

Influência do epitélio corneal limbar sobre a expressão do antígeno dos linfócitos da mucosa humana (HML-1)

Corneal limbal epithelium influence on Human Mucosal Lymphocyte Antigen (HML-1) expression

José Alvaro Pereira Gomes ^(1, 2, 3)
Luiz Rizzo ⁽⁴⁾
Mauro Nishi ⁽²⁾
Larry A. Donoso ⁽¹⁾
Harinder Singh Dua ^(4, 5)

RESUMO

Os linfócitos intraepiteliais (IELs) parecem desempenhar papel importante na defesa e na tolerância induzidas pelo tecido linfocitário associado à mucosa (MALT). No epitélio das mucosas, os IELs expressam a integrina HML-1, que é a responsável pela sua aderência no epitélio. Neste trabalho, propõe-se estudar os mecanismos de expressão do HML-1 nos linfócitos do sangue periférico associados ao epitélio corneal limbar.

Culturas do epitélio da córnea de diferentes doadores e de linfócitos do sangue periférico de um paciente foram estabelecidas. Três grupos de estudo foram determinados: Grupo A, linfócitos não-ativados juntamente com células epiteliais corneais limbares em meio de cultura; Grupo B, linfócitos não-ativados separados do epitélio por membrana semi-permeável em meio de cultura; Grupo C, linfócitos não-ativados em meio de cultura (controle). No sétimo dia, os linfócitos de todos os grupos foram recuperados e enviados para análise dos antígenos CD8/HML-1, CD3/CD8, CD3/CD4, CD3/CD25, CD8/CD25 e CD4/CD25 por citometria de fluxo. Comparações entre os grupos A, B e C foram realizadas pela análise de variância com medidas repetidas (ANOVA) e pelo teste t-Student para amostras pareadas.

Diferenças estatisticamente significantes foram observadas em relação a expressão dos antígenos CD8/HML-1 ($p=0,001$), CD3/CD8 ($p=0,006$), CD3/CD25 ($p=0,023$) e CD8/CD25 ($p=0,002$).

Este estudo permitiu concluir que a expressão do antígeno HML-1 pelos linfócitos periféricos CD8+ parece ser dependente da sua interação direta e indireta com o epitélio da córnea. A participação de fatores de crescimento e citocinas pelo epitélio têm, provavelmente, papel importante na expressão do antígeno HML-1.

Palavras-chave: Linfócitos-imunologia; Imunidade nas mucosas; Limbo da córnea; Antígeno dos linfócitos da mucosa humana (HML-1).

Research Dept., Wills Eye Hospital, Philadelphia ¹; Depto. de Oftalmologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)²; Depto. de Oftalmologia da Santa Casa, SP³; National Institute of Health, Bethesda, E.U.A.⁴; Dept. of Ophthalmology, Nottingham University, Inglaterra⁵.

⁽¹⁾ Parte da tese de mestrado "Mecanismos de expressão do HML-1 no tecido linfocitário associado à conjuntiva (CALT)", apresentada em 1996 à UNIFESP pelo autor, que obteve o Título de Mestre em Oftalmologia.

⁽²⁾ Realizado no Corinne Bower Research Laboratory, Wills Eye Hospital, Philadelphia, PA, E.U.A. e no Depto. de Oftalmologia da UNIFESP.

⁽³⁾ Apoio do "The Wills Eye Hospital Women's Committee".

Endereço para correspondência: R. Sabará, 566, 212 - São Paulo/SP - CEP 01239-010 - FAX: (011)2550223 - E-mail: japgomes@uol.com.br

INTRODUÇÃO

O sistema imunológico das mucosas, tradicionalmente, inclui o tecido linfocitário associado às mucosas (MALT) dos tratos gastro-intestinal, respiratório e urogenital ^{1, 2}. O MALT é caracterizado: pelo predomínio de linfócitos T do tipo supressor/citotóxico (CD8+) no epitélio e pela igualdade no número de

linfócitos do tipo T auxiliador (CD4+) e CD8+ na lâmina própria; ³ pela presença de agregados linfocitários revestidos na superfície por um epitélio modificado (células M), especializado na captura e apresentação de antígenos;⁴ pela existência de mastócitos especializados e linfócitos que expressam o antígeno dos linfócitos da mucosa humana (HML-1+); ^{2, 5} e pela capacidade

de induzir tolerância preferencialmente à sensibilização^{3,6,7}.

Os linfócitos intra-epiteliais (IELs) das mucosas constituem uma sub-população específica de células do tipo T que se localiza na face externa da membrana basal adjacente às superfícies latero-basais das células epiteliais⁸. Co-expressam, predominantemente, antígenos do tipo CD8 e HML-1 e apresentam, na sua maioria, isoformas do antígeno CD45 associadas à função de linfócito T de memória (CD45RO)⁸. Funcionalmente, os IELs parecem participar na defesa imunológica através da citotoxicidade, além de estarem relacionados como parte do(s) mecanismo(s) de indução de tolerância^{8,9}.

O antígeno de membrana HML-1 é uma integrina pertencente à sub-família $\beta 7$, expressa em aproximadamente 95% dos linfócitos intra-epiteliais CD8+, mas em apenas 1 a 2% dos linfócitos do sangue periférico⁹. A expressão do antígeno HML-1 pode aumentar após estimulação dos linfócitos com mitógeno ou 12-miristato 13-acetateína forbol (PMA) e cultura com fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)^{9,10}. O HML-1 media a interação entre o IEL e o epitélio das mucosas através de sua adesão à molécula E-caderina¹¹. O antígeno HML-1 também tem sido relacionado como mediador de sinais co-estimulatórios para ativação linfocitária¹⁰.

Mais recentemente, a conjuntiva também foi incluída como parte do MALT^{2,12}. A distribuição específica de linfócitos CD8+ e CD4+ e a presença de células epiteliais especializadas na apresentação de antígenos (*M cells*) são características comuns à conjuntiva e a outras mucosas^{2,12}. Em trabalho prévio por nós realizado, foi possível identificar linfócitos CD8/HML-1+ na conjuntiva, glândula lacrimal e limbo córneo-escleral de olhos de cadáver². Num trabalho subsequente, observamos alterações na distribuição desses linfócitos em amostras de biópsias de neoplasia intra-epitelial da con-

juntiva e penfigóide cicatricial ocular, o que sugere ter o antígeno HML-1 participação importante nos mecanismos imunes associados às doenças da superfície ocular¹³. Dua e col.⁷ demonstraram que tolerância antígeno-específica a antígenos retínicos pode ser induzida pela instilação desses antígenos na conjuntiva de ratos da espécie Lewis. Os autores sugerem que a tolerância ocorreu via tecido linfocitário associado à conjuntiva (CALT)⁷.

Este trabalho tem como objetivo

elucidar o efeito da interação das células epiteliais corneais limbares com os linfócitos T do sangue periférico no que se refere à expressão do HML-1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linfócitos obtidos a partir do sangue periférico de 1 paciente foram diluídos a 1×10^6 células/ml. Uma amostra contendo 1×10^5 células foi separada para análise por citometria de fluxo,

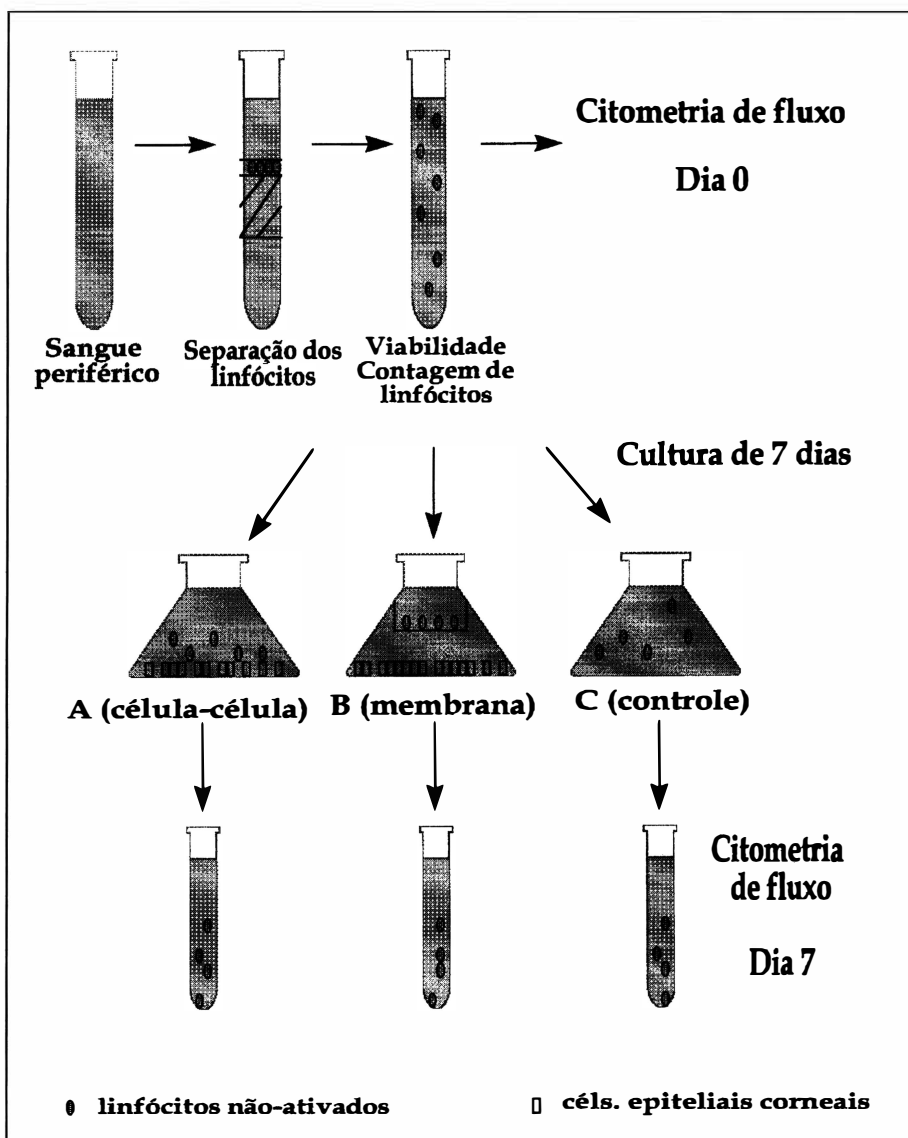


Fig. 1 - Esquematização do experimento

a fim de determinar o perfil fenotípico inicial dos linfócitos. Três poços das placas de cultura (dois poços contendo células epiteliais corneais provenientes de um mesmo doador em meio de cultura e um poço apenas com meio de cultura) foram escolhidos para receber os linfócitos. Um dos poços que continha células epiteliais corneais foi selecionado aleatoriamente para receber uma membrana semi-permeável hidrofílica com poros de 1,0µm (Falcon 25 mm cell culture insert with a 1,0µm pore size hydrophilic cyclopore membrane of polyethylene terephthalate: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.U.A.). Cada poço recebeu 1 ml da amostra (1×10^6 linfócitos) e os poços foram agrupados de acordo com a condição da cultura: Grupo A) linfócitos e células epiteliais corneais, em meio de cultura; Grupo B) linfócitos e células epiteliais corneais separados pela membrana semi-permeável, em meio de cultura; Grupo C) linfócitos em meio de cultura (controle) (Figura 1).

Durante o período de estudo, o meio de cultura foi parcialmente trocado a cada 3 dias. No sétimo dia, os linfócitos de todos os grupos foram recuperados, suspensos em 2 ml de meio de cultura e submetidos à análise por citometria de fluxo. As células epiteliais de 4 culturas de córnea que não haviam recebido linfócitos foram utilizadas como controles negativos na análise por citometria de fluxo.

Cultura de células epiteliais corneais limbares

O tecido limbar utilizado no experimento foi obtido a partir de 8 rimas corneo-esclerais, provenientes de 8 doadores. A idade dos doadores variou de 30 a 77 anos, com média de $54,20 \pm 14,50$ anos. Cinco doadores eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino. Culturas primárias de epitélio corneal limbar humano foram obtidas de acordo com técnica descrita por Ebato, Friend e Thoft¹⁴. O tecido limbar foi obtido a partir das rimas corneo-esclera-

rais remanescentes da trepanação de córneas utilizadas em cirurgias de transplantes de córnea. Procedeu-se à dissecação da metade posterior do estroma do resto da córnea mediante técnica estéril e com o uso de microscópio cirúrgico. Explantes de 2 mm² compostos por epitélio e estroma anterior corneal foram obtidos e colocados com a face epitelial para cima, em cada um dos 6 poços de 35 mm da placa de cultura de tecidos "Primaria" (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.U.A.). Os explantes foram deixados nas placas cobertas por aproximadamente 15 minutos sob fluxo laminar. Posteriormente, 0,5 ml do meio de cultura de linfócitos AIM-V (Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.) enriquecido com 5 µg/ml de insulina cristalina bovina (Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.) e com 0,01 µg/ml de fator recombinante de crescimento epitelial humano (Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.) foi cuidadosamente colocado sobre cada explante. Esse meio de cultura foi utilizado devido à intenção de co-cultivar células epiteliais e linfócitos num meio adequado para ambas linhagens celu-

lares. As culturas foram colocadas em incubadora umidificada a 37°C, em 5% CO₂. Meio ml do meio de cultura foi adicionado diariamente às culturas até as células epiteliais iniciarem o crescimento, aderidas ao fundo do poço da placa de cultura (por volta do quarto dia). Em seguida, 3 ml de meio de cultura foram adicionados. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana, durante duas semanas. Os explantes foram deixados nas placas de cultura durante todo o tempo de incubação (Figura 2).

O grau de pureza das culturas epiteliais obtidas foi determinado a partir da avaliação diária do aspecto morfológico das células aderidas por microscopia invertida, pelo estudo histológico das células aderidas através da coloração por hematoxilina-eosina, e por citometria de fluxo com marcação indireta, utilizando como anticorpos primários o anticorpo monoclonal de camundongo AE-5, específico para queratina epitelial K3 (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, E.U.A.), e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-fibroblasto humano (DAKO, Carpinteria, CA, E.U.A.).

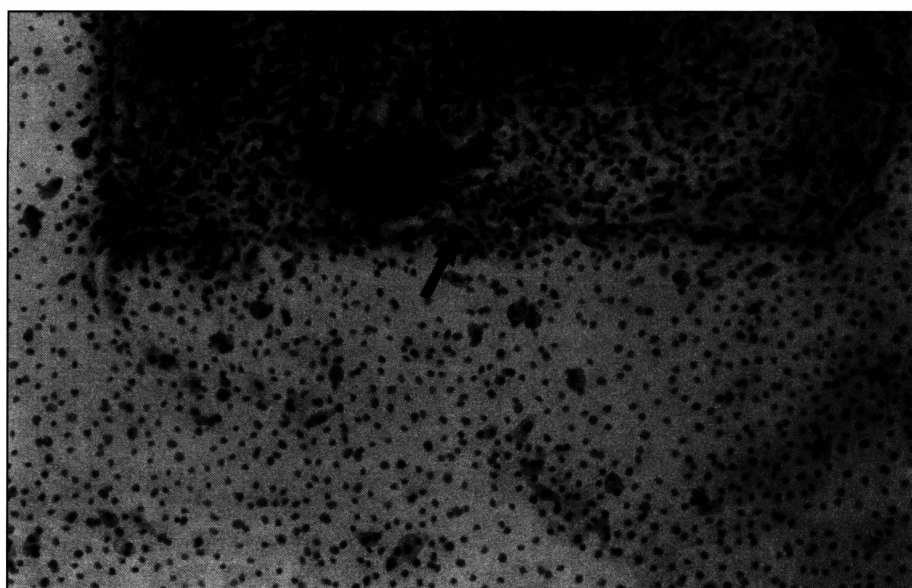


Fig. 2 - Cultura de epitélio corneal limbar, demonstrando o explante central (seta) e a camada de células epiteliais aderidas ao fundo do poço da placa de cultura (hematoxilina-eosina x100).

Separação dos linfócitos

Cem ml de sangue periférico venoso fresco foram obtidos de 1 voluntário, após seu consentimento prévio. O sangue foi coletado em 1 bolsa plástica de banco de sangue, contendo 14 ml de citrato de sódio 0,129 M como anticoagulante. O método da centrifugação por gradiente de densidade utilizando Ficoll/Hypaque ET (Pharmacia, Uppsala, Suécia) foi empregado na separação das células mononucleares, segundo método descrito por Fotino, Merson, Allen¹⁵. Após serem re-suspensas em meio de cultura, as células foram contadas no microscópio com o uso de um hematocímetro (Neubauer, American Optical, Buffalo, NY, E.U.A.) e coradas com o corante Azul de Trypan "Trypan Blue" (Trypan Blue 0,4%, Life Technology, Grand island, NY, E.U.A.) para determinar a viabilidade celular.

Recuperação linfocitária no sétimo dia

O meio de cultura dos linfócitos foi removido no sétimo dia do experimento. Três ml de solução tampão fosfato (PBS) foram colocados nas culturas epiteliais remanescentes, que foram mantidas de 2° a 6° C durante 20 minutos. Este procedimento foi realizado na tentativa de recuperar os linfócitos ainda aderidos, pois as células contraem-se com a queda da temperatura e liberam-se de adesões prévias. Posteriormente, procedeu-se à remoção do PBS dos poços, que foi adicionado ao meio de cultura e linfócitos de mesma origem. Procedeu-se à centrifugação a 100 xg, por 7 minutos, e lavagem com meio de cultura fresco. As células recuperadas foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

Para melhor compreender o efeito da incubação de 7 dias sobre os linfócitos, foi realizada comparação da expressão dos diferentes antígenos pesquisados pela citometria de fluxo entre o dia 0 (antes da incubação) e o dia 7 para o grupo C (somente linfócitos).

Citometria de fluxo

Os linfócitos foram incubados com concentrações saturadas de combinações dos anticorpos monoclonais diretamente conjugados: anti-Leu-4/FITC e anti-Leu-4/PE (CD3), anti-IL-2R/FITC (CD25), anti-Leu-2a/PE (CD8) e anti-Leu-3a/PE (CD4) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, E.U.A.); e do anticorpo monoclonal não-marcado de camundongo anti-antígeno linfocitário das mucosas humanas (MLA, Ber-ACT8) (Dako, Glostrup, Dinamarca) e do anticorpo de cabra anti-camundongo Ig FITC (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, E.U.A.), para formar os seguintes pares de anticorpos: CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD25, CD4/CD25, CD8/CD25, CD8/HML-1 (Tabela 1). Dois controles foram utilizados: a) IgG de camundongo, conjugado com FITC e PE e não reativo para leucócitos humanos, na determinação de fluorescência inespecífica e b) o par de anticorpos CD45 FITC/CD14 PE como controle positivo e para seleção da população dos linfócitos. Após a incubação dos linfócitos com os anticorpos por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e as células de cada tubo de ensaio foram fixadas com 0,5 ml de paraformaldeído a 1%. Os linfócitos foram deixados a 4°C e no outro dia foi

realizada a aquisição e análise fenotípica pelo FACScan. Pelo menos 10X10³ células de cada amostra foram analisadas pelo "dual LASER" citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, E.U.A.) e pelo citômetro de fluxo Epics (Epics cell sorter, Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, E.U.A.), através do emprego dos programas FACScan e Consort-30 (Becton Dickinson, San Jose, CA, E.U.A.). Os linfócitos foram selecionados pelo tamanho e granularidade (gráficos FSC x SSC) a fim de excluir monócitos, células epiteliais e células mortas. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas (%) para o(s) anticorpo(s) monoclonal(is) em estudo, corrigida para o controle negativo.

A análise estatística utilizada na comparação entre os grupos A, B e C, quanto à expressão dos antígenos pesquisados, foi realizada em duas etapas: 1) Análise de variância com medidas repetidas (ANOVA) para a comparação entre os três grupos, de um modo geral; 2) Se o resultado da etapa 1 foi significativo, a localização dessa diferença entre os 3 grupos foi realizada através do teste *t-Student* para amostras pareadas. Nessa etapa, o interesse está na comparação entre os grupos 2 a 2. Vale ressaltar que, na etapa 2, não foi necessária utilizar a correção de

TABELA 1
Anticorpos utilizados na análise fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo.

Antígeno	Clone	Diluição utilizada	Procedência
CD3 (PAN células T)	Leu-4/FITC Leu-4/PE	1:10 1:10	Becton Dickinson
CD4 (T auxiliador)	Leu-3a/PE	1:10	Becton Dickinson
CD8 (T supressor/citotóxico)	Leu-2a/PE	1:10	Becton Dickinson
CD25 (receptor de IL-2)	IL2-R/FITC	1:10	Becton Dickinson
HML-1 (linfócitos da mucosa humana)	Ber-ACT8	1:10	DAKO

Bonferroni para comparações múltiplas, uma vez que essa etapa foi realizada somente nos casos em que o resultado da etapa 1 foi significativo. Em todos os testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

Cultura de células epiteliais corneais limbares

O tempo médio para a confluência das culturas epiteliais corneais foi de 25 ± 5 dias. A avaliação diária pela microscopia invertida e o estudo histo-

lógico revelou que todas as culturas apresentaram aspecto morfológico semelhante e compatível com células epiteliais corneais limbares. Três culturas epiteliais foram utilizadas na determinação do grau de pureza celular por citometria de fluxo, que demonstrou positividade para AE-5 em $36,1 \pm 26,4\%$ das células quando comparado ao controle. Apenas $7,5 \pm 7,7\%$ das células foram positivas para o anticorpo antifibroblasto.

Separação dos linfócitos

A separação dos linfócitos a partir do sangue periférico foi bem sucedida,

permitindo a obtenção de $6,2 \times 10^7$ linfócitos. A viabilidade obtida foi de aproximadamente 95%.

Citometria de fluxo: comparação da expressão dos antígenos linfocitários entre os grupos A (linfócitos-epitélio), B (linfócitos-membrana-epitélio) e C (controle: linfócitos) após 7 dias de incubação.

Não foi observada positividade para nenhum dos anticorpos utilizados nas células epiteliais corneais e conjuntivais correspondentes aos controles negativos do experimento.

Um resultado representativo do teste de citometria de fluxo encontra-se na figura 3. Os grupos A, B e C foram estatisticamente diferentes quanto à expres-

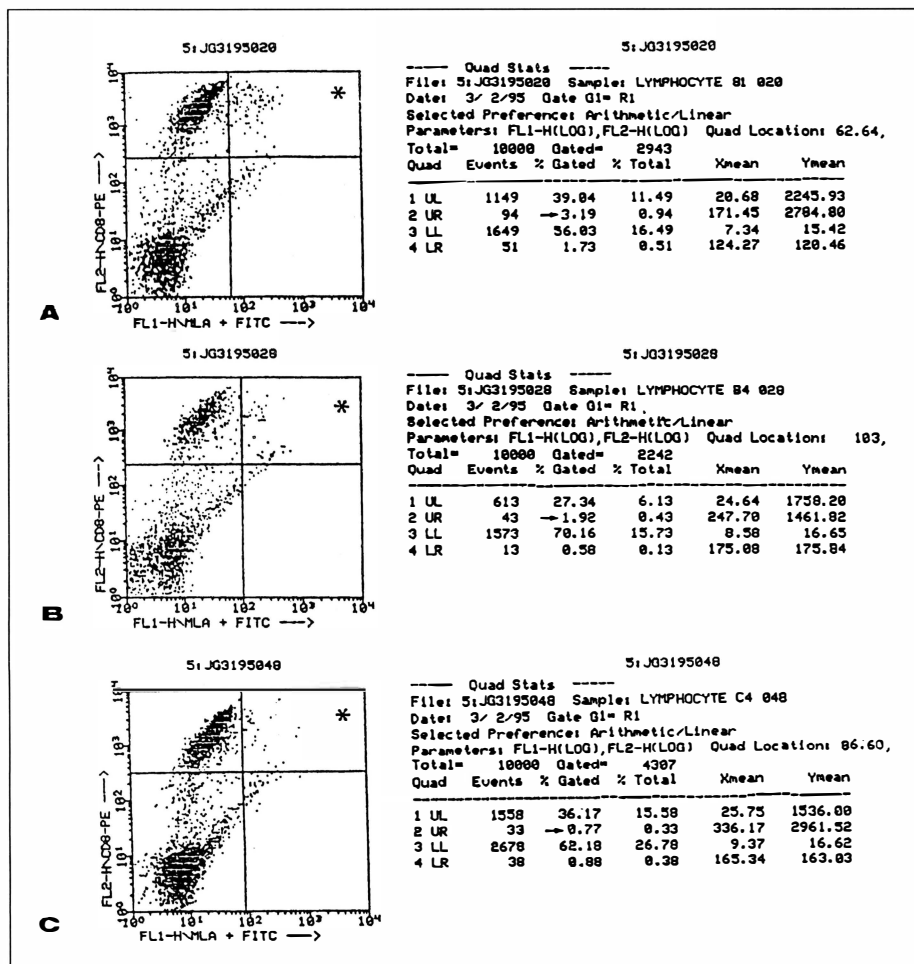


Fig. 3 - Análise por citometria de fluxo da expressão dos antígenos CD8 e HML-1 nos grupos A (linfócitos-epitélio), B (linfócitos-membrana-epitélio) e C (linfócitos: controle) de uma amostra de linfócitos e epitélio corneal. Os asteriscos indicam os quadrantes contendo linfócitos positivos para CD8 e HML-1. As setas mostram as porcentagens desses linfócitos dentre as células analisadas.

TABELA 2

Estatística descritiva da expressão dos diferentes antígenos linfocitários nos grupos A (linfócitos-epitélio), B (linfócitos-membrana-epitélio) e C (controle: linfócitos) após 7 dias de incubação.

Antígenos Linfocitários	Medida Descritiva	Grupos		
		A	B	C
CD8/HML-1	média	2,00	1,64	0,91
	desvio padrão	0,43	0,33	0,13
	mediana	2,01	1,57	0,9
	n	8	8	8
CD3/CD8	média	32,87	31,88	22,38
	desvio padrão	2,04	0,72	4,22
	mediana	33,48	31,89	24,47
	n	8	8	7
CD3/CD4	média	50,77	52,05	56,07
	desvio padrão	5,14	3,28	4,61
	mediana	52,51	52,66	57,15
	n	8	8	8
CD3/CD25	média	11,05	8,11	9,3
	desvio padrão	1,38	2,45	1,55
	mediana	11,31	7,63	10,1
	n	8	8	7
CD8/CD25	média	3,08	0,66	0,32
	desvio padrão	1,14	0,29	0,19
	mediana	3,03	0,65	0,27
	n	8	8	7
CD4/CD25	média	7,97	7,45	8,98
	desvio padrão	1,65	2,52	1,47
	mediana	8,53	7,11	9,77
	n	8	8	7

n = Número de Amostras

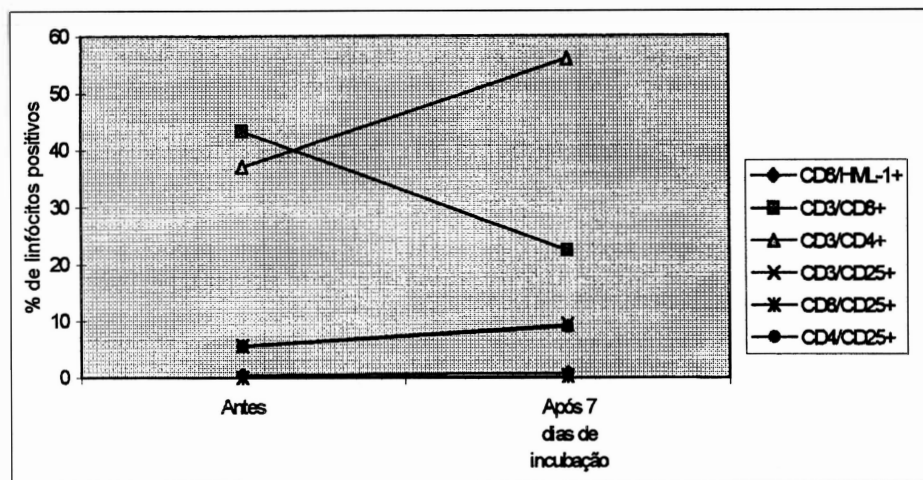


Gráfico 1. - Sub-populações linfocitárias antes e após 7 dias de incubação

são de CD8/HML-1 ($p=0,001$), CD3/CD8 ($p=0,006$), CD3/CD25 ($p=0,023$) e CD8/CD25 ($p=0,002$) (Tabela 2). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos de estudo quanto a expressão de CD3/CD4 ($p=0,235$) e CD4/CD25 ($p=0,486$) (Tabela 2). Os resultados foram re-confirmados com o uso de fórmula para correção de possível erro intra-amstral (CD8/HML-1, $p=0,034$; CD4/CD25, $p=0,682$; CD8/CD25, $p=0,005$).

As comparações múltiplas indicaram que, para CD8/HML-1 e CD3/CD8, os grupos A e B foram estatisticamente diferentes do grupo C (AxC: $p=0,0007$ e BxC: $p=0,002$, para CD8/HML-1; AxC: $p=0,001$ e BxC: $p=0,002$, para CD3/CD8). Em relação a CD3/CD25 e CD8/CD25, o grupo A foi diferente do grupo B ($p=0,037$ e $p=0,002$, respectivamente).

Citometria de fluxo: comparação da expressão dos antígenos linfocitários do grupo C (controle: linfócitos) entre dia 0 e após 7 dias de incubação

No gráfico 1, nota-se que todos os pares de antígenos apresentaram manutenção ou aumento de expressão, exceto CD3/CD8, que apresentou diminuição após os 7 dias do experimento. Como os linfócitos foram obtidos a partir do sangue de 1 paciente, no dia 0 houve apenas 1 amostra para cada par de antígenos

pesquisados. Por isso, não foi realizada comparação estatística entre os dois momentos do experimento.

DISCUSSÃO

Vários fatores regulam a expressão dos antígenos de superfície dos linfócitos num determinado tecido. Entre eles, destacam-se a ativação linfocitária e as interações celulares, sejam diretas através do contato célula-célula, ou indiretas através da participação de citocinas¹⁶. Cada antígeno linfocitário de membrana responde quantitativa e qualitativamente a uma equação específica envolvendo esses fatores.

Em condições normais, os IELs das mucosas expressam o antígeno HML-1 em quantidade muito superior à encontrada no sangue periférico (>90% e 1-2%, respectivamente)⁸⁻¹⁰. O motivo dessa diferença pode ser explicado pelo fato dos IELs representarem um sub-população específica de linfócitos³. Ou por serem linfócitos periféricos que, ao circularem perto do epitélio, expressam o HML-1 em determinadas condições³. Dua e col.¹³ postularam que a saída dos linfócitos dos vasos sanguíneos das mucosas é inespecífica ou regulada por mecanismos de re-circulação independentes da expressão do antígeno

HML-1. Uma vez dentro das camadas epiteliais, somente linfócitos que expressam o antígeno HML-1 são retidos¹³.

Técnicas experimentais envolvendo culturas simultâneas de linfócitos e outras células têm sido utilizados para o estudo das relações entre linfócitos e células de diferentes linhagens. Iwata e col.¹⁷ e Shams e col.¹⁸ utilizaram coculturas de linfócitos do sangue periférico e células epiteliais corneais para determinar o papel das interações entre epitélio e linfócitos alogênicos no processo de ativação linfocitária.

No presente trabalho, procurou-se utilizar um modelo experimental *in vitro* para estudar as alterações na expressão dos antígenos de superfície dos linfócitos periféricos, especialmente do antígeno linfocitário da mucosa humana (HML-1), induzidas pelas interações celulares direta e indireta com o epitélio corneal limbar. Três grupos de estudo foram determinados, na tentativa de reproduzir os níveis de interação celular entre epitélio e linfócitos. Esse modelo apresentou as vantagens de permitir o estudo da relação linfócito-epitélio, o que foi possível pela disponibilidade de um meio de cultura adequado para as duas linhagens celulares. Deve-se salientar, no entanto, que o grupo controle C, sem células epiteliais, não apresentou condições de cultura idênticas aos grupos A e B, com células epiteliais, devido ao número reduzido de células por mm^3 de meio. O período de incubação dos linfócitos de 7 dias foi determinado a partir de trabalhos prévios de Schieferdecker e col.¹⁰, que relataram ser máxima a expressão do antígeno HML-1 em linfócitos ativado entre o quinto e sétimo dia.

O uso de sangue proveniente de apenas um doador teve implicações positivas, pois permitiu que fosse testada a reprodutibilidade do experimento. Além disso, permitiu que fosse avaliada a resposta alogênica linfocitária daquele doador frente a diferentes estímulos antigênicos (culturas epiteliais de dife-

rentes doadores). No entanto, o presente trabalho não permitiu que fosse avaliada a variabilidade da resposta linfocitária de diferentes indivíduos. Essa variabilidade foi avaliada num estudo similar, utilizando sangue de diferentes doadores, e não detectou diferenças significativas aos deste trabalho ¹⁹.

A utilização de linfócitos e células epiteliais alogênicas pode ser criticada do ponto de vista de interpretação dos resultados encontrados. O modelo alogênico não reproduz as condições idênticas às encontradas pelos linfócitos periféricos durante a re-circulação pelo tecido linfocitário associado à conjuntiva (CALT). As interações do epitélio corneal com linfócitos alogênicos poderiam ter induzido a expressão dos antígenos do MHC de classe II na superfície epitelial. Essa interação poderia ter resultado na ativação linfocitária e no aumento da expressão de HML-1, classicamente um antígeno de ativação. No entanto, interferon- γ , fator necessário para a expressão do MHC de classe II pelo epitélio, não foi utilizado ¹⁷. Além disso, provavelmente não houve interferência das células apresentadoras de antígenos, uma vez que não foram cultivadas células endoteliais limbares, macrófagos e células de Langerhans. Não foram observadas diferenças significantes na expressão de CD4/CD25, o que seria esperado na resposta alogênica. Entretanto, observou-se aumento na expressão de CD8/CD25, especialmente no grupo A em relação ao grupo C. Assim sendo, não se pode refutar a hipótese de que a expressão do HML-1 pelos linfócitos tenha sido influenciada por ativação alogênica. Somente com utilização de modelos autólogos, ou, talvez, com bloqueio das moléculas de MHC classe I e II com anticorpos específicos, seria possível afastar a possibilidade de ativação alogênica.

O epitélio da superfície ocular é composto pelos epitélios corneal e conjuntival. Ambos apresentam características comuns, porém divergem

fenotipicamente quanto à localização, presença de células caliciformes e síntese de citoqueratinas ²⁰. O verdadeiro epitélio mucoso da superfície ocular é o da conjuntiva, onde se encontra o maior número de IELs da superfície ocular ². O limbo representa a fronteira entre os dois epitélios e é possivelmente sede de células germinativas de ambos os epitélios ¹⁴. Dua e col. ² identificaram a presença de IELs no epitélio limbar corneal de olhos humanos. No presente trabalho, a cultura de epitélio limbar corneal foi escolhida pela maior facilidade de obtenção, melhor crescimento *in vitro* e menor contaminação por fibroblastos do que a cultura de epitélio conjuntival. Num trabalho subsequente, Gomes e col. ¹⁹ repetiram o presente experimento utilizando ambos epitélios da superfície ocular. Esses autores não observaram diferença na expressão do HML-1 dos linfócitos incubados com epitélio da córnea ou da conjuntiva. Cerf-Bensusan e col. ⁹ observaram linfócitos HML-1+ nos epitélios bronquial, mamário e até mesmo na epiderme de lesões cutâneas, como parapsoríase e doença do enxerto contra hospedeiro. É possível que a expressão da integrina HML-1 dependa de fatores produzidos pelo epitélio e não da interação específica entre os receptores de adesividade linfocitário e epitelial conjuntival.

O grau de pureza das culturas epiteliais foi determinado pelo aspecto microscópico e através da citometria de fluxo, utilizando o anticorpo anti-citoqueratina AE-5 como anticorpo primário. O aspecto microscópico de todas as culturas foi compatível com epitélio corneal e conjuntival. No entanto, a análise por citometria de fluxo não detectou positividade condizente com o aspecto microscópico. A presença de células mortas e em diferentes estágios de maturação pode ter influenciado o resultado, que não chegou a 100% nas amostras analisadas.

No experimento realizado, a maior expressão do HML-1 nos linfócitos

CD8+ foi observada nos grupos que continham células epiteliais. Este aumento foi maior no grupo A, que compreendia o contato epitélio-linfócito. Mas foi também observado nos linfócitos separados do epitélio pela membrana semi-permeável, o que sugere que fator(es) solúveis produzido(s) pelo epitélio partícipe(m) na indução do antígeno HML-1.

Um fato que deve ser lembrado é o de que os linfócitos não foram ativados, o que diminui a expressão dos antígenos ditos de ativação, como o HML-1. Em trabalho subsequente, Gomes e col. ¹⁹ repetiram o presente experimento utilizando linfócitos ativado com PMA e ionomicina. Esses autores observaram que o comportamento da expressão do HML-1 nos linfócitos CD8+ ativado segue padrão similar aos dos linfócitos não-ativado, porém apresentando valores aumentados em relação aos últimos.

Citocinas são fatores reguladores protéicos produzidos pelas células e que possuem funções relacionadas a comunicação e manutenção da homeostase ²¹. O TGF- β 1 é uma citocina que, dentre outras funções, parece modificar a expressão das integrinas β ₁, em determinadas situações ²¹. Parker e col. ⁸ evidenciaram aumento da expressão do HML-1 em linfócitos do sangue periférico cultivados com TGF- β 1. TGF- β 1 é produzido por diferentes linhagens de células epiteliais, inclusive pelo epitélio da córnea e conjuntiva ²². Esses achados indicam que a expressão do HML-1 pode estar relacionada a produção epitelial de TGF- β 1.

Neste trabalho, é possível que o aumento da expressão do HML-1 observado nos linfócitos CD8+ dos grupos A (contato direto com epitélio) e B (contato indireto com epitélio) esteja relacionado à produção de citocinas pelas células epiteliais em cultura. As diferenças observadas entre os dois grupos pode ser explicada pela presença da membrana semi-permeável no grupo B, que mesmo sendo permeável ao

TGF- β e outras citocinas, representa uma barreira que diminui o contato entre essas substâncias e os linfócitos durante os 7 dias do experimento. Ou que o contato direto entre o epitélio e os linfócitos também seja um fator importante na expressão do HML-1. A hipótese de que as citocinas participem na expressão do HML-1 poderá ser confirmada, em experimentos futuros, pela mensuração das mesmas por ELISA ou detecção dos respectivos RNAm.

SUMMARY

The intraepithelial lymphocytes (IELs) may play an important role in the defense and tolerance induced by the mucosal associated lymphoid tissue (MALT). In the mucosal epithelium, IELs express the human mucosal lymphocyte integrin (HML-1), which is important in their adherence to the epithelial cells. In this experiment, the authors investigate the mechanisms of HML-1 expression on peripheral blood lymphocytes associated with corneal limbal epithelium. Lymphocytic and corneal epithelial cultures were performed. Three groups were determined: Group A, non-activated lymphocytes with corneal limbal epithelial cells in culture media; Group B, non-activated lymphocytes separated by a semi-permeable membrane from epithelial cells in culture media; and group C, non-activated lymphocytes in culture media (control). In the seventh day, the lymphocytes were recovered and sent to flow cytometric analysis of the antigens CD8/HML-1, CD3/CD8, CD3/CD4, CD3/CD25, CD8/CD25 and CD4/CD25. Comparisons amongst groups A, B and C were done by the repeated-measured statistical

analysis (ANOVA) and Student's paired -t test.

Statistically significant differences were observed in the following lymphocytic sub-populations: CD8/HML-1+ (p=0,001), CD3/CD8+ (p=0,006), CD3/CD25+ (p=0,023) e CD8/CD25+ (p=0,002).

This experimental study suggests that the HML-1 expression by the CD8+ peripheral T lymphocytes increase may be dependent upon direct and indirect interactions with corneal epithelium. Growth factors and cytokines may play a role in HML-1 expression.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STROBER, W. & JAMES, S. P. - The mucosal immune system. In: Stites, D. P. & Terr, A. I., eds. *Basic and clinical immunology*. 7th ed. Norwalk: Appleton and Lange; 175-186, 1991.
2. DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; JINDAL, V. K.; APPA, S. N.; SCHWARTING, R.; EAGLE JR., R. C.; LAIBSON, P. R. - Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lacrimal gland. *Curr. Eye Res.*, **13**: 87-93, 1994.
3. CERF-BENSUSSAN, N. & GUY-GRAND, D. - Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **20**: 549-76, 1991.
4. TRIER, J. S. - Structure and function of intestinal M cells. - *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **20**: 531-547, 1991.
5. WERSHIL, B. K. & GALLI, S. J. - Gastrointestinal mast cells: new approaches for analysing their function in vivo. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **21**: 613-27, 1991.
6. NUSSENBLATT, R. B.; CASPI, R. R.; MAHDI, R.; CHAN, C.C.; ROBERGE, F.; LIDER, O.; WEINER, H. L. - Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J. Immunol.*, **144**: 1689-1695, 1990.
7. DUA, H. S.; DONOSO, L. A.; LAIBSON, P. R. - Conjunctival instillation of retinal antigens induces tolerance. Does it invoke mucosal tolerance mediated via conjunctival associated lymphoid tissue (CALT)? *Ocular Immunol. Inflamm.*, **2**: 29-36, 1994.
8. PARKER, C. M.; CEPEK, K. L.; RUSSELL, G. J.; SHAW, S. K.; POSNETT, D. N.; SCHWARTING, R.; BRENNER, M. B. - A family of $\beta 7$ integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 1924-1928, 1992.
9. CERF-BENSUSSAN, N.; JARRY, A.; BROUSSE, N.; LISOWSKA-GROEPIERRE, B.; GUY-GRAND, D.; GRISCELLI, C. - A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **17**: 1279-1285, 1987.
10. SHIEFERDECKER, H. L.; ULLRICH, R.; WEISS-BRECKWOLDT, R.; SCHWARTING, R.; STEIN, H.; RIECKEN, E.; ZEITZ, M. - The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J. Immunol.*, **144**: 2541-2549, 1990.
11. CEPEK, K. L.; SHAW, S. K.; PARKER, C. M.; RUSSELL, G. J.; MORROW, J. S.; RIMM, D. L.; BRENNER, M. B. - Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha^{\beta 7}$, integrin. *Nature.*, **372**: 190-193, 1994.
12. FRANKLIN, R. M. & REMUS, L. E. - Conjunctival-associated lymphoid tissue: Evidence for a role in the secretory immune system. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**: 181-187, 1984.
13. DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; DONOSO, L. A.; LAIBSON, P. R. - The ocular surface as part of the mucosal immune system: conjunctival mucosa-specific lymphocytes in ocular surface pathology. *Eye.*, **9**: 261-267, 1995.
14. EBATO, B.; FRIEND, J.; THOFT, R. A. - Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**: 1450-1456, 1987.
15. FOTINO, M.; MERSON, E. J.; ALLEN, F. H. - Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **1**: 131-133, 1971.
16. SPRINGER, T. A. - Adhesion receptors of the immune system. *Nature.*, **346**: 425-434, 1990.
17. IWATA, M.; KIRITOSHI, A.; ROAT, M. I.; YAGIHASHI, A.; THOFT, R. A. - Regulation of HLA Class II antigen expression on cultured corneal epithelium by interferon-gama. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **33**: 2714-2721, 1992.
18. SHAMS, N. B. K.; HUGGINS, E. M.; SIGEL, M. M. - Interleukin-1 regulates the proliferation of leukocytes in human corneal cell-peripheral blood leukocyte cocultures. *Cornea.*, **13**: 9-15, 1994.
19. CHEN, W. Y. W.; MUI, M. M.; KAO, W. W. Y.; LIU, C. Y.; TSENG, S. C. G. - Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Curr. Eye Res.*, **13**: 765-78, 1994.
20. GOMES, J. A. P.; RIZZO, L.; NISHI, M.; DONOSO, L. A.; DUA, H. S. - Human mucosal lymphocyte antigen (HML-1) expression on lymphocytes induced by corneal and conjunctival epithelial cells. ARVO Abstracts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**: S1078, 1996.
21. SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. - Autocrine secretion-10 years later. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **4**: 229-255, 1988.
22. WILSON, S. E.; SCHULTZ, G. S.; CHEGINI, N.; WENG, J.; HE, Y. G. - Epidermal growth factor, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp. Eye Res.*, **59**: 63-72, 1994.