

Determinación de secuencias de nucleótidos de DNA bacteriano en humor acuoso de pacientes con uveítis anterior secundaria a espondilitis anquilosante

Dra. Alicia Lavalle-Graef *, Dr. Edgar Contreras-Arévalo *, Dra. Guadalupe Elorriaga **

RESUMEN

Objetivo: Determinar la presencia de bacterias por medio de cultivo en agar de humor acuoso, y de fragmentos bacterianos por PCR.

Material y método: Paracentesis de cámara anterior y obtención de 100 microlitros de humor acuoso para cultivo en agar y PCR. Se realizó microscopia especular de ocho ojos (previo a la paracentesis) con antecedente de haber presentado por lo menos un cuadro de uveítis secundaria a EA.

Resultados: Ocho pacientes (seis masculinos y dos femeninas) con edad promedio de 41.8 años y uveítis secundaria a EA, no mostraron una relación directa entre el daño endotelial y el número de recaídas de uveítis por medio de microscopia especular; el pleomorfismo y polimegatismo sí presentó relación directa con la hexagonalidad. Las guttatas se encontraron desde el primer cuadro de uveítis aunque no presentaban relación directa con el número de recaídas. Ninguno de los cultivos mostró desarrollo bacteriano. Por PCR se logró determinar y amplificar secuencias de nucleótidos de DNA bacteriano con un primer universal para gram negativos en 5/8 muestras de humor acuoso de pacientes con EA (62.5%).

Conclusiones: El número de brotes agudos de uveítis no determina el grado de lesión endotelial; esta última básicamente se debe a la intensidad de la reacción inflamatoria, la oportunidad del tratamiento, la toxicidad del esteroide y/o del vehículo utilizado, y a la idiosincrasia. El hecho de que los cultivos resultaran negativos significa que: 1) la técnica de asepsia y antisepsia fue adecuada; 2) no hay bacterias completas o funcionales en el humor acuoso. La identificación de secuencias de DNA bacteriano en el humor acuoso de pacientes con EA y uveítis, sugiere que el mecanismo de daño inmunológico de esta última puede ser por mimetismo molecular.

Palabras clave: Espondilitis anquilosante, gram negativos, uveítis anterior.

SUMMARY

Purpose: To search for bacteria in aqueous humor by means of culture and for bacterial fragments with PCR.

Methods: Anterior chamber paracentesis was performed in eight eyes in order to obtain 100 microliters of acous humor for culture in agar and PCR. Endothelial specular microscopy was realized in the eight eyes (before the paracentesis) in patients with at least one episode of uveitis secondary to ankylosing spondylitis (AS).

Results: Eight patients (6 masculine, 2 feminine) with mean age of 41.8 years and with uveitis secondary to AE showed no direct relation between the number of episodes of anterior uveitis and the endothelial damage in the specular microscopy; pleomorphism and polymegatism did have a direct relation with hexagonality. Guttate were found even in the first episode of anterior uveitis. The guttate did not have a direct relation with the number of episodes of anterior uveitis. All bacterial cultures in agar were negative. The PCR determined and amplified bacterial DNA sequences with an universal primer in five of eight samples (62.5%).

Conclusions: The number of episodes of anterior uveitis does not determine the degree of endothelial lesion; this is mainly caused by the intensity of the inflammatory reaction, the prompt initiation of treatment, the toxicity of steroids drops and/or vehicles, and probably idiosyncrasy. The fact that the cultures were negative implies that: 1) the sterile technique for the anterior chamber paracentesis was adequate; 2) that there are no complete bacteria or functional bacteria in the aqueous humor. The identification of bacterial DNA sequences in aqueous humor of patients with AS and uveitis suggests that the mechanism of immunological damage is molecular mymethylism.

Key words: Ankylosing spondylitis, gram negative bacteria, anterior uveitis.

* Fundación Hospital "Nuestra Señora de la Luz". Ezequiel Montes 135, Delegación Cuauhtemoc, 06030, México, D.F. Teléfono 55462081. E-mail: somita@hotmail.com

**Unidad de investigación en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional "La Raza".

Las espondiloartropatías seronegativas (ESN) son un grupo de padecimientos caracterizados por afección de la columna vertebral, articulaciones periféricas y estructuras periarticulares (entesitis). Pueden encontrarse asociadas a manifestaciones extra articulares como uveítis anterior (UA), lesiones mucocutáneas, fibrosis pulmonar, lesiones aórticas y anomalías de la conducción cardiaca. Las ESN incluyen a la espondilitis anquilosante (EA), síndrome de Reiter (SR), artritis reactiva (Are), espondilitis asociada a psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal y a las espondilitis seronegativas indiferenciadas. Los mecanismos patogénicos subyacentes incluyen factores genéticos, ya que se ha demostrado mayor riesgo de padecer ESN en individuos con el antígeno HLA-B27. La demostración de infecciones por microbios como *Chlamydia*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Klebsiella spp*¹ en estos huéspedes predispuestos genéticamente, sugiere que la interacción entre factores ambientales y genéticos es una clave importante para conocer el papel que juegan estos en la patogénesis de la ESN. El antígeno HLA-B27 comparte algunos determinantes antigenicos con los gérmenes anteriormente mencionados (mimetismo molecular),² lo cual desencadena la reacción inflamatoria.

La uveítis anterior que presentan los pacientes con espondilitis anquilosante se caracteriza por ser de inicio súbito, unilateral alternante, con exacerbaciones y remisiones inflamatorias tanto del iris como del cuerpo ciliar, con escasas complicaciones del segmento posterior y evolución favorable ante el tratamiento con corticoesteroides.³ La incidencia de uveítis anterior (UA) en pacientes con EA varía de 20% a 30%. De los pacientes con uveítis asociada a HLA-B27, un alto porcentaje tiene EA o SR (84% a 90%). Los pacientes con EA tienen 10 veces mayor probabilidad de desarrollar uveítis anterior aguda que aquellos HLA-B27 positivos que no presentan dicho padecimiento.²

La inyección de endotoxina en el vítreo o en un sitio distante (utilizando lipopolisacáridos de la membrana externa de diferentes bacterias gram negativas, como son *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*) en especies susceptibles, induce una uveítis anterior autolimitada, dosis dependiente y bilateral.² El proceso inflamatorio, al parecer, está mediado por la liberación de una variedad de citocinas pro inflamatorias como son la IL 1^a, TNF a, IL 6 y otras como el óxido nítrico de las células epiteliales del iris y del cuerpo ciliar y células del segmento anterior.

Baggia y colaboradores han desarrollado un modelo de uveítis anterior inducido por bacterias, en ratas transgénicas y en ratas no transgénicas de control.⁴ Las ratas transgénicas expresaron un bajo número de copias de HLA B 27, y las ratas control fueron expuestas a *Salmonella* o *Yersinia* desarrollando uveítis anterior siete a nueve días posteriores a la infección, la cual frecuentemente fue unilateral, en ocasiones de varias semanas de duración y recurrentes, lo cual es un patrón muy similar al presentado por el humano.² Se han encontrado fragmentos bacterianos por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en líquido sinovial de articulaciones inflamadas en pacientes con EA.^{2,5} Por lo

anterior, en este estudio se decidió realizar cultivo de humor acuoso para determinar bacterias en este medio, y PCR para determinar la presencia de fragmentos bacterianos. Es sabido que las uveítis crónicas generan lesión endotelial; sin embargo, las características específicas de este tipo de uveítis (reacción leve pero de múltiples cuadros anuales) son datos que generan inquietud.

En las uveítis agudas se encuentran guttatas que aparecen y desaparecen a la biomicroscopia especular una vez que ha cedido el cuadro.⁶ En la pars planitis se han encontrado lesiones endoteliales similares a la línea de rechazo de aloinjerto, como resultado de endoteliosis autoinmune, por lo que se supone que ambas patologías presentan la misma patogénesis en cuanto al proceso autoinmune que actúa contra las células endoteliales en el aloinjerto y contra las células vítreas en la pars planitis.⁷

El objetivo del presente trabajo es estudiar pacientes con diagnóstico de uveítis anterior secundaria a EA y el daño al endotelio corneal secundario a los múltiples cuadros uveíticos en dichos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio clínico, prospectivo y observacional en ocho pacientes, 6 masculinos y 2 femeninos, con diagnóstico de uveítis anterior secundaria a espondilitis anquilosante que satisficieron los criterios modificados de Nueva York para el diagnóstico de la enfermedad¹ y que fueron valorados en el Departamento de uveítis de la Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz” durante el periodo comprendido de mayo del 2001 a noviembre del 2001. Se realizó examen oftalmológico completo: agudeza visual, refracción, examen con lámpara de hendidura, tonometría por aplanación (Goldman), tinción con fluoresceína sódica, fondo de ojo con oftalmoscopia indirecta, con lente de tres espejos (Goldman) y valoración del ángulo camerular, así como microscopía especular de campo amplio (Topcon) del ojo con mayor número de cuadros de uveítis anterior, para valorar el deterioro endotelial previo a la paracentesis ocular.

Previa autorización del Comité de ética del hospital y firma de la carta de consentimiento informado del paciente, se tomó una muestra de humor acuoso (0.1 ml) por medio de paracentesis de la cámara anterior (siguiendo protocolo de asepsia y antisepsia) con aguja de insulina para determinar, por medio de cultivo de humor acuoso en agar glucosado y reacción en cadena de polimerasa, la presencia de bacterias y/o fragmentos bacterianos (secuencias de nucleótidos de las bacterias gram negativas (*Salmonella flexneri*, *Chlamydia trachomatis* y *Klebsiella spp*)) utilizando un “primer” universal para bacterias.

Técnica

Bajo protocolo de asepsia y antisepsia, con campos estériles y anestesia con tetracaína tópica, se coloca blefaróstato de colibrí y se hace un lavado profuso conjuntival con colirio

de cloramfenicol. Se hace paracentesis de la cámara anterior con jeringa y aguja de insulina para tomar 0.1 ml de humor acuoso. La aguja de insulina se dobla 180° y se congela la muestra. Posteriormente, se llevan las muestras al laboratorio de Inmunología e Investigación del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" para ser guardadas en el criocongelador a -80°C.

Se enviaron al mismo departamento cuatro muestras de humor acuoso tomadas de forma estéril de pacientes con catarata senil, sin antecedentes de uveítis, para que sirvieran como control. Dichas muestras también fueron guardadas en el criocongelador a -80°C.

Posteriormente, se demostró la presencia de DNA en las muestras control y en los casos problema (uveítis), para de esta manera poder correr las pruebas de PCR.

Se utilizó 50% de la muestra de humor acuoso de los pacientes con uveítis secundaria a EA para su cultivo en caja de Petri con agar estéril glucosado a 30° por un lapso de 48 horas para la determinación de bacterias presentes en dicho medio.

RESULTADOS

Se estudiaron ocho pacientes (6 masculinos y 2 femeninos) con edades entre 12 y 61 años (edad promedio de 41.8 años) con uveítis anterior secundaria a EA. Todos los pacientes eran HLA B27 positivos. Se les realizó microscopía especular del ojo más afectado, así como paracentesis de cámara anterior de dicho ojo.

Dos pacientes presentaron un solo cuadro de uveítis anterior coincidiendo esto con ser los pacientes más jóvenes (12 y 21 años).

El paciente de 12 años presentó un solo cuadro de uveítis anterior del ojo derecho (OD), paquimetría de 609 micras, pleomorfismo y polimegatismo leve, hexagonalidad de 90% y guttatas grado I.



Fig. 1. Paciente de 43 años que presentó tres cuadros de uveítis anterior en OD. Celularidad de 2200, paquimetría de 575 micras, pleomorfismo y polimegatismo leve, hexagonalidad de 70% y guttatas grado I.

El paciente de 21 años presentó un solo cuadro de uveítis anterior del OI, celularidad de 2400, paquimetría de 535 micras, pleomorfismo y polimegatismo leve, hexagonalidad de 70% y guttatas grado I.

Tres pacientes presentaron dos cuadros de uveítis anterior (edades de 41, 44 y 58 años).

El paciente de 41 años presentó dos cuadros de uveítis anterior del OI, celularidad de 1600, paquimetría de 560 micras, pleomorfismo y polimegatismo moderado y hexagonalidad de 70% con guttatas grado I. Así también cursó con glaucoma secundario a esteroides.

La paciente de 58 años presentó dos cuadros de uveítis anterior del OD, celularidad de 800, paquimetría de 520 micras, pleomorfismo y polimegatismo severo, hexagonalidad de 30% y guttatas grado I. Antecedente de herpes zoster con involucro corneal del OD.

El paciente de 44 años presentó dos cuadros de uveítis anterior del OI, celularidad de 2000, paquimetría de 587 micras, pleomorfismo y polimegatismo moderado y hexagonalidad de 70%, guttatas grado II.

Tres pacientes presentaron tres cuadros de uveítis anterior (edades de 43, 55 y 61 años).

La paciente de 43 años presentó tres cuadros de uveítis anterior del OD, celularidad de 2200, paquimetría de 575 micras, pleomorfismo y polimegatismo leve, hexagonalidad de 70% y guttatas grado I (Figura 1).

El paciente de 55 años presentó tres cuadros de uveítis anterior del OD, celularidad de 600, paquimetría de 504 micras, pleomorfismo y polimegatismo severo, hexagonalidad de 40%, guttatas grado II (Figura 2).

El paciente de 61 años presentó tres cuadros de uveítis anterior del OD, celularidad de 2000, paquimetría de 506 micras, pleomorfismo y polimegatismo moderado, hexagonalidad de 70% y guttatas grado I. Fue operada de extracción extracapsular de catarata con colocación de lente intraocular del OD previo a la microscopía (septiembre 1999).

Se realizó una gráfica en la cual se expone el número de

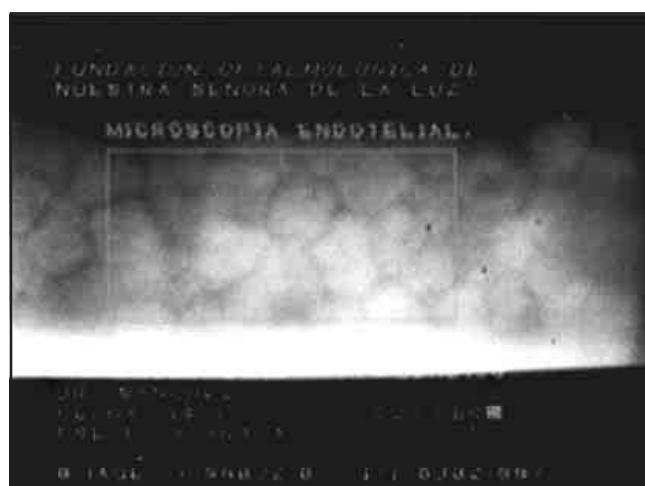


Fig. 2. Paciente de 55 años que presentó tres cuadros de uveítis anterior en OD. Celularidad de 600, paquimetría de 504 micras, pleomorfismo y polimegatismo severo, hexagonalidad de 40%, guttatas grado II.

células endoteliales y el número de cuadros de uveítis anterior registradas en el expediente de cada paciente (Gráfica 1). En ella podemos observar que el número de células endoteliales en los pacientes con un solo cuadro de uveítis es el más alto y en aquellos pacientes que han presentado dos y tres cuadros inflamatorios hay un menor número de células. Se encuentran representados dos pacientes con antecedentes que han lesionado al endotelio corneal; una paciente con antecedente de herpes zoster corneal, con 800 células endoteliales y sólo dos cuadros de uveítis, y un paciente operado de extracción extracapsular de catarata y tres cuadros de uveítis con 2000 células. Un paciente presentó tres cuadros de uveítis y cuenta con 600 células endoteliales.

En la gráfica 2 se representa el grado de pleomorfismo y polimegatismo así como la hexagonalidad en dichos pacientes y se observa que los pacientes con pleomorfismo y polimegatismo leve y moderado son los que presentan mayor hexagonalidad (mayor de 70%), mientras que aquellos con pleomorfismo y polimegatismo severo presentan hexagonalidad de 30 y 40%, lo que sugiere un daño permanente en el endotelio corneal.

En la gráfica 3 se representa el número de cuadros de uveítis con el grado de guttatas encontrado en el endotelio corneal. En dicha gráfica se puede observar que no necesariamente el número de cuadros se relaciona con el grado de daño al endotelio. El cultivo de humor acoso en agar glucosado, bajo condiciones estériles, resultó negativo a bacterias en todos los casos.

La tercera parte de este estudio fue la determinación de fragmentos bacterianos en humor acoso de pacientes con

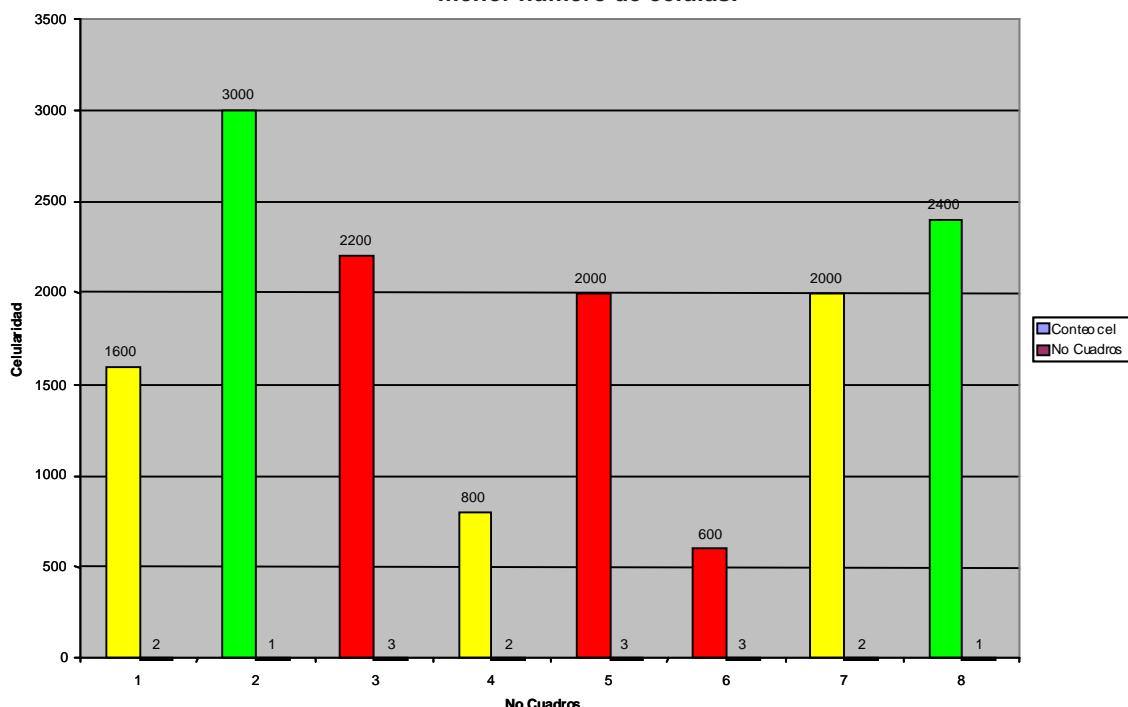
EA, lo que puede hacerse pidiendo las secuencias de nucleótidos o primers de las bacterias *Salmonella sp*, *Chlamydia trachomatis* y *Klebsiella Spp*, o bien utilizando un primer universal para bacterias. Este último procedimiento fue el elegido en esta investigación.

Las muestras de humor acoso de pacientes controles (sin uveítis) fueron negativas para bacterias al correrse la PCR. Dentro de las ocho muestras de pacientes con uveítis, tres resultaron negativas (37.5%) y cinco positivas (62.5%). La figura 3 es un ejemplo de corrimiento de PCR de tres pacientes con uveítis. La segunda franja vertical, de izquierda a derecha, es un control marcado con *Escherichia coli*. Esta franja muestra una banda a nivel de los 600 bp, y se observan franjas de las muestras problema con una banda aproximadamente en el mismo nivel que la anterior (aproximadamente entre los 570 y los 600 bp). Por ello es que se consideraron positivas a bacterias gram negativas estas cinco muestras problema.

CONCLUSIONES

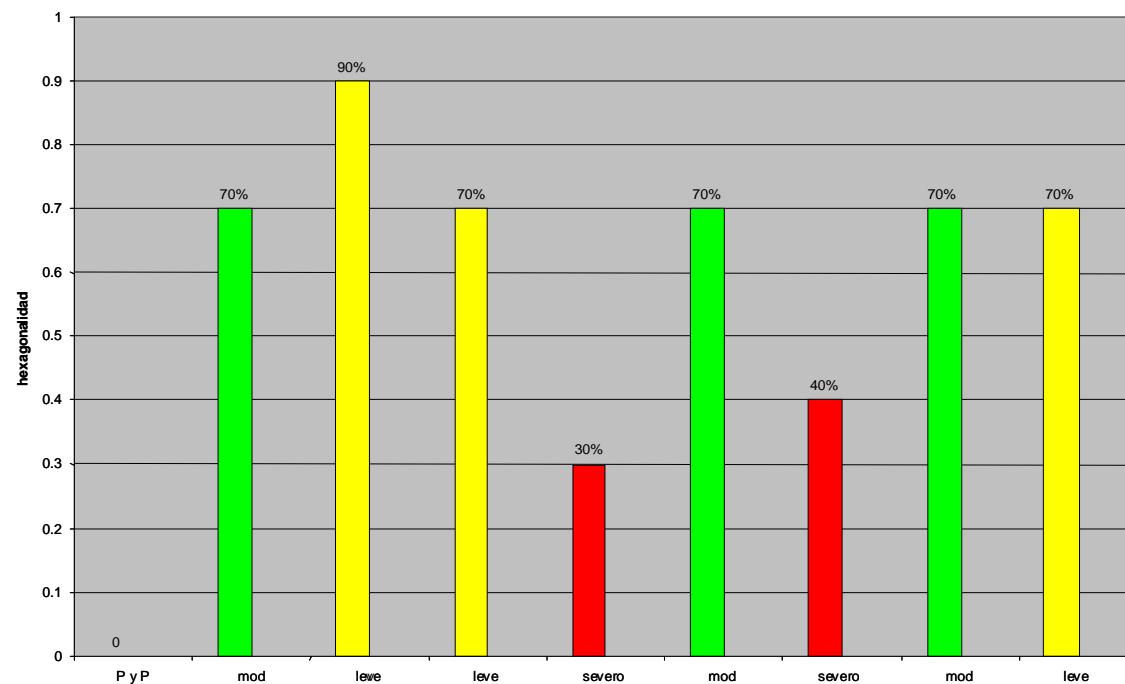
Se encontró que seis pacientes presentaron guttatas grado I y dos pacientes guttatas grado II. Los pacientes con guttatas grado II no presentaron antecedentes traumáticos, infecciosos o inmunológicos de otra índole y habían cursado con dos o tres cuadros de uveítis anterior previos al estudio. Esto genera controversia ya que con frecuencia el paciente puede pasar por desapercibidos los cuadros de uveítis anterior (debido a que son generalmente de naturaleza leve con

Gráfica 1
Se observa que el número de células endoteliales en los pacientes con un solo cuadro de uveítis es el más alto y que en los pacientes que han presentado dos y tres cuadros inflamatorios hay un menor número de células.

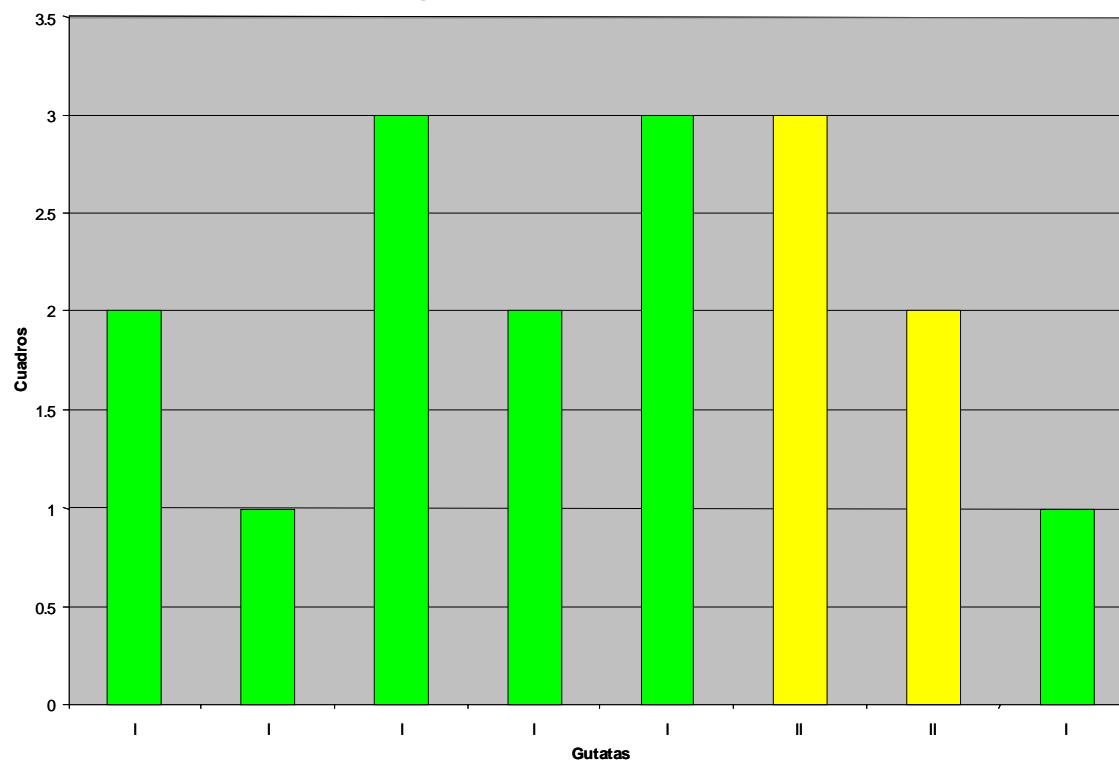


Gráfica 2

Se representa el grado de pleomorfismo, polimegatismo y hexagonalidad en los pacientes estudiados. Se observa que los pacientes con pleomorfismo y polimegatismo leves y moderados son los que presentan mayor hexagonalidad (mayor de 70%), mientras que aquellos con pleomorfismo y polimegatismo severos presentan hexagonalidad de 30 y 40%, lo cual sugiere un daño permanente en el endotelio corneal.

**Gráfica 3**

Muestra la relación entre el número de cuadros de uveítis y el grado de guttatas encontrado en el endotelio corneal. Se observa que no necesariamente el número de cuadros se relaciona con el grado de daño al endotelio.



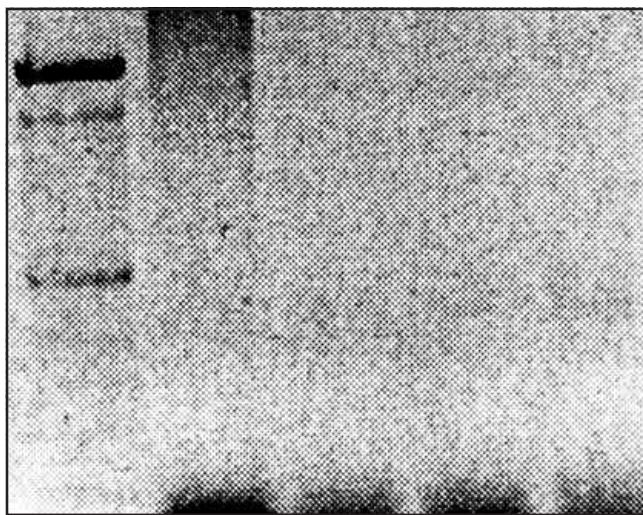


Fig. 3. Ejemplo de corrimiento de PCR de tres pacientes con uveítis. La primera franja vertical, de izquierda a derecha, representa el "primer" universal para bacterias. La segunda franja vertical es un control marcado con *Escherichia coli*. Esta franja muestra una banda a nivel de los 600 bp y se pueden observar las franjas de la muestra problema (3, 4, 5) con una banda en el mismo nivel que la anterior (aproximadamente entre los 570 y los 600 bp). Debido a esto se consideraron positivos a bacterias gram negativas estas cinco muestras problema.

tyndall de + o ++),⁸ y la diversidad en intensidad de algunos cuadros y la prontitud con la que se instala el tratamiento pudieran ser los responsables del mayor daño en algunos pacientes.

Esto puede ejemplificarse con el paciente de 55 años que presenta celularidad de 600, pleomorfismo y polimegatismo severo, guttatas grado II y hexagonalidad de 40% con tres cuadros referidos de uveítis anterior, mientras que otros pacientes con tres cuadros tienen celularidad normal, pleomorfismo y polimegatismo leve, hexagonalidad de 70% y guttatas grado I, aun habiendo sido operados de catarata previamente.

La presencia de guttatas indica daño al endotelio corneal, y el que estas guttatas no aparezcan y desaparezcan como se menciona en el artículo publicado por Zantos⁶ en las uveítis anteriores agudas, habla de cuadros repetitivos que no han sido percibidos por el paciente, ya que el número de cuadros referidos es muy escaso para el daño endotelial encontrado. En otra publicación realizada en el Departamento de uveítis del Hospital de Nuestra Sra. de la Luz⁹ se encontraron guttatas en los pacientes con uveítis anteriores y éstas no presentaban las características mencionadas por Zantos. Probablemente los datos encontrados por Zantos pueden correlacionarse con pseudoguttatas, mientras que las observadas en nuestros pacientes sean guttatas verdaderas. Esto ya había sido mencionado anteriormente en las uveítis anteriores agudas y en algunas enfermedades inflamatorias como pars planitis y toxoplasmosis.⁹

Así también habría que valorar el posible efecto tóxico de los esteroides y los vehículos utilizados en dichos colirios para controlar los cuadros de uveítis anterior como probables agentes causales de lesión endotelial.¹⁰

Los pacientes con antecedentes de glaucoma o herpes zoster presentaron menor celularidad a la esperada para su grupo de edad y cuadros de uveítis anterior. El hecho de que hallan resultado negativo los cultivos de humor acuoso con EA en nuestro estudio nos arroja resultados importantes ya que:

1. Se determinó que las muestras de humor acuoso fueron tomadas con una técnica adecuada de asepsia y antisepsia.
2. No se encontraron bacterias completas o funcionales en el humor acuoso de dichos pacientes ya que clínicamente no había datos de uveítis bacteriana y no hubo crecimiento bacteriano por cultivo del humor acuoso en agar.

El hecho de que cinco pacientes con uveítis secundaria a espondilitis anquilosante presentaran fragmentos bacterianos en el humor acuoso sugiere que, probablemente, estos fragmentos sean restos bacterianos que se encontraban en la circulación sanguínea y que lograron atravesar la barrera hematoacuosa. Posiblemente sea por mimetismo molecular que estos fragmentos desencadenen la reacción inflamatoria ocular en pacientes susceptibles genéticamente. La importancia de haber encontrado fragmentos bacterianos en el humor acuoso de estos pacientes radica en que, tal vez, la toma de humor acuoso para corrimiento con PCR de un paciente sospechoso de espondilitis anquilosante se vuelva un arma diagnóstica más para dicha enfermedad y que permita la instauración oportuna de medidas preventivas en pacientes con EA sin uveítis previa.

REFERENCIAS

1. Careless, D.; Chiu, B.; Rabinobitch, T.; Wade, J.; y col.: Inmunogenetic and microbial factors in acute anterior uveitis. *J Rheumatol*, 1997; 24:102.
2. Bañares, A.; Hernández-García, C.; Fernández-Gutiérrez, B.; y col.: Rheumatic Disease Clinics of North America. Eye Involvement in the Spondyloarthropathies. 1998.
3. Felltkamp, T.; Ringrose, J.: Acute anterior uveitis and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*, 1998; 10(4):314-318.
4. Baggia, S.; Lyons, J.; Angell, E.; y col.: A novel model of bacterially induced acute anterior uveitis in rats and the lack of effect from HLA B27 expression. *J Investig Med*, 1997; 45:295.
5. Pacheco-Tena, C.; Alvarado De La Barrera, C.; López-Vidal, Y.; y col.: Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies. *Rheumatology*, 2001; 40(8):920-927.
6. Zantos, A.; Holden, B.: Guttate endotelial changes with anterior eye inflammation. *Brit J Ophthalmol*, 1981; 65:101-103.
7. Khodadoust, A.; Karnama, Y.; Stoessel, K.; y col.: Pars Planitis and Autoimmune Endotheliopathy. *Am J Ophthalmol*, 1986; 102:633-639.
8. Lavalle, A.; Contreras, E.: Características clínicas de la uveítis anterior en pacientes con espondilitis anquilosante. *Boletín oftalmológico*, 2001; 2(187):38-42.
9. Velasco, M.; Martínez, J.; Contreras, E.: Hallazgos de microscopia espectral en pacientes con uveítis. *Boletín oftalmológico*, 2000; 2(187):38-42.
10. Martins, J.; Wilensky, J.; Asseff, C.: Corticosteroid-Induced Uveitis. *Am J Ophthalmol*, 1974; 4(77):433-437.