

TRABAJOS DE COLABORACION

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ADHERENCIA BACTERIANA A LINFOCITOS HUMANOS Y MURINOS

G. Alvarez de Cienfuegos, A. Ruiz-Bravo y A. Ramos-Cormenzana

RESUMEN

Hemos estudiado la capacidad de adherencia selectiva a distintas subpoblaciones linfocitarias humanas y murinas de diferentes cepas bacterianas pertenecientes a distintos géneros y especies.

Las cepas pertenecientes al género *Bacillus* tienen, en general gran capacidad de unión a la superficie linfocitaria murina. Otras especies que presentan interesantes propiedades de adherencia son: *Staphylococcus epidermidis*, *S. aurcus*, *Yersinia enterocolitica* y *Sporosarcina halophila*. En el ensayo de adherencia a linfocitos humanos solo *Y. enterocolitica* y *S. halophila* se unen a ellos, aunque en ninguno de los casos de forma selectiva.

SUMMARY

We have studied the capacity for a selective adherence to different human and murine lymphoid subpopulation of bacterial strains belonging to different genera and species.

The strains of the genus *Bacillus* normally have a great capacity to bind to the murine lymphoid surfaces. Other strains with interesting adherence properties are *Staphylococcus epidermidis*, *S. aurcus*, *Yersinia enterocolitica* and *Sporosarcina halophila*. In the assay of adherence to human lymphocytes only *Y. enterocolitica* and *S. halophila* show binding capacity although in any one of cases in selective way.

INTRODUCCION

La membrana citoplasmática juega un papel decisivo en las interacciones intercelulares que protagonizan las funciones de activación y regulación de los linfocitos.

- 1.- Departamento de Microbiología, Colegio Universitario "Santo Reino" de Jaén
- 2.- Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia de Granada.

tos. Hay numerosos ejemplos de estos fenómenos en los que participa la membrana linfocitaria: interacción con las células auxiliares; reconocimiento de aloantígenos en las membranas de otras células; etc.

La capacidad de algunas poblaciones linfocitarias para interactuar con otras células, especialmente con hematíes, ha sido utilizada para su identificación, por ejemplo la unión selectiva de las células T humanas con hematíes de carnero (2) o de las células B humanas con las de ratón (3). Estas experiencias muestran que los linfocitos funcionalmente diferentes pueden unirse a diferentes tipos de superficies celulares.

Las bacterias representan un campo prácticamente ilimitado para ser utilizadas en ensayos de adherencia a la superficie de linfocitos (5). Las experiencias realizadas en este sentido han demostrado que: a) la unión de linfocito-bacteria es ampliamente reproducible, b) dicha unión parece estar relacionada con la función del linfocito, c) las diferentes poblaciones definidas mediante su unión a bacterias, son funcionalmente diferentes entre sí, d) uno de los posibles mecanismos por el que se realiza dicha unión parece ser la interrelación entre ciertas glucoproteínas de la superficie linfocitaria que actúan como lectinas y grupos oligosacarídicos de la superficie bacteriana. El uso de la clasificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos mediante su unión a bacterias es clínicamente útil (6).

En el presente trabajo hemos estudiado la capacidad de adherencia de diferentes cepas bacterianas, pertenecientes a distintos géneros y especies o poblaciones linfocitarias de distinto origen tanto murinas como humanas por si pudieran ser utilizadas como marcadores de subpoblaciones linfocitarias.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias.

Hemos utilizado 17 cepas bacterianas pertenecientes a la Colección de nuestro Departamento y cuya relación:

Bacillus brevis CCM2050; *Bacillus megaterium* ATCC 28848; *Bacillus subtilis* ATCC 6151; *Micrococcus luteus* CCM 732; *Staphylococcus aureus* CCM 858; *Staphylococcus epidermidis* CCM 901; *Yersinia enterocolitica* ser. 03 IP134; *Yersinia enterocolitica* ser. 04 IP1476; *Alcaligenes* sp.; *Pseudomonas* sp.; *Acinetobacter* sp.; *Flavobacterium* sp.; *Vibrio costicola*; *Flavobacterium halosaccharolitica*; *Micrococcus varians*; *Sporosarcina halophila* y *Planococcus* sp.

Linfocitos murinos.

Hemos ensayado suspensiones celulares procedentes de médula ósea, bazo, timo y peritoneo de ratones homocigotos de la línea Balb/c.

Linfocitos humanos.

Como fuente de linfocitos T humanos hemos utilizado linfocitos de sangre periférica de individuos normales y como fuente de células B, linfocitos de sangre periférica de un enfermo de leucemia linfocítica (LLC) de tipo B con un recuento de 120.000 leucocitos/l de sangre periférica. En ambos casos la técnica usada para la separación de linfocitos a partir de sangre periférica fue la descrita por Alvarez de Cienfuegos (1).

Ensayo de adherencia bacteriana a linfocitos.

Hemos seguido la técnica descrita por Teodorescu *et al.*, (1979) (6). Básicamente esta técnica consiste en fijar las bacterias con glutaraldehído al 2,5 % , y mezclarlas con la suspensión de células linfocíticas a razón de 200 bacterias por célula. La mezcla se centrifuga a 200 x G y del sedimento se realizan frotis que se tiñen con Giemsa. Se dan como positivas, para el ensayo de adherencia, aquellas células con al menos tres bacterias en su superficie.

RESULTADOS

Los resultados de adherencia de las cepas ensayadas sobre poblaciones celulares murinas se muestran en la Tabla I. En ella se puede apreciar los altos valores obtenidos al probar las cepas de *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* en todas las poblaciones estudiadas. La cepa de *M. luteus* presenta una adherencia alta a células peritoneales. *S. aureus* se adhiere en general a todas las células ensayadas, pero lo hace especialmente a células procedentes de médula ósea. Algo similar, pero con menor intensidad, se observa en *S. epidermidis* que se adhiere en mayor proporción a los esplenocitos. En cuanto al comportamiento de la cepa IP134 de *Y. enterocolitica*, esta presenta los mayores porcentajes de adherencia celular, especialmente sobre poblaciones de médula ósea y bazo.

Otras bacterias con las que hemos obtenido valores interesantes de adherencia a células linfocíticas murinas han sido las cepas de *Pseudomonas* sp. y *S. halophila*, que se adhieren fundamentalmente a células esplénicas y peritoneales, la primera y a células tímicas y del peritoneo, la segunda.

En la Tabla 3 se recogen los resultados de la investigación de la adherencia de las cepas bacterianas, seleccionadas en el ensayo anterior. En ella se puede apreciar que *Y. enterocolitica* IP134 y *S. halophila* se adhieren en gran proporción a los linfocitos estudiados, aunque preferentemente lo hacen a linfocitos de individuos normales y a los de los enfermos de LLC, respectivamente. En los demás casos los porcentajes de adherencia obtenidos son en general menores que los encontrados frente a células murinas.

TABLA I.- Ensayo de adherencia de bacterias a poblaciones celulares murinas

Bacteria	Bazo	Médula ósea	Timo	Células peritoneales
<i>Bacillus brevis</i>	43 ^a	38	40	38
<i>Bacillus megaterium</i>	31	36	44	36
<i>Bacillus subtilis</i>	38	64	26	84
<i>Micrococcus luteus</i>	24	4	4	42
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	72	36	82
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	48	25	20	26
<i>Yersinia enterocolitica</i> ser. 03	52	50	31	30
<i>Yersinia enterocolitica</i> ser. 04	40	20	17	12
<i>Alcaligenes</i> sp.	2	5	1	10
<i>Pseudomonas</i> sp.	13	5	9	10
<i>Acinetobacter</i> sp.	20	50	10	3
<i>Flavobacterium</i> sp.	25	23	15	20
<i>Vibrio costicola</i>	10	2	1	2
<i>Micrococcus varians</i>	1	5	1	10
<i>Sporosarcina halophila</i>	8	7	20	24
<i>Planococcus</i> sp.	5	5	1	17
<i>Flavobacterium halosaccharolitica</i>	7	3	1	2

^a Porcentaje de células con un mínimo de tres bacterias en su superficie.

Estos resultados son la media de al menos 5 determinaciones.

DISCUSION

De los resultados obtenidos podemos destacar el gran porcentaje de células que poseen receptores para las especies del género *Bacillus*, independientemente de su función dentro del sistema inmune. *M. luteus* tiene muy poca adherencia sobre células inmaduras, en cambio si se une de forma apreciable a las células maduras y lo hace de una forma especial a las células peritoneales. Contrariamente *S. aureus* parece tener una mayor afinidad con las células linfoides inmaduras, especialmente con las de médula ósea. Debemos resaltar que esta bacteria se une en un porcentaje, que no dudamos en considerarlo como extraordinario, a los macrófagos peritoneales.

S. epidermidis por el contrario se une de una forma similar a todas las células ensayadas, el porcentaje mayor que aparece sobre las células esplénicas, pierde valor al considerar que en este organo existe una mezcla de células B y T por lo que el porcentaje obtenido en la adherencia a células esplénicas es aproximadamente igual a la suma de las obtenidas en la de médula ósea, fundamentalmente B y la del tipo T en casi su totalidad.

Los dos serotipos de *Y. enterocolitica* ensayados, poseen un comportamiento similar en relación a su adherencia a linfocitos, la única diferencia radica en una mayor tendencia a la unión a células de la cepa cirulenta del serotipo 03 y la explicación de esta diferencia debe radicar en que la adherencia celular es considerada como una etapa previa a la infección de las bacterias patógenas.

TABLA II.- Adherencia de bacterias a linfocitos humanos.

CEPA	Linfocitos de sangre periférica	
	Normales	Leucémicos ^a
<u>B. brevis</u>	10 ^b	6
<u>Y. enterocolitica</u> ser. 03	68	48
<u>Pseudomonas</u> sp.	10	5
<u>S. epidermidis</u>	2	5
<u>S. aureus</u>	5	12
<u>Sp. halophila</u>	30	54

^a
células de LLC tipo B.

^b
Porcentaje de células con un mínimo de tres bacterias en su superficie

Estos resultados son la media de al menos 5 determinaciones.

En general las bacterias halófilas moderadas no tienen tendencia a adherirse a la superficie celular, lo que quizás pueda relacionarse con la ausencia de adaptación de esta bacteria a vivir sobre hospedadores mamíferos. *Acinetobacter* sp. y *Flavobacterium* sp. son las únicas bacterias, pertenecientes a este grupo fisiológico, ensayadas que se unen en una mayor proporción a la membrana linfocitaria. *Acinetobacter* sp. se une fundamentalmente a células inmaduras y llama la atención su escasa adherencia sobre células peritoneales. *Flavobacterium* sp. por el contrario, se adhieren uniformemente a todos los tipos celulares estudiados.

De los resultados obtenidos, en los ensayos de adherencia bacteriana sobre linfocitos humanos, podemos apreciar que solo *Y. enterocolitica* IP134 y *S. halophi-*

la se unen en un porcentaje elevado a estas células, en el primer caso más fuertemente a células T y en el segundo a células B, aunque en ninguno de los casos lo hacen de forma selectiva, por lo que no es recomendable su uso como marcador de diferentes subpoblaciones linfocitarias. Resulta paradójico que la cepa de *B. brevis* ensayada, se une de forma tan débil a linfocitos murinos; esto nos induce a pensar que la unión célula-bacteria se hace a nivel de receptores ausentes en la mayoría de las células humanas.

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. Estudio de las poblaciones linfocitarias en individuos leucemicos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. (1983).
2. MENDEZ, M.F.; TOLNAI, M.E.; SILVEIRA, N.P.; GILBERTEN, R.B. y METZGAR, R.S. *J. Immunol.*, 111: 860 - 867, (1973).
3. POTOMSKI, J.; HARLOZINSKA, A.; BEKER, M. y NOWOROISKA, A. *Neoplasma* 12: 295 - 300, (1980).
4. TEODORESCU, M.; BRATESCU, A. y MAYER, E.P. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 13: 194 - 210, (1979).
5. TEODORESCU, M. y MAYER, E.P. *Adv. Immunol.* 33: 305 - 351, (1982).
6. TEODORESCU, M.; MAYER, E.P.; REITER, H. y DRAY, S. *Cell. Immunol.* 22: 66 - 75, (1976).