

Estandarización de la citometría de flujo en el estudio de las uveítis

Flowcytometry in the study of uveitis. Standardization

José Luis Olea¹, Cassandra Santos¹,
Julio Iglesias², Joana Ferrer².

1. Sección de Vitreo-Retina. Servicio de Oftalmología. 2. Servicio de Inmunología.
Hospital Universitari Son Espases

Correspondencia

Dr. José Luis Olea Vallejo
Hospital Universitari Son Espases.
Ctra. de Valldemossa, 79 - 07120 Illes Balears.
Tel. 871 205 382
e-mail: josel.olea@ssib.es

Recibido: 22 - III - 2013
Aceptado: 13 - VI - 2013

doi:

Resumen

Objetivo: Describir los patrones celulares característicos en las muestras oculares de las uveítis con la citometría de flujo.

Material y métodos: Estudio prospectivo de las muestras del humor vítreo o acuoso en uveítis. Se analizan 12 de 17 pacientes con uveítis inmune o infecciosa o síndrome mascarada (amiloidosis, linfoma de células B).

Resultados: Las uveítis infecciosas tenían un patrón de predominio de neutrófilos. Las inmunes un patrón linfocitario T con índice CD4/CD8 medio de 3,1. En las uveítis por inmunorecuperación había una inversión del índice CD4/CD8. El linfoma ocular primario tenía las células características y las muestras de la amiloidosis fueron acelulares.

Conclusiones: La citometría de flujo es una técnica alternativa a la citología clásica para mostrar las respuesta celular, en el estudio de las uveítis.

Palabras clave: Citometría de flujo. Uveítis infecciosa. Uveítis inmune. Linfoma intraocular primario de células B. Uveítis por inmunorecuperación.

Abstract

Purpose: To describe the inflammatory cellular patterns of uveitis using flow cytometry in clinical intraocular specimens.

Patients and Methods: This was a prospective study of diagnostic vitreous and aqueous samples in uveitis. Twelve out of 17 patients with immune or infectious uveitis and masquerade syndrome (amyloidosis and B-cell lymphoma) were selected for the study.

Results: Infectious uveitis showed a neutrophilic pattern. A T-cell profile was found in immune uveitis, and a CD4/CD8 rate average of 3,1. Immunorecovery uveitis had an inverse CD4/CD8 rate. A large B-cell lymphoma showed characteristic pathological cells. Amyloidosis samples were acellular.

Conclusions: Flow cytometry is an alternative technique to gain information regarding cellular constituents from intraocular specimens in uveitis studies.

Key words: Flow cytometry. Infectious uveitis. Immune uveitis. Large B-cell intraocular primary lymphoma. Immunorecovery uveitis.

Introducción

Se define como uveítis al proceso inflamatorio que afecta a la úvea (iris, cuerpo ciliar o coroides), aunque por extensión se incluyen otras estructuras adyacentes, como esclera, papila, vítreo o retina. La incidencia es de 17-52 por 100.000 habitantes año, y la prevalencia oscila entre los 38 y 714 por 100.000 habitantes, dependiendo de los países¹. Aunque las más frecuentes son las uveítis anteriores (51 %), las que afectan al segmento posterior, suelen ser de peor pronóstico y curso crónico.

La clasificación etológica, de la clasificación simplificada del *International Uveitis Study Group*, reconoce tres grupos: uveítis no infecciosas, infecciosas y los síndromes mascarada, entre los que se encuentran tumores, por ejemplo el linfoma intraocular primario (LIOP), enfermedades por depósito, como la amiloidosis, o cualquier otra etiología imaginable, que simule una uveítis².

Determinar la causa de la uveítis es importante de cara al

tratamiento, al pronóstico o para determinar una enfermedad sistémica más o menos grave. Esto es especialmente importante en las uveítis en las que se ven infiltradas las estructuras del segmento posterior: uveítis intermedia, uveítis posteriores y panuveítis. La mayoría de las veces se llega al diagnóstico a través de la clínica, pruebas sistémicas ya sean analíticas o de imagen (actualmente bien protocolizados) y respuesta al tratamiento¹.

No obstante, en algunos casos, para el diagnóstico se necesitan analizar muestras intraoculares, ya sea el propio tejido (poco frecuente) o más habitualmente se obtienen del humor vítreo y/o acuoso.

Los avances en las técnicas de laboratorio han mejorado mucho la información que podemos obtener de ellas^{3,4,5} y esto es muy importante ya que son muestras difíciles de obtener y con muy poco volumen para estudio.

Aunque la citología es el "gold standard" de la respuesta celular presente en la inflamación ocular, muchas veces el bajo contenido de células en una muestra pequeña y con un gran componente de fibrina, tejidos necróticos, etc., hace que sean muestras difíciles de evaluar, incluso en manos expertas. La citometría de flujo, ampliamente utilizada por otras especialidades, es capaz de determinar células inflamatorias o neoplásicas, con muestras pequeñas y alta fiabilidad, pudiendo utilizarse marcadores de superficie para identificar el tipo de células presentes y su proporción, identificando el tipo de respuesta celular^{4,5}.

En este estudio se muestran los resultados de la citometría de flujo, con los marcadores más habituales y disponible en muchos centros, aplicada al diagnóstico diferencial de los casos que llegaron a la sección de vítreo-retina del Hospital Universitario Son Espases, en los que se indicaba un estudio del vítreo o del acuoso. Las muestras fueron analizadas, de forma protocolizada y estandarizada por el servicio de inmunología de nuestro hospital.

Material y Métodos

Se han incluido todos los pacientes que acudieron al Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Son Espases, con el diagnóstico clínico de uveítis posterior, intermedia o panuveítis según los criterios de la Clasificación Internacional de las Uveítis, o linfoma intraocular primario y que dada su dificultad diagnóstica o con finalidad diagnóstico-terapéutica, se precisó la realización de una paracentesis de cámara anterior con extracción de humor acuoso o un vitrectomía posterior diagnóstico-terapéutica.

Entre otras pruebas, se efectuó un citometría de flujo con suficiente calidad como para validar los resultados. Sólo se han incluido en esta serie, aquellos casos, en los

que se llegó a un diagnóstico de certeza por otros medios, ya que el objetivo es evaluar la fiabilidad de esta técnica.

Para la obtención de la **muestra de acuoso**, se instilo anestesia tópica, se efectuó un lavado de fondos de saco con un solución iodada acuosa al 2 %, se colocó un blefaróstato y a través del limbo temporal se efectuó una punción con una aguja de 32 G conectada a una jeringa de insulina. La aguja se entrujo a través del estroma corneal hasta que penetra unos 2-3 mm en cámara anterior, momento en el que se extraen entre 0,15 y 0,3 ml. Tras sacar la aguja de la cámara anterior, se comprueba la presencia de Seidel con fluoresceína sódica, para asegurar la estanqueidad de la cámara anterior.

La muestra en su totalidad o una alícuota, mínima de 0,1 ml, se remite, sin manipular, y lo antes posible, al servicio de inmunología centro para la realización de la técnica.

En el caso de la **muestra del vítreo**, se obtuvieron a través de una vitrectomía posterior de 3 vías de 23 ó 25G, intercalando en la aspiración, un depósito de 10 ml, utilizando el equipo Constellation de la casa Alcon.

Se obtuvieron tres tipos diferentes de muestras:

- 1) Una biopsia no diluida, purgando la vía de infusión con aire y aspirando hasta obtener al menos 2 ml de humor vítreo puro.
- 2) Una biopsia diluida, en la que la vía de infusión se purgaba con la solución Ringer Lactato habitual, en este caso, se recogían al menos 5 ml.
- 3) Muestra del contenido del cartucho que incluía el líquido total de la cirugía. La mayoría de las muestras vítreas de mayor calidad se obtuvieron con este sistema.

En todos los casos, la alícuota correspondiente, se enviaba directamente al laboratorio de inmunología, inmediatamente, para la realización de la citometría de flujo.

La **citometría de flujo** se efectuaba en el servicio de inmunología, donde dicha técnica se realiza de forma habitual para todo tipo de muestras, y que brevemente se resume a continuación:

Al llegar al laboratorio, la muestra se centrifugaba, filtraba y se procedía a su lavado y suspensión. Para el análisis de la citometría de flujo, se incubaba con anticuerpos monoclonales marcadores de linfocitos T: CD3, CD4, CD8.

Linfocitos B: CD19 ó CD20 ó CD 22. En el caso de sospecha de linfoma intraocular primario se utilizó también CD10.

El plot side-scatter (SS) y forward-scatter (FS), sin marcador alguno, permitía averiguar la presencia de linfocitos, monocitos-macrófagos y neutrófilos.

La forma standard de presentación de los resultados era, porcentaje de monocitos-macrófagos, neutrófilos y lin-

focitos, y porcentaje de CD4, CD8, índice CD4/CD8, y linfocitos B.

Una vez conocido el diagnóstico final, por otros medios, se procedió a la agrupación y análisis descriptivo de los casos, buscando un patrón característico en cada grupo.

Resultados

Se exponen los resultados de 17 pacientes, en 5 no se observaron células. Al final se evalúan 12 pacientes:

Hay 4 muestras de uveítis inmunológicas, 5 infecciosas

(endofthalmitis endógenas), 2 síndromes de inmunorecuperación, 1 caso bilateral de amiloidosis no diagnosticada previamente y 1 caso de linfoma intraocular primario, en 3 estadios diferentes.

Uveítis infecciosas: Se analizaron 5 muestras en cuatro casos clínicos, correspondientes a endofthalmitis infecciosas endógenas bacterianas. Dos muestras fueron de humor acuoso y 3 vítreas. Los resultados se muestra en la **tabla I**. El perfil de las uveítis infecciosas se caracteriza por el predominio de la presencia de polimorfonucleares (porcentaje medio 42,2 %), un porcentaje de linfocitos muy bajo, con un índice CD4/CD8 superior a 3.

Tabla I. Citometría de flujo en las uveítis infecciosas. Porcentajes e índice CD4/CD8

UVEÍTIS INFECCIOSAS									
#	Linfo	PMN	M/M	CD3 (LT)	CD4 (H)	CD8 (S)	CD4/8	CD19 (B)	Muestra
1	1	25	0	75	56	18	3,11	3	Vítreo
2	1	25	0	84	65	19	3,4	4	Vítreo
2	10	48	0	75	69	6	11,5	5	Acuoso
3	0	33	0	-	-	-	-	-	Acuoso
4	0	80	0	-	-	-	-	-	Vítreo
	Media	(<10)	42,2	0	78			6	(< 5)

Número de muestra.

Linfo Porcentaje Linfocitos. PMN Porcentaje Polimorfonucleares/Neutrófilos. M/M Porcentaje Monocitos / Macrófagos.

CD3 (LT) Linfocitos T. CD4 (H) Linfocitos T4 ó Helper. CD8(S) Linfocitos T8 supresores. CD4/8 Índice CD4/CD8 CD19(B) Linfocitos B. [Porcentaje]

Tabla II. Citometría de flujo en las uveítis inmunes. Porcentajes e índice CD4/CD8

UVEÍTIS INMUNES									
#	Linfo	PMN	M/M	CD3 (LT)	CD4 (H)	CD8 (S)	CD4/8	CD19 (B)	Muestra
1	8	0	0	87	67	20	3,35	14	Acuoso
2	7	0	0	90	47	44	1	<1	Acuoso
2	10	0	0	90	60	38	1,5	0	Vítreo
3	4	0	0	90	76	11	6,9	< 1	Vítreo
	Media	0	0	90			3,1	(< 15)	

Número de muestra.

Linfo Porcentaje Linfocitos. PMN Porcentaje Polimorfonucleares/Neutrófilos. M/M Porcentaje Monocitos / Macrófagos.

CD3 (LT) Linfocitos T. CD4 (H) Linfocitos T4 ó Helper. CD8(S) Linfocitos T8 supresores. CD4/8 Índice CD4/CD8 CD19(B) Linfocitos B. [Porcentaje]

Tabla III. Citometría de flujo en las uveítis por inmunorecuperación. Porcentajes e índice CD4/CD8

UVEÍTIS POR INMUNORECUPERACIÓN									
#	Linfo	PMN	M/M	CD3 (LT)	CD4 (H)	CD8 (S)	CD4/8	CD19 (B)	Muestra
1	2	0	2	66	22	44	0,5	1	Acuoso
2		0	0	85	22	61	0,3	8	Acuoso
	Media	0	1	75,5			0,4	4	

Número de muestra.

Linfo Porcentaje Linfocitos. PMN Porcentaje Polimorfonucleares/Neutrófilos. M/M Porcentaje Monocitos / Macrófagos.

CD3 (LT) Linfocitos T. CD4 (H) Linfocitos T4 ó Helper. CD8(S) Linfocitos T8 supresores. CD4/8 Índice CD4/CD8 CD19(B) Linfocitos B. [Porcentaje]

Tabla IV. Citometría de flujo en linfoma intraocular primario. Porcentajes e índice CD4/CD8

LINFOMA INTRAOCULAR PRIMARIO									
#	Linfo	PMN	M/M	CD3 (LT)	CD4 (H)	CD8 (S)	CD4/8	CD19 (B)	Muestra
1	10	0	0	90	15	78	0,2	3	Vítreo
2	15	0	0	80	20	65	0,3	10	Vítreo
3	30	0	0	50	30	20	1,7	30*	Vítreo

Número de muestra.

* Mayor tamaño de lo normal.

Linfo Porcentaje Linfocitos. PMN Porcentaje Polimorfonucleares/Neutrófilos. M/M Porcentaje Monocitos / Macrófagos.

CD3 (LT) Linfocitos T. CD4 (H) Linfocitos T4 ó Helper. CD8(S) Linfocitos T8 supresores. CD4/8 Índice CD4/CD8 CD19(B) Linfocitos B. [Porcentaje]

Uveítis inmunológicas: Tres casos clínicos, con cuatro muestras, 2 de acuoso y 2 vítreas. No se encontraban apenas polimorfonucleares y monocitos-macrófagos, siendo la respuesta, casi pura de linfocitos T, aunque el índice CD4/CD8 fue superior a 1, pero variable (**tabla II**). Hubo en la serie, 2 casos de uveítis por inmunorecuperación (**tabla III**), que se produce en pacientes con infección VIH con buena respuesta a la terapia antiVIH y antecedentes de retinitis CMV en ese ojo. En ambos casos se obtuvo muestra de humor acuoso y lo característico fue la inversión del cociente CD4/CD8.

La muestra fue acelular, en las muestras vítreas, en ambos ojos de un caso bilateral de amiloidosis ocular, sin diagnóstico previo.

Por último, se efectuaron 3 citometrías de flujo en un caso de linfoma intraocular primario (**tabla IV**): la primera en una de las recaídas, siendo la respuesta pura de linfocitos, con un 30 % de linfocitos B (CD19%), y marcador CD10 +. Las otras dos tomas se hicieron en fase de inactividad y en la fase incipiente de una recaída. El porcentaje de linfocitos B fueron 3 % y 10 % respectivamente, curiosamente en ambos casos había una inversión del índice CD4/CD8.

Discusión

La citometría de flujo es una técnica alternativa a la citología, que se está aplicando a múltiples muestras orgánicas con buenos resultados.

Aplicada al estudio de las uveítis, es capaz de identificar la respuesta celular presente en humor acuoso y vítreo, de una forma rápida y precisa, y establecer, por ejemplo, un diagnóstico de linfoma intraocular primario (LIOP)⁶.

El primer problema reside en las características de las muestras, en el caso del humor acuoso, nos encontramos con menos celularidad que un vítreo inflamado, sin embargo, en el caso de las muestras de vitrectomía, se necesita que las células se liberen, ya que muchas están adheridas a restos necróticos, redes de fibrina, o el propio gel vítreo. Las muestras vítreas procedentes del colector del equipo y las de las muestras diluidas, son las que presentaron mejor celularidad para su identificación.

Este fenómeno hay que tenerlo en cuenta, ya que en 5 de los 17 casos, a pesar de estar presente la inflamación, no se pudo obtener su componente celular, y se debe considerar un falso negativo, sin embargo en los 2 ojos en los que se diagnóstico la opacidad vítreo como una amiloidosis, la acelularidad era real, por eso tenemos que evaluar los resultados con el resto de pruebas.

Una vez obtenidas las muestras, en pocas horas podemos obtener los resultados, la identificación del componente de polimorfonucleares, monocitos-macrófagos y linfocitos se obtienen sin necesidad de marcador alguno, simplemente por la identificación morfológica de los componentes presentes. A continuación, se procedía al marcaje del componente de linfocitos.

El LIOP es una patología muy poco frecuente, se trata de un linfoma difuso de cel B (gigantes), en el caso incluido en esta serie, las muestras se tomaron directamente de la cavidad vítreo, con una aguja de 30 G a través de la pars plana, el tamaño mayor de las células B y el uso de los marcadores de células inmaduras identificaron bien estas células patológicas, como ya estaba probado en otras series⁶, sin embargo, en el momento en el que estaba libre de recidiva o esta estaba comenzando, se encontró una inversión del cociente CD4/CD8 que no tiene explicación.

Esta inversión se encontró en los dos casos de la uveítis por inmunorecuperación, aunque se sabe que estos pacientes la presentan a nivel sistémico y por tanto puede traducir, la rotura de la barrera hemato-retiniana interna o una característica intrínseca de la propia reacción inflamatoria a nivel ocular⁷.

En el caso de la uveítis infecciosas (la mayoría endoftalmítis endógenas), las muestras tanto en acuoso como en vítreo mostraban una reacción con predominio claro de polimorfonucleares, la respuesta de linfocitos era predominantemente T y había un índice CD4/CD8 superior a 3. Este perfil era distinto al que encontramos en las inmunes, donde apenas había polimorfonucleares o monocitos-macrófagos, y la respuesta era principalmente de linfocitos T, y en 2 casos el índice CD4/CD8 era menor de 3.

Establecer el diagnóstico diferencial entre la etiología infecciosa o inflamatoria, es difícil, sobre todo en casos de panuveítis, endoftalmítis crónicas o endógenas. La citometría de flujo, junto con la citología, puede ayudarnos al ser un test más rápido que los cultivos clásicos.

Kojima y cols⁸ han publicado que el índice CD4/CD8 a nivel vítreo comparándolo con el sistémico es mayor en el caso de la sarcoidosis, con un valor igual o superior a 3,5 en vítreo, la sensibilidad era del 100 % y la especificidad del 96,3 % para el diagnóstico de la sarcoidosis ocular. Es un buen ejemplo de cómo esta técnica se va incorporando a los test diagnósticos del estudio de las uveítis.

Se necesitan aumentar el número de casos y profundizar más en los resultados de esta técnica para poder incorporarla plenamente al catálogo de los test diagnósticos en las uveítis

Bibliografía

1. Fernández-Cid C, Cruz-Martinez J. Clasificación y frecuencia de las uveítis. In: Uveítis. Protocolos diagnóstico y nuevas estrategias terapéuticas. Valencia: GEMU-SEDU; 1:13-6.
2. Deschenes J, Murray PI, Rao NA, Nussenblatt RB, International Uveitis Study Group. International Uveitis Study Group (IUSG): clinical classification of uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2008; 16 (1):1-2.
3. Margolis R. Diagnostic vitrectomy for the diagnosis and management of posterior uveitis of unknown etiology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2008; 19 (3):218-24.
4. Davis JL, Ruiz P, Shah M, Mandelcorn ED. Evaluation of the reactive T-cell infiltrate in uveitis and intraocular lymphoma with flow cytometry of vitreous fluid (an american ophthalmological society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2012; 110:117-29.
5. Davis JL, Miller DM, Ruiz P. Diagnostic testing of vitrectomy specimens. *Am J Ophthalmol*. 2005;140 (5):822-9.
6. Davis JL, Viciano AL, Ruiz P. Diagnosis of intraocular lymphoma by flow cytometry. *Am J Ophthalmol*. 1997;124 (3):362-72.
7. Karavellas MP, Lowder CY, MacDonald J, Avila CP, Freeman WR. Immune recovery vitritis associated with inactive cytomegalovirus retinitis: a new syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1998;116 (2):169-75.
8. Kojima K, Maruyama K, Inaba T, Nagata K, Yasuhara T, Yoneda K, et al. The CD4/CD8 ratio in vitreous fluid is of high diagnostic value in sarcoidosis. *Ophthalmology*. 2012;119 (11): 2386-92.