

Marcadores de migración celular en uveítis: correlación clínica inmunológica

Dr. Sergio Groman-Lupa*, Dra. Stephanie Voorduin*, Dr. Miguel Pedroza-Seres*, Dra. Teresa Valdés-Gonzalez**,
Dr. Ellery López-Star*, Dra. Maria C Jiménez-Martínez*

RESUMEN

Objetivo: Determinar la frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ en pacientes con uveítis, la expresión de marcadores de migración celular en linfocitos T, correlacionando los datos inmunológicos con las manifestaciones oftalmológicas.

Material y métodos: Se incluyeron pacientes con diagnóstico de uveítis. Se determinó por citometría la expresión de CD8, CD57, CD103, CD108, CCR9, CLA en células mononucleadas. Los resultados obtenidos fueron analizados con Sigma Stat. Las correlaciones se realizaron con Spearman o Pearson. Se consideró $p < 0.05$ significativa.

Resultados: Los pacientes con uveítis mostraron incremento en la frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+. La expresión de CD103 ($p=0.02$), CD108 ($p=0.03$), CCR9 ($p<0.001$), CLA ($p=0.01$) fue significativa en pacientes con panuveítis. La puntuación clínica correlacionó con la expresión de CLA ($r=-1$, $p=0.0001$) y CD8 ($r=-1$, $p=0.008$) en panuveítis. Hubo correlación positiva entre la expresión de CD108 y CCR9 ($r=0.9$, $p=0.03$) en pacientes con uveítis intermedia.

Conclusiones: La frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ se encuentra incrementada en pacientes con uveítis. Los linfocitos T de pacientes con uveítis intermedia fueron predominantemente CD108+CCR9+, sugiriendo migración a ojo. Los linfocitos T de pacientes con panuveítis fueron CD103+CD108+CCR9+CLA+, sugiriendo migración a ojo y piel. La correlación clínica-inmunológica fue significativa en pacientes con panuveítis. CLA y CD8 podrían ser considerados marcadores biológicos de actividad inmunológica intraocular.

Palabras clave: Linfocitos T CD8+CD57+, migración celular, uveítis.

SUMMARY

Objective: To evaluate CD8+CD57+ T cell frequency in uveitis patients, the expression of cell migration markers on T cells, and to correlate the immunological data with the ocular findings.

Methods: Uveitis patients were included. The expression of CD8, CD57, CD103, CD108, CCR9, CLA were assessed by flow cytometry on peripheral blood mononuclear cells. Data were analyzed with Sigma-Stat software. The correlations were performed using Spearman or Pearson correlations. Differences were considered statistically when $p < 0.05$.

Results: CD8+CD57+ T cell frequency was increased in uveitis patients. Expression of CD103 ($p=0.02$), CD108 ($p=0.03$), CCR9 ($p<0.001$) and CLA ($p=0.01$) on T cells was statistically significant in panuveitis patients than in intermediate uveitis patients. Patients with more clinical punctuation showed significant correlation with the expression of CLA ($r=-1$, $p=0.0001$) and CD8 ($r=-1$, $p=0.008$). A positive correlation was observed in intermediate uveitis patients, when CD108 expression was associated with CCR9 expression ($r=0.9$, $p=0.03$) on T cells.

Conclusions: CD8+CD57+ T cell frequency was increased in uveitis patients. T cells from intermediate uveitis patients were mainly CD108+CCR9+, suggesting eye homing. T cells from panuveitis patients were mainly CD103+CD108+CCR9+CLA+, suggesting both, eye and skin homing. Clinical-immunological correlation was significant only in panuveitis patients. CLA/CD8 could be biological markers of intraocular immunological activity.

Key words: CD8+CD57+ T cells, cell migration, uveitis.

Trabajo presentado en el XXVIII Congreso Mexicano de Oftalmología, Mérida, Agosto 2008

* Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana.

** Hospital Oftalmológico Nuestra Señora de la Luz, IAP.

Correspondencia: Dra. María C. Jiménez Martínez. Departamento de Inmunología, Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Tel. + 52 55 54 42 17 00 ext. 3212, Fax + 52 55 54 42 17 00 ext. 3206, mcjimenezm@institutodeoftalmologia.org

INTRODUCCIÓN

En 1995, la Organización Mundial de la Salud informó que aproximadamente 38 millones de personas eran ciegas y 110 millones tenían disminución de la agudeza visual de manera importante (1). Para 1997 el número aproximado de personas ciegas a nivel mundial aumentó a 45 millones. Las causas más frecuentes de ceguera son la degeneración retiniana, alteraciones congénitas, diabetes mellitus, uveítis y accidentes (1).

La incidencia de uveítis en países desarrollados es aproximadamente de 15 a 17 casos por cada 100 000 habitantes y se estima que es responsable de 10% de los casos de ceguera en Estados Unidos. En México, en un estudio llevado a cabo por Voorduyn y cols. (2), en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, registró una frecuencia mayor de uveítis anterior (38%), seguida de uveítis posterior (26%), uveítis intermedia (20%) y panuveítis (16%).

En el caso de las uveítis intermedias, en particular pars planitis, se sabe que la inmunopatología está asociada con un daño mediado por linfocitos T CD8+, que tienen como característica la coexpresión de CD57+ (3). Los linfocitos T CD8+CD57+ de pacientes con pars planitis son funcionalmente IFN- γ + perforina+ granzima+ y se ha sugerido que son los responsables del daño al órgano blanco (3). La expresión de CD57 en linfocitos T está asociada con respuestas inmunitarias tardías y a condiciones de estimulación crónica del sistema inmunitario (4). Aunque se sabe que las poblaciones CD8+ CD57+ están aumentadas en uveítis intermedias, no se conoce si este fenómeno ocurre en otros tipos de uveítis, si existen diferencias en la expresión de marcadores de superficie asociados con migración celular y si existe correlación clínica oftalmológica con los datos inmunológicos, por lo que éstos fueron los objetivos de nuestro estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en este trabajo 7 pacientes con diagnóstico clínico de uveítis (5 mujeres, 2 hombres, con edad promedio de 31.8 años y rango de 9 a 53 años), 3 con panuveítis y 4 con uveítis intermedia, que voluntariamente quisieron participar en este estudio y que dieron su consentimiento informado para la toma de muestra sanguínea. Este estudio siguió fielmente los criterios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP, clave CC-18/2007.

Reactivos y anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón conjugados a Ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5) dirigidos contra CD4, CD8 obtenidos de eBioscience (San Diego, CA, EUA) así como mAb conjugados a ficoeritrina (PE) contra CD103 y CD108 mAb marcados con isotiocianato de fluoresceína

(FITC) dirigidos contra CD57, CLA obtenidos de BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). Se adquirieron mAbs conjugados a PECy5 contra CD57 de Abcam Co (Cambridge, Inglaterra) y CCR9 obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). El Lymphoprep (Ficoll densidad 1.077) fue obtenido de Nycomed Pharma (Nyegaard, Oslo, Noruega). Las sales para la preparación del PBS (phosphate buffered saline) fueron obtenidas de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA).

Separación de células mononucleares

A partir de una muestra de sangre venosa obtenida por punción periférica se obtuvieron las células mononucleares (CMN). La muestra fue diluida 1:2 (vol/vol) en PBS, pH 7.2. Las CMN fueron aisladas del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,700 rpm en Ficoll (1.077 de densidad), durante 30 minutos a 18°C. Después de la centrifugación, las células de la interfase fueron recolectadas, se lavaron en dos ocasiones con PBS y fueron cuantificadas en un hemocitómetro para determinar su viabilidad por medio de exclusión de eosina al 1%.

Inmunofluorescencia de marcadores de superficie

Se realizó una triple tinción en 2×10^5 CMN en volumen mínimo (20 μ l) de PBS suplementado con 0.2% de albumina sérica bovina y 0.2% de azida sódica (PBA), utilizando mAb marcados con FITC y PE-Cy5 dirigidos contra CD57, mAb marcados con PE-Cy5 y PE dirigidos contra CD4 o CD8 y finalmente mAb marcados con PE o FITC dirigidos contra CD103, CD108, CCR9 y CLA. Las CMN fueron incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Al concluir el tiempo de incubación, las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBA y analizadas por citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo

Todas las células fueron analizadas para la expresión del marcador de superficie por medio de la recolección de 5000 eventos utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) y el software CellQuest Pro. Para analizar la tinción de los marcadores de superficie, se dibujó una ventana alrededor de la población de linfocitos, basándonos en sus propiedades físicas (difracción frontal o lateral de la luz). Las tinciones de control se realizaron mediante el uso mAb del mismo isotipo de especificidad no relacionada marcados con PE, PE-Cy5 y FITC. La tinción de fondo fue <1% y fue sustraída de valores experimentales.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba T de Student o U-Mann Whitney para comparación entre dos grupos, dependiendo del análisis de normalidad, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat 3.1 y las gráficas con Sigma Plot 10.0. La correlación clínica se realizó con Spearman o Pearson dependiendo de la distribución normal de las muestras.

RESULTADOS

Frecuencia de linfocitos T CD8+, linfocitos T CD57+ y linfocitos T CD8+CD57+ en pacientes con uveítis

Se determinó la frecuencia de linfocitos CD8+, CD57+ y CD8+CD57+ en pacientes con panuveítis y con uveítis intermedia, encontrando que los linfocitos T CD8+CD57+ se encontraban incrementados en ambos tipos de uveítis, de acuerdo con lo reportado previamente para valores normales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes.

Frecuencia de marcadores de migración celular en linfocitos T

Se determinó la frecuencia de marcadores de migración celular (CD103, CD108, CCR9, CLA) en pacientes con panuveítis y uveítis intermedia, encontrando que la frecuencia de expresión de CD103 en linfocitos T fue 3.4 veces mayor en pacientes con panuveítis, que en pacientes con uveítis intermedia. De la misma forma, la frecuencia de expresión de CD108 en linfocitos T fue 2.5 veces mayor en pacientes con panuveítis. Interesantemente la frecuencia de expresión del receptor de quimiocinas CCR9, fue 3.7 veces mayor en pacientes con panuveítis que en pacientes con uveítis intermedia ($p=0.003$). De igual manera encontramos que la frecuen-

cia de los linfocitos T CLA+ fue 2.1 veces superior en pacientes con panuveítis que en pacientes con uveítis intermedia ($p=0.007$).

Correlación clínico oftalmológica-datos inmunológicos

Para analizar los datos clínicos y hacer la correlación de los hallazgos oftalmológicos con los datos inmunológicos se desarrolló una tabla de contingencia utilizando la clasificación del grupo de trabajo de estandarización para la nomenclatura de las uveítis (SUN working group) (5), otorgando valores numéricos arbitrarios a los descriptores definidos en esta clasificación (Cuadro 1).

Correlación de la expresión de marcadores de superficie en linfocitos T de pacientes con panuveítis y características clínicas

En la Figura 1A se observa la correlación positiva hallada entre la frecuencia de linfocitos T CD8+ y la expresión del marcador CLA en linfocitos T de pacientes con panuveítis ($r = 1.00$, $p = 0.008$). En las figuras 1B y 1C se observa que, tanto la frecuencia de linfocitos T CD8+ ($r = -1.00$, $p = 0.008$), como la frecuencia de linfocitos T CLA+ ($r = -1.00$, $p = 0.0001$) disminuyen de manera estadísticamente significativa a mayor puntuación clínica.

Cuadro 1. Cuadro de contingencia para evaluar numéricamente los datos clínicos oftalmológicos con base en la clasificación del SUN working group

Categoría	Descriptor	Valor otorgado
Inicio	Insidioso	1
	Agudo	2
Duración	Limitada	3
	Persistente	4
Curso	Agudo	5
	Recurrente	6
	Crónico	7
0+ de flare	Nada	0
1+ de flare	Escaso	1
2+ de flare	Moderado (detalles de iris y cristalino claros)	2
3+ de flare	Marcado (detalles de iris y cristalino borrosos)	3
4+ de flare	Intenso (fibrina o humor acuoso plástico)	4
0 de celularidad en cámara anterior	<1 célula por campo	0
0.5+de celularidad en cámara anterior	1-5 células por campo	0.5
1+ de celularidad en cámara anterior	6-15 células por campo	1
2+ de celularidad en cámara anterior	16-25 células por campo	2
3+ de celularidad en cámara anterior	26-50 células por campo	3
4+ de celularidad en cámara anterior	>50 células por campo	4
Inactividad	Celularidad grado 0	0
Empeoramiento de actividad	Aumento de 2 niveles de inflamación (Ej. Células en cámara anterior, vítreo opaco)	3
	o aumento de grado 3+ a 4+	
Mejoría de actividad	Disminución de 2 niveles de inflamación (Ej. Células en cámara anterior, vítreo opaco)	2
	o disminución al grado 0.	
Remisión	Enfermedad inactiva por > de 3 meses	1
	después de discontinuar cualquier tratamiento para enfermedad ocular.	

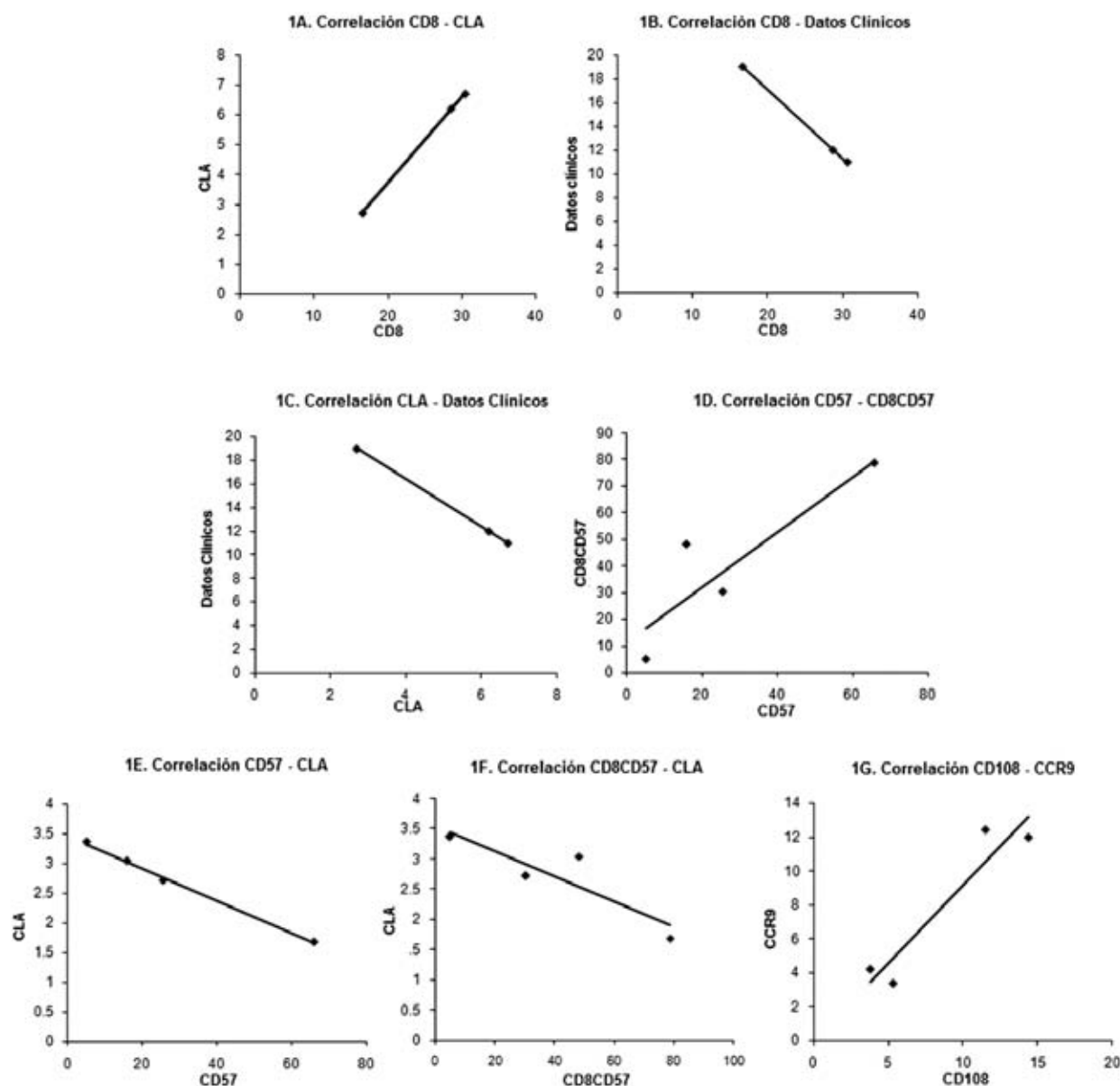


Fig. 1. Correlación clínica-inmunológica. Se observan las diferentes correlaciones estadísticamente significativas encontradas en el estudio. Panel superior pacientes con panuveítis, panel inferior pacientes con uveítis intermedia. 1A. Correlación Linfocitos T CD8+-Linfocitos T CLA+. 1B. Correlación linfocitos T CD8+-Características clínicas. 1C. Correlación linfocitos T CLA+-Características clínicas. 1D. Correlación linfocitos T CD57+-Linfocitos T CD8+CD57+. 1E. Correlación linfocitos T CD57+-Linfocitos CLA+. 1F. Correlación linfocitos T CD8+CD57+-Linfocitos CLA+. 1G. Correlación linfocitos T CD108+-Linfocitos T CCR9+ (Detalles en texto).

Correlación de la expresión de marcadores de superficie en linfocitos T en pacientes con uveítis intermedia

En la Figura 1D se observa que en pacientes con uveítis intermedia existe una correlación positiva entre la frecuencia de linfocitos T CD57+ y la frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ ($r = 0.99$, $p = 0.003$). Por otra parte, encontramos una correlación negativa entre la frecuencia de expresión de linfocitos T CD57+ con la expresión del marcador CLA ($r = -0.99$, $p = 0.001$), de la misma manera observamos una correlación negativa con la frecuencia de expresión de linfocitos T CD8+CD57+ con la expresión de CLA en linfocitos T ($r = -0.99$, $p = 0.004$) (Figuras 1E

y 1F, respectivamente). Por otra parte, encontramos una correlación positiva entre la frecuencia de expresión de linfocitos T CCR9+ y linfocitos T CD108+ ($r = 0.96$, $p = 0.03$) (Figura 1G).

DISCUSIÓN

Se ha sugerido que la inmunopatología de las uveítis está mediada por linfocitos T, en particular, aquellos que expresan la molécula CD8. En los últimos años se ha descrito que las poblaciones de linfocitos T CD8+, que expresan en

su superficie el marcador CD57, son subpoblaciones de linfocitos T con mayor capacidad citotóxica, ya que son productores de interferón gamma y presentan moléculas asociadas con función citotóxica importante como perforina y granzima (3). Es por eso que en este estudio nos enfocamos a la búsqueda de estas poblaciones de linfocitos T en dos tipos de pacientes con uveítis: uveítis intermedia y panuveítis.

En ambos tipos de pacientes encontramos que la frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ estaba elevada de acuerdo con datos reportados para sujetos sanos en la literatura (3, 6), aunque se ha sugerido que esta subpoblación de linfocitos T tiene la capacidad de migrar a ojo (3, 4). Este es el primer trabajo que buscó intencionadamente la expresión de moléculas asociadas con migración celular en los linfocitos T provenientes de pacientes con uveítis intermedia y panuveítis.

CD103 es una molécula expresada en linfocitos T activados, su ligando es la E-cadherina expresada en la membrana basolateral de células epiteliales. La función de esta molécula favorece la permanencia de linfocitos T intraepiteliales (7). El-Asady R y cols. (8) sugirieron que la expresión de CD103 en linfocitos T CD108 favorece la migración de clonas efectoras que median el modelo de enfermedad injerto contra huésped, esto es interesante ya que encontramos que la frecuencia de CD103 es más elevada en pacientes con panuveítis que en pacientes con uveítis intermedia, lo que podría explicar el mayor daño inmunológico observado en pacientes con panuveítis.

CD108 es una molécula que pertenece a la familia de las semaforinas, se expresa en linfocitos activados en proceso de migración y regula la respuesta inflamatoria a través de la interacción con alfa 1 beta 1 integrina. En los últimos años Susuki y cols. (9) sugirieron que esta molécula se asocia con funciones reguladoras de la respuesta inmunitaria. En nuestro estudio encontramos en pacientes con panuveítis una mayor expresión de CD108 en linfocitos T, lo cual es interesante porque es probable que estos pacientes tengan mayor migración de células inmunitarias al ojo, y que estas células sean reguladoras, sin embargo, hacen falta estudios funcionales para poder determinar su verdadera función intraocular.

CCR9 es receptor de quimiocinas tipo beta. Es una molécula que actúa como ligando de CCL25 (quimiocina asociada con inflamación). A pesar de que su función está asociada con reclutamiento y especialización de la respuesta inmune en mucosa intestinal, recientemente de Hass y cols. (10) sugirieron que CCR9 es una molécula importante en la migración celular a SNC. Lo anterior llama la atención porque en pacientes con panuveítis encontramos una mayor expresión de CCR9, lo cual sugiere que la expresión de CCR9 podría estar favoreciendo la migración al interior del ojo como ocurre en SNC y no sólo a mucosa intestinal. Además, las correlaciones positivas entre la expresión de CD108 y CCR9 en pacientes con uveítis intermedia, pudieran explicar molecularmente por qué los pacientes con uveítis intermedia tienen menos o no tienen manifestaciones sistémicas, en comparación con los pacientes con panuveítis;

desafortunadamente esto no fue buscado intencionadamente en este trabajo.

CLA es un ligando para E-selectina formado por carbohidratos y presente en linfocitos con capacidad de migración a tejidos; principalmente se ha identificado como marcador de migración a piel (11). En este trabajo encontramos incrementada su expresión en pacientes con panuveítis, con una correlación significativa con los datos clínicos. La correlación sugiere fuertemente que los datos clínicos se deben a la migración intraocular de células CLA+ CD8+. Aunque la expresión de CLA en linfocitos T podría explicar los datos extraoculares en los pacientes con panuveítis, especialmente en individuos con VKH, en este estudio no se realizó la búsqueda intencionada de este tipo de asociaciones en ninguno de los pacientes incluidos.

En conclusión, la frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ se incrementa en pacientes con uveítis. Los linfocitos T de pacientes con uveítis intermedia son predominantemente CD108+CCR9+, lo que sugiere migración dirigida a ojo. Los linfocitos T de pacientes con panuveítis son CD103+CD108+CCR9+CLA+ lo que sugiere migración dirigida a ojo y a piel. La correlación clínica fue positiva en pacientes con panuveítis, lo que sugiere que la expresión de CLA en linfocitos T CD8+ es un buen marcador biológico de actividad inmunológica.

Agradecimientos

A la M en C. Marisela Linares por el apoyo técnico recibido. Este trabajo fue financiado en parte por el Proyecto CONACYT-SALUD C01-71291 (2008-2009) y en parte por la Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP.

REFERENCIAS

1. Rothova A, Suttrop-van Schulten MSA, Treffers WF, Kijlstra A. Causes and frequency of blindness in patients with intraocular inflammatory disease. *Br J Ophthalmol* 1996; 80(4):332-336.
2. Voorduyn S, Zagorin F. Frecuencia y causa de la uveítis en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. *Rev Mex Oftalmol* 2005; 79(4): 193-196.
3. Pedroza-Seres M, Linares M, Voorduyn S, Rojas-Ramos E y cols. Pars Planitis is associated with and increased frequency of effector-memory CD57+ T cells. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(10):1393-8.
4. Jiménez-Martínez MC, Carrera-Cardenas I, Pedroza-Seres M y cols. Uveitis Immunopathology: current knowledge, clinical correlation and research perspectives in the immune-ocular area. *Rev Alerg Mex* 2006; 53(6):226-35.
5. The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Standardization of Uveitis Nomenclature for Reporting Clinical Data. Results of the First International Workshop. *J Ophthalmol* 2005; 140:509-516.
6. Sada-Ovalle I, Torre-Bouscoulet L, Valdez-Vázquez R y cols. Characterization of a cytotoxic CD57+ T cell subset from patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Immunol* 2006; 121(3):314-23.

7. Abbas A, Baker D. Cellular and molecular immunology. 6a ed. EUA: Saunders-Elsevier, 2007.
8. El-Asady R, Yuan R, Liu K, Wang D, Gress RE y cols. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2005; 201(10):1647-57.
9. Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ y cols. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through $\alpha 1\beta 1$ integrin. *Nature* 2007; 446(7136):680-4.
10. de Haas AH, Boddeke HW, Biber K. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 2008; 56(8):888-94.
11. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK y cols. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 2006; 176(7):4431-9.