

Heterogeneidade das células do epitélio pigmentado da retina na expressão do complexo principal de histocompatibilidade - II (CPH-II) após estimulação com Interferon- γ

MHC expression of retinal pigmented epithelium after Interferon- γ

Antonio Marcelo Barbante Casella⁽¹⁾
Michel Eid Farah⁽¹⁾
Katia Emiko Taba⁽¹⁾
Stephen J. Ryan⁽¹⁾

RESUMO

Proposição: O objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) classe II *in vitro* em células do epitélio pigmentado da retina (EPR) em humanos, em culturas de explantes tratados com gama interferon (IFN- γ) e *in vivo* em EPR de coelhos após injeção subretiniana de IFN- γ .

Métodos: A expressão da Classe II foi estudada no EPR por imunohistoquímica em culturas de explantes de 6 olhos humanos adultos (todos acima de 70 anos), 4 olhos humanos fetais, e em 12 olhos de coelho albino. Os explantes humanos foram estimulados com IFN- γ (50 U/ml) por 72 horas, e em seguida submetidos a imunocoloração para classe II. Os olhos de coelhos, *in vivo*, foram submetidos à injeção subretiniana de 500U de IFN- γ e analisados por imunohistoquímica após 3 dias.

Resultados: Obteve-se um padrão heterogêneo de expressão da classe II, presente no EPR estimulado com IFN- γ em ambos os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Em olhos humanos idosos a porcentagem de células positivas classe II foi mais alta na periferia do que no polo posterior (região macular) ($P < 0,01$), entretanto não foi observada tal diferença em olhos fetais. Diferenças regionais na Classe II foram observadas em olhos humanos idosos mas não em olhos humanos fetais.

Conclusão: Este estudo estabelece evidência de heterogeneidade funcional do EPR e é sustentado por estudos prévios demonstrando heterogeneidade fenotípica.

Palavras-chave: Epitélio pigmentado da retina (EPR); Complexo de histocompatibilidade maior (CPH) Classe II; Envelhecimento; Proliferação vítreo-retiniana (PVR).

INTRODUÇÃO

O Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) exerce um papel crítico na função e manutenção da retina externa¹⁰. Apesar das diversas funções que estas células promovem, o EPR tem uma aparência relativamente uniforme *in situ* sugerindo a existência e atividade funcional similar. Variação regional na distribuição da capacidade proliferativa do EPR e mudanças de acordo com a idade têm sido relatadas^{3,7}, entretanto, não está claro se isto representa heterogeneidade fenotípica ou diferentes influências do meio ambiente. Recentemente, evidências fenotípicas da microheterogeneidade

Este trabalho foi realizado no "Doheny Vision Research Center, University of Southern Califórnia, Los Angeles", Califórnia, Estados Unidos da América, em conjunto com o Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina (EPM), São Paulo, Brasil.

⁽¹⁾ Departamento de Oftalmologia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

Endereço para correspondência: Antonio Marcelo Barbante Casella – Av. Bandeirantes, 500 – sala 109 – CEP: 86010-010 – Londrina – PR – Brasil.
Fax: (043) 321-1758.
E-mail: mcasella@sercomtel.com.br

do EPR têm sido relacionadas com respeito à forma da célula, e a distribuição dos filamentos intermediários e de fosfotirosina *in vitro* e *in situ* ⁴.

Células do EPR respondem a uma variedade de citocinas e fatores de crescimento ambos *in vitro* e *in vivo*, e estão envolvidos em resposta a injúria e na patogênese das desordens proliferativas ¹². Células do EPR respondem ao gama interferon (IFN- γ), uma citocina encontrada em muitos distúrbios inflamatórios intraoculares, através da expressão de antígenos classe I e II do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) na superfície da célula ¹¹. Células que expressam MHC classe II têm o potencial para apresentar o antígeno para linfócitos T CD4+ e podem estar envolvidas na geração da resposta imune local ⁹.

Neste estudo, procuramos verificar se as células do EPR apresentam expressão heterogênea dos antígenos de classe II, quando estimulados por IFN- γ .

MATERIAIS E MÉTODOS

Indução de CPH-II em culturas de explantes

Seis olhos adultos foram obtidos do Banco de Olhos do Doheny Eye Institute dentro de 12 horas pós morte. Os doadores tinham idade acima de 70 anos (média: 73,8 anos); nenhum dos doadores sofreu cirurgia ocular prévia, ou apresentava evidência de doença de retina ou coróide em análise realizada pelo autor. Todos olhos mediam entre 22 e 24 mm no plano axial. Foi obtido consentimento de todas as famílias de doadores e aprovação institucional do uso destes tecidos. Todos os experimentos seguiram os princípios da Declaração de Helsinki em experimentação humana e de animais. Usando um microscópio de dissecação, sob condições estéreis foram retirados o humor vítreo e a retina neurosensorial sem prejudicar a camada do EPR. Os olhos foram divididos em partes nasal e temporal através do nervo óptico. Um trépano córneoescleral de 6 mm foi usado para cortar os botões que continham o EPR, coróide e esclera. Quatro botões foram removidos de cada olho: um botão centrado na fôvea e contínuo ao disco óptico; um botão na área temporal superior (meridiano de 10 horas para o olho direito e de 2 horas para o olho esquerdo), contínuo a ora serrata; 2 botões foram removidos entre os botões posteriores e periféricos. Cada botão foi colocado por 72 horas a 37°C em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado com penicilina G (100 U/ml), L-glutamina (0,292 mg/ml), soro fetal bovino 10% (SBF, Sigma) e 50 U/ml de IFN- γ (Genzyme). Um dos botões intermediários foi colocado na mesma solução mas sem IFN- γ . Após 72 horas de incubação os botões foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos e transferidos para HBSS a 4°C. Dois botões da área intermediária foram congelados e crioseccionados com espessura de 8 mm.

Quatro olhos fetais entre 22 e 24 semanas de gestação foram obtidos da Fundação de Doação Anatômica após abortos terapêuticos. Sob condições estéreis o cristalino, humor

vítreo e retina neurosensorial foram cuidadosamente removidos sem prejudicar a camada do EPR. Os olhos foram divididos em setor nasal e temporal através do nervo óptico. Segmentos medindo 2 por 2 mm adjacentes ao disco óptico na parte temporal do olho e na periferia superior temporal foram removidos.

Culturas dos explantes fetais foram tratadas da mesma maneira dos olhos de idosos e uma área do lado nasal foi usada como controle. Botões do polo posterior dos olhos fetais também foram estimulados com 500U de IFN- γ , no sentido de avaliar se a heterogeneidade era dose dependente. Após 72 horas os explantes foram fixados em paraformaldeído por 15 minutos e transferidos para PBS a 4°C. Dois botões da periferia foram congelados e crioseccionados com espessura de 8mm.

Indução da expressão do CPH-II in vivo

Foram usados os olhos direitos de 12 coelhos machos brancos Nova Zelândia, pesando entre 2,5 e 3,5 kg. Os animais foram anestesiados com uma mistura (4:1) de hidrocloridrato de quetamina (24 mg/kg) e hidrocloridrato de xilazina (6 mg/kg) e as pupilas foram dilatadas com colírio tropicamida 1% e cloridrato de fenilefrina 2,5%. Uma incisão conjuntival límbica foi realizada expondo a esclera para realização de uma esclerotomia perpendicular de 2 mm de extensão e distante 2 mm do limbo. Em 5 coelhos, um descolamento de retina de 6 diâmetros papilares de largura, a partir da margem do disco óptico, foi obtido com a criação de uma rotura mínima na retina e uma injeção de aproximadamente 50 ml de HBSS contendo 500U/ml de IFN- γ usando uma micropipeta de 20 mm sem prejudicar a membrana de Bruch. Em 5 coelhos, uma injeção similar subretiniana foi realizada usando apenas HBSS. Uma vitrectomia no vítreo central foi executada antes da injeção subretiniana para facilitar o descolamento da retina. Em 2 coelhos, usados para controle, os olhos foram vitrectomizados sem a realização da injeção subretiniana. Os coelhos foram sacrificados 72 horas depois, com uma injeção intracardiaca de fenobarbital. Os olhos foram então fixados com paraformaldeído 4% por 15 minutos, e transferidos para PBS (4°C). A área de descolamento de retina foi ressecada e a retina foi descolada usando uma alça de inoculação. Dois olhos, sendo um injetado com IFN- γ e outro com HBSS, foram criocauterizados e a região da bolha foi seccionada em um criostato de 8 mm.

Imunohistoquímica e imunoeletromicroscopia

Coloração imunohistoquímica foi executada nos botões de EPR usando complexo avidina-biotina (ABC) pelo método da imunoperoxidase utilizando-se o anticorpo monoclonal primário de camundongo anti-CPH humano classe II (HLA-DR). A porcentagem de células positivas foi contada com aumento de 100X em 4 campos aleatórios em olhos adultos, 2 no centro e 2 na periferia; e em 3 campos de olhos fetais, 2 na periferia e 1 no centro. Foi realizada coloração de imunoperoxidase nos cortes congelados. Análises estatísticas foram executadas usando o teste de t pareado.

As preparações de coelho foram coradas pelo mesmo método usando anticorpo monoclonal para coelho CPH-II. Em paralelo, todas espécimens montadas foram coradas com um anticorpo contra a proteína da junção intercelular ZO-1 como controle. Espécies de 2 coelhos (1 injetado com IFN- γ e outro com HBSS) foram corados com diaminobenzidina (DAB) como o cromógeno e a seguir, embebidos em glicometacriolato. Três microcortes foram realizados para localizar expressão do antígeno de classe II no EPR. Com o objetivo de avaliar a viabilidade das células positivas e negativas, cortes finos congelados (700Å) foram obtidos e examinados por microscopia eletrônica de transmissão.

RESULTADOS

Heterogeneidade do CPH Classe II em explantes

Explantes adultos e fetais não estimulados foram negativos para expressão do CPH-II na monocamada do EPR. Células ocasionais, mais comumente macrófagos, foram positivas classe II na coróide subjacente, de maneira igual nas culturas não estimuladas. Em 72 horas explantes tratados com IFN- γ mostraram células do EPR com expressão de classe II aparentando estar presente em suas superfícies (Figura 1).

Um tempo de 72 horas foi escolhido com base em estudos pilotos *in vitro* que tinham mostrado ser esse período necessário, para demonstrar a expressão máxima da Classe II sem comprometer a viabilidade do explante.

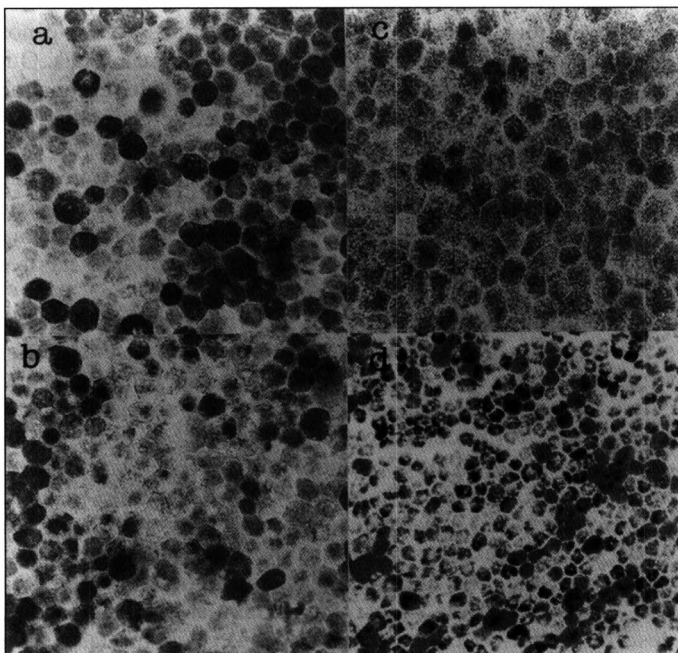


Fig. 1 - Fotomicrografia (100X) mostrando células positivas classe II em áreas diferentes de olhos idosos e em olhos fetais: a) Periferia com grande porcentagem de células positivas; b) polo posterior; c) explantes não estimulados negativos para células classe II; d) olho fetal apresentando o mesmo aspecto de células positivas, que aparecem agrupadas.

A concentração considerada a menor dose efetiva de IFN- γ (50 U/ml) foi determinada por estudos *in vitro*. Em olhos

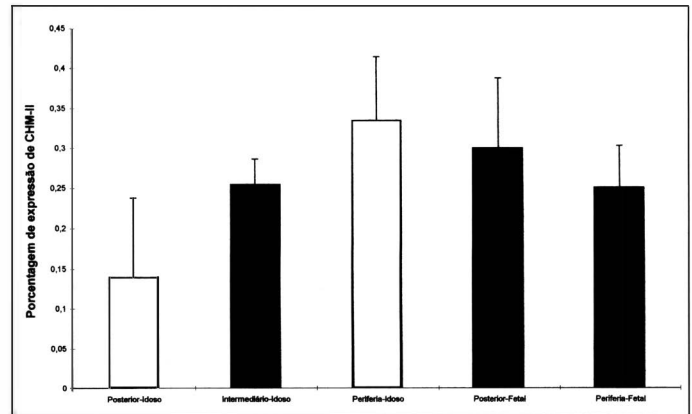


Fig. 2 - Gráfico demonstrando a porcentagem de células classe II positivas em olhos humanos idosos (n = 5) e em olhos fetais (n = 3). Há uma diferença significativa entre o polo posterior e periferia em olhos idosos ($p < 0,01$).

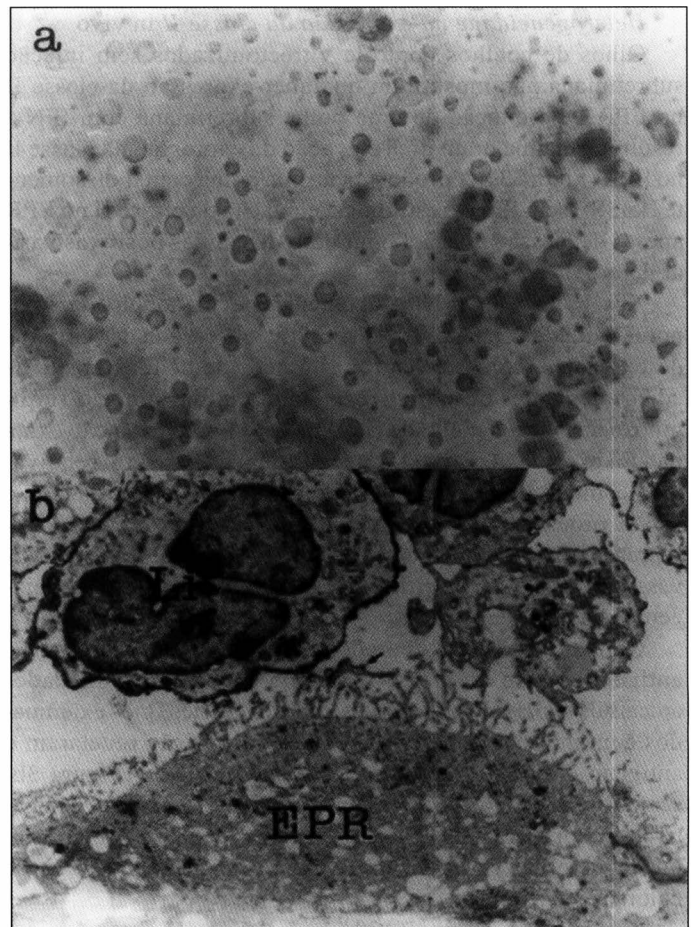


Fig. 3 - a) Fotomicrografia de células do EPR de coelho (100X) coradas para MHC classe II na área da bolha estimulada com IFN-g mostrando modelo em mosaico observado em explantes humanos; b) Eletromicrografia (700Å) demonstrando o antígeno classe II nas microvilosidades apicais (seta) do EPR, bem como presença de linfócitos (LI).

fetais, houve um modesto aumento no número de células positivas identificadas, usando uma dose de 500 U/ml (quando comparado a 50 U/ml de concentração). O modelo de expressão da classe II no EPR, em ambos os explantes adulto e fetal foi heterogêneo com variação dos níveis de expressão. Grupos pequenos de células fortemente positivas foram encontradas próximos as células fracamente positivas e negativas resultando em um modelo de mosaico (Figura 1).

As células fortemente positivas não tinham nenhuma relação aparente aos vasos subjacentes ou as células positivas classe II na coróide. A porcentagem de células positivas classe II variou significativamente de acordo com a região nos olhos adultos. Em todos a porcentagem de classe II positiva no EPR foi significativamente mais alta na periferia (33,4%), comparada ao polo posterior (13,9%) e região intermediária (Figura 2). Exames de olhos fetais tratados com IFN- γ revelaram que 25% das células do EPR foram positivas para a Classe II na periferia e 30% no polo posterior, porém sem diferença significativa (Figura 2). As células positivas formaram um modelo em mosaico, similar ao dos olhos adultos (Figura 1).

Heterogeneidade na expressão da classe II in vivo

Olhos de coelhos controle vitrectomizados sem injeção subretiniana não mostraram qualquer expressão da classe II no EPR. A produção de uma bolha subretiniana com IFN- γ resultou em uma dramática elevação da expressão da classe II no EPR (Figura 3). A produção de uma bolha contendo somente HBSS e sem IFN- γ resultou na elevação da classe II no EPR apesar de, nessa situação, o número de células positivas variar dentro da região da bolha.

Nas bolhas de IFN- γ , a extensão e o modelo da imunoreatividade da classe II foi similar a observada nas culturas de explantes, com exceção do número de células positivas adjacentes, que foi maior, resultando em um modelo serpiginoso de heterogeneidade (Figura 3a). A quantificação exata não foi executada, pois o limite marginal da bolha foi relativamente impreciso. As diferenças regionais dentro da bolha foram proeminentes; sendo que, em campos de alto poder representativo (100X) 5-40% das células do EPR foram positivas. Não pode ser verificada relação com os vasos subjacentes da coróide.

Os três microcortes corados com DAB revelaram que o antígeno classe II estava presente nas microvilosidades apicais da superfície das células do EPR. Cortes finos examinados com microscopia eletrônica de transmissão revelaram o antígeno classe II nas microvilosidades apicais (Figura 3b) sem diferenças morfológicas entre as células positivas e negativas. As preparações coradas para anti ZO-1 não revelaram um modelo heterogêneo, mas sim um modelo uniforme de coloração periférica.

DISCUSSÃO

Demonstramos que células do EPR, normalmente negativas para antígenos classe II na monocamada, podem ser

induzidas para expressar classe II em suas superfícies apicais após exposição ao IFN- γ em ambas culturas de explantes (Figura 1) e *in situ* (Figura 2a) depois de injeções subretinianas. Células do EPR positivas para classe II se apresentaram em um modelo heterogêneo em cada região anatômica estudada fornecendo suporte para a noção de que existem diferenças funcionais entre células individuais do EPR. Embora fisicamente separadas da coróide pela membrana de Bruch, células do EPR poderiam potencialmente ser afetadas por células ou citoquinas difusíveis da coróide, sem relação aparente entre as células positivas e os vasos coroideanos subjacentes ou macrófagos classe II positivos observados. Uma estreita relação está presente entre o EPR e segmentos externos de cones e bastonetes; entretanto, nenhum modelo específico indicativo de uma relação particular com diferentes tipos de fotorreceptores é evidenciada. Heterogeneidade do EPR poderia resultar de determinadas diferenças individuais entre o EPR ou de microambientes devido ao posicionamento de células individuais do EPR mostrando diferenças fenotípicas ⁴.

Há suporte para nossa descrição de heterogeneidade do EPR em vários estudos *in vitro* recentes. Burke e cols. (1996), relataram que células do EPR de diferentes regiões do olho mostraram diferentes potenciais de crescimento e variações no modelo de expressão de vimentin e fosfotirosina entre células individuais do EPR em olhos bovinos ⁴. Células do EPR, epitelióides ou fusiformes, podem ser selecionadas baseadas na adesão celular; MacLaren (1996), descreveu que diferentes variantes fenotípicas das células do EPR, variando em forma e pigmentação, apresentam diferenças cinéticas na aderência e ingestão de bastonetes ⁸.

Observamos variabilidade regional na expressão da classe II entre o polo posterior e regiões periféricas somente nos olhos idosos mas não evidenciadas em espécimes fetais. Outras investigações têm mostrado heterogeneidade regional no EPR em associação com a idade. Há perda diferencial do EPR durante envelhecimento, sendo que 25% das células do EPR são perdidas na região periférica enquanto a região foveal não apresenta perdas ⁷. Durante o envelhecimento há variação regional no acúmulo de enzimas lisossomais e de lipofuccina e taxas diferentes nas deleções de DNA mitocondrial na área central e periférica do EPR ^{1,5}.

Estendendo esse modelo para experimentos *in vivo* é possível excluir a possibilidade de que a heterogeneidade nos explantes tenha sido devido à degeneração diferencial das células do EPR *postmortem*. Um modelo similar de heterogeneidade foi encontrado *in vivo* depois da formação de uma bolha subretiniana. O grande número de células positivas *in vivo* pode ter sido relacionado à influência de pequeno número de células inflamatórias no espaço subretiniano, fato confirmado em estudos ultraestruturais que não encontraram diferenças aparentes entre células classe II positivas e negativas. Expressão classe II positiva nas células do EPR tem sido descrita em retinose pigmentar e uveítes ⁸ e em muitas células do EPR em membranas epiretinianas da PVR ². Nestas condições, como em nosso modelo, somente um conjunto de células do EPR são positivas refletindo nas espécies doentes um efeito de heterogeneidade do meio ambiente ou heterogeneidade das próprias células do EPR.

A observação nas bolhas subretinianas de indução da expressão da classe II em EPR sem injeção de IFN- γ , sugerem que o descolamento de retina está associado a respostas inflamatórias críticas para o desenvolvimento da resposta imune local. O decréscimo regional na habilidade das células do EPR no polo posterior para expressar a classe II pode ter valor potencial na proteção desde que possa ajudar a evitar uma resposta inflamatória na região foveal. Análises posteriores da heterogeneidade do EPR, proporcionarão a possibilidade de determinar qual a idade de aparecimento das diferenças regionais na habilidade das células do EPR expressar a classe II e maior compreensão das variadas funções das células do EPR e sua resposta ao envelhecimento.

SUMMARY

Purpose: To evaluate the pattern of expression of MHC Class II in vitro in human retinal pigment epithelium (RPE) explant cultures treated with interferon-gamma (IFN- γ), and in vivo in rabbit RPE after subretinal injection of IFN- γ .

Methods: Class II expression was studied on RPE by immunohistochemistry in explant cultures of 6 adult human eyes (all over 70 years), 4 fetal human eyes, and in 12 albino rabbit eyes. The human explants were stimulated with IFN- γ (50 U/ml) for 72 hours prior to immunostaining for Class II. The rabbit eyes were injected in vivo subretinally with 500 U of IFN- γ and analyzed immunohistochemically 3 days later.

Results: A heterogeneous pattern of Class II expression was present on IFN- γ stimulated RPE in both in vivo and in vitro experiments. In aged human eyes the percent of Class II positive cells was higher in the periphery than the posterior pole (macular region) ($P < 0.01$), however there was no such difference in the fetal eyes.

Conclusion: RPE cells are heterogeneous in their expression of HLA Class II after stimulation with IFN- γ in both in

vitro and in vivo studies. Regional differences in Class II are seen in aged human eyes but not in fetal human eyes. This study provides evidence of functional heterogeneity of RPE and it is supportive of previous studies demonstrating phenotypic RPE heterogeneity.

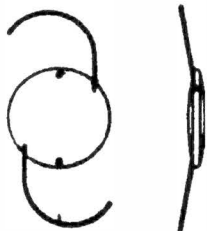
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barreau E, Brossas JY, Coutois Y, Treton JA. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:384-91.
2. Baudouin C, Brinole F, Bayle J, Fredj-Reygrobelle D, Lapalus P, Gastaud P. Class II histocompatibility antigen expression by cellular components of vitreous and subretinal fluid in proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32:2065-72.
3. Burke JM, McKay BS. In vitro aging of bovine and human retinal pigment epithelium: number and activity of the Na/K ATPase pump. Exp Eye Res 1993;57:51-57.
4. Burke JM, Skumatz CMB, Irving PE, Mackay B. Phenotypic heterogeneity of retinal pigment epithelial cells in vitro and in situ. Exp Eye Res 1996;62:63-73.
5. Cabral L, Unger W, Boulton M, Lighfoot R, McKechnie N, Grierson I, Marshall J. Regional distribution of lysosomal enzymes in the canine retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:670-6.
6. Chan CC, Detrick B, Nussemlat RB, Palestine AG, Fujikawa LS, Hooks JJ. HLA-DR antigens on retinal pigment epithelial cells from patients with uveitis. Arch Ophthalmol 1986;104:725-9.
7. Gao H, Hollyfield JG. Aging of the human retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992;33:1-17.
8. Maclaren MJ - Kinetics of rod outer segment phagocytoses by cultered retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;34:3068-75.
9. Percopo CM, Hooks JJ, Shinohara T, Caspi R, Detrick B. Cytokine-mediated activation of a neuronal retinal resident cell provokes antigen presentation. Journal of Immunology 1990;145:4101-7.
10. Yamamoto S, Du J, Gouras P, Kjeldyett H. Retinal pigment epithelial transplants and retinal function in RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993;34:3068-75.
11. Wackefield D, Loyde A. The role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory eye disease. Cytokine 1992;4:1-5.
12. Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy and retinal degeneration. Surv Ophthalmol 1992;36:373-84.

APPALENS

"C" LOOP DESIGN

MULTIPIECE POSTERIOR CHAMBER IOL LENSES



Biconvex, Power: 8--30D com incremento de 0.5D

Dia. Ótico: 6,5 mm, Comprimento Total: 13,00 mm

Consante: 118.2

Alça: Azul, PMMA com dia. 0,16 mm, 2 furos de 0,35 mm

Ótica: PMMA com absorvente UV

R\$ 16,00 a unidade

(Lote mínimo de venda 25 unidades)

MEDSERV

Rua Adib Auada, 41 • Granja Viana 06700-000 • Cotia SP

Fone/Fax: (011) 492-5051 • 7922-1667 • 492-3484