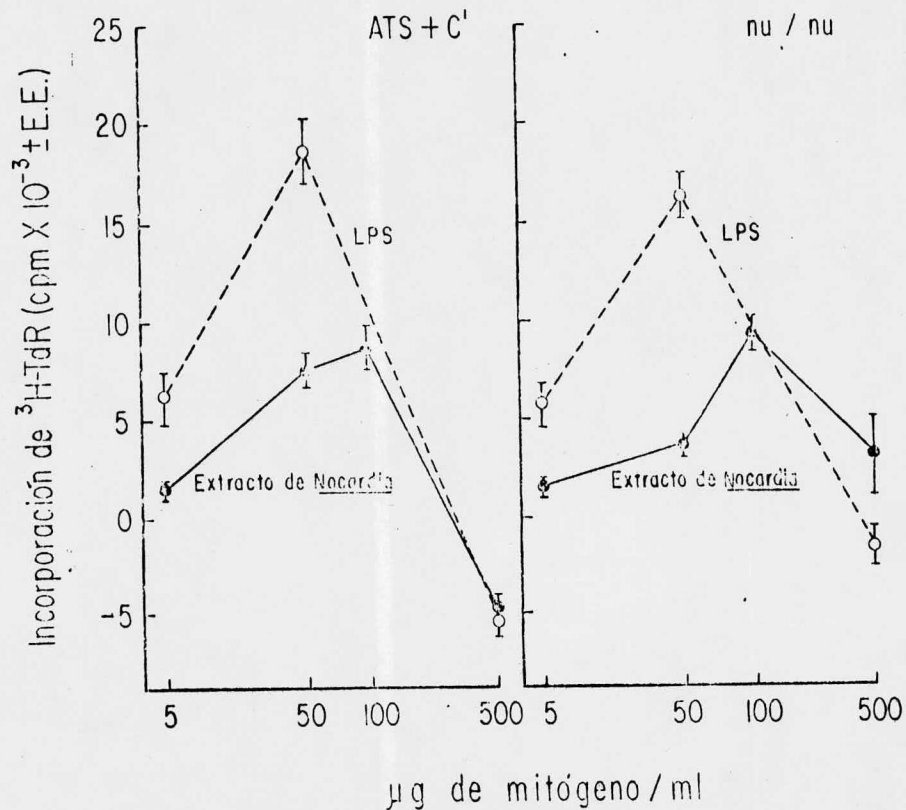


Fig. 3. Efecto mitogénico de diferentes concentraciones de un extracto de Nocardia (●—●) y de LPS (○---○) sobre células de bazo de ratones C3H/HeJ tratadas con ATS + C<sup>1</sup> y de ratones atímicos (nu/nu). Las condiciones de cultivo son las mismas que se indican en la Fig. 2.

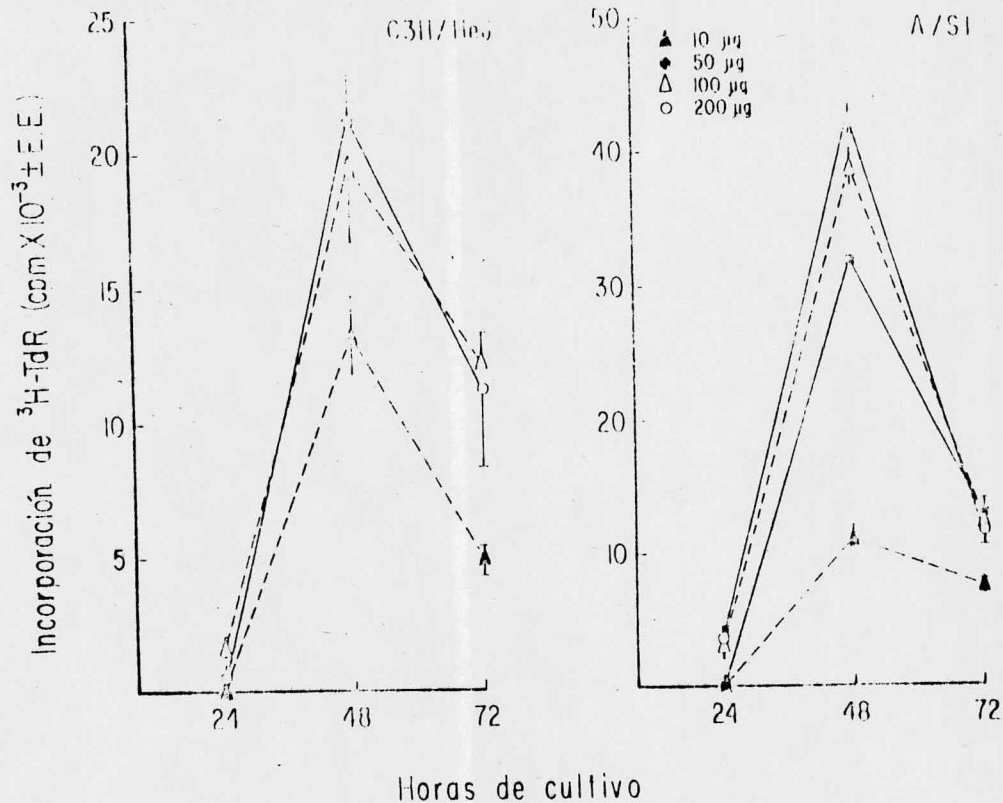


Fig. 4. Cinética del efecto mitogénico de un extracto de Nocardia sobre células esplénicas de ratones C3H/HeJ y A/St. Los cultivos se realizaron como se indica en la Fig. 2.

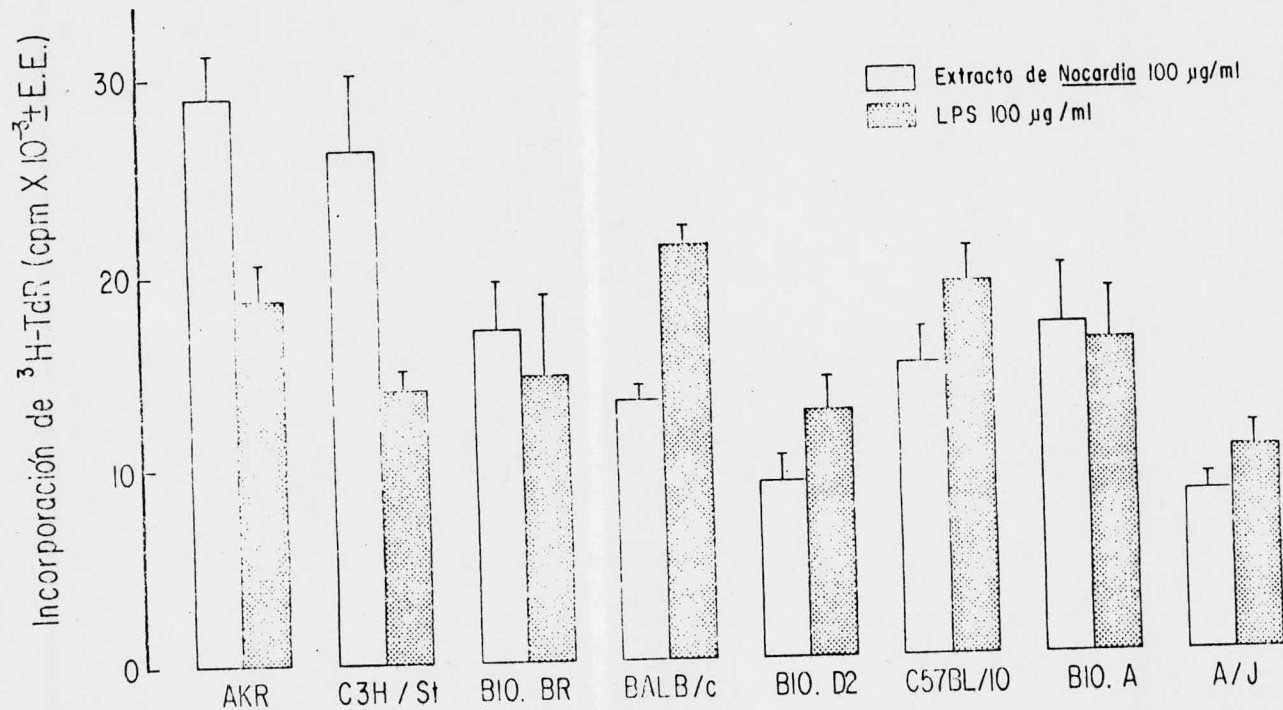


Fig. 5. Efecto mitogénico de un extracto de *Nocardia* y de LPS sobre células esplénicas obtenidas de diferentes cepas de ratones que difieren en la región H-2. Se cultivaron  $5 \times 10^5$  células viables de ratones  $H-2^k$ : AKR, C3H/St y B10.BR;  $H-2^d$ : BALB/c y B10.D2;  $H-2^b$ : C57BL/10; y  $H-2^a$ : B10.A y A/J en 0.2 ml de RPMI conteniendo 5% de suero fetal de ternera durante 48 horas. Se adicionó 1 µCi de  $^3H$ -TdR durante las últimas 24 horas de cultivo. Promedio  $\pm$  E. E. de 4 cultivos.



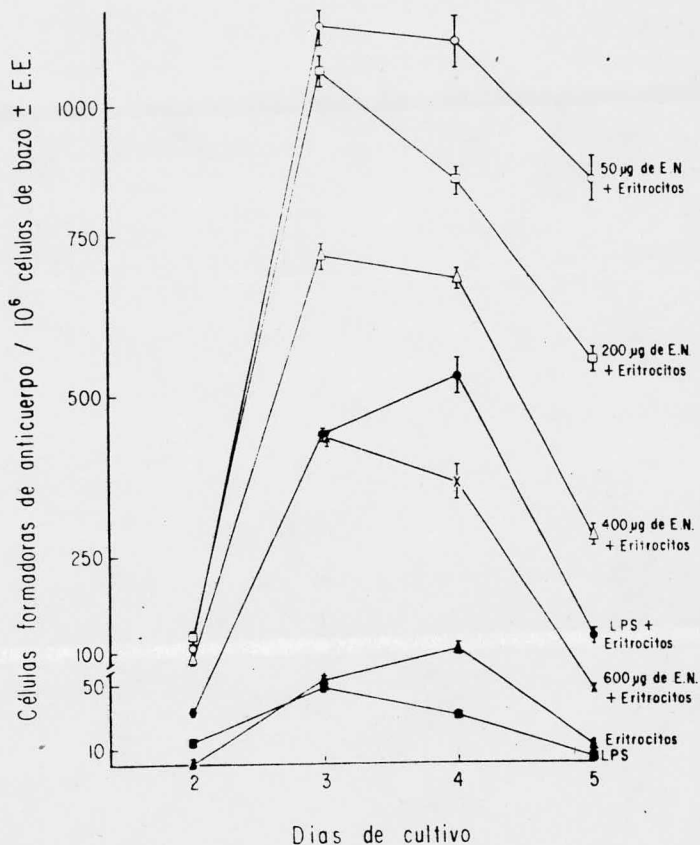


Fig. 6. Cinética del efecto adyuvante de un extracto de *Nocardia* (E. N.) y de LPS (10 µg) sobre la formación de anticuerpos a eritrocitos de carnero en un sistema *in vitro*. El cultivo se realizó con 10<sup>7</sup> células de bazo de ratones A/St en 1 ml de RPMI con 5% de suero fetal de ternera y 2-mercapto-etanol. Los cultivos se estimularon con aprox. 30 µl de una suspensión al 1% de eritrocitos de carnero en presencia de diferentes concentraciones de la sustancia en estudio. Promedio ± E. E. de 5 placas conteniendo cada una la mezcla de 4 cultivos.

TABLA II

RESPUESTA DE TIMOCITOS AL EXTRACTO DE NOCARDIA<sup>a</sup>

Incorporación de <sup>3</sup> H-TdR en cultivos estimulados con:					
Cepa	Horas de cultivo	Medio	Con A	Extracto de <u>Nocardia</u>	LPS
A/St	48	728 ± 23 <sup>b</sup>	60,025 ± 5,345	521 ± 29	619 ± 28
BALB/c	48	677 ± 24	37,254 ± 1,452	554 ± 33	699 ± 34
A/St	72	311 ± 14	47,265 ± 4,329	336 ± 7	322 ± 14
BALB/c	72	384 ± 9	32,013 ± 2,123	358 ± 17	381 ± 20

<sup>a</sup> Se cultivaron  $5 \times 10^5$  células viables de timo de ratones de 6 semanas de nacidos en medio RPMI conteniendo 5% de suero fetal de ternera en presencia de 1 µg/ml de Con A, 100 µg/ml del extracto de Nocardia o 100 µg/ml de LPS. Se adicionó 1.0 µCi de <sup>3</sup>H-TdR a las células durante las últimas 24 horas de cultivo.

<sup>b</sup> Promedio de las cpm ± E. E. de 4 cultivos.

TABLA III

ACTIVACION POLICLONAL INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE NOCARDIA EN CELULAS  
DE BAZO DE RATONES C3H/HeJ y C3H/St<sup>a</sup>

Cepa	Extracto bacteriano <sup>b</sup>	CFA 19S por cultivo contra <sup>c</sup> :		
		Eritrocitos de carnero	Eritrocitos de cabra	TNP
C3H/HeJ	Ninguno	0	0	4
	<u>Nocardia</u>	62	50	300
	LPS	10	10	32
C3H/St	Ninguno	4	0	16
	<u>Nocardia</u>	46	38	278
	LPS	24	12	184

<sup>a</sup> Se incubaron  $10^7$  células de ratones C3H en 1 ml. de medio RPMI-1640 sin suero fetal, por 48 horas.

<sup>b</sup> Se adicionó a cada cultivo 100 µg de extracto de Nocardia o 10 µg de LPS.

<sup>c</sup> Valor promedio de 3 o 4 cultivos por grupo.

TABLA IV

ACTIVACION POLICLONAL INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE NOCARDIA EN CELULAS DE  
BAZO DE RATONES C3H/HeJ (nu/nu) Y HETEROZIGOTOS (nu/+) <sup>a</sup>

		CFA 19S por cultivo contra <sup>c</sup> :														
		Eritrocitos de:									TNP			HGG		
		carnero			cabra			burro								
		días			días			días			días			días		
Cepa	Extracto bacteriano <sup>b</sup>	2	3	5	2	3	2	3	5	2	3	5	2	3	5	
nu/nu	Ninguno	25	10	13	0	397	2	0	8	68	397	44	5	4	0	
	<u>Nocardia</u>	231	364	173	24	1782	13	21	20	318	1782	1982	11	19	8	
	LPS			53					5		2351	522			0	
nu/+	Ninguno		8	44				0	0		90	178		0	0	
	<u>Nocardia</u>		325	200				37	25		1525	1276		25	0	
	LPS		235	307				15	69		1350	784		0	0	

<sup>a</sup> Ver Tabla II, nota a.

<sup>b</sup> Se adicionó a cada cultivo 100 µg del extracto de Nocardia ó 10 µg de LPS.

<sup>c</sup> Ver Tabla III, nota c.

TABLA V

FORMACION DE ANTICUERPOS IN VITRO A ERITROCITOS DE CARNERO EN CELULAS DE BAZO DE RATONES C3H/HeJ DESNUDOS (nu/nu) O HETEROZIGOTOS (nu/+) <sup>a</sup>

Antígeno <sup>b</sup>	Extracto bacteriano <sup>c</sup>	CPA 19S por cultivo de células obtenidas de <sup>d</sup> :	
		nu/nu	nu/+
-	-	15 ± 2	50 ± 10
Eritrocitos de carnero	-	49 ± 6	787 ± 24
Eritrocitos de carnero	<u>Nocardia</u>	314 ± 7	955 ± 27
Eritrocitos de carnero	LPS	238 ± 7	1139 ± 44
-	<u>Nocardia</u>	180 ± 15	153 ± 15
-	LPS	61 ± 15	127 ± 37

<sup>a</sup> Se cultivaron  $10^7$  células de bazo en 1 ml de medio RPMI con 5% de suero fetal de ternera durante 4 días.

<sup>b</sup> Por cultivo se adicionó aproximadamente 30 µl de una solución al 1%.

<sup>c</sup> 100 µg de extracto de Nocardia ó 10 µg de LPS.

<sup>d</sup> Promedio ± E. E. de placas por triplicado conteniendo cada una la mezcla de 3 ó 4 cultivos.

TABLA VI

EFEECTO DEL EXTRACTO DE NOCARDIA SOBRE LA FORMACION DE ANTICUERPOS IN VITRO A  
ERITROCITOS DE CARNERO EN CELULAS DE BAZO DE RATONES A/St

Antígeno <sup>b</sup>	Extracto bacteriano	CFA 19S por cultivo a los días <sup>d</sup> :	
		3	4
-	LPS <sup>c</sup>	33 ± 3	8 ± 2
Eritrocitos de carnero	-	35 ± 1	139 ± 12
Eritrocitos de carnero	LPS	423 ± 18	624 ± 29
-	<u>Nocardia</u> 50 µg	62 ± 4	31 ± 4
Eritrocitos de carnero	<u>Nocardia</u> 50 µg	1100 ± 29	1056 ± 42
-	<u>Nocardia</u> 200 µg	76 ± 3	63 ± 4
Eritrocitos de carnero	<u>Nocardia</u> 200 µg	950 ± 25	786 ± 41
-	<u>Nocardia</u> 400 µg	117 ± 7	91 ± 4
Eritrocitos de carnero	<u>Nocardia</u> 400 µg	617 ± 22	416 ± 21
-	<u>Nocardia</u> 600 µg	126 ± 5	94 ± 6
Eritrocitos de carnero	<u>Nocardia</u> 600 µg	389 ± 15	332 ± 21

<sup>a</sup> Se cultivaron  $10^7$  células en 1 ml de medio RPMI con 5% de suero fetal de ternera y 2-mercaptoetanol.

<sup>b</sup> Por cultivo se adicionó aproximadamente 30 µl de una solución al 1%.

<sup>c</sup> 10 µg de LPS.

<sup>d</sup> Promedio ± E. E. de 5 placas conteniendo cada una la mezcla de 4 cultivos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Dumond, D. C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G. S., Mathew, M., Morley, J. y Howson, W. T. "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. Nature (Lond) 224 : 38 , 1969.
- 2) George, M. y Vaughan, J. H. In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111 : 514 , 1962.
- 3) Bloom, B. R. y Bennett, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. Science 153 : 80 , 1966.
- 4) David, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc. Nat. Acad. Sci. 56 : 72 , 1966.
- 5) Ward, P. A. y David, J. R. A leukotactic factor produced by sensitized lymphocyte. Federation Proc. 28 : 630 , 1969.
- 6) Mooney, J. J. y Waksman, B. H. Activation of normal rabbit macrophage monolayers by supernatants of antigen-stimulated lymphocytes. J. Immunol. 105 : 1138 , 1970.
- 7) Valentine, F. T. y Lawrence, H. S. Lymphocyte stimulation: Transfer of cellular hypersensitivity to antigen in vitro. Science 165 : 1014 , 1969.
- 8) Bloom, B. R. y Bennett, B. The assay of inhibition of macrophage migration and the production of migration inhibitory factor (MIF) and skin reactive factor (SRF) in the guinea pig. En: In vitro methods in cell mediated immunity. (B. R. Bloom y P. R. Glade,

- eds.) p. 235. Academic Press, New York, 1971.
- 9) Granger, G. A., Shacks, S. J., Williams, T. W. y Kolb, W. P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin sensitive lymphoid cell. *Nature (Lond)* 221 : 1155 , 1969.
  - 10) Lawrence, H. S. The transfer of hypersensitivity of the delayed-type in man. En: Cellular and humoral aspects of hypersensitivity states. (H. S. Lawrence, ed.) p. 279. Hoeber Harper, New York, 1959.
  - 11) Lawrence, H. S. Some biological and immunological properties of transfer factor. En: Ciba Foundation, Symposium on cellular aspects of immunity. (W. Wolotenholme y M. O'Connor, eds.) p. 243. Little Brown, Boston, 1960.
  - 12) Younger, J. S. y Salvin, S. B. Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 111 : 1914 , 1973.
  - 13) Podleski, W. K. Cytodestructive mechanisms provoked by lymphocytes. *Am. Journ. Med.* 61 : 1 , 1976.
  - 14) Eisen, H. N. *Immunology: An introduction to molecular and cellular principles of the immune responses.* p. 588. Harper and Row, New York, 1974.
  - 15) Valdimarsson, H. Effector mechanisms in cellular immunity. En: The immune system. A course on the molecular and cellular basis of immunity (M. J. Hobart y I. McConnell eds.) p. 179. Blackwell, London, 1976.
  - 16) Pernis, B., Porni, M. D. L. y Amante, L. Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. *J. Exp. Med.* 132 : 1001 , 1970.



- 17) Mitchell, G. F. y Miller, J. F. A. P. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128 : 821 , 1968.
- 18) Miller, J. F. A. P. Lymphocyte interactions in antibody responses. *Int. Rev. Cytol.* 33 : 77 , 1972.
- 19) Nowell, P. C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20 : 462 , 1960.
- 20) Cunningham, B. A., Sela, B., Yahara, I. y Edelman G. M. Structure and activities of lymphocyte mitogens. En: Mitogens in immunobiology. (J. J. Oppenheim y D. L. Rosenstreich) p. 13. Academic Press, New York, 1976.
- 21) Novogrodsky, A. Selective activations of mouse T and B lymphocytes by periodate, galactose oxidase and soybean agglutinin. *Eur. J. Immunol.* 4 : 646 , 1974.
- 22) McClain, D. A., Wang, J. L. y Edelman, G. M. The effects of sodium metaperiodate on T and B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 15 : 287 , 1975.
- 23) Andersson, J., Edelman, G. M., Möller, G. y Sjöberg, O. Activation of B lymphocytes by locally concentrated Con A. *Eur. J. Immunol.* 2 : 233 , 1972.
- 24) Greaves, M. F. y Bauminger, S. Activation of T and B lymphocytes by insoluble phyto mitogens. *Nature New Biol.* 235 : 67 , 1972.
- 25) Andersson, J., Sjöberg, O. y Möller, G. Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular co-operation. *Transplant. Rev.* 11 : 131 , 1972.

- 26) Coutinho, A. y Möller, G. B cell mitogenic properties of thymus-independent antigen. *Nature New Biol.* 245 : 12 , 1973.
- 27) Möller, E. y Persso, U. Mitogenic properties of rabbit anti-human beta<sub>2</sub>-microglobulin for murine B cells. *Scand. J. Immunol.* 3 : 445 , 1974.
- 28) Farnes, P., Barker, B. E., Brownhill, L. E. y Fanger, H. Mitogenic activity in *Phytolacca americana* (pokeweed). *Lancet* ii : 1100 , 1964.
- 29) Greaves, M. y Janossy, G. Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. *Transplant. Rev.* 11 : 87 , 1972.
- 30) Yoshinaga, M., Yoshinaga, A. y Waksman, B. H. Regulation of lymphocyte responses in vitro. I. Regulatory effect of macrophages and thymus-dependent (T) cells on the response of thymus-independent (B) lymphocyte to endotoxin. *J. Exp. Med.* 136 : 956 , 1972.
- 31) Blythman, H. E. y Waksman, B. H. Effect of locally administered endotoxin on regenerating appendix structure and responses of appendix cells to mitogens. *J. Immunol.* 111 : 1081 , 1973.
- 32) Vaheri, A., Ruoslahti, E., Sarvas, M. y Nurminen, M. Mitogenic effect by lipopolysaccharide and pokeweed lectin on density-inhibited chick embryo fibroblasts. *J. Exp. Med.* 138 : 1356 , 1973.
- 33) Betel, I. y Van den Berg, K. J. Interaction of Con A with rat lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 30 : 571 , 1972.
- 34) Biberfeld, P. Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes transformed by PHA. *J. Ultrastruct. Res.* 37 : 41 , 1971.
- 35) Taylor, R. B., Duffus, W. P. H., Raff, M. C. y De Petris,

- S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.* 233 : 225 , 1971.
- 36) Engers, H. D. y Unanue, E. R. Fate of anti-Ig-surface Ig complexes on B lymphocytes. *J. Immunol.* 110 : 465 , 1973.
- 37) Hadden, J. W., Hadden, E. M., Haddox, M. K. y Goldberg, N. D. Guanosine 3'5'-cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69 : 3024 , 1972.
- 38) Resch, K. y Ferber, E. Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 27 : 153 , 1972.
- 39) Fisher, D. B. y Mueller, G. C. An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by PHA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60 : 1396 , 1963.
- 40) Alford, R. M. Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 104 : 698 , 1970.
- 41) Whitney, R. B. y Sutherland, R. M. Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by PHA. *J. Cell. Physiol.* 80 : 329 , 1972.
- 42) Smith, J. W., Steiner, A. L. y Parker, C. W. Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation by PHA. *J. Clin. Invest.* 50 : 442 , 1971.
- 43) Coulson, A. S. y Kennedy, L. A. Lymphocyte membrane enzymes. II. Cyclic 3'5'-adenosine monophosphatase located on unstimulated human small lymphocyte nuclear membranes. *Blood* 38 : 485 , 1971.
- 44) Robinson, G. A., Butcher, R. W. y Sutherland, E. W. Cyclic

AMP. Ann. Rev. Biochem. 37 : 149 , 1968.

- 45) Cooper, H. L. y Rubin, A. D. RNA metabolism in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin: Initial responses to phytohemagglutinin. Blood 25 : 1014 , 1965.
- 46) Mueller, G. C. y LeMahieu, M. Induction of ribonucleic acid synthesis in human leucocytes by phytohemagglutinin. Biochem. Biophys. Acta 114 : 100 , 1966.
- 47) Bach, F. y Hirschhorn, K. Gamma-globulin production by human lymphocytes in vitro. Exp. Cell. Res. 32 : 592 , 1963.
- 48) Kay, J. E. y Korner, A. Effect of cycloheximide on protein and ribonucleic acid synthesis in cultured human lymphocytes. Biochem. J. 100 : 815 , 1966.
- 49) Pegoraro, L. y Bernengo, M. G. Thimidine kinase, deoxycytidine kinase and deoxycytidylate deaminase activities in PHA stimulated human lymphocytes. Exp. Cell Res. 68 : 283 , 1971.
- 50) Coutinho A., Möller, G. y Richter, W. Molecular basis of B cell activation. I. Mitogenicity of native and substituted dextrans. Scand. J. Immunol. 3 : 321 , 1974.
- 51) Gronowicz, E., Coutinho, A. y Möller, G. Differentiation of B cells: Sequential appearance of responsiveness to polyclonal activators. Scand. J. Immunol. 3 : 413 , 1974.
- 52) Gronowicz, E. y Coutinho, A. Selective triggering of B cell subpopulations by mitogens. Eur. J. Immunol. 4 : 771 , 1974.
- 53) Möller, G. Mechanism of B-cell activation and self-non-self discrimination. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41 : 217 , 1976.

- 54) Coutinho, A. y Möller, G. Immune activation of B cells: Evidence for one non-specific triggering signal not delivered by the Ig receptors. *Scand. J. Immunol.* 3 : 133 , 1974.
- 55) Gronowicz, E. y Coutinho, A. Functional analysis of B cell heterogeneity. *Transplant. Rev.* 24 : 3 , 1975.
- 56) Coutinho, A. y Möller, G. Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv. Immunol.* 21 : 113 , 1975.
- 57) Primi, D., Hammarström, L., Smith, C. L. E. y Möller, E. Characterization of self-reactive B cells by polyclonal B-cell activators. *J. Exp. Med.* 145 : 21 , 1977.
- 58) Primi, D., Hammarström, L., Smith, C. I. E. y Möller, G. Immunological unresponsiveness of self-recognizing B lymphocytes to the PBA property of a soluble T cell factor. *Cell. Immunol.* 41 : 320 , 1978.
- 59) Möller, G., Gronowicz, E., Persso, U., Coutinho, A., Möller, E., Hammarström, L. y Smith, E. Spleen cells from animals tolerant to a thymus-dependent antigen can be activated by lipopolysaccharide to synthesize antibodies against the tolerogen. *J. Exp. Med.* 143 : 1429 , 1976.
- 60) Lechevalier, M. P. The taxonomy of the genus Nocardia: Some light at the end of the tunnel?. En: The biology of the nocardiae. (M. Goodfellow, G. H. Brownell y J. A. Serrano) p. 1. Academic Press, New York, 1976.
- 61) Trevisan, V. I generi e le specie delle Batteriacee. p. 9. Milano, 1889.
- 62) Nocard, E. Note sur la maladie de boeufs de la Guadeloupe, connue sous le nom de farcin. *Ann. Inst. Pasteur* 2 : 293 , 1888.

- 63) González-Ochoa, A. Virulence of nocardiae. Can. J. Microbiol. 19 : 901 , 1973.
- 64) Williams, S. T., Sharples, G. P., Serrano, J. A., Serrano, A. A. y Lacey, J. The micromorphology and fine structure of nocardioform organisms. En: The biology of the nocardiae. (M. Goodfellow, G. H. Brownell y J. A. Serrano) p. 102. Academic Press, New York, 1976.
- 65) Melendro, E. I. Inmunidad celular en infecciones producidas por Nocardia brasiliensis. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM, 1975.
- 66) De la Riva-Pinal, M. Respuesta inmune humoral en la infección experimental por Nocardia brasiliensis. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, 1977.
- 67) Bojalil, L. F. y Zamora, A. Precipitin and skin testing in the diagnosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113 : 40 , 1963.
- 68) Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M. F. y Bojalil, L. F. Cytoplasmic antigens from Nocardia eliciting a specific delayed hypersensitivity. Infec. Immunol. 5 : 879 , 1972.
- 69) Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M. F. y Bojalil, L. F. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from Nocardia. Sabouraudia 10 : 147 , 1972.
- 70) Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F. y Contreras, M. F. Delayed hypersensitivity to polysaccharides from Nocardia. J. Immunol. 108 : 1409 , 1972.
- 71) Ortiz-Ortiz, L. y Bojalil, L. F. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of Nocardia organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of Nocardia infection. Clin. Exp. Immunol. 12 : 225 , 1972.

- 72) Arêa Leão, A. E. L'intradermo-réaction dans L'actinomycose. Réaction spécifique de la peau avec le filtrat de culture d'Actinomyces bovis. Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris) 98 : 1575 , 1928.
- 73) Lacaz da Silva, C. Contribuicao para o estudio dos Actinomicetos productores de micetomas. Tesis Rec. de Med. Univ. Sao Paulo, 1945.
- 74) Glover, R. P., Herrell, W. E., Heilman, F. R. y Pfuetze, K. H. Nocardiosis. Nocardia asteroides infection simulating pulmonar tuberculosis. J. A. M. A. 136 : 172 , 1948.
- 75) González-Ochoa, A. y Baranda, F. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por Nocardia brasiliensis. Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. 13 : 189 , 1953.
- 76) Magnusson, M. Specificity of mycobacterial sensitins. I. Studies in guinea pigs with purified "tuberculin" prepared from mammalian and avian tubercle bacilli Mycobacterium balnei and other acid-fast bacilli. Am. Rev. Resp. Dis. 83 : 57 , 1961.
- 77) Bojalil, L. F. y Magnusson, M. Specificity of skin reactions of human to Nocardia sensitins. Amer. Rev. Resp. Dis. 88 : 409 , 1963.
- 78) Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M. F. y Melendro, E. I. Cell-mediated immune responses in mice infected with Nocardia brasiliensis. Third International Conference on the Mycoses (Pan American Health Organization, Washington, D. C.) p. 36. Brazil, 1975.
- 79) Melendro, E. I., Contreras, M. F., Ximenez, C., Garcia-Maynes, A. M. y Ortiz-Ortiz, L. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis in mice. Cross-protection against Listeria monocytogenes.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57 : 74 , 1978.

- 80) Adam, A., Petit, J. F., Wietzerbin-Falszpan, J., Sinay, P., Thomas, D. W. y Lederer, E. L'acide N-glycolyl muramique, constituant des parois de Mycobacterium smegmatis: Identification par spectrométrie de masse. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 4 : 87 , 1969.
- 81) Vacheron, M. J., Guinand, M., Michel, G. y Ghuysen, J. M. Structural investigations on cell wall of Nocardia sp. The wall lipid and peptidoglycan moieties of Nocardia kirovani. Eur. J. Biochem. 29 : 156 , 1972.
- 82) Bordet, C., Karahjoli, M., Gateau, O. y Michel, G. Cell walls of nocardiae and related actinomycetes. Identification of the genus Nocardia by cell wall analysis. Int. J. Syst. Bact. 22 : 251 , 1972.
- 83) Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bact. 20 : 435 , 1970.
- 84) David, G. H. G. y Baird-Parker, A. C. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. J. Gen. Microbiol. 21 : 612 , 1959.
- 85) Cummins, C. S. Chemical and antigenic studies on cell walls of mycobacteria, corynebacteria and nocardiae. Am. Rev. Resp. Dis. 92 : 63 , 1965.
- 86) Baboolal, R. Cell wall analysis of oral filamentous bacteria. J. Gen. Microbiol. 58 : 217 , 1969.
- 87) Freund, J. y Walter, A. W. Saprophytic acid-fast bacilli and paraffin oil as adjuvants in immunization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56 : 47 , 1944.
- 88) Adam, A., Ciobaru, R., Petit, J. F., Lederer, E., Chedid, L., Lamensans, A., Parat, F., Parant, M., Rosselet, J. P. y Berger, P. M. Preparation and biological



properties of water-soluble adjuvant fractions from delipidated cells of Mycobacterium smegmatis and Nocardia opaca. Infect. Immun. 7 : 855 , 1973.

- 89) Ellouz, F., Adam, A., Ciobaru, R. y Lederer, E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59 : 1317 , 1974.
- 90) Ciobaru, R., Adam, A., Petit, J. P., Lederer, E., Bona, C. y Chedid, L. Isolation of mitogenic and adjuvant active fractions from various species of Nocardia. Infect. Immun. 11 : 257 , 1975.
- 91) Bona, C., Chedid, L., Damais, C., Ciobaru, R., Shek, P. H. Dubiski, S. y Cinader, B. Blast transformation of rabbit B-derived lymphocytes by a mitogen extract from Nocardia. J. Immunol. 114 : 348 , 1975.
- 92) Brochier, J., Bona, C., Ciobaru, R., Revillard, J. P. y Chedid, L. A human T-independent B lymphocyte mitogen extracted from Nocardia opaca. J. Immunol. 117 : 1434 , 1976.
- 93) Lethibichthuy, Ciobaru, R. y Brochier, J. Human B cell differentiation. I. Immunoglobulin synthesis induced by Nocardia mitogen. Eur. J. Immunol. 8 : 119 , 1978.
- 94) Del Bosque, J. E. Inmunidad celular en ratones infectados con Nocardia brasiliensis: actividad blastogénica de células T a mitógenos y cambios funcionales en macrófagos inducidos por linfocinas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, 1978.
- 95) Youmans, G. P. y Karlson, A. G. Streptomycin sensitivity of tubercle bacilli. Studies on recently isolated tubercle bacilli and the development of resistance to streptomycin in vivo. Am. Rev. Tuberc. 55 : 529 , 1947.

- 96) Boyse, E. A., Old, L. J. y Chourolinkov, I. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Meth. Med. Res.* 10 : 39 , 1964.
- 97) Jerne, N. K. y Nordin, A. A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140 : 405 , 1963.
- 98) Kettmen, J. y Dutton, R. W. An in vitro primary immune response to 2,4,6-trinitrophenyl substituted erythrocytes: Response against carrier and hapten. *J. Immunol.* 104 : 1558 , 1970.
- 99) Gclub, E. S., Mishell, R. I., Weigle, W. O. y Dutton, R. W. A modification of the hemolytic plaque assay for use with protein antigens. *J. Immunol.* 100 : 133 , 1968.
- 100) Mishell, R. I. y Dutton, R. W. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.* 126 : 423 , 1967.
- 101) Parks, D. E., Doyle, M. V. y Weigle, W. O. Effect of lipo polysaccharide on immunogenicity and tolerogenicity of HGG on C57BL/6J nude mice: Evidence for a possible B-cell deficiency. *J. Immunol.* 119 : 1923 , 1977.
- 102) Andersson, J., Möller, G. y Sjöberg, O. Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 4 : 381 , 1972.
- 103) Andersson, J., Sjöberg, O. y Möller, G. Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* 2 : 349 , 1972.
- 104) Coutinho, A., Gronowicz, E. y Möller, G. Signals and receptors in B cell activation En: Immune recognition (A. S. Rosenthal ed.) p. 63. Academic Press, New York, 1975.

- 105) Sjöberg, O., Andersson, J. y Möller, G. Lipopolysaccharide can substitute for helper cells in the antibody response in vitro. Eur. J. Immunol. 2 : 326 , 1972.
- 106) Sultzer, B. M. y Nilsson, B. S. PPD tuberculin-a B cell mitogen. Nature New Biol. 240 : 198 , 1972.
- 107) Yin, E. T., Galanos, C., Kinsky, S., Bradshaw, R. A., Wessler, S., Lüberitz, O. y Sarmiento, M. E. Picogram sensitive assay for endotoxin: Gelation of Limulus polyphemus blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. Biochem. Biophys. Acta 261 : 284 , 1972.
- 108) Bona, C., Yano, A., Dinitriu, A. y Miller, R. G. Mitogenic analysis of murine B-cell heterogeneity. J. Exp. Med. 148 : 136 , 1978.
- 109) Armerding, D. y Katz, D. H. Activation of T and B lymphocyte in vitro. I. Regulatory influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on specific T-cell helper function. J. Exp. Med. 139 : 24 , 1974.
- 110) Shinohara, N. y Kern, M. Differentiation of lymphoid cells: B cell as a direct target and T cell as a regulator in lipopolysaccharide enhanced induction of immunoglobulin production. J. Immunol. 116 : 1607 , 1976.
- 111) Kunkel, H. G. y Tan, E. M. Autoantibodies and disease. Adv. Immunol. 4 : 351 , 1964.
- 112) Dresser, D. W. Most IgM-producing cells in the mouse secrete auto-antibodies (rheumatoid factor). Nature 274 : 480 , 1978.