

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

WAGNER BAETAS DA CRUZ

**Expressão do receptor para manose em células de Schwann e
Schwannoma ST88-14**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Biologia Celular.

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Suzana Côrte-Real Faria
Prof^a. Dr^a. Leny Alves Cavalcante

RIO DE JANEIRO
2006

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

C957

Cruz, Wagner Baetas da

Expressão do receptor para manose em células de schwann e schwannoma ST88-14 / Wagner Baetas da Cruz. – Rio de Janeiro, 2006.

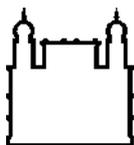
xiv, 83 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2006.

Bibliografia: f. 68-83

1. Células de Schwann. 2. Schwannoma. 3. Receptor para manose. 4. Apresentação de antígenos. 5. Endocitose. 6. Neuroimunologia. I. Título.

CDD 611.0181



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

WAGNER BAETAS DA CRUZ

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR PARA MANOSE EM CÉLULAS DE SCHWANN E
SCHWANNOMA ST88-14**

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Suzana Côrte-Real Faria
Prof^a. Dr^a. Leny Alves Cavalcante

Aprovada em: 26/09/2006

EXAMINADORES:

Dr^a. Euzenir Nunes Sarno – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (Presidente)
Dr. Rafael Linden – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ
Dr. Vivaldo Moura Neto – Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ
Dr^a. Helene Santos Barbosa – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Dr^a. Mirian Cláudia de Souza Pereira – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 26 de setembro de 2006.

Dedicatória: Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

- *Acima de tudo a **Deus**, por estar sempre junto a mim mesmo nos meus instantes de incredulidade e falta de fé.*
- *Aos meus pais, **Walfrido Jugma da Cruz e Áclea Baetas Cruz** e meus seis **irmãos** sempre unidos pelos laços de amor de uma verdadeira família.*
- *Aos meus sobrinhos, **André, Gabriel, Letícia, Raphael, Victor**.*
- *Às minhas madrinhas, **Rosangela e Isaura** e meu padrinho, **Severino**, simplesmente pela presença em minha vida desde a minha infância. Vocês fazem parte da pessoa que sou hoje.*
- *À minha orientadora, amiga verdadeira e conselheira, **Dra. Suzana Côrte-Real Faria**, de coração agradeço todas as oportunidades que me tem dado, principalmente nos momentos mais difíceis e decisivos. O seu jeito tranquilo e maternal torna tudo menos estressante. Não há palavras que possam mensurar a minha gratidão.*
- *À minha orientadora, amiga verdadeira e mãe científica, **Dra. Leny A. Cavalcante**, por ter aceitado me orientar e por todos os instantes de convívio agradável e bem humorado. Seus exemplos, seu vasto conhecimento e sua ética representam tudo que almejo ser nesta minha recente caminhada de neurocientista. Não há palavras que possam mensurar a minha gratidão e orgulho de ser uns dos seus eternos orientandos.*
- *À **Dra. Helene Santos Barbosa**, por ter voluntariamente revisado a tese e por seus exemplos de profissionalismo, competência, respeito ao trabalho alheio e principalmente por estimular a perseverança e disciplina nesta nossa árdua carreira. Sou seu fã!*
- *À **Dra. Maria de Nazareth S. L. de Meirelles**, minha primeira orientadora, que me ensinou a dar os primeiros passos na vida científica. Obrigado pelos*

exemplos e ensinamentos que me deixou e, por todo apoio que me deu ao emprestar seu nome para que eu pudesse trilhar o meu caminho junto a pesquisadores de igual prestígio ao seu. Sou eternamente grato por tudo que fez por mim.

- *À amiga **Dra. Andréa Henriques** ou simplesmente “**Luz**”, não existe um apelido mais apropriado para uma pessoa tão brilhante como você. Só tenho a agradecer por sua amizade. Você é incrível!*
- *Ao meu amigo **Dr. Maurilio José Soares**, pelas horas de bom humor e por toda ajuda sempre prestativa e generosa, principalmente na revisão de textos ou outras “roubadas” qualquer. Obrigado!*
- *Aos meus sinceros amigos e companheiros, doutores e quase doutores, **Alexandre (Xandele), Corrêa, Erick, Marquinhos Moura, Maurício Paiva & Ricardo Santa-Rita**. Amigões mais uma vez continuamos juntos em cada conquista individual e de todos.*
- *Aos meus sinceros amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento, **Eliane, Felipe, Fernanda, Lítia, Paulinho, Renata, Viviane** e mais os valiosos amigos emprestados por outros laboratórios do fundão, **Brenda e Dayse**. Obrigado pelas boas horas de convívio e todo apoio que sempre me deram.*
- *Ao meu amigo **Sérgio Carvalho “Serginho”** Obrigado pela amizade, apoio e ajuda em toda a tese, principalmente nos experimentos que nunca davam certo. Cara você é demais! Obrigado!*
- *Às professoras **Dras. Silvana Allodi e Penha Barradas**, por toda a ajuda e apoio durante o meu mestrado e agora também no doutorado.*
- *Às minhas amigas **Dras. Carolina Spiegel, Ellen, Mariana Waghabi, Luciana Garzzoni (Luquinhaaaa)**, pelo carinho, amizade e apoio que sempre dão ao “Wra”, adoro vocês meninas. Obrigado mesmo por tudo!*

- Às minhas amigas **Dras. Celeste Souza, Kátia Calabrese e Tânia Zaverucha do Valle**, pela amizade sincera, apoio e carinho de sempre.
- A **Dra. Solange Lisboa de Castro “Sol”**, por sua amizade, ajuda sempre generosa e principalmente por ser uma legítima rubro-negra, Obrigado!
- Ao **Dr. Robson Coutinho e Dra. Cláudia Coutinho** pela amizade e por todos os conselhos e valiosas dicas para a minha vida pessoal e profissional.
- As **Dr(a)s. Adelaide, Andréia Pereira, Bianca, Maria de Nazaré Soeiro, Mirian Cláudia, Roberto Tedesco, Vinícius, Tânia** e demais pesquisadores do Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, pela forma sempre prestativa de passarem suas experiências e seus conhecimentos. Obrigado!
- À professora **Dra. Ana Maria Blanco Martinez**, por toda a ajuda na análise dos dados “in situ” e pela paciência e gentileza com que me recebeu em seu laboratório.
- A **Dra. Maria Cristina Pessolani**, por ter me dado acesso ao seu laboratório, além de ceder as culturas e ajudar na bioquímica e análise dos dados. Sem a sua contribuição este trabalho não se realizaria.
- À amiga **Lucinéia Alves** pela amizade, ajuda nas culturas e apoio. Sem a sua contribuição este trabalho não se realizaria.
- À amiga **Camila Adade (carinhosamente peste)** eu implico contigo, mas você sabe que eu gosto de você. Obrigado por tudo e pelas horas de bate-papo e conversa fora. Valeu você é demais!
- Às amigas, **Dayse Teixeira & Elisabete Ferreira “Betinha”**, por todo incentivo, amizade verdadeira e boas horas de conversa e cafezinho.
- Ao meu amigão **Bruno Ávila**, “cara gente boa ta aí” se eu for agradecer a toda ajuda dele, uma tese só não basta. Obrigado pela ajuda em

praticamente toda a tese. Ainda bem que você é administrador, senão teria que agradecer até pelos experimentos. Cara você é demais! Obrigado!

- *Aos amigos do “Clã dos Meuser” **Marcelo & Marcos Meuser** “Marquinhos”, pela amizade e por todo apoio técnico. Obrigado!*
- *Aos amigos **José, Genésio, Luciano & Levi**, pelo apoio e amizade. Obrigado!*
- *Às amigas e secretárias **Soninha, Lourdes & Cida**, pelo apoio e amizade. Obrigado! Adoro vocês!*
- *Aos amigo(a)s & estudantes de Pós-Graduação: **Alessandra Gomes, Cláudia Calvet** “**Claudinha ou Clauclau**”, **Cristiane França, Daniel, Francisco, Gabriel, Giani Santoro, Juliana, Kelly, Marialice, Renata Hespanhol, Rubem, Tatiana** e demais estudantes. Obrigado por tudo!*
- *Aos amigo(a)s & estudantes de Iniciação Científica: **Xênia, Renata Bambino, Lílian, Elaine, Rafaela, Mariana** “**bebê**”, **Azzan** e demais estudantes. Obrigado por tudo!*
- *As amigas **Cleide, Daniele, Eliete, Kátia, Michele & Fabíola** do Depto. de Ensino, pela dedicação e “*paciência*” comigo e com todos os estudantes do Instituto Oswaldo Cruz. Vocês merecem um prêmio pela dedicação com que fazem os seus trabalhos.*
- *Aos demais amigos: **Alanderson, Marielle, Alexandre** “**Seninha**”, seu **Alexandre, Fátima, Nilda, Angélica, Jorge, Anderson, Danielle, Vanessa, Sandra, Dirce, Ângela, Daniele, André** e **Sônia** por todos os momentos de alegrias e dificuldades que nós passamos durante este tempo. Obrigado por tudo!*

Agradeço também a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz e no Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ sob as orientações da Dr^a. Suzana Côrte-Real Faria e da Dr^a. Leny Alves Cavalcante, respectivamente, com o apoio financeiro das seguintes entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho – FAPERJ.
- Conselho de Ensino e Pesquisa para Graduados da UFRJ- CEPG/UFRJ.

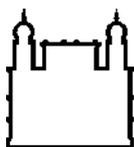
Data de ingresso no Programa de doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: Setembro de 2002.

ÍNDICE

Ficha Catalográfica	ii
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	01
1.1. Ações Gerais das Células Gliais	01
1.2. Propriedades Imunológicas das Células Gliais	01
1.3. Receptor para manose: estrutura e propriedades.....	05
1.4. Componentes Celulares do Sistema Nervoso Periférico.....	11
1.4.1. Células de Schwann	13
1.4.2. Células de Schwann e Receptores de Reconhecimento de Padrões...21	
2. Objetivos	25
3. Materiais e Métodos	26
3.1. Animais	26
3.2. Obtenção de culturas primárias de células de Schwann.....	26
3.3. Linhagem tumoral humana de células de Schwann – ST88-14	27
3.4. Obtenção de macrófagos peritoneais	27
3.5. Isolamento e preparação do nervo ciático.....	27
3.6. Anticorpos e neoglicoproteína.....	28
3.6.1. Primários.....	28
3.6.2. Secundários.....	28
3.6.3. Neoglicoproteína.....	28
3.7. Citometria de Fluxo	28

3.8. Tratamento das Culturas com Interferon-gama e Dexametasona.....	29
3.9. Imuno-química e identificação de ligante do receptor para manose em células isoladas, culturas de explantes ou nervos “esgarçados”	30
3.10. Bioquímica para o receptor manose	30
3.10.1. Extração de proteína.....	30
3.10.2. Dosagem de proteína	31
3.10.3. Eletroforese	31
3.10.3.1 Corrida.....	32
3.10.3.2 Transferência.....	33
3.10.4. “Immunoblotting” e “Overlay”	33
3.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	34
3.11.1. Inclusão em resina Epon	34
3.11.2. Inclusão em resina Lowicryl.....	34
3.11.3. Imunohistoquímica ultra-estrutural.....	34
3.11.4. Citoquímica ultra-estrutural	35
4. Resultados	36
4.1. Marcação de células de Schwann e células ST88-14 com neoglicoproteína manosilada.....	36
4.2. Citometria de Fluxo para a marcação de células de Schwann e células ST88-14 com neoglicoproteína manosilada.....	39
4.3. Células ST88-14 internalizam o ligante manosilado peroxidase de raiz forte	41

4.4. Internalização de neoglicoproteína manosilada por células de Schwann é regulada por imunomoduladores.....	43
4.5. O receptor para manose colocaliza com moléculas MHC classe II em sítios intracelulares de células de Schwann	44
4.6. Células de Schwann, células ST88-14 e macrófagos expressam uma proteína de mesmo peso molecular que se liga a HRP e ao anticorpo anti-RM	46
4.7. Imunocitoquímica para o RM de células de Schwann e Células ST88-14	48
4.8. Marcação in situ do RM de células de Schwann.....	50
5. Discussão	58
6. Conclusões	67
7. Referências Bibliográficas	68
8. Anexo	84



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

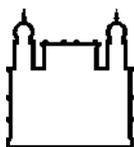
EXPRESSÃO DO RECEPTOR PARA MANOSE EM CÉLULAS DE SCHWANN E SCHWANNOMA ST88-14

TESE DE DOUTORADO

Wagner Baetas da Cruz

RESUMO

O receptor para manose receptor (RM) é uma glicoproteína transmembrana que é expressa em vários tipos celulares, mas, pouca ou nenhuma informação sobre RM existe em células de Schwann (CS). Mostramos que CS de rato em culturas primárias de células dissociadas ou em explantes de nervo bem como, numa linhagem de Schwannoma humano (ST88-14) liga uma neoglicoproteína manossil/albumina de soro bovino - isotiocianato de fluoresceína (man/BSA-FITC) de uma maneira altamente específica. Após incubação com man/BSA-FITC, a análise por citometria de fluxo demonstra 62% de células ST88-14 e 90% de CS positivas, uma ligação dose-dependente de ligantes marcados e inibição quase total pela competição com 250 mM D-manose ou com a proteína (altamente manossilada) peroxidase de raiz forte (HRP) ~ 1.1 μ M. O tratamento de CS cultivadas com dexametasona (0.1 μ g/ml) ou interferon γ (IFN- γ – 100 U/ml) seguido pela marcação com man/BSA-FITC e análise por citometria de fluxo mostra um acréscimo e um decréscimo, respectivamente, da captação do ligante. Explantes de nervo ciático cultivados na presença de IFN- γ mostram colocalização de man/BSA-FITC e imunoreatividade para MHC classe II. A análise ultra-estrutural de células ST88-14 após incubação a 4°C por 40min com HRP-Au coloidal com ou sem subsequente elevação da temperatura para 37°C mostra uma localização inicial na superfície, seguida da internalização do traçador temperatura e tempo-dependente. Células ST88-14 e CS dissociadas bem como nervos recentemente “esgarçados” mostram reatividade a um anticorpo policlonal contra o domínio C-terminal do RM de macrófagos murinos (anti-cMR). No caso de nervos “esgarçados”, a imunoreatividade é particularmente abundante em regiões topograficamente homólogas às alças para-nodais. Além disso, a imuno-histoquímica ultra-estrutural de nervo ciático incluído em Lowicryl mostra reatividade ao anti-cMR, com máxima deposição do anticorpo secundário-Au em pericários de CS mielinizantes ou não-mielinizantes. Proteínas de extratos de CS e ST88-14, separadas por SDS-PAGE, e analisadas pela ligação às lectinas endógenas mostram que ambos os tipos celulares compartilham uma proteína ligadora de HRP de ~180 kDa com macrófagos peritoneais. Uma única banda de 180 kDa foi também obtida em “immunoblots” com anti-cMR. Nossos resultados sugerem que células de um Schwannoma e CS expressam uma proteína MR-semelhante em um estado potencialmente funcional e que ambos os tipos podem ser modelos úteis em estudos do papel deste receptor em diferentes estados infecciosos/inflamatórios ou na homeostase do sistema nervoso periférico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EXPRESSÃO DO RECEPTOR PARA MANOSE EM CÉLULAS DE SCHWANN E SCHWANNOMA ST88-14

TESE DE DOUTORADO

Wagner Baetas da Cruz

ABSTRACT

The mannose receptor (MR) is a transmembrane glycoprotein that is expressed in several cell types but little or no information is available on Schwann cells (SC). We show that rodent SC in primary cultures of dissociated cells or explant nerve cultures and a human Schwannoma cell line (ST88-14) bind the exogenous MR ligand neoglycoprotein mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate (man/BSA-FITC) in a highly specific manner. After incubation with man/BSA-FITC, flow cytometry demonstrates 62% positive ST88-14 cells and 90% positive SC cells, a dose-dependent increase in tagged ligands and near total inhibition of binding by 250 mM D-mannose or $\sim 1.1 \mu\text{M}$ of the highly mannosylated protein horseradish peroxidase (HRP). Treatment of cultured SC with dexamethasone (0.1 $\mu\text{g/ml}$) or interferon γ (IFN- γ – 100 U/ml) followed by tagging with man/BSA-FITC and analysis by flow cytometry shows an increase and a decrease, respectively, of the ligand uptake by the putative receptor. Sciatic nerve explants cultured in the presence of IFN- γ show colocalization of man/BSA-FITC and MHC class II immunoreactivity. Ultrastructural analysis of ST88-14 cells after incubation with HRP-colloidal gold without or with subsequent chasing at 37°C mostra localização inicial na superfície celular e internalização ation on the cell surface and temperature- and time dependent internalization of the probe. ST88-14 cells and dissociated SC and recently teased nerves exhibit reactivity to a polyclonal antibody against the C-terminal domain of the mouse macrophage MR (anti-cMR). In the case of teased nerves, immunoreactivity was particularly abundant in regions topographically homologous to paranodal loops. Furthermore, ultrastructural immunohistochemistry of Lowicryl-embedded sciatic nerve from normal animals showed reactivity to anti-cMR with maximal deposition of Au-tagged secondary antibody in myelinating or non-myelinating SC somata. SDS-PAGE separated proteins studied by endogenous lectin binding of SC and ST88-14 extracts show that both share a unique HRP-binding protein of about 180 kDa with peritoneal macrophages. A single band of 180 kDa was also obtained in immunoblots with anti-cMR. Our results suggest that Schwannoma cells and SC in vitro and in situ express a MR-like protein in a prospectively functional state and that both types may be useful models for studies regarding the role of this receptor in different infectious/inflammatory states or in homeostasis of the peripheral nervous system.

INTRODUÇÃO

1.1. Ações Gerais das Células Gliais

O Sistema Nervoso (SN) é constituído de dois grupos principais de células: os neurônios e as células gliais. O funcionamento do SN é atribuído principalmente à atividade dos neurônios, mas é reconhecido o papel crucial das células gliais na regulação e manutenção do tecido nervoso, controlando, dentre outros, o meio iônico e disponibilidade de neuro-transmissores, e também o metabolismo neuronal por meio do sincício astrocitário (Farahani e cols., 2005). As células gliais participam ativamente no processo de formação do SN e persistem ao longo da vida adulta como mantenedoras da integridade dos neurônios. Durante o desenvolvimento do SN as células gliais auxiliam a migração, controlando a extensão, direcionamento, fasciculação e embainhamento dos axônios, além de promover a sinaptogênese (Barradas e cols., 2005). Além disso, ainda no período de desenvolvimento do SN, as células gliais são essenciais na liberação de fatores tróficos indutores de proliferação e diferenciação dos neurônios e também da própria glia (revisado em Jessen, 2004). Um número crescente de trabalhos tem demonstrado a influência da glia sobre a plasticidade sináptica e também sobre o metabolismo de neurotransmissores, o que, de certa forma, reflete indiretamente no controle das interações neurais.

1.2. Propriedades Imunológicas das Células Gliais

Os processos inflamatórios eliciados no Sistema Nervoso Central (SNC) configuram um desafio aos pesquisadores, considerando o sítio imunologicamente privilegiado deste sistema. A condição de ausência de uma drenagem linfática e a presença de uma barreira hemato-encefálica torna, por enquanto, incompreensíveis algumas das etapas da ativação imunológica eliciada no SNC, principalmente as

dependentes de linfócitos, comumente observados em outros tecidos. Por outro lado, há pouco mais de uma década é sabido que, em determinadas patologias, linfócitos migrantes são capazes de atravessar o endotélio da barreira hematoencefálica. Esta condição é resultante da inativação da via indutora de apoptose mediada pelas moléculas Fas-L/Fas presentes na superfície das células endoteliais e dos linfócitos, respectivamente (Nishimura e cols., 1995; Greil e cols., 1998; Bechmann e cols., 1999). Apesar disso, mesmo nos dias atuais, ainda persiste o conceito que, em condições normais, o encéfalo e a medula espinhal estariam isolados do sistema imune por uma, hipoteticamente, impenetrável barreira hematoencefálica, a qual impede o livre acesso de células do sistema imune ao SNC. Desde o início dessa hipótese de isolamento neuro-immune, evidências têm se acumulado mostrando que esta não é uma descrição exata das interações entre os respectivos sistemas (revisto em Reinke e Fabry, 2006).

O debate atual enfoca uma ação muito mais cooperativa e integrada entre os sistemas nervoso e imune. Admite-se, atualmente, o conceito de moléculas com significado funcional comum aos dois sistemas e, supostamente, como integrantes de um mecanismo pelo qual o controle neural da resposta imune é mantido. Ao nível molecular, moléculas sinalizadoras como hormônios, neurotransmissores, neuropeptídeos, citocinas, além de seus receptores, são consideradas como elementos mediadores desse controle (Armstrong e cols., 2003). Atualmente, há evidências que confirmam que o SNC pode regular a resposta imune inata através de rotas neurais e hormonais. As respostas neuro-endócrinas ao “estresse” e também dos sistemas nervosos simpático e parassimpático, geralmente, inibem a ativação do sistema imune inato ao nível local e sistêmico através da inervação de órgãos com função imune (Czura e Tracey, 2005; revisto em Sternberg, 2006). Por outro lado, o sistema nervoso periférico (SNP), por sua vasta difusão pelo

organismo, configura uma primeira linha de defesa nos sítios de inflamação, onde a liberação de neuropeptídeos tende a amplificar a resposta imune inata local (Czura e Tracey, 2005; revisto em Sternberg, 2006). Desta forma, o SNP, primeiramente, ativaria e amplificaria as respostas inflamatórias locais de contenção e/ou eliminação de patógenos invasores através da ativação dos macrófagos de nervo e, possivelmente, das células de Schwann (CS). Numa segunda etapa, os sistemas nervosos simpático e parassimpático encerram esta inflamação, restabelecendo a homeostase do hospedeiro (Czura e Tracey, 2005; revisto em Pavlov e Tracey, 2004).

Rotas de comunicação bidirecionais recentemente descritas entre o SNC e o sistema imune fornecem pistas sobre uma participação direta do SNC no controle dos processos infecciosos e inflamatórios, possivelmente monitorados através das inúmeras redes de nervos que cobrem todo o organismo, inclusive nos próprios locais de injúria (revisto em Wrona, 2006). Não obstante, para que estes mecanismos sejam elucidados é necessário que antes sejam compreendidas as inter-relações neurônio-glia, tanto ao nível central, com a participação de astrócitos, microglia e oligodendrócitos, quanto ao nível periférico com a participação de CS, de células satélites de gânglios e da glia entérica. Pode-se prever que qualquer sinal regulatório “eferente” ou “ aferente” do SNC através de rotas neurais ou mesmo humorais como proposto por Guijarro e cols. (2006), envolva uma ativação direta das células gliais, presentes tanto nos sítios inervados, onde o estímulo foi gerado, quanto na região ascendente localizada ao nível central.

É conhecido que células gliais sob estimulação adequada são potencialmente aptas a produzir citocinas e mediadores inflamatórios e, não se pode estranhar que, sob esta condição, os neurônios sejam ao mesmo tempo estimuladores e alvos para

essas moléculas, considerando-se ainda o íntimo contato entre neurônios e glia (Belmadani e cols., 2006).

As propriedades imunológicas independentes (não condicionadas) das células gliais, aos componentes celulares exógenos ao SNC, configuram um paradoxo, pois, sob esta condição, alguns dos componentes celulares gliais seriam elevados à função de agentes análogos às células do sistema imune residentes no SNC (Aloisi, 2001). Algumas funções unicamente executadas por células do sistema imune como reconhecimento antigênico, processamento e apresentação de antígenos, além da regulação da imunidade adaptativa, têm sido atribuídas à microglia em um processo que sugere a ação cooperativa dos astrócitos (revisto em Bailey e cols., 2006). Embora os astrócitos também possam exercer funções como células apresentadoras de antígenos, estes têm a expressão de moléculas MHC classe II (complexo principal de histocompatibilidade do tipo II) condicionada à estimulação pelo INF- γ (Interferon-gama), sendo considerados, portanto, apresentadores de antígenos facultativos ou não profissionais (Fontana e cols., 1986). A premissa de uma co-estimulação astrocítica da microglia aponta para um provável mecanismo de controle do perfil anti ou pró-inflamatório da microglia. Os astrócitos, presumivelmente seriam os responsáveis pela reversibilidade da ativação microglial (revisto em Schwartz e cols., 2006), a qual contraria o antigo conceito de uma invariável eliminação da microglia ativada por apoptose (Reid e cols., 1993; Rupalla e cols., 1998).

As moléculas com funções imunológicas expressas na superfície celular dos astrócitos e da microglia têm sido freqüentemente abordadas em diversos artigos, incluindo revisões recentes sobre imunidade inata e adaptativa e seus reflexos na neuroproteção e neurodegeneração (Bonifati e Kishore, 2006; Ralay e cols., 2006). Existe um foco principal em moléculas com funções de receptores envolvidas em múltiplos processos como captura e inativação de patógenos, apresentação

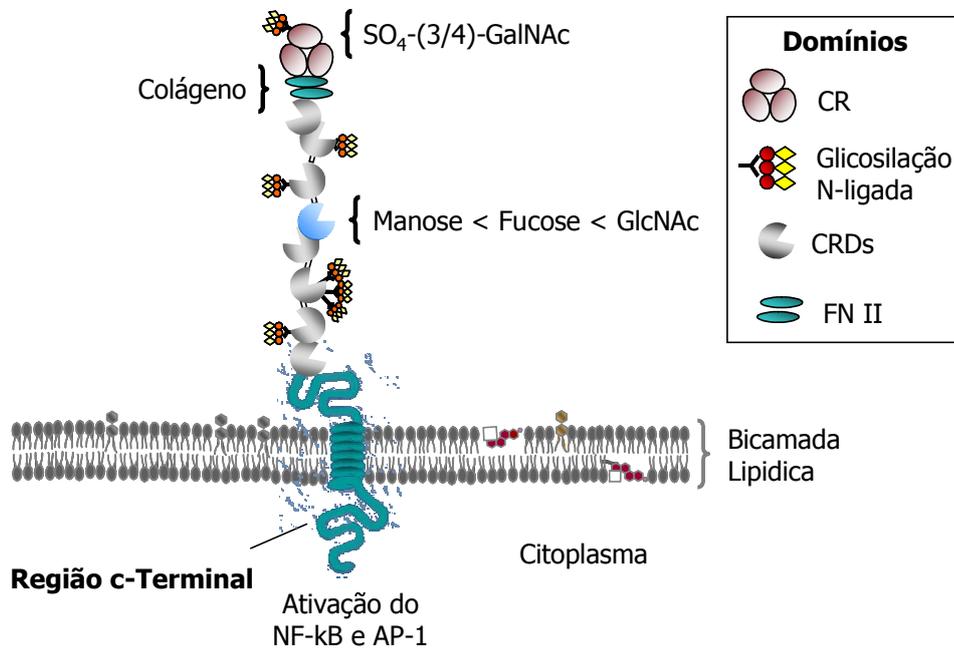
antigênica e reparo tecidual. Nessa vertente, as bases celulares e moleculares do reconhecimento e captura de patógenos por classes de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) proposto por Medzhitov e Janeway (2002) em sistemas não neurais, têm sido um foco importante de estudo da neuroimunologia. Diversas classes de PRRs foram detectadas em células gliais do SNC, sendo a função destes receptores identificada em alguns dos principais eventos infecciosos e inflamatórios que afetam este tecido (Galea e cols., 2005; Kielian, 2005).

Dentre os PRRs identificados em sistemas neurais, o receptor para manose (RM) tem despertado o interesse dos pesquisadores com progressiva intensidade nos últimos anos (revisto em Regnier-Vigouroux, 2003). As conhecidas propriedades do RM como uma molécula de interface entre o sistema imune inato e adaptativo (revisto em Taylor e cols., 2005), além do papel nas respostas fisiológicas durante o reparo e regeneração tecidual (Lee e cols., 2002), capacitam-no como uma molécula-chave nos processos infecciosos e inflamatórios do SNC (revisto em Regnier-Vigouroux, 2003). No caso do SNP, ainda não existem relatos sobre a expressão e modulação do RM em nenhum dos componentes do tecido nervoso periférico.

1.3. Receptor para manose: estrutura e propriedades

O receptor para manose (RM) é um dos quatro membros de uma família de receptores glicoproteicos trans-membranares expresso principalmente em fagócitos mononucleares. Este receptor compreende a superfamília de receptores semelhantes a lectinas onde estão incluídos também os receptores DEC205, fosfolipase A₂ e Endo180. O RM apresenta peso molecular em torno de 180 kDa, possuindo um domínio amino-terminal rico em cisteína, dois domínios análogos à

fibronectina tipo II, um domínio transmembranar, um domínio carboxi-terminal citoplasmático, além de domínios de ligação a carboidratos semelhantes a lectina ou CRDs - “Carbohydrate Recognition Domain” (Taylor e cols.,2005). O domínio rico em cisteína é conhecido por se ligar a resíduos de N-acetilgalactosamina e outros açúcares sulfatados, enquanto suspeita-se que o domínio fibronectina tipo II reconheça moléculas de colágeno (Leteux e cols., 2000). O quarto domínio CRD (CRD4) do RM é o mais ativo no reconhecimento e internalização de gliconjugados contendo resíduos terminais de manosil, fucosil e N-acetilglicosamina, em uma maneira Ca^{2+} -dependente (Stahl e Ezekowitz 1998) (Figura 1). Embora não completamente conhecida a sinalização via RM parece envolver a ativação da cascata das MAP-K (quinases ativadoras de mitose) e também a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Rivera-Marrero e cols., 2002; Zhang e cols., 2004).



Modificado de Taylor et al, TRENDS in Immunology, 2005.

Figura 1. Estrutura do receptor para manose. No esquema estão representados os múltiplos domínios ativos do receptor como uma região rica em cisteína (CR) que liga N-acetil galactosaminas sulfatadas (SO₄-(3/4)-GalNAc), duas subunidades de fibronectina tipo II (FNII) que liga colágeno e oito unidades repetidas para reconhecimento de carboidratos (CRDs), sendo a quarta unidade específica para o reconhecimento de manose, fucose e N-acetil glicosamina (GlcNAc).

O RM foi incluído no grupo de PRRs com um papel fundamental na defesa do organismo, atuando principalmente na captura e processamento de antígenos, promovendo assim uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Stahl e Ezekowitz, 1998). Estudos evidenciam a participação do RM na captação de ligantes endógenos como hidrolases lisossomais, tPA (ativador do plasminogênio tecidual), hormônios e peptídeos de colágeno. Uma outra possível função fisiológica atribuída ao RM refere-se à sua capacidade de captação da acetil-colinesterase (AChE) (Klegeris e cols., 1996). A AChE é conhecida por sua atividade enzimática e regulação da transmissão colinérgica por facilitar a rápida eliminação da acetilcolina (Massoulié e cols., 1993). Desta forma, a captação da AchE via RM poderia resultar em um papel regulador deste receptor na atividade neuronal. Adicionalmente, o RM atua na fagocitose de microorganismos através do reconhecimento de polissacarídeos constituintes da superfície celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, micobactérias, fungos, protozoários e mais recentemente foi encontrado ligado também a gp120 (glicoproteína 120) do vírus HIV-1 durante a infecção de astrócitos (Blackwell, 1985; Ezekowitz e cols., 1991; Kahn e cols., 1995; Lefkowitz e cols., 1997; López-Herrera e cols., 2005). No entanto é importante notar que o RM não parece ter um papel crítico na resposta imune contra fungos, uma vez que animais nocaute para o receptor não apresentam aumento significativo na suscetibilidade à infecção por estes microorganismos (Swain e cols., 2003).

Com relação a função imunológica do RM em macrófagos, a sua expressão pode ser modulada *in vivo* e *in vitro* por uma variedade de agentes pró e anti-inflamatórios, sendo o IFN- γ um dos principais moduladores negativos dessa expressão. Por outro lado, o cortisol e seus análogos sintéticos, como a dexametasona, atuam como moduladores positivos da expressão do RM, apesar de

não existirem evidências concretas sobre o papel fisiológico dessa regulação (Cambi e Figdor, 2003). Resultados semelhantes foram reproduzidos em culturas de microglia e astrócitos (um fagócito tipo não-profissional do SNC) pré-tratadas com IFN- γ , sendo observada significativa redução da expressão do RM que, por outro lado, teve sua expressão aumentada por ocasião do tratamento por agentes anti-inflamatórios como IL-4 e dexametasona (Marzolo e cols., 1999; Burudi e cols., 1999; Burudi e Régnier-Vigouroux, 2001). Alguns autores têm demonstrado que as citocinas IL-4 e IFN- γ podem agir cooperativamente aumentando a fagocitose mediada pelo RM, sendo este achado curioso, considerando-se que a IL-4 é uma citocina Th2 a qual freqüentemente tem efeito antagônico ao IFN- γ (Raveh e cols., 1998; Stahl e Ezekowitz, 1998).

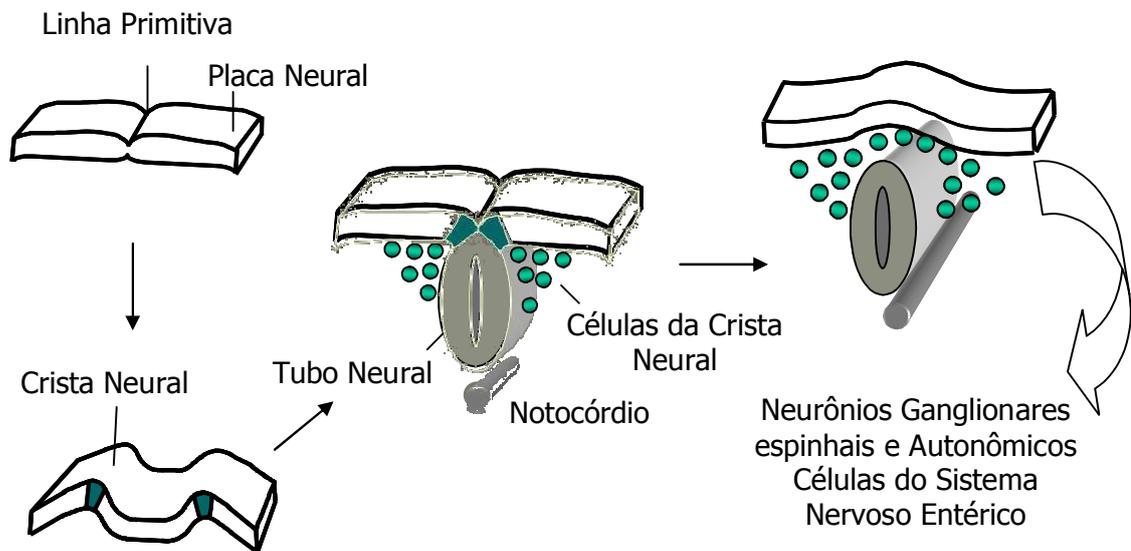
O reconhecimento antigênico via RM ocorre em pH neutro, sendo o complexo ligante-receptor endocitado e conduzido para o interior de vesículas pré-lisossomais. O baixo pH das vesículas pré-lisossomais promove a dissociação do complexo e o retorno do RM à superfície celular através do aparato endocítico, enquanto o ligante é encaminhado aos lisossomas (Stahl e Ezekowitz, 1998). O RM pode reconhecer e processar, através dos seus múltiplos domínios uma grande variedade de moléculas como hormônios sulfatados e glicolipídios além dos resíduos de manose-fucose e N-acetilglicosamina (Fiete e cols., 1997). Alguns autores demonstraram o envolvimento do RM com a apresentação de lipoarabinomananas, com um papel crítico no processamento de glicolipídeos derivados de micobactérias em conjunto com a via de apresentação de antígenos CD1b (Prigozy e cols., 1997). Estas hipóteses apontam para duas prováveis funções do RM em fagócitos profissionais e não-profissionais: a primeira hipótese seria o receptor acelerar o processo de limpeza e regeneração dos tecidos após o processo inflamatório, e a segunda seria de agir na captura, processamento e apresentação antigênica (Sallusto e cols., 1995; Engering

e cols., 1997). Com relação à função do RM na apresentação antigênica em órgão linfóides e não-linfóides, este receptor têm sido freqüentemente encontrado expresso constitutivamente em colocalização com moléculas MHC classe II (Linehan, 2005).

O RM foi inicialmente caracterizado em macrófagos alveolares utilizando-se neoglicoproteínas como ligantes (Stahl e cols., 1978), sendo posteriormente identificado também em outras classes de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos derivados da medula óssea, macrófagos derivados de monócitos circulantes, células de Kupffer, macrófagos peritoneais e mais recentemente na microglia (Shepherd e cols., 1982; Stahl e Gordon 1982; Marzolo e cols., 1999; Linehan e cols., 1999). Anteriormente, pensava-se que a expressão do RM era restrita a células do sistema fagocítico mononuclear em especial macrófagos situados às portas de entrada de antígenos (Shepherd e cols., 1982, Lane e cols., 1998), células dendríticas e de Langerhans (Reis-e-Sousa e cols., 1993, Noorman e cols., 1997). No entanto, um número cada vez maior de trabalhos tem mostrado a expressão e modulação do RM em outros tipos celulares não fagócitos, como células endoteliais, cardiomiócitos, fibroblastos e células musculares lisas (Lew e cols., 1994; Soeiro e cols., 1999; Linehan e cols., 1999; Sheikh e cols., 2000; Melzer e cols., 2001; Hespanhol e cols., 2005). No SNC, o RM tem sido detectado na microglia perivascular, no epitélio pigmentar da retina, astrócitos e neurônios jovens ambos *in vitro* e *in vivo*, mas não em oligodendrócitos jovens ou maduros (Shepherd e cols., 1991; Burudi e cols., 1999; Galea e cols., 2005 para revisão, ver Regnier-Vigouroux, 2003). No entanto, até onde vai o nosso conhecimento, não existem relatos sobre a expressão constitutiva ou modulada do RM em CS.

1.4. Componentes Celulares do Sistema Nervoso Periférico

A formação da maior parte do SNP inicia-se quando um grupo de células progenitoras se separa gradativamente das bordas da placa neural, originando uma estrutura denominada de crista neural. Este processo ocorre concomitantemente ao início da formação do tubo neural, estrutura responsável pela formação do encéfalo e medula espinhal. As células multipotentes oriundas da crista neural iniciam um processo de migração marginal ao tubo neural em formação, originando, desta forma, as células pertencentes ao SNP além de melanócitos, células cromafins dentre outras. Os componentes celulares do SNP oriundos das células da crista neural incluem os fibroblastos endoneurais (Joseph e cols., 2004), neurônios sensitivos, neurônios ganglionares autonômicos e do sistema nervoso entérico, células satélites e células de Schwann (CS) (Figura 2). Alguns dos neurônios e das células gliais dos gânglios autônomos da região da cabeça bem como neurônios sensitivos primários e da glia do sistema olfatório se originam dos placódios (Lent, 2001; Barradas e cols, 2005; Marques, 2005).



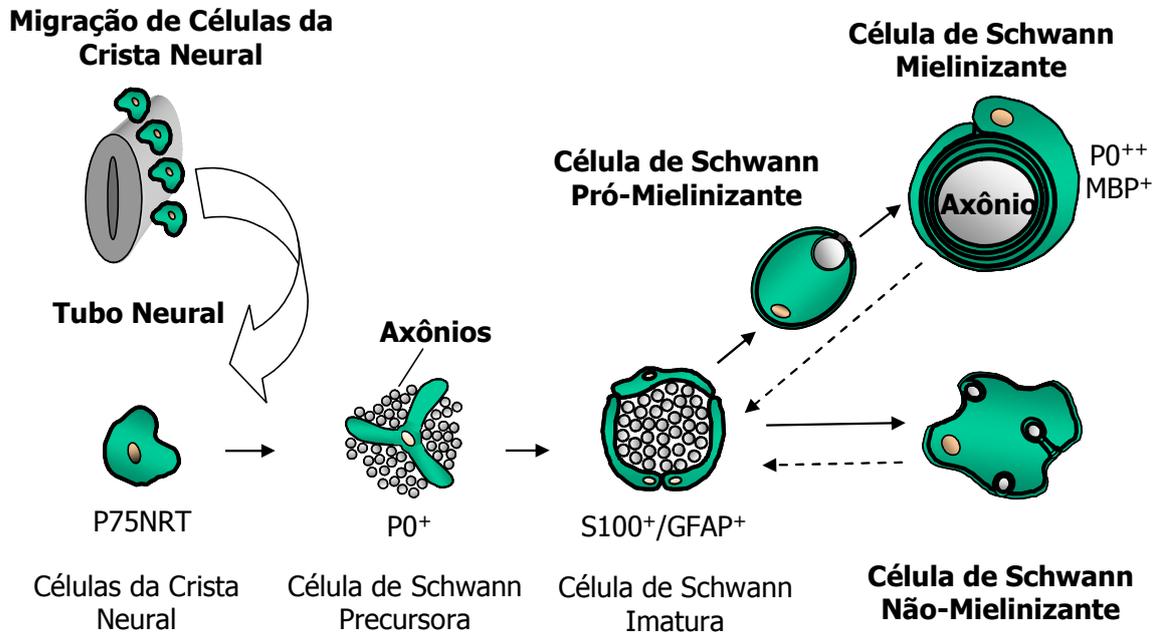
Células de Schwann

Baetas-da-Cruz, 2006

Figura 2. Representação esquemática sumariando as principais etapas do desenvolvimento do sistema nervoso. As cristas neurais aparecem em cada lado a partir das células que ficam nas bordas de fusão (em verde) da placa neural, quando esta se dobra para formar o tubo neural. Notar que as células da crista neural migram marginalmente ao tubo neural para formar diversos tipos celulares tais como os neurônios ganglionares espinhais e autonômicos, células do sistema nervoso entérico e as células de Schwann.

1.4.1. Células de Schwann

As CS são as principais células gliais do sistema nervoso periférico (SNP), encontradas *in vivo* como unidades célula glial-axônio. Durante o desenvolvimento, os axônios que já atingiram previamente os órgãos-alvos (músculos e pele) servem como verdadeiros trilhos para as CS migrantes, que utilizam estes axônios também como fonte de estímulos mitogênicos. No entanto, no caso da junção neuromuscular, sabe-se que antes do contato axônio motor com o músculo, as CS já se encontram morfológica e funcionalmente diferenciadas. Durante os estágios E12 e E13 da vida embrionária dos camundongos, precursores de CS começam a expressar três marcadores de diferenciação: proteína P0 de mielina (Lee e cols., 2001) GAP43 (proteína associada ao crescimento) (Curtis e cols., 1992) e F- espondina (Klar e cols., 1992). No estágio E15 até o nascimento, estes precursores de CS transformam-se em CS imaturas, as quais expressam níveis elevados de S100 β (Dong e cols., 1999) e a P0 em baixos níveis (Lee e cols., 1997). A S100 β é um importante marcador fenotípico das CS, sendo uma proteína ligadora de cálcio intracelular (Spreca e cols., 1989), membro de uma numerosa família encontrada somente em vertebrados (Donato, 1999) (Figura 3).



Modificado de Jessen & Mirsky, Nature Neuroscience, 2005.

Figura 3. Representação esquemática sumariando as etapas do desenvolvimento das células de Schwann. As células da crista neural expressando o receptor de baixa afinidade do fator de crescimento de nervo (P75NRT) iniciam a diferenciação do seu fenótipo em células de Schwann precursoras, as quais expressam a proteína P0 de mielina. Por conseguinte, as células de Schwann precursoras se diferenciam em células de Schwann imaturas, que sob determinados estímulos divergem para um dos dois fenótipos das células de Schwann em adultos: mielinizantes e não-mielinizantes.

Após o nascimento, a SC imatura diferencia-se nos fenótipos mielinizantes, não-mielinizantes (Figura 3) e perisináptico (ou células de Schwann terminais) em um processo que persiste por diversas semanas (D' Antonio e cols., 2006; revisto em Jessen e Mirsky, 2005). Os axônios fornecem os sinais que regulam a definição dos diferentes fenótipos das CS, porém, a identidade das moléculas envolvidas neste processo, ainda permanece desconhecida. No caso particular da CS mielinizante, o contato com o axônio é fundamental para a sua diferenciação. Este processo pode ser verificado nos casos onde a perda do axônio leva à desdiferenciação da CS mielinizante com drástica redução da expressão de genes para a mielina, a qual é conseqüentemente perdida. No axônio em crescimento a adesão com as CS é parcialmente modulada pelas moléculas N-CAM (molécula de adesão celular neural), L1 e as caderinas.

As CS sabidamente expressam GDNF (fator neurotrófico derivado de glia) e seu similar neurturina na vida embrionária, CNTF (fator neurotrófico ciliar) na vida pós-natal, e, possivelmente, NT3 (neurotrofina 3) em todas as suas etapas do desenvolvimento (Jessen e Mirsky, 1999). Estudos recentes demonstraram que a mielinização pela CS é regulada por distintos fatores de crescimento, incluindo neurotrofinas (Chan e cols., 2001), GDNF (Hoke e cols., 2003) e neuregulinas (Michailov e cols., 2004; Taveggia e cols., 2005). A condição que determina se uma CS irá se diferenciar no fenótipo mielinizante depende da quantidade de NRG1-III (neuregulina-1 do tipo III) presente tanto na sua superfície de contato com o axônio como de outros sinais oriundos do próprio axônio (Taveggia e cols., 2005). Além disso, a quantidade de NRG1-III determina também a espessura da bainha de mielina (Michailov e cols., 2004; Taveggia e cols., 2005). Curiosamente, NRG1-III é ativa somente quando associada à membrana e inativa na sua forma solúvel, indicando que o contato CS-axônio mediados por moléculas de adesão celular

(CAMs) pode ser um pré-requisito para a mielinização. As CAMs estão envolvidas em vários estágios do desenvolvimento das CS mielinizantes, incluindo a extensão e embainhamento axonal, dobramento em espiral, compactação e formação do nó de Ranvier (Lustig e cols., 2001; revisto em Bartsch, 2003; Spiegel e cols., 2006). Um tipo importante de CAM como a N-caderina tem sido frequentemente eleita como fundamental na mielinização (Wanner e Wood, 2002), sendo a L1 e a MAG outras importantes candidatas sugeridas, pelo menos *in vitro*, para a manutenção da associação CS-axônio (Seilheimer e cols., 1989). Entretanto, em estudos mais recentes, alguns autores reivindicam que nem a L1 e nem a MAG (mielina associada a glicoproteína) estariam envolvidas no início ou manutenção da associação CS-axônio. (Montag e cols., 1994; Haney e cols., 1999).

Os três tipos de SC diferem não somente no tipo de axônio com os quais estão associadas, mas também por sua posição ao longo destes axônios. Ainda em termos morfológicos, os diferentes subtipos de CS também podem ser drasticamente diferenciados por sua composição bioquímica. Dentre todos os subtipos de CS, a mielinizante é a melhor caracterizada bioquimicamente, expressando as proteínas da mielina, tais como: MBP (proteína básica da mielina), PMP22 (proteína periférica 22 da mielina), P0, MAG e MAL (proteína da mielina e linfócitos). Estas proteínas são críticas para a formação e a função da bainha de mielina. As CS não-mielinizantes diferem da CS mielinizantes por seus níveis elevados de GFAP (proteína fibrilar glial ácida) (Jessen e cols., 1990), p75NRT, receptor de baixa afinidade do fator de crescimento de nervo (NGF) (Jessen e cols., 1990) e a molécula L1 de adesão celular (Faissner e cols., 1984).

Ainda em termos de seus diferentes fenótipos, as CS podem ser funcionais e estruturalmente análogas às populações gliais do sistema nervoso central (SNC). Assim, as CS não-mielinizantes seriam similares aos astrócitos, principalmente, nas

suas funções como células de suporte mecânico e metabólico, enquanto as CS mielinizantes seriam semelhantes aos oligodendrócitos (Marques, 2005).

A formação da mielina periférica inicia-se por ocasião do estabelecimento do contato de 1:1 entre uma CS e um segmento axonal. O deslocamento em espiral da membrana plasmática da CS mielinizante juntamente com porções do conteúdo citoplasmático que é, subseqüentemente, extrudido, resulta em uma estrutura cada vez mais delgada, culminando com a formação de um empilhado de membranas com as faces citoplasmáticas e extracelulares extremamente compactadas como uma única estrutura. A bainha de mielina é constituída pelo envolvimento da membrana da CS ao redor de um axônio. A cada volta as membranas aderem entre si pelas proteínas da mielina, sendo compactadas de maneira lameliforme. (Revisto em Sherman e Brophy, 2005).

O sistema membranoso multilamelar apresenta compartimentos individualizados, como alças terminais de região paranodal, a internodal composta pela mielina compacta, as incisuras de Schmidt-Lanterman e o componente radial (Figura 4). Durante este período de formação da bainha de mielina, a CS além de organizar as diversas regiões do seu corpo celular e a sua membrana plasmática, também organiza os seus componentes lipídicos e proteicos formando áreas de mielina compacta e não-compacta. Por sua vez, os axônios também são capazes de organizar os seus componentes lipídicos e protéicos concentrando-os em distintas regiões, principalmente, nos locais onde delicadas projeções do citoplasma de duas CS contíguas se tocam sem lamelas de mielina. Esta junção entre uma CS e a seguinte constitui um nó ou nodo de Ranvier (Revisto em Sherman e Brophy, 2005). Nestas regiões do nó de Ranvier a membrana do axônio ou axolema torna-se mais densa, devido ao grande número de canais iônicos. A intensa compactação da bainha de mileina não permitiria as trocas metabólicas se não fosse pela presença

das incisuras de Schmidt-Lanterma, as quais formam fendas que interrompem obliquamente a bainha de mielina em toda a extensão das suas múltiplas camadas permitindo a integração dessa organela com o citoplasma de outras regiões semi-compactas. Função semelhante também é executada pelas incisuras longitudinais que cortam lateralmente a bainha de mielina ligando-se às incisuras de Schmidt-Lanterman em alguns pontos da bainha (Peters e cols., 1976).

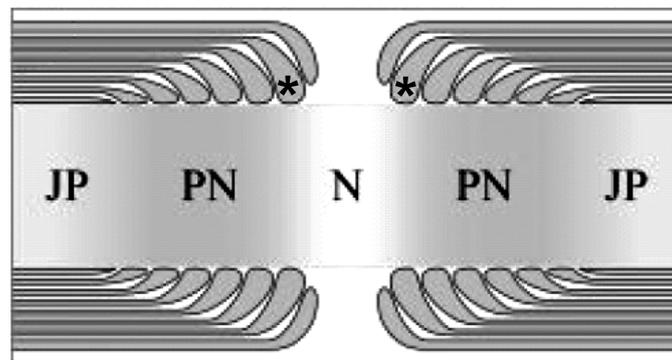


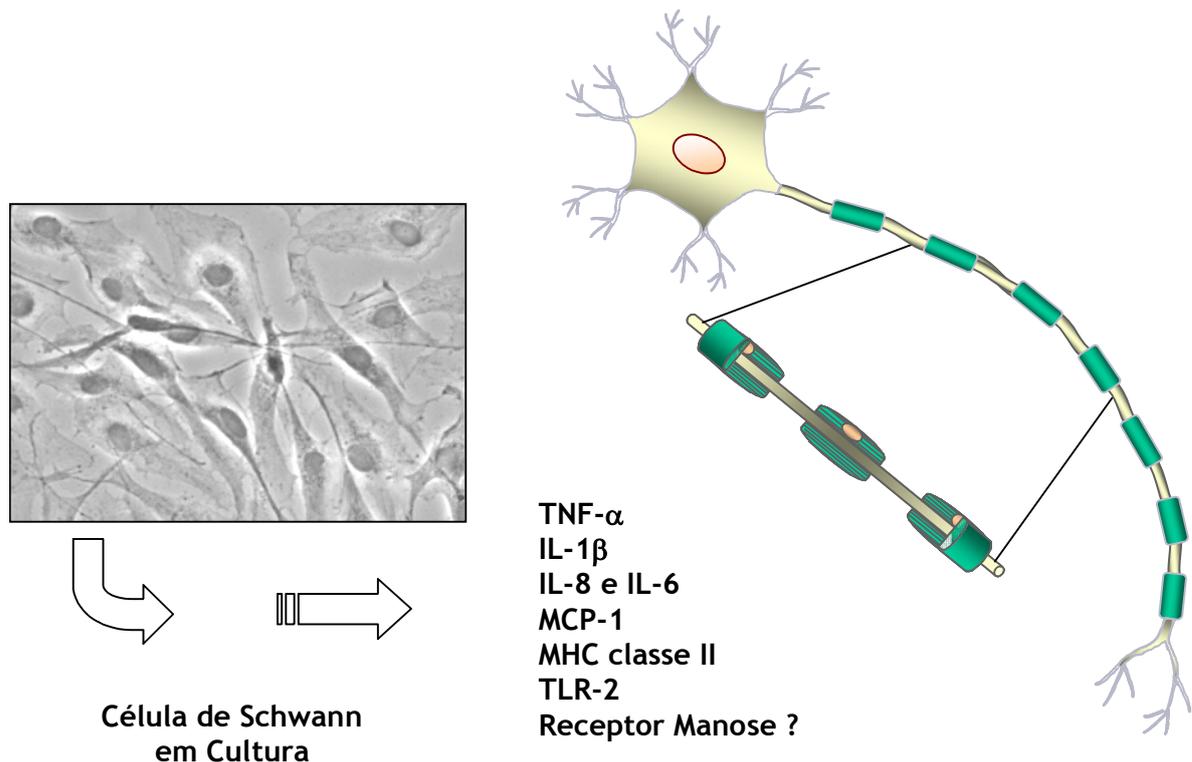
Figura 4. Representação esquemática de um segmento axonal mostrando a região do nó de Ranvier (N), as regiões justa para-nodais (JP) e para-nodais (PN). Asteriscos indicam regiões do citoplasma das CS onde se localizam as alças terminais da mielina.

Pelas propriedades isolantes da mielina e suficiência de cargas associadas a cada potencial de ação, ocorre um aumento da velocidade de condução do impulso nervoso em um processo conhecido como condução saltatória (Gerebtzoff, 1963; Ritchie e Rogart, 1977). A condução saltatória se faz de nó a nó de Ranvier, sendo que, quanto mais longo o espaço internodal (dentro de certos limites da CS), maior a velocidade de condução do impulso nervoso através de uma fibra nervosa (Ritchie e Rogart, 1977; Revisto em Fields e Stevens-Graham, 2002). As fibras nervosas sensitivas e motoras trafegam ao longo dos nervos reunidas em fascículos. Os fascículos são reunidos entre si pelo epinêurio, constituído por fibras colágenas e que abrigam capilares, vênulas e arteríolas. Cada fascículo é envolvido por uma estrutura formada por uma camada de células especializadas denominadas de perinêurio. As células do perinêurio se unem umas às outras por junções muito fortes e estreitas do tipo “tight junctions”. Em continuidade, a estrutura que delimita os axônios mielínicos e amielínicos em meio a tecido conjuntivo frouxo é denominada de endonêurio. Este espaço endoneural também é habitado por célula de origem não-neural como fibroblastos, mastócitos e células endoteliais dos capilares endoneurais (Revisto em Fields e Stevens-Graham, 2002). Tanto no caso das CS mielinizantes quanto das não-mielinizantes, a unidade célula glial-axônio é completamente envolvida pela lâmina basal (Bunge e Bunge, 1986),

As hipóteses sobre as propriedades imunológicas das CS têm aumento substancialmente devido ao interesse na utilização deste tipo celular em terapias celulares de reparo do SNC, além, é claro, da necessidade de compreensão dos processos infecciosos, inflamatórios e degenerativos do próprio SNP. Há muito é sabido da produção e/ou influência de mediadores inflamatórios nas CS durante a evolução das inúmeras patologias que afetam o SNP (Samuel e cols., 1987; Turka e cols., 1995; Jander e cols., 1996; revisto em Gold e cols., 1999). As CS têm sido

identificadas como fontes de diversas citocinas, como as pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β , e IL-8 (Bergsteindottir e cols., 1991; Bolin e cols., 1995; Wagner e Myers 1996; Rutkowski e cols., 1999) e as anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 (Jander e cols., 1996; Murwani e cols., 1996) além de diversas outras moléculas com função imune como MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócitos 1), PGE-2 (prostaglandina 2), TBX-A (tromboxana A), receptores toll-semelhantes 2, moléculas MHC classe I e II, entre outras. (Bergsteindottir e cols., 1991; Constable e cols., 1994; Gold e cols., 1995; Oliveira e cols., 2003) (Figura 5). Nos processos de degeneração de nervos periféricos um combinado de citocinas é freqüentemente encontrado nos locais da lesão. As citocinas TNF- α , IL-1 α e IL-1 β estão muito aumentadas nestes processos apesar de suas funções ainda serem desconhecidas (Shamash e cols., 2002). A IL-6 parece estar envolvida na diferenciação de monócitos, durante a migração ao nervo, em macrófagos inflamatórios, controlando também as suas funções no tecido (Tofaris e cols., 2002). Concomitantemente, a IL-8 induz o acúmulo de neutrófilos nos locais de injúria do nervo, embora a função dos neutrófilos em lesões do nervo seja desconhecida (Yang e cols., 1994). Admite-se que as citocinas TNF- α , IL-1 α e IL-1 β contribuam para o recrutamento dos macrófagos para os sítios inflamados através da ativação de células endoteliais com produção de citocinas e quimiocinas (revisto em Oppenheim, 2001). Outras funções propostas seria a regulação indireta do crescimento e sobrevivência dos neurônios do SNP e da dor neuropática através do controle da produção de NGF (fator de crescimento de nervo) por fibroblastos residentes do nervo (Lindholm e cols., 1987; Hattori e cols., 1993; 1994). Além disso, as CS sob co-estimulação por TNF- α e INF- γ apresentam características de células apresentadoras de antígenos facultativas ou não profissionais (Gold e cols., 1995). Estes fatores em combinação geram inúmeras possibilidades de atuação das CS na defesa e homeostase do SNP, muito além da convencional função acessória de

sustentação e estruturação dos axônios atribuída, até recentemente, como principal função deste tipo celular. Diante destas potencialidades das CS, no controle da resposta imune, estudos são necessários a fim de identificar outras moléculas imunologicamente ativas, incluindo receptores da superfície celular que medeiam a produção de citocinas, moléculas da matriz extracelular e radicais livres.



Baetas-da-Cruz, 2006.

Figura 5. Esquema ilustrativo indicando a expressão ou secreção de algumas moléculas com função na resposta imunológica em CS em cultura.

1.4.2. Células de Schwann e Receptores de Reconhecimento de Padrões

Nas últimas duas décadas, muitos estudos têm sido desenvolvidos objetivando substituir células lesadas do SNC, após trauma ou doenças crônicas, tais como transecção da medula espinhal, esclerose múltipla, acidentes vasculares cerebrais e outros distúrbios neurológicos. Em modelos animais foi mostrado que, embora as CS mielinizantes sejam estruturalmente análogas aos oligodendrócitos nas suas características morfofuncionais, as CS são muito superiores a estes na re-

mielinização de axônios afetados (Blakemore, 1977; revisto em Jasmin e Ohara, 2002). Alternativamente, as CS têm sido testadas, por serem promissoras em transplantes autólogos, considerando-se que os axônios do SNP apresentam capacidade de regeneração e crescimento por longas distâncias ao longo de colunas de CS, rodeadas por lâmina basal (Aguayo e cols., 1981). As CS passaram a ser consideradas como estimuladoras do crescimento de axônios centrais desde que os estudos pioneiros de Aguayo e colaboradores (1981) demonstraram que, após o implante de segmentos de nervos periféricos em pontos externos a medula espinhal lesada, axônios originados de neurônios medulares associavam-se com CS e alongavam-se significativamente.

Embora relativamente avançados, os estudos utilizando CS para enxertos autólogos na região de injúria da medula espinhal e do encéfalo apresentam entre os fatores limitantes ao êxito, o baixo conhecimento sobre as propriedades imunológicas destas células. Este fato é ainda agravado pela dificuldade de compreensão do comportamento das CS frente aos componentes celulares imunologicamente ativos (astrócitos e microglia) na região do enxerto. Algumas das ações e reações da glia central, atuantes ou não, em conjunto com células extrínsecas ao SNC, são classificadas como as principais responsáveis pela falência regenerativa dos neurônios do SNC. As possíveis interações célula-célula, célula-matriz extracelular, além da influência de fatores solúveis, tornam imprescindíveis os estudos sobre os componentes de superfície celular que medeiam as funções das CS tanto na regeneração quanto nas suas potenciais propriedades imunológicas. Não existem relatos sobre a expressão e modulação de PRRs após transplantes de CS no SNC, mas sabe-se que a ativação de Toll-semelhante 2 em CS humanas bem como em células ST88-14, uma linhagem obtida a partir de um paciente de neurofibromatose tipo 1 (Ryan e cols., 1994), induz a apoptose destes tipos celulares

(Oliveira e cols., 2003). Conforme mencionado, não existem dados sobre a expressão constitutiva ou modulada do RM em CS ou Schwannomas, mas a característica deste receptor como uma molécula de interface entre o sistema imune inato e adaptativo, além do papel nas respostas fisiológicas durante o reparo e regeneração tecidual, capacitam-no como uma molécula chave nos processos inflamatórios do SN.

Alguns indícios da relevância do RM em CS nos processos patológicos degenerativos podem ser vistos em camundongos com mutações genéticas do tipo “quaking” para a mielinogênese. Estes animais com hipomielinização, principalmente do SNP, apresentam grandes quantidades de oligossacarídeos de manose na isoforma de baixo peso molecular da MAG (Bartoszewicz e cols., 1995). Outras alterações em glicoproteínas da mielina como a P1 e P2 também são vistas nestes mutantes que as expressam em baixos níveis, tendo, porém, a P0 aparentemente nos seus níveis normais (Matthieu, 1978). Além disso, trabalhos mais recentes mostram a ligação de oligossacarídeos de manose aos resíduos serina e treonina da glicoproteína central da alfa-distroglicana (Seifert e cols., 2000). Essas pistas podem ser significativas para a proposição de um papel funcional do RM na formação e manutenção estrutural da mielina periférica além de uma possível participação na regeneração axonal, acelerando a captação da mielina degenerada pelas CS antes da chegada dos macrófagos aos locais de injúria. Macrófagos hematógenos conhecidamente fagocitam a mielina degenerada em um processo que pode ser inibido pelo tratamento das culturas com beta-manosidase e L-fucosidase, sugerindo um papel do RM na remoção eficiente dos componentes residuais do nervo em degeneração (Bruck e Friede, 1990). Reações degenerativas como, por exemplo, após um dano traumático ou patológico em um axônio mielinizado do SNP geram uma seqüência de eventos celulares ao longo do axônio distal ao sítio de injúria em

um processo conhecido como degeneração Walleriana (Brown e cols., 1992; revisto em Koeppen, 2004). Estudos recentes de degeneração Walleriana em nervos periféricos mostram que as CS, e não fibroblastos e macrófagos, são os componentes celulares essenciais das fases iniciais da degeneração. Assim, ocorreria uma ativação inicial e transitória de erbB2 que levaria, dentro de horas, à formação de “debris” da bainha de mielina ou “ovoides” que se acumulam no citoplasma da CS. Desta forma, um sistema de captação eficiente de hidrolases lisossomais (altamente oxidantes) nos estágios iniciais da lesão podem ser determinantes para a prevenção da extensão do dano e comprometimento do tecido. Subseqüentemente à “desmielinização” relatada, em aproximadamente três dias, inicia-se a fase de proliferação de CS (Guertin e cols., 2005).

Comparativamente, a superioridade regenerativa dos axônios periféricos em relação aos centrais é atribuída ao eficiente sistema de remoção de debris executado, principalmente, pela entrada maciça de macrófagos hematógenos no nervo (Stoll e cols., 1989). Ao nível central, em modelos murinos para estrangulamento do nervo óptico, alguma regeneração foi observada por ocasião da aplicação de enxertos de células mielóides oriundas do estroma de medula óssea (Dezawa, 2002; Okada e cols., 2005; Caicedo e cols., 2005). Além disso, a expressão de receptores endocíticos de macrófagos, como no caso do RM em CS, poderia capacitá-las a executar funções parcialmente análogas a estes fagócitos durante o reparo tecidual.

OBJETIVOS

Geral

- Investigar a ocorrência do RM em células de Schwann (normais e transformadas), caracterizando sua funcionalidade putativa e susceptibilidade à imuno-modulação.

Específicos

1. Detectar e analisar quantitativamente a ocorrência e especificidade de uma proteína com sítios lectínicos para manose em células da linhagem ST88-14 (Schwannoma) e em culturas primárias de CS de nervo adulto por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.
2. Analisar os efeitos do IFN- γ e dexametasona como moduladores da captação de man/BSA-FITC por células de Schwann ;
3. Verificar a ocorrência de colocalização da marcação com man/BSA-FITC e imunorreatividade para MHC classe II nas células de Schwann como evidência da função participativa de uma proteína de ligação a manose na apresentação antigênica;
4. Estudar os processos de adesão e destino intracelular do complexo HRP-Au coloidal em células ST88-14.
5. Verificar a expressão do RM de macrófagos nas células de Schwann e células ST88-14 através de ensaios por imuno-citoquímica e “western blot”;
6. Verificar a expressão constitutiva do RM em fibras nervosas isoladas por “esgarçamento” e em fragmentos de nervo por microscopia confocal a laser e imuno-histoquímica ultra-estrutural, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Todos os experimentos foram executados de acordo com as normas de segurança estabelecidas pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA) da FIOCRUZ, licença sob número 0049003 e pelas normas internacionais dos cuidados na manipulação de animais e agentes infecciosos. Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar fêmeas e machos, com idade de 30 a 35 dias. Os animais foram fornecidos pelo centro de criação de animais de laboratório (CECAL) biotério central da FIOCRUZ.

3.2. Culturas isoladas de células de Schwann

Após eutanásia dos animais em câmara de CO₂, o nervo ciático foi rapidamente removido e colocado em PBS 10mM pH 7,4 estéril (137mM de NaCl; 2,7mM de KCl; 6,4 Na₂HPO₄; 0,88mM de KH₂PO₄ em 1L de água). O perineurio foi removido e o nervo cortado em pequenos fragmentos. Em seguida os fragmentos foram aderidos em lamínulas de vidro previamente revestidas com laminina. Após o trigésimo dia de crescimento em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino 1mM de L-glutamina, 1000U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina, os fragmentos foram tratados em pernoite a 37°C em uma solução de colagenase tipo I (0.5 mg/mL) e dispase II (1 mg/mL). Após o tratamento, as células dissociadas foram cultivadas em presença dos indutores de crescimento: 2 µM de forskolina e 20µg/mL de extrato de pituitária bovina. As células de Schwann foram aderidas em lamínulas ou em placas de Petri, conforme o experimento e, em seguida cultivadas por três dias em meio DMEM suplementado em estufa a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.3. Linhagem tumoral humana de células de Schwann – ST88-14

As células tumorais ST88-14 obtidas de um paciente com Schwannoma (Neurofibromatose tipo I) foram cedidas por J. A. Flechter (Instituto do Câncer Dona Farber, Boston, EUA) e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino 1mM de L-glutamina, 1000U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina em estufa a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As culturas foram expandidas e as passagens feitas após o terceiro dia de crescimento, pela dissociação das células com 10mM de EDTA a 37°C. As células foram aderidas em laminulas ou em placas de Petri, conforme o experimento.

3.4. Obtenção de macrófagos peritoneais

Os animais foram “desafiados” com o inóculo de 3mL de tioglicolato de sódio (agente indutor de inflamação) a 3% diretamente na cavidade peritoneal. No quarto dia pós-injeção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, a cavidade peritoneal exposta, procedendo-se a lavagem do peritoneo com meio RPMI. Os macrófagos foram recolhidos em tubos falcon e mantidos em gelo até o plaqueamento. As células em suspensão foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de 1x10⁶ células em placas de petri de 35mm diâmetro. Após a adesão, as células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino 1mM de L-glutamina, 1000U/mL penicilina e 50µg/mL de estreptomicina por três dias em estufa a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.5. Isolamento e preparação do nervo ciático

Os animais anestesiados foram fixados por perfusão intracardiaca iniciada com solução salina 0,9% por 5 min, seguida de solução fixadora de PFA a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por 20 min e 4% de PFA com 10% de sacarose por mais 15 min.

Nesta etapa os nervos ciáticos de alguns animais foram recolhidos e processados também para microscopia eletrônica de transmissão (ver sub-seção 11.2). Após a fixação, o nervo ciático foi dissecado e pós-fixado, por 2h, em PFA a 4% com 10% de sacarose. Posteriormente, os nervos mantidos em 0,1M de tampão fosfato pH 7,4 com 30% de sacarose foram “esgarçados” e aderidos em lâminas revestidas com poli-L-lisina na concentração de 400mg/mL.

3.6. Anticorpos e neoglicoproteína

3.6.1. Primários - contra o RM (produzido por Anne Regnier-Vigouroux, Universidade de Heidelberg, Alemanha), Anti-S100 (monoclonal sub-unidade β Sigma Chemical, MO; 1:500), marcador de células de Schwann, anti-MHC classe II de rato (Santa Cruz, CA; 1:100).

3.6.2. Secundários - contra IgG de camundongo, conjugados a Cy3 (Sigma; 1:200) ou fluoresceína (Santa Cruz; 1:25), contra IgG de coelho, conjugados a Cy3 (Sigma; 1:300) ou fluoresceína (Santa Cruz; 1:25), contra IgG de coelho conjugado ao Alexa Fluor 405 (Molecular Probes), contra IgG de coelho conjugado à biotina (Kit biotina-avidina; 1:20).

3.6.3. Neoglicoproteína - Glicoproteína sintética Man-BSA-FITC (Sigma) que se liga especificamente à porção CRD-4 do RM.

3.7. Citometria de Fluxo

Uma monocamada de células de Schwann ou células ST88-14 aderidas em placas de Petri foram dissociadas através da exposição a 10mM de EDTA em PBS, pH 7,4 a 37°C por 10 min e mecanicamente após repetidas ressuspensões com pipetas Pasteur. Em seguida, as células foram lavadas em solução de Ringer e incubadas a 37°C por 1h com 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 μ g/mL da neoglicoproteína Manosil-soro albumina bovina conjugada fluoresceína (Man-BSA-

FITC, Sigma) diluída em solução de Ringer contendo 5mM de CaCl₂, 1% de BSA, 0.1% de saponina e 20mM de NH₄Cl. Após duas sucessivas lavagens em Ringer as células foram mantidas em gelo até a análise. Os controles foram obtidos incubando-se as células em 250mM de D-manose (Hespanhol e cols., 2005) ou em ~ 1,1 μM (50μg/mL) de peroxidase (HRP) diluída também em solução de Ringer contendo 5mM de CaCl₂, 1% de BSA, 0.1% de saponina e 20mM de NH₄Cl a 37°C por 40 min e em seguida foram lavadas e incubadas com 50 μg/mL da Man-BSA-FITC como descrito acima. Alguns experimentos foram executados com células levemente fixadas com 1% de paraformaldeído (PFA) em PBS a 4°C por 15min e então incubadas com Man-BSA-FITC como descrito a acima. As amostras foram analisadas em um aparelho Becton & Dickinson FACsCalibur (Mountain View, CA). O “gating” com a morfologia das células foi fixado, sendo coletados 10000 eventos para cada amostra. Os dados foram analisados pelo “software” WinMDI 2.8 (Seattle, WA).

3.8. Tratamento das Culturas com Interferon-gama e Dexametasona

Culturas de explantes de nervo ciático de ratos neonatos ou culturas de células de Schwann, macrófagos peritoneais e células ST88-14 foram incubadas com 0,1μg/mL de dexametasona (DM) ou com 100U/mL de interferon-gama (IFN-γ - SIGMA) por 18h a 37°C em meio Eagle suplementado com 10% SFB. Após o tratamento as culturas foram incubadas com 50 ou 100μg/mL da neoglicoproteína Man/BSA. Nos experimentos de colocalização do RM e moléculas MHC classe II as culturas de explantes com 7 dias de cultivo foram tratadas com DM ou IFN-γ e marcadas com o anticorpo monoclonal anti-MHC classe II de rato e em seguida incubadas com a neoglicoproteína Man/BSA a 37°C por 1h. Após incubação com a

neoglicoproteína, as células foram processadas para análises por citometria de fluxo (item 5) ou para microscopia confocal a laser CSLM Meta 510 (Zeiss).

3.9. Imuno-química e identificação de ligante do RM em células isoladas, culturas de explantes ou nervos “esgarçados”

As amostras (células isoladas, culturas de explantes ou nervos “esgarçados”) foram lavadas com 0,3% de PBS-Triton X-100 (5x de 5 min), em seguida foi feito o bloqueio das reações inespecíficas com 10% soro normal de cabra (NGS) em 0,3% de PBS-Triton por 1h. Após esse período, o material foi novamente lavado e incubado com o anticorpo primário (conforme listados no item 5.1) diluído em 0,3% de PBS-Triton / 1% de albumina de soro bovino (BSA), em pernoite. As amostras foram submetidas a novas lavagens com 0,3% de PBS-Triton (5x de 5 min), ao término das lavagens o material foi incubado com anticorpo secundário (conforme listados no item 5.2) diluído em 0,3% de PBS-Triton / 1% de BSA por 1h e em seguida lavadas em PBS pH 7,4 (5x de 5 min). As culturas foram marcadas com 50µg/mL da neoglicoproteína Man/BSA (conforme listada no item 5.3). Após esta incubação as amostras foram lavadas em PBS pH 7,4 e montadas em uma solução de p-fenilenodiamina em glicerol (5mg de fenilenodiamino em 500µl de PBS 0,15M, 3,5mL de glicerol e 1mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 8,9) e analisadas por microscopia de fluorescência e confocal.

3.10. Bioquímica para o RM

3.10.1. Extração de proteína

Culturas de células de Schwann, macrófagos peritoneais e células ST88-14 foram lavadas com PBS pH 7,4 (2x de 5min) sobre uma superfície gelada e, em seguida incubadas por 10 minutos com 200µl de tampão ripa (100µl de Triton X-100

a 1%; 1mL de Tris-HCL a 10mM pH 7,6; 100µl de NP-40 a 1%; 500µl de EDTA a 5mM; 0,01g de SDS a 0,1%; 100µl de NaCl a 150mM; em 10mL H₂O Mili-Q). Posteriormente, as células foram raspadas com o auxílio de um “cell scraper”. O lisado obtido foi agitado em um vortex (6x de 5 min) e centrifugado por 40 minutos a 14000 rpm a 4°C.

3.10.2. Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi efetuada através do kit baseado no ácido bicinconínico (BCA – Protein Assay Reagent, Pierce), tendo como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Para este procedimento os reagentes de trabalho foram mesclados de acordo com as instruções do fabricante: 25 partes do reagente MA; 24 partes do reagente MB e 1 parte do reagente MC.

Para a realização da curva padrão após o experimento foi preparada uma solução estoque de BSA. A curva padrão consisti em 12 partes de 0,5 µg/mL até 200 µg/mL de BSA. Foram adicionadas nas amostras do padrão, 150 µl do reagente de trabalho e completado até 300µl com 0,2% SDS. Para a dosagem de proteína dos extratos, foram utilizadas 150 µl do reagente de trabalho, 40µl de H₂O, 10 µl das amostras e 100 µl de SDS a 0,3%. Após 2 horas a 37°C, foi realizada a leitura das amostras no comprimento de onda 562 nm.

3.10.3. Eletroforese

As amostras foram fervidas por 5 minutos em tampão de amostra (0,5M de Tris-HCL pH 6,8; 0,8mL de Glicerol; 1,6mL de SDS a 10%; e 1% de azul de Bromofenol em 3,6mL H₂O). A separação das proteínas das amostras de interesse foi realizada por eletroforese em 7,5% de gel de poliacrilamida, na presença de SDS, de acordo com o método Laemmli (1970). O espaço entre as placas foi preenchido

com a solução do gel de separação (4mL de Acrilamida/Bisacrilamida a 30%; 2,5mL de Tris-HCL a 1,5 M pH 8,8; 100µl de SDS a 10%; 3,35mL de H₂O deionizada; 50µl de persulfato de amônia a 10% e 5µl de Temed) até o limite definido e recoberto cuidadosamente com H₂O deionizada. Depois da polimerização do gel (40 min, aproximadamente), a água foi desprezada e os espaços entre as placas foi secado com papel de filtro e preenchido com a solução do gel de empilhamento (665 µl de Acrilamida/Bisacrilamida a 30%; 1,25mL de Tris-HCL a 0,5M pH 6,8; 50µl de SDS a 10%; 3,05 mL de H₂O deionizada; 25µl de persulfato de amônia a 10% e 5µl de Temed) sobre o gel de separação. O pente foi inserido entre as placas e aguardada a polimerização.

3.10.3.1. Corrida

O pente foi cuidadosamente retirado do gel e as placas fixadas na cuba de corrida. Em seguida, a cuba foi preenchida com tampão de corrida (Bio-Rad) e aplicados nos "slots" 25µg de cada amostra. Por último, foram aplicados 5µl dos padrões de pesos moleculares (Sigma) completando-se o volume com tampão de amostra. A fonte foi ligada e ajustada para correr na amperagem constante de 25 mA/gel durante 40 minutos. O fronte de corrida foi acompanhado e a fonte desligada próximo ao término da corrida. Um dos géis foi corado com azul de Comassie para verificação das bandas, enquanto o outro, foi utilizado para a transferência das proteínas.

3.10.3.2. Transferência

As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, mediante corrente constante de 100 volts, durante 120 minutos, segundo protocolo da Bio-Rad.

3.10.4. “Immunoblotting” e “Overlay”

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram submetidas à reação para detecção do RM. As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução de bloqueio (2% de BSA diluído em PBS/Tween 20 a 0,05%) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação contínua e mantida em pernoite a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-cRM 1/1000 ou 2µg/mL de HRP-biotina diluídos em PBS/Tween 20 e mantidas em pernoite a 4°C, no caso da marcação com anti-cRM e, por 3h a 37°C, no caso da HRP-biotina. Após este período, as membranas foram lavadas com PBS/Tween por 4h com intervalo de 30 minutos entre cada troca do PBS/Tween. A membrana reagida com o anti-cRM, ao término das lavagens, foi incubada com o anticorpo secundário biotilado anti IgG de coelho 1/1000 por 1 hora, seguido de novas lavagens com PBS/Tween 20 (6x de 20min). Após este período, a membrana reagida com o anti-cMR ligado ao anticorpo secundário biotilado e a membrana reagida com a HRP-biotina foram incubadas com 0,04 µg/mL de extravidina conjugada a peroxidase por 40 min e lavadas com PBS/Tween 20 (6x de 5 min). A reação foi revelada pelo método WB-ECL através da impressão das bandas marcadas em um filme tipo Hyperfilm-ECL ou pela incubação das membranas com 0,03% de H₂O₂ usando o 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) como aceptor.

3.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.11.1. Inclusão em resina Epon

As amostras foram fixadas em diferentes tempos em 2,5% de glutaraldeído em 0.1M de tampão cacodilato, pH 7.2, com 2,5mM de CaCl_2 por 2 horas a temperatura ambiente; pós-fixadas com 1% de OsO_4 , desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em epon. Após polimerizado o material foi cortado (semifino e ultrafino) recolhido em grades de cobre de 300 mesh, contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente observados no microscópio eletrônico EM 10C da Zeiss.

3.11.2. Inclusão em resina Lowicryl

As amostras foram fixadas por 1h a 4°C em 4% de paraformaldeído com 0,1% de glutaraldeído (GA) e 0,2% de ácido pícrico diluídos em 0,1M tampão cacodilato com 3,5% de sacarose. Em seguida, lavadas com o mesmo tampão por 3 vezes/10 min cada; incubadas em PBS com cloreto de amônio 50mM por 30 min a 4°C e lavadas em PBS 3 vezes/10min cada. O material foi desidratado em bateria crescente de metanol 30%, 50% por 5 min cada a 4°C e metanol 70% e 90% por 7 min cada a (-10°C). Após a desidratação as células foram impregnadas na resina Lowicryl em metanol:Lowicryl 2:1 por 24h, metanol:Lowicryl 1:1 por 24h, metanol:Lowicryl 1:2 por 24h e Lowicryl puro por 14 dias. A seguir, o material foi embocado em Lowicryl puro por 5 dias a (-20°C) e mais 2 dias a temperatura ambiente.

3.11.3. Imunohistoquímica ultra-estrutural

Após o processamento e inclusão das amostras em resina Lowicryl, foram obtidos cortes ultrafinos recolhidos em grades de níquel. Os cortes foram hidratados em tampão salina (TBS - "tris saline buffer") por 3 vezes (10 min/cada) e

posteriormente incubados por 20 min em uma solução de NH_4Cl 50mM (bloqueio de aldeídos livres). Após 3 sucessivas lavagens (10 min/cada) em TBS contendo 4% albumina bovina e 1% de Tween 20. As grades contendo os cortes foram incubadas por 1h-37°C com o anticorpo primário (específico para o RM). Posteriormente, os cortes foram lavados e incubados por 20 min/37°C com o anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro coloidal de 15nm (proteína A/Au). Em seguida as amostras foram novamente lavadas em TBS contendo 4% albumina bovina e 1% de tween 20, e 2 vezes em água tridestilada deionizada. Após contrastação por 7 min em acetato de uranila as amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

3.11.4. Citoquímica Ultra-estrutural

Para a detecção ultra-estrutural dos receptores presentes na superfície de células ST88-14, as culturas foram incubadas com o ligante específico previamente acoplado a ouro coloidal (HRP-Au) diluído em PBS/BSA 1% contendo 5mM de CaCl_2 por 30 min a 4°C. Após os 30 min, parte das amostras foi fixada com 2,5% de GA e as demais mantidas por até 3h, com a temperatura elevada para 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram processadas como de rotina para microscopia eletrônica de transmissão.

RESULTADOS

Como premissa para o desenvolvimento desse trabalho, utilizamos o anticorpo anti-S100, um marcador específico de célula de Schwann, a fim de garantir que as culturas primárias obtidas a partir do nervo ciático e a linhagem celular ST88-14 eram constituídas das células alvo desta tese. Nossos resultados obtidos por microscopia correlativa de imagens geradas por microscopia de contraste de fase e por imunofluorescência demonstraram que aproximadamente 96% das células de culturas primárias foram marcadas pelo anticorpo anti-S100 (Fig. 6A) e que virtualmente todas as células ST88-14 apresentaram marcação (dado não mostrado). Desta forma, os objetivos propostos e os resultados obtidos passam a ser descritos como se segue:

4.1. Marcação de CS e células ST88-14 com neoglicoproteína manosilada

A incubação das células fixadas com man/BSA-FITC em meio contendo Ca^{2+} revelou uma evidente marcação distribuída por toda a superfície celular das CS de culturas primárias de nervo ciático (Fig. 6B). A omissão do anticorpo primário anti-S100 (Fig. 6D) ou a incubação com altas concentrações de D-manose (Fig. 6E) resultou na perda das respectivas marcações (ver também Fig. 6F).

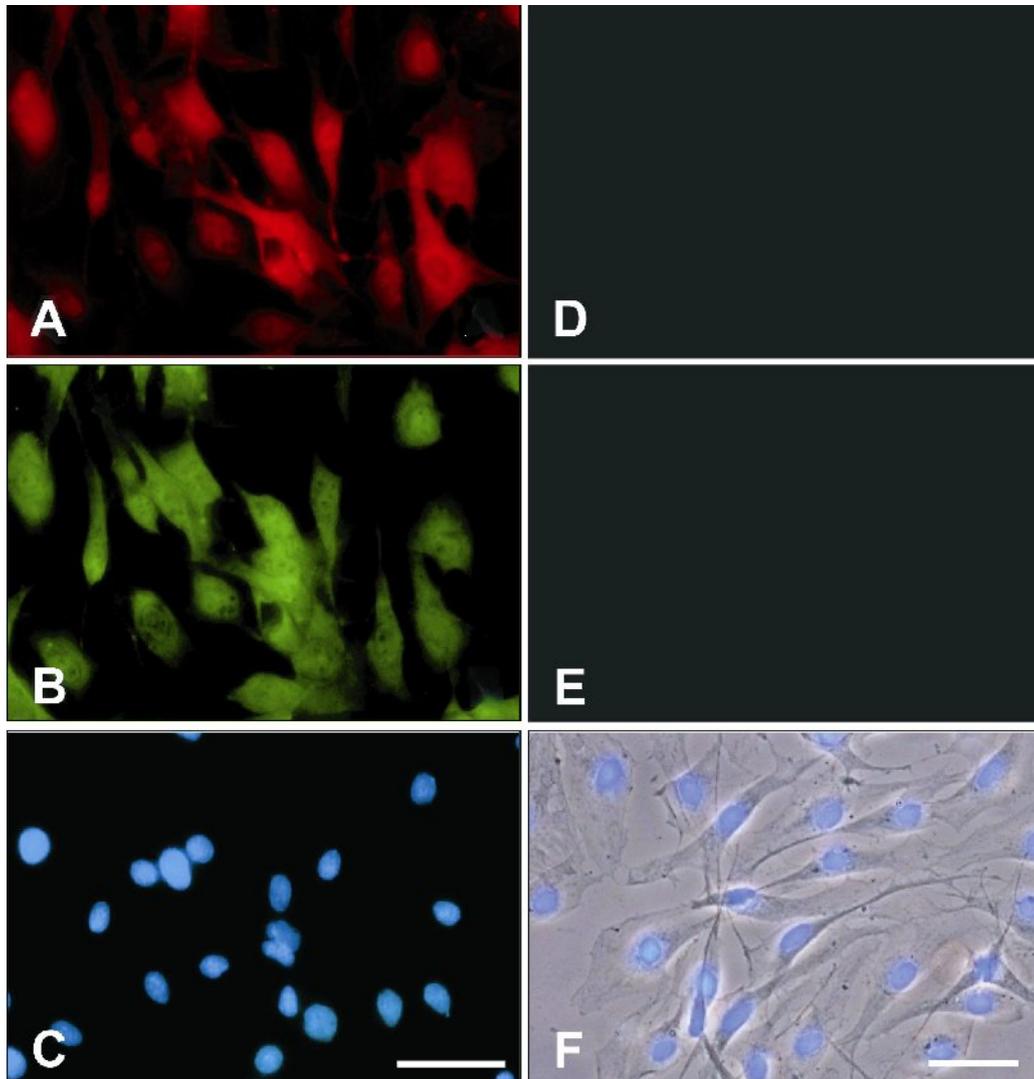


Figura 6. Microscopia de fluorescência mostrando a marcação com ligante do receptor para manose em células de Schwann de culturas primárias de nervo ciático. A: mostra a marcação das células com o anticorpo anti-S100 de cérebro revelada pelo anticorpo secundário conjugado ao Cy3. Em B: o mesmo campo marcado com a neoglicoproteína man/BSA-FITC. C: mostra os núcleos das células deste mesmo campo marcados com DAPI. D, E e F: mostram outro campo após a omissão de anti-S100 (D), incubação com 250 mM D-manose antes da marcação com man/BSA-FITC (E) e fusão da marcação do DAPI com contraste de fase. Barra = 20 μ m.

Para informações adicionais sobre a natureza de CS das células ST88-14 e também para confirmá-la com um modelo adequado para estudos fisiopatológicos das CS, as células ST88-14 foram marcadas com Man/BSA-FITC e com anticorpo anti-S100 e examinadas por microscopia confocal a laser (7A - 7L).

Células ST88-14 fixadas e incubadas com man/BSA-FITC, mostraram evidente marcação com distribuição ampla por toda a superfície celular (Fig. 7A) e também em domínios intracelulares (Fig. 7D e 7G). No máximo diâmetro do núcleo houve uma intensa marcação com man/BSA-FITC na região perinuclear (Fig. 7D). A marcação com o anticorpo anti-S100 concentrou-se predominantemente no citoplasma (Fig. 7E e 7H) e ausente na membrana plasmática (Fig. 7B). O merge da marcação com Man/BSA-FITC e S100 mostrou uma significativa colocalização destes marcadores (Fig. 7F e 7I) sugerindo um percentual intracelular importante de uma proteína ligante de manosil. Considerável sobreposição pixel a pixel de Man/BSA-FITC e S100 foi observada através das diversas seções de cortes ópticos na série z. O pré-tratamento das células ST88-14 com 250mM D-manose (Fig. 7J, Cf. marcação do núcleo na Fig. 7L) ou $\sim 1.1 \mu\text{M}$ ($50\mu\text{g/mL}$) HRP (não mostrado) resultou na perda da marcação com a Man/BSA-FITC. Não foram detectadas marcações inespecíficas com o anticorpo secundário em células controle (Fig. 7K).

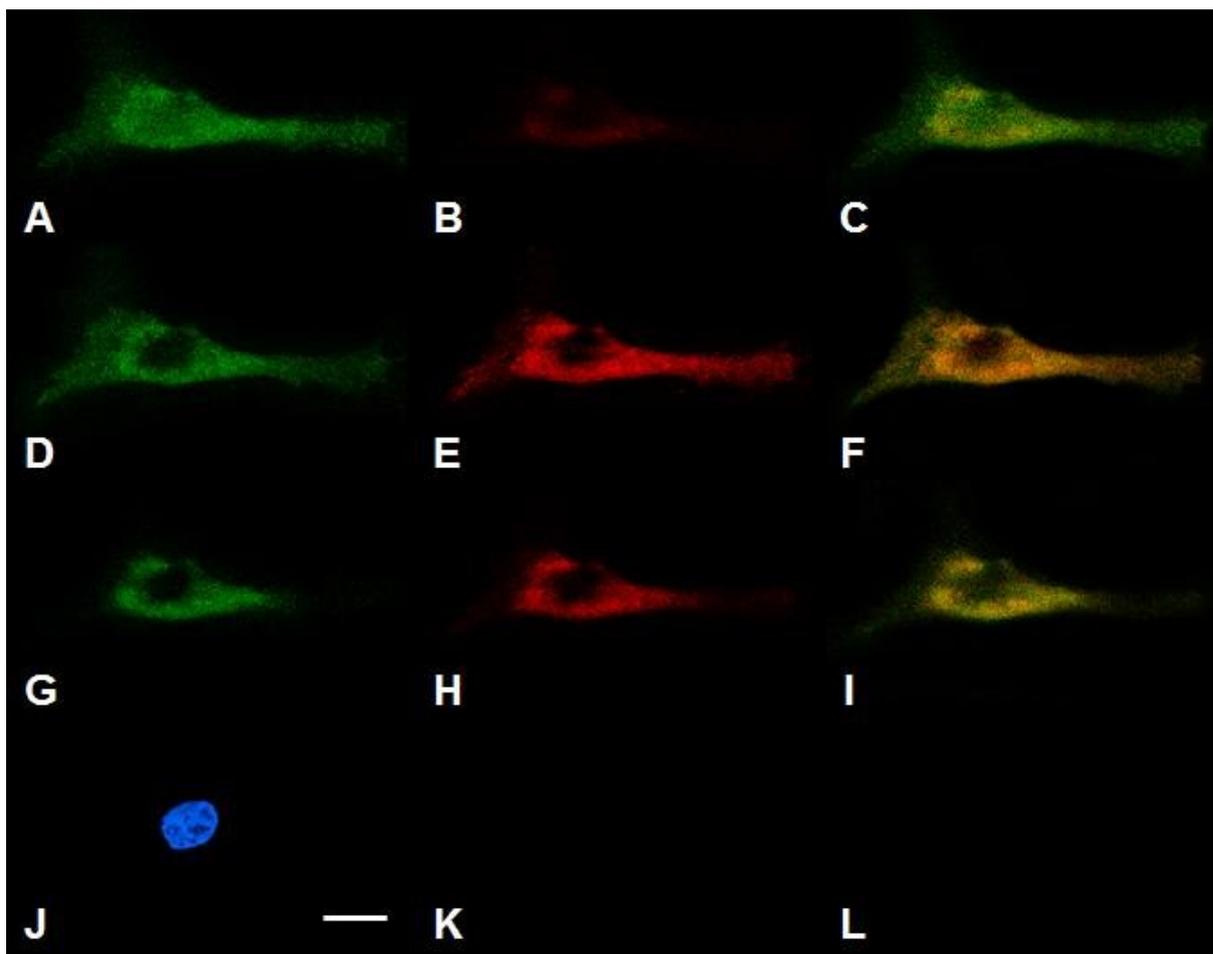


Figura 7. Imagens de microscopia confocal mostrando a marcação com ligante do receptor para manose e S100 de cérebro em uma linhagem tumoral humana de Schwannoma (ST88-14). As três linhas a partir do topo mostram imagens de uma célula tomada de diferentes cortes ópticos selecionados da série-z. Colunas mostram a marcação com man/BSA-FITC (coluna da esquerda), imunomarcação com S100 (coluna do meio) e a colocalização entre as marcações (coluna da direita). A linha do topo representa um corte óptico próximo à superfície livre da membrana enquanto as duas linhas seguintes mostram dois planos através do núcleo (máximo diâmetro do núcleo em D, E e F). A linha da base mostra outra célula marcada com TO-PRO (J), reagidas apenas com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3 (K) e incubada com man/BSA-FITC em presença de D-manose (L). Estes dados são representativos de cinco experimentos separados. Barra (para A-L) = 20 μ m.

4.2. Citometria de Fluxo para a marcação de CS e células ST88-14 com neoglicoproteína manosilada.

Os ensaios de saturação da captação da neoglicoproteína man/BSA-FITC em células ST88-14 e CS por citometria de fluxo mostraram um aumento gradual de receptores marcados de maneira concentração-dependente de neoglicoproteína (dado não mostrado). O RM foi eficazmente saturado em células ST88-14 e em CS

na concentração de 50 μ g/mL de man/BSA-FITC (Fig. 8A e 8B). A marcação com Man/BSA-FITC revelou 62% de células ST88-14 positivas (Fig. 8A) enquanto o percentual de SC positivas foi de 90% (Fig. 8B). A pré-incubação de células ST88-14 e SC com ~ 1,1 μ M (50 μ g/mL) HRP (dado não mostrado) ou com 250mM D-manose inibiu a ligação de Man/BSA-FITC (Fig. 8A). Os resultados foram essencialmente idênticos quando as células foram primeiro fixadas e então marcadas com Man/BSA-FITC, porém a intensidade de marcação foi mais fraca (dados não mostrados) em comparação ao encontrado com a marcação das células vivas.

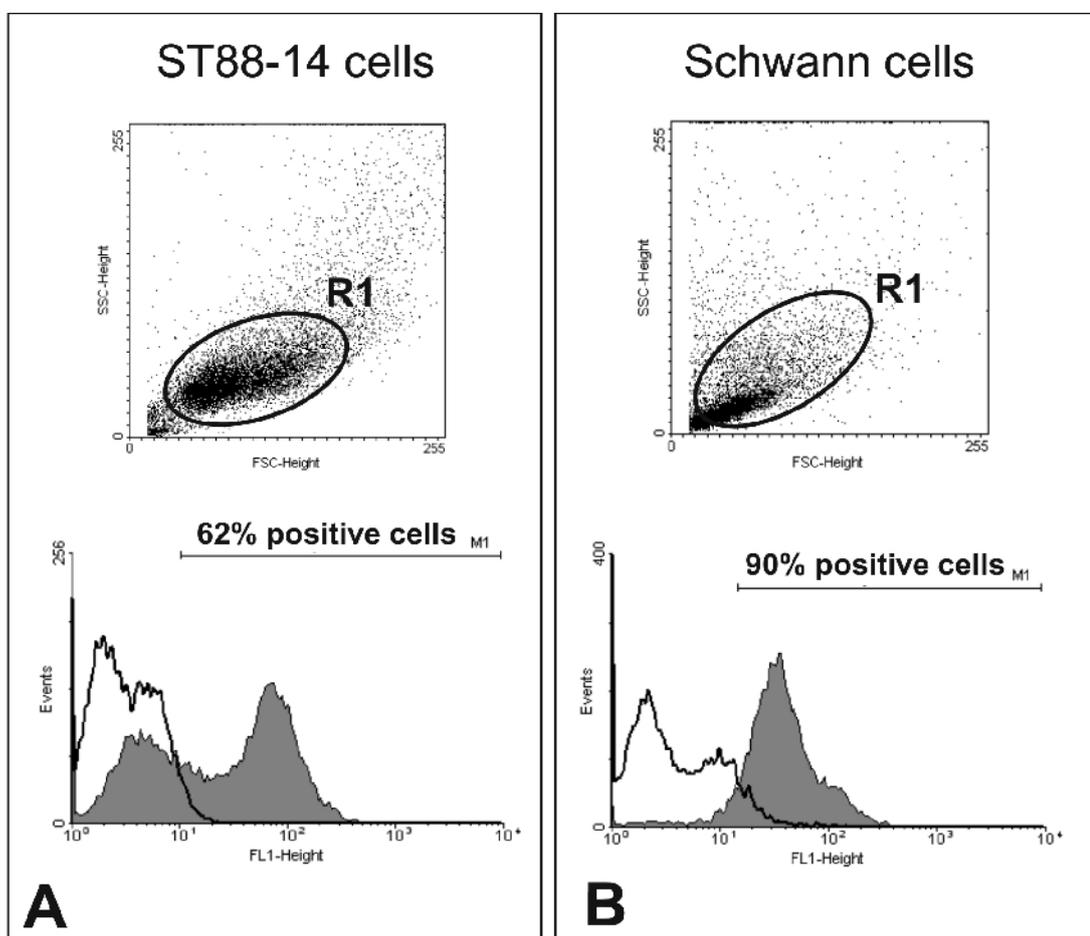


Figura 8. Marcação com ligante do receptor para manose em uma linhagem tumoral humana de Schwannoma (ST88-14) e em células de Schwann de culturas primárias (CS). A-B: Análise por citometria de fluxo da captação da man/BSA-FITC nas células ST88-14 (A) e CS (B). As análises foram realizadas nas regiões especificadas (R1). As células foram incubadas com man/BSA-FITC na concentração de 50 μ g/mL (histograma com preenchimento) ou na mesma concentração em células pré-incubadas com D-manose por 40 min (histograma sem preenchimento). A e B: mostram 62% e 90% de células ST88-14 e CS positivas para Man/BSA-FITC, respectivamente. Estes dados são representativos de três experimentos separados.

4.3. Células ST88-14 internalizam o ligante manosilado HRP

Para o estudo do papel funcional do RM de CS na endocitose mediada pelo receptor, as culturas de ST88-14 foram incubadas com o ligante manosilado HRP acoplado ao ouro coloidal e avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. A incubação das células com HRP/Au a 4°C por 40 min, seguida de lavagem e fixação, resultou na evidência de numerosas partículas aderidas sobre a superfície celular (Fig. 9A). O destino intracelular da HRP/Au foi acompanhado após lavagem das culturas com Ringer para a retirada de partículas não aderidas, seguida da elevação da temperatura para 37°C. Após incubação das células por 1h com HRP-Au, algumas partículas foram encontradas ainda aderidas à superfície celular, enquanto outras foram visualizadas nas invaginações da membrana, bem como no interior de pequenas vesículas próximas a face interna da membrana plasmática (Fig. 9B). Após 3h de incubação, não foram mais encontradas partículas aderidas à membrana, porém foi possível observar várias vesículas contendo partículas do complexo HRP-Au dispersas pelo citoplasma (Fig. 9C). A especificidade da ligação foi testada pela incubação das culturas com HRP/Au em presença de 250 mM D-manose, o que resultou em substancial redução no número de partículas aderidas (dados não mostrado).

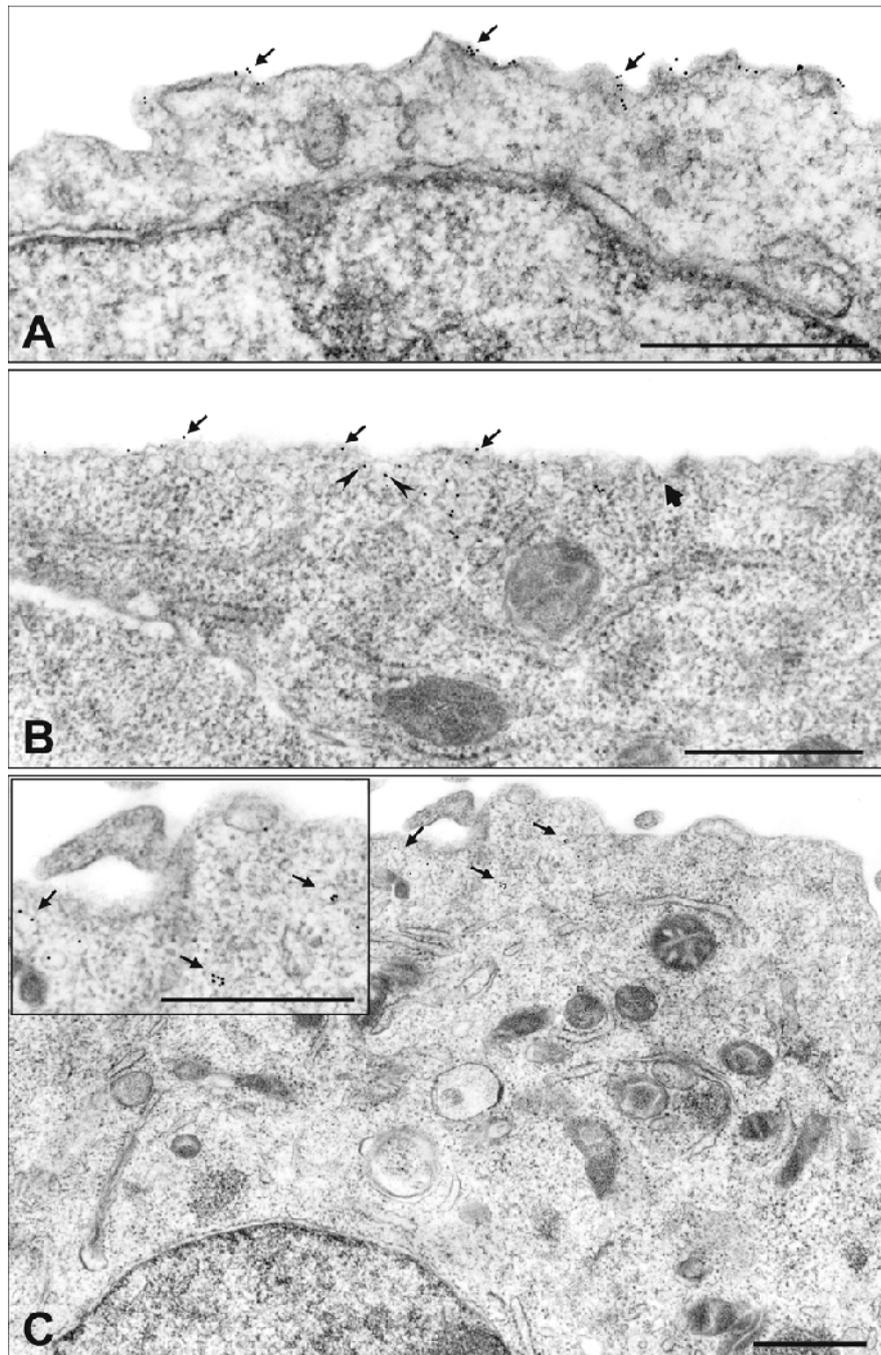


Figura 9. Análise ultra-estrutural da endocitose da HRP com características de ocorrer via receptor para manose em células ST88-14. A: mostra numerosas partículas de HRP/Au restritas à membrana plasmática de uma célula ST88-14 após incubação a 4°C por 40 min com o ligante. Em B: após lavagem e aumento gradual da temperatura até 37°C por 1h, as partículas de ouro foram encontradas ainda aderidas à superfície celular (setas) e, em numerosas invaginações da membrana (setas largas), bem como em pequenas vesículas próxima a face citoplasmática da membrana plasmática (cabeças de seta). Com o tempo de 3h pós-incubação a 37°C com HRP/Au, virtualmente todas as partículas são encontradas no interior de pequenas vesículas (setas). Inserido mostra em maior aumento, detalhe das vesículas concentrando numerosas partículas de HRP/Au. Barras = 0,5μm.

4.4. Internalização de neoglicoproteína manosilada por CS é regulada por imunomoduladores

A regulação do MR foi testada pelo tratamento das CS com mediadores de função imune. As culturas primárias de CS foram estimuladas por 18 h com interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) ou dexametasona (DM). Após este período a captação da Man/BSA-FITC foi determinada pela análise por citometria de fluxo (Fig. 10). A incubação com DM induziu um substancial aumento no sinal de fluorescência das células marcadas com Man/BSA-FITC (média geométrica - Gmean: 36.10 ± 0.71) em comparação com as células controle não estimuladas (Gmean: 21.31 ± 0.45). Em contraste, o tratamento com $\text{IFN-}\gamma$ induziu a redução no sinal de fluorescência (Gmean: 11.98 ± 0.11) em comparação as mesmas células controle não estimuladas (Gmean: 21.31 ± 0.45).

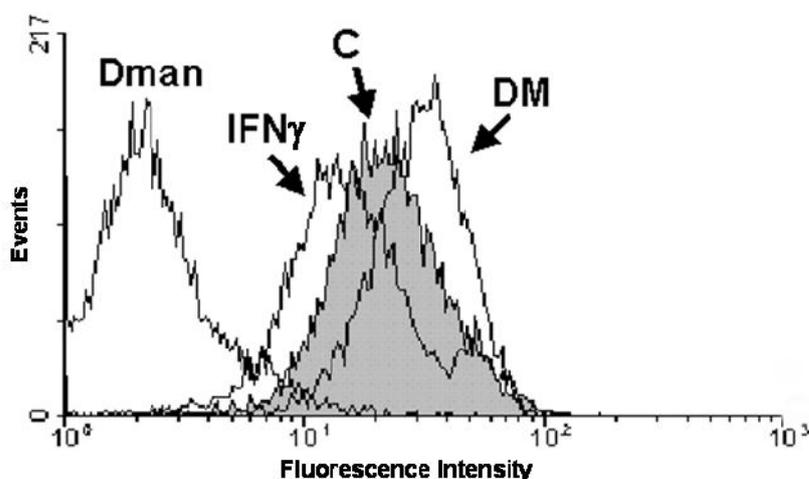


Figura 10. Ensaio por citometria de fluxo mostrando a influência dos moduladores do RM interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) e dexametasona (DM) na captação da man/BSA-FITC por CS de culturas primárias. Células pré-incubadas com $\text{IFN-}\gamma$ ou DM por 18h ou mantidas sem tratamento (C). Todas as células foram incubadas com $50 \mu\text{g/mL}$ man/BSA-FITC, sendo os controles obtidos pela incubação prévia a marcação com a neoglicoproteína com 250mM D-manose (D-manose) por 40 min. Histograma mostra que o tratamento com $\text{IFN-}\gamma$ reduziu a expressão basal do RM de CS em 42%, sendo que o tratamento nas mesmas condições com a DM induziu um aumento de 71%. Os dados são representativos da média geométrica de três experimentos em separados.

4.5. O RM colocaliza com moléculas MHC classe II em sítios intracelulares de CS.

Análise por microscopia confocal de culturas de explantes de nervos duplamente marcados para o RM e MHC classe II revelou a colocalização destes dois marcadores em sítios intracelulares de células identificadas fenotipicamente como CS através da marcação com S100 (Fig. 11A). Nas culturas previamente tratadas por 18h com INF- γ pontos em amarelo resultantes da colocalização pixel a pixel da neoglicoproteína marcada com FITC e o anticorpo anti-MHC classe II revelado pelo Cy3 foram observados no citoplasma das CS, concentrados, principalmente em domínios próximos ao núcleo (Fig. 11B). O MHC classe II não foi detectado nas culturas de explantes mantidas sem tratamento ou tratadas pela DM (dados não mostrados). A incubação com o isotipo controle para o MHC classe II e a incubação das culturas em presença de 250 mM D-manose resultou na perda das respectivas marcações em SC reveladas pelo anticorpo anti-S100 e pelo anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 405 (dados não mostrados).

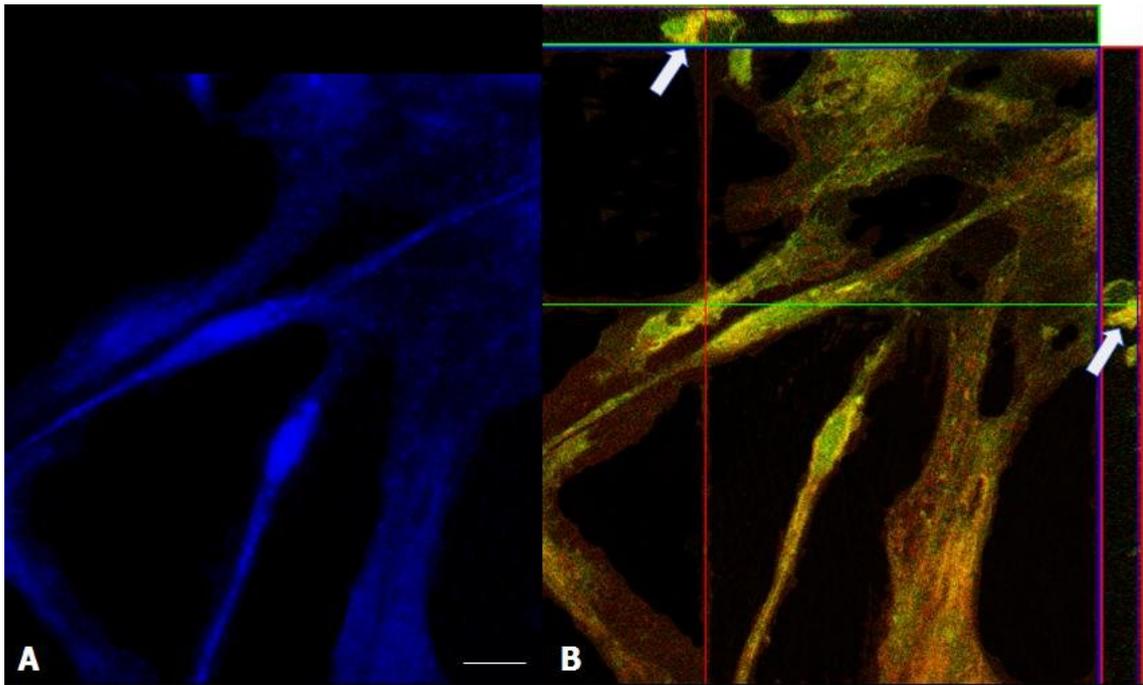


Figura 11. Análise por microscopia confocal mostrando a colocalização do ligante de RM e MHC classe II em CS egressas de explantes de nervo ciático tratados por 18h com $\text{INF-}\gamma$. Em A: CS marcadas pelo anticorpo anti-S100 de cérebro e reveladas pelo anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 405. B: pontos em amarelo próximos ao núcleo de CS são resultantes da colocalização pixel a pixel da neoglicoproteína marcada com FITC e o anticorpo anti-MHC classe II revelado pelo Cy3. Setas em B apontam a colocalização dos dois marcadores em regiões do citoplasma próximas ao núcleo da CS. Estes dados são representativos de três experimentos separados. Barra = $25\mu\text{m}$.

4.6. Células de Schwann, células ST88-14 e macrófagos expressam uma proteína de mesmo peso molecular que se liga a HRP e ao anticorpo anti-RM

Os ensaios de “overlay” usando a HRP como ligante permitiu a identificação de uma única banda de aproximadamente 180 kDa em extratos de CS, células ST88-14 e em macrófagos peritoneais (Fig. 12).

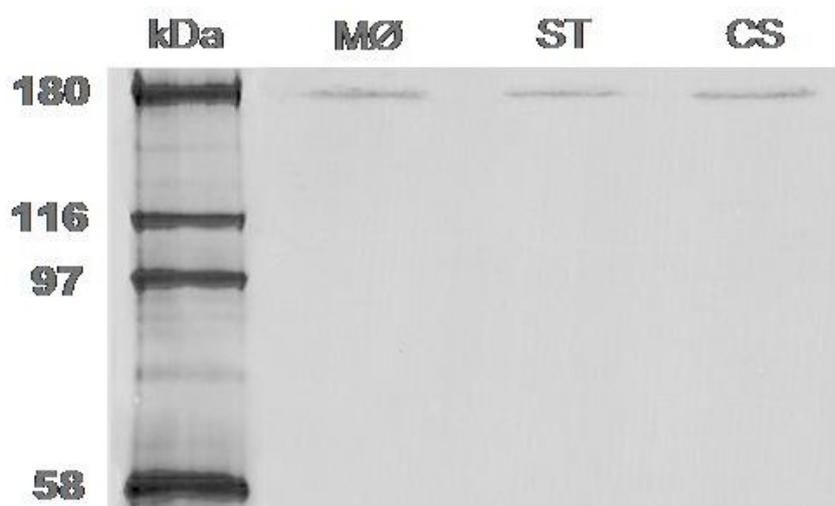


Figura 12. Ensaio de “overlay” mostrando a ligação da HRP a uma proteína de 180 kDa de extratos de proteínas de CS primárias, macrófagos peritoneais e células ST88-14. As proteínas de extratos totais das culturas foram separadas em 8.5 % de SDS-PAGE em condições não redutoras e imobilizadas em membranas de nitrocelulose. As membranas foram reagidas com 2,0µg/mL de HRP-biotinilada seguida de incubação com extravidina-peroxidase e revelada com H₂O₂ e 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). Bandas de aproximadamente 180 kDa são observadas em todas as culturas após revelação da reação. Estes dados são representativos de três experimentos separados.

Os ensaios por “Immunoblotting” com o anticorpo policlonal para região C terminal do RM confirmou a proteína de 180 kDa que se liga a HRP dos extratos de SC e células ST88-14 como semelhante ao RM de macrófagos (Fig. 13).

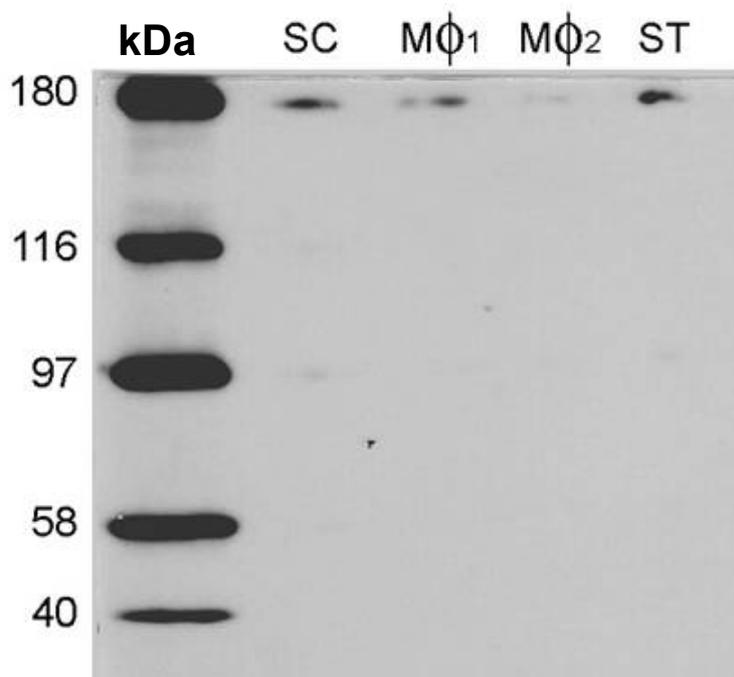


Figura 13. Análise por “western blot” mostrando a expressão do RM *in vitro*. As proteínas de extratos totais das culturas de células de Schwann (CS – 25µg), células ST88-14 (ST – 25µg) e macrófagos (MØ1 – 25µg; MØ2 – 6µg) foram aplicadas e separadas em 7.5 % de SDS-PAGE em condições não redutoras, imobilizadas em membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal anti-RM. A reação com o secundário HRP foi revelada pelo método WB-ECL através da impressão das bandas marcadas em um filme tipo Hyperfilm-ECL. Bandas de aproximadamente 180 kDa são observadas em todas as culturas após revelação da reação. Estes dados são representativos de dois experimentos separados.

4.7. Imunocitoquímica para o RM de CS e Células ST88-14

Ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-RM confirmou o RM como responsável pelo reconhecimento de ligantes manosilados nas culturas de CS primárias (Fig. 14A) e células ST88-14 (Fig. 15A). Em ambos os tipos celulares o RM foi localizado na superfície celular e também em regiões do citoplasma próximos ao núcleo (Fig. 14A e 14B e Fig. 15A e 15B). A omissão do anticorpo primário e incubação com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3 resultou em perda da marcação (Fig. 14C e 14D e Fig. 15C e 15D).

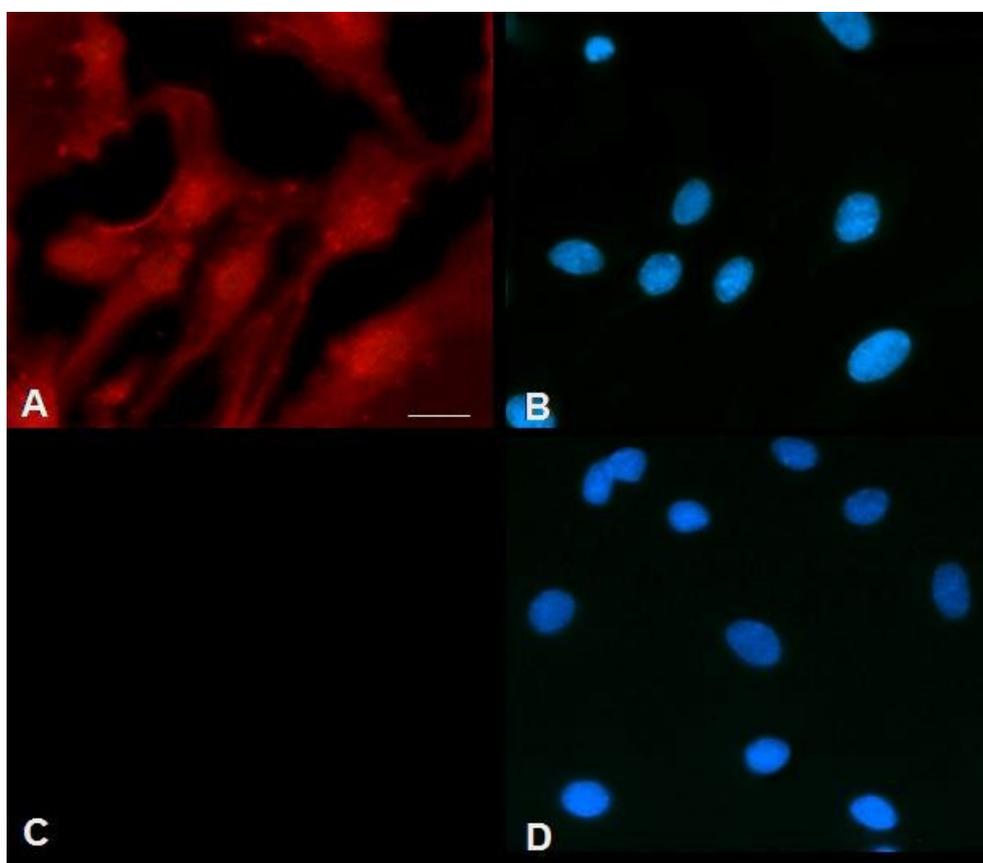


Figura 14. Microscopia de fluorescência mostrando a imunoreatividade para o RM em CS. A: mostra células cultivadas e incubadas com o anticorpo policlonal anti-RM e o anticorpo secundário conjugado ao Cy3. B e D: o núcleo das células está corado pelo DAPI. C: Omissão do anticorpo primário e incubação com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3. Estes dados são representativos de três experimentos separados. Bar = 20µm.

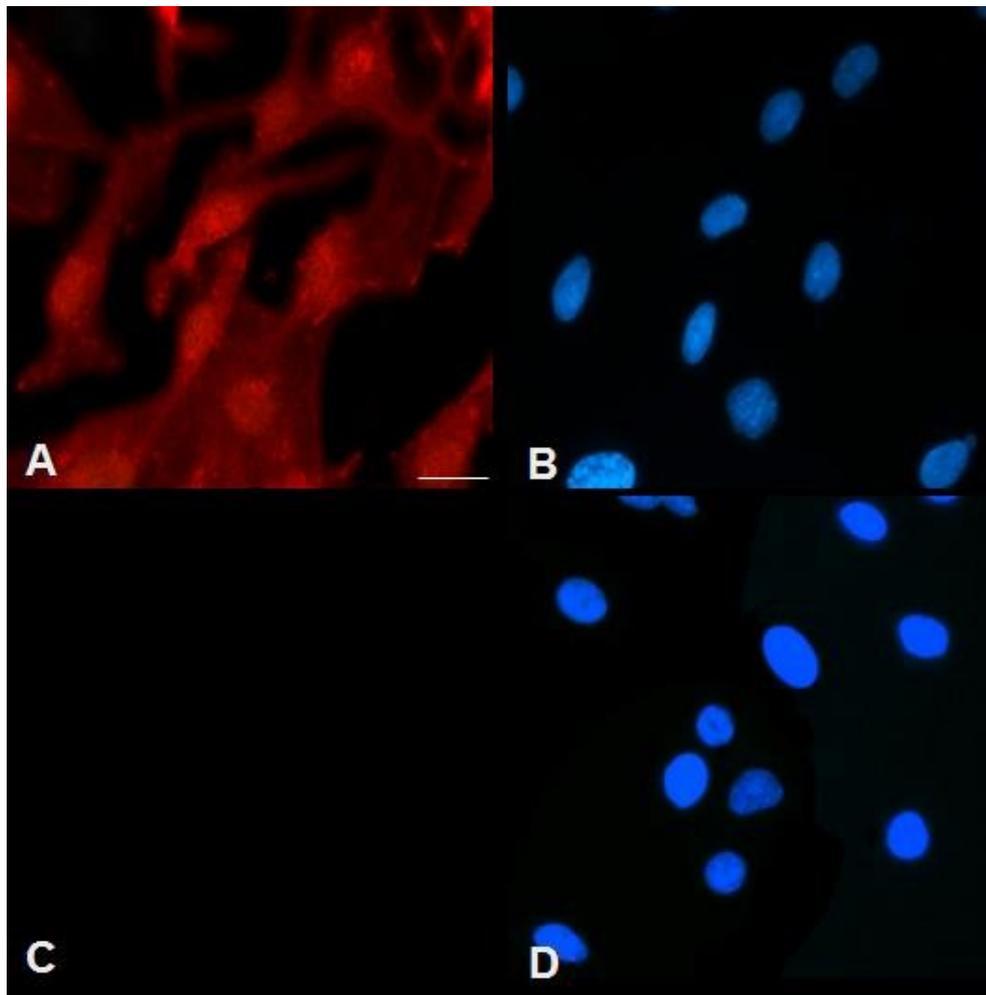


Figura 15. Microscopia de fluorescência mostrando a imunorreatividade para o RM em células ST88-14. A: mostra células cultivadas e incubadas com o anticorpo policlonal anti-RM e o anticorpo secundário conjugado ao Cy3. B e D: o núcleo das células está corado pelo DAPI. C: Omissão do anticorpo primário e incubação das células com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3. Estes dados são representativos de três experimentos separados. Bar = 20 μ m.

4.8. Marcação *in situ* do RM de SC

Com o objetivo de investigar a ocorrência *in situ* do RM em CS, ensaios de imunomarcação do RM foram realizados em preparações para microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Em nossas preparações para microscopia de fluorescência e confocal analisamos a expressão constitutiva do RM em CS de fibras isoladas por “esgarçamento”. O RM foi localizado nas regiões para-nodais concentrados, principalmente, nas áreas de mielina não-compacta como o citoplasma das alças terminais das CS (Fig. 16A). A ocorrência de ligações inespecíficas foi testada com a omissão do anticorpo primário e incubação com o secundário conjugado ao Cy3, a qual resultou na ausência de marcação (Fig. 16B).

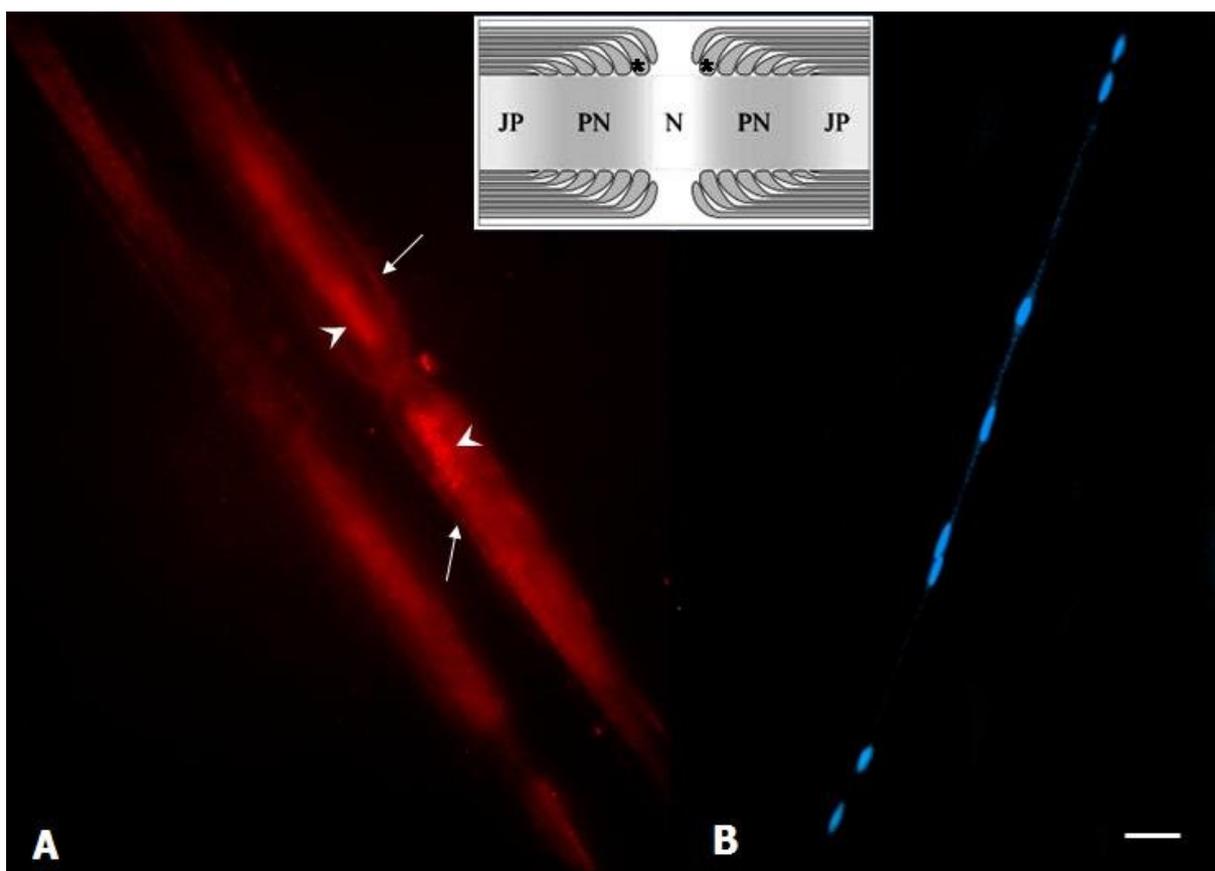


Figura 16. Nervo ciático de rato adulto com fibras isoladas por “esgarçamento” mostrando imunorreatividade para o anticorpo policlonal anti-RM. Notar a marcação do RM em regiões da membrana externa (setas) e também nas regiões para-nodais, concentrados predominantemente em regiões topograficamente homólogas as alças terminais de duas CS (cabeças de setas). B: omissão do anticorpo primário e incubação das células com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3. Núcleo das células em B estão corados pelo DAPI. Barra = 30 μ m.

Nas preparações analisadas por microscopia confocal detectamos marcações para o RM próximos ao núcleo de CS bem como na membrana externa e interna em contato com o axolema. Não foram detectadas marcações na região axonal (Fig.17).

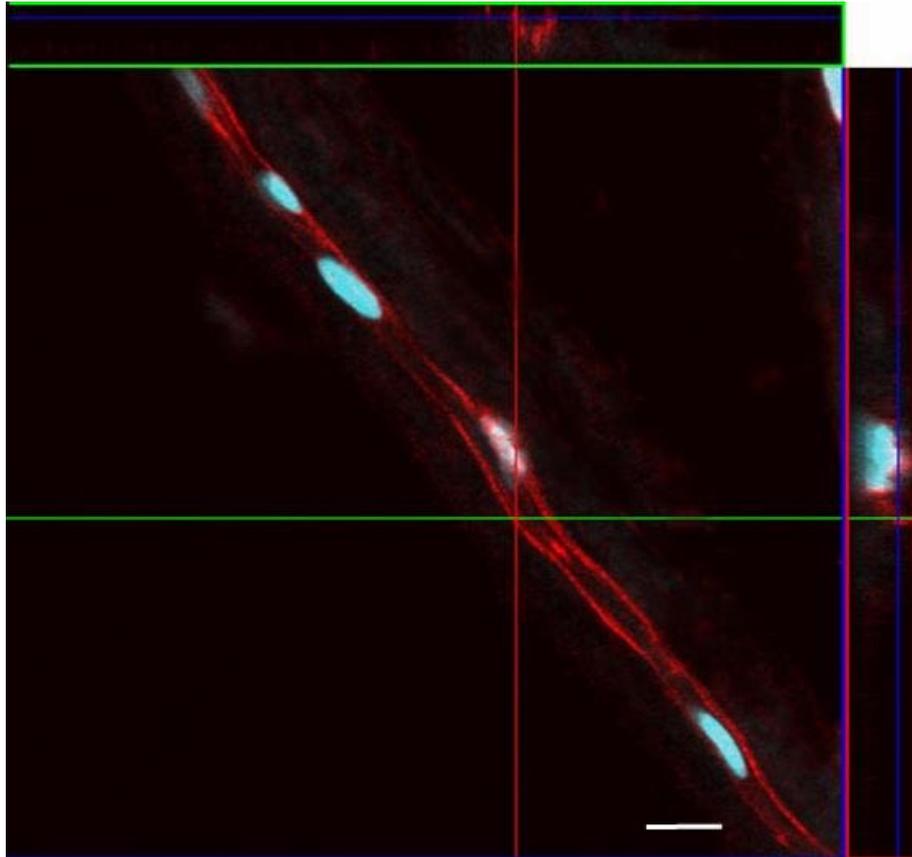


Figura 17. Análise por microscopia confocal de nervo ciático de rato adulto com fibras isoladas por “esgarçamento” e reagidas com o anticorpo policlonal anti-RM. Notar a marcação do RM em regiões da membrana externa e interna e também em regiões próximas ao núcleo das CS. Barra = 25 μ m.

Para o estudo morfológico ultra-estrutural do nervo ciático as preparações foram processadas como de rotina para microscopia eletrônica de transmissão, com fixação primária em GA, pós-fixação em OsO₄ e inclusão em Epon. Estas análises permitiram a identificação morfológica das CS mielinizantes e não-mielinizantes (Fig. 18), bem como estruturas e outras populações celulares características do nervo (Fig. 18).



Figura 18. Seção transversal de nervo ciático de rato adulto fixado com ósmio, incluído em resina “Epon” e contrastado com citrato de chumbo e acetato de uranila. Setas apontam células de Schwann não-mielinizantes e cabeças de setas apontam células de Schwann mielinizantes. a = axônio. Barra = 1µm.

Para ensaios imunohistoquímico as preparações de nervo ciático foram incluídas na resina hidrofílica Lowicryl e cortadas transversalmente. Após reação dos cortes ultrafinos com anticorpo anti-cMR e revelação pela proteína A ouro coloidal foi observada uma intensa marcação do RM nas CS identificadas morfológicamente como mielinizantes e não-mielinizantes (Fig. 19 e Fig. 20 comparar com Fig. 18). Em ambos os fenótipos, grandes quantidades de partículas de ouro foram encontradas distribuídas por todo o citoplasma das CS, sendo raramente encontradas no interior dos axônios tanto mielínicos quanto amielínicos (Fig. 19A e 19B e Fig. 20A, 20B e 20C). Curiosamente, nas CS não-mielinizantes (Fig. 19A e 19B) numerosas partículas foram encontradas na membrana interna das CS circundando o axolema de fibras amielínicas (Fig. 19B). No caso das CS mielinizantes (Fig. 20A, 20B e 20C) m número reduzido de partículas foi encontrado nas regiões da mielina compacta (Fig. 20C).

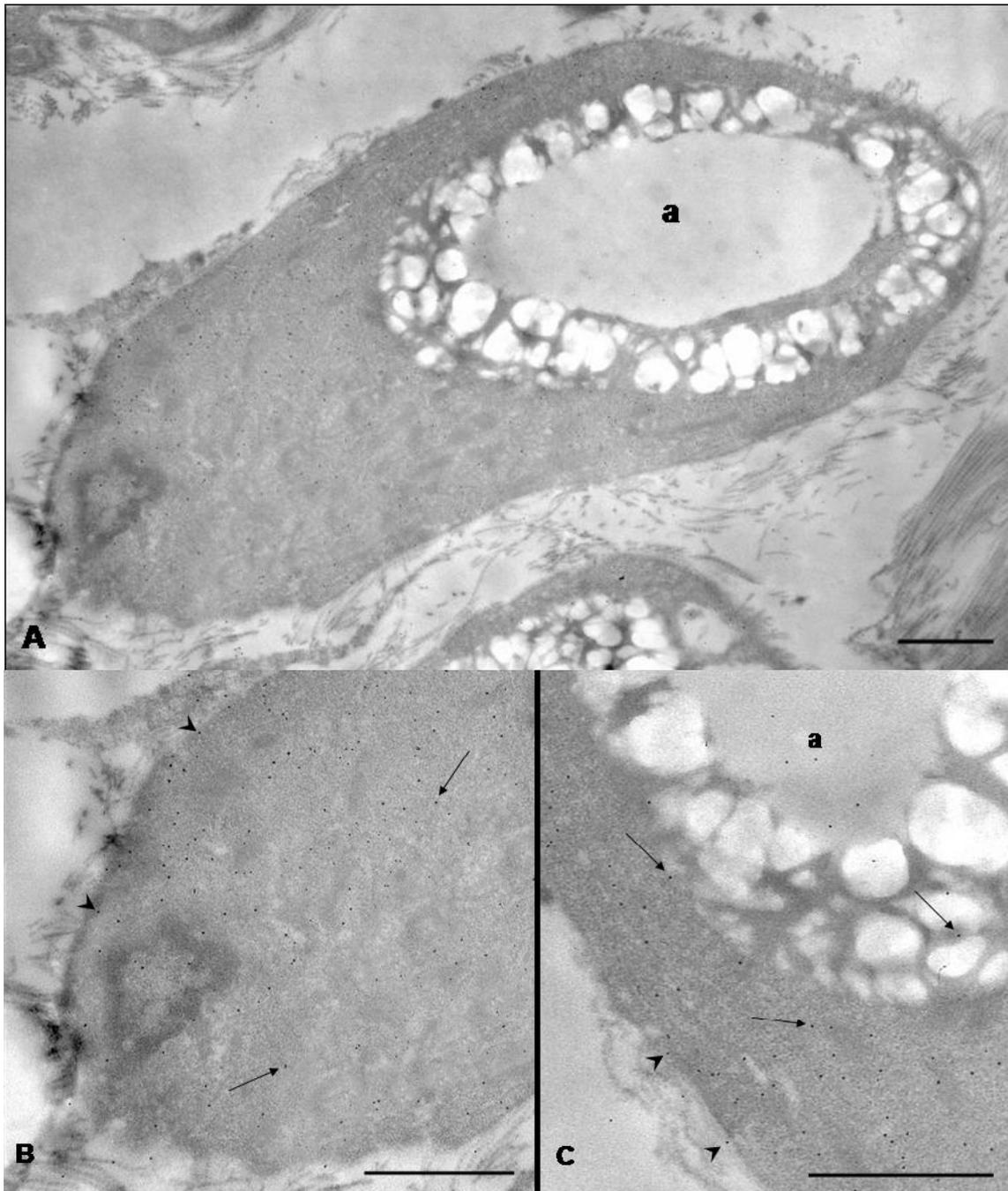


Figura 19. Seção transversal de nervo ciático de rato adulto incluído em resina hidrofílica “Lowicryl”. O RM foi detectado *in situ* através da reação de cortes ultra-finos reagidos com o anticorpo anti-RM e Proteína A acoplada à ouro coloidal e examinados à microscopia eletrônica de transmissão. A: partículas de ouro são vistas distribuídas na membrana externa (cabeça de seta) e por todo o citoplasma (seta) de uma CS mielinizante. Em B notar em maior aumento a distribuição das partículas de ouro na membrana externa e citoplasma de uma região de CS indicada pelo asterisco à esquerda em A. Em C notar detalhes de uma região de CS referente ao asterisco da direita em A indicando a localização ocasional de partículas de ouro em regiões de mielina compacta possivelmente extraída durante o processamento das amostras na ausência de fixação pelo ósmio. a = axônio. Barras = 1 μ m.

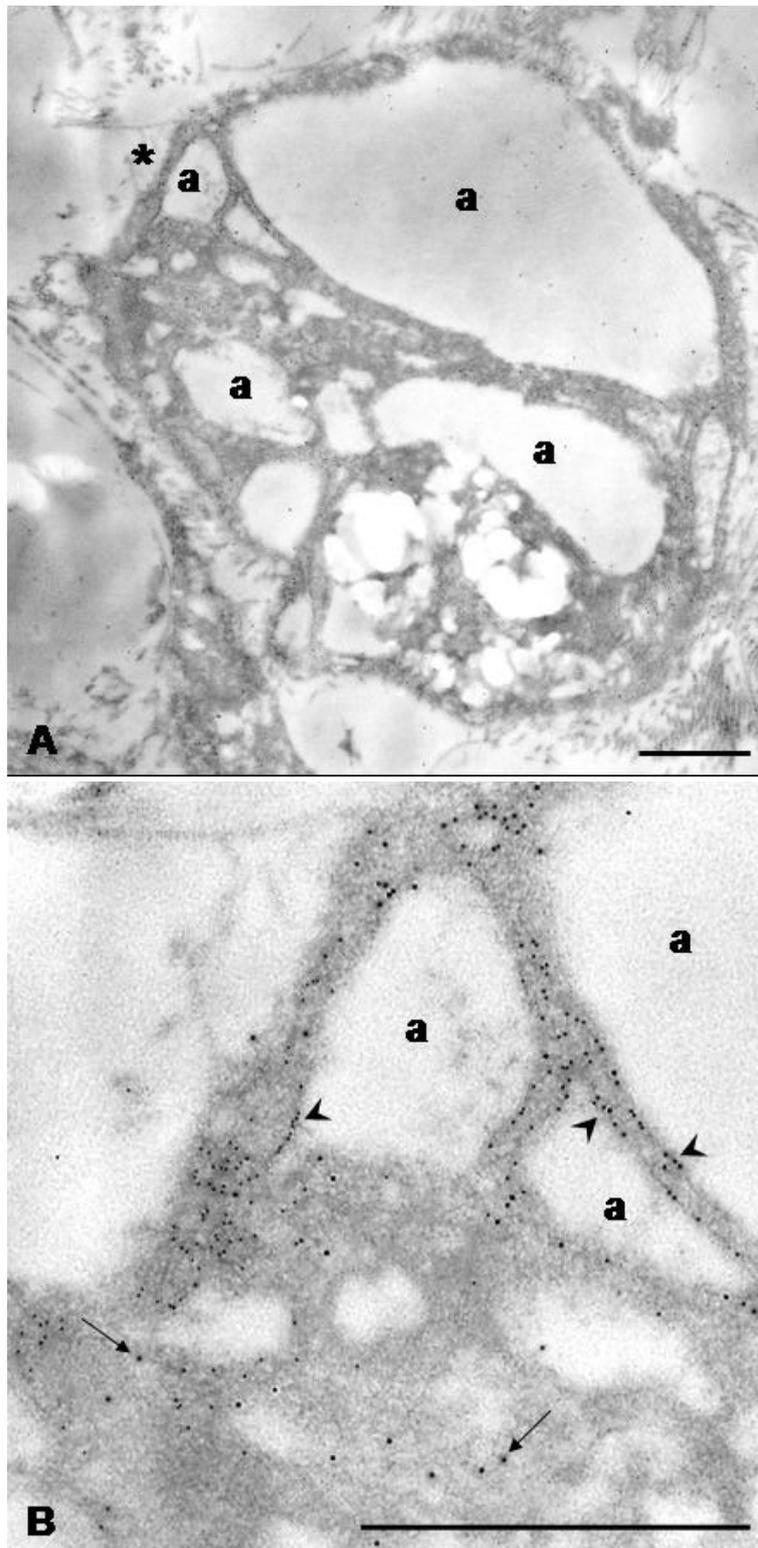


Figura 20. Seção transversal de nervo ciático de rato adulto incluído em resina hidrofílica "Lowicryl". O RM foi detectado *in situ* através da reação de cortes ultra-finos reagidos com o anticorpo anti-RM e proteína A acoplada a ouro coloidal e examinados à microscopia eletrônica de transmissão. A e B: partículas de ouro são vistas distribuídas por todo citoplasma de uma CS não-mielinizante (setas em B) Em B notar detalhes de uma região de CS referente ao asterisco em A indicando a localização de partículas de ouro na membrana interna da CS alinhadas e circundando o axolema (cabeças de setas em B). a = axônio. Barras = 0,5 μ m.

No entanto, devido a limitações técnicas durante o processamento das amostras, principalmente pela ausência da fixação com ósmio, não foi possível determinar, se esta baixa marcação foi ocasionada por extrações durante o processamento das amostras, comprometendo a conservação dos componentes lipídicos. Algumas partículas dispersas na região endoneural também foram observadas, presumivelmente, provenientes de fibroblastos endoneurais expressando o RM. A ocorrência de ligações inespecíficas foi testada com a omissão do anticorpo primário e incubação com a proteína A conjugada a ouro coloidal, a qual resultou na ausência de marcação (Fig. 21).

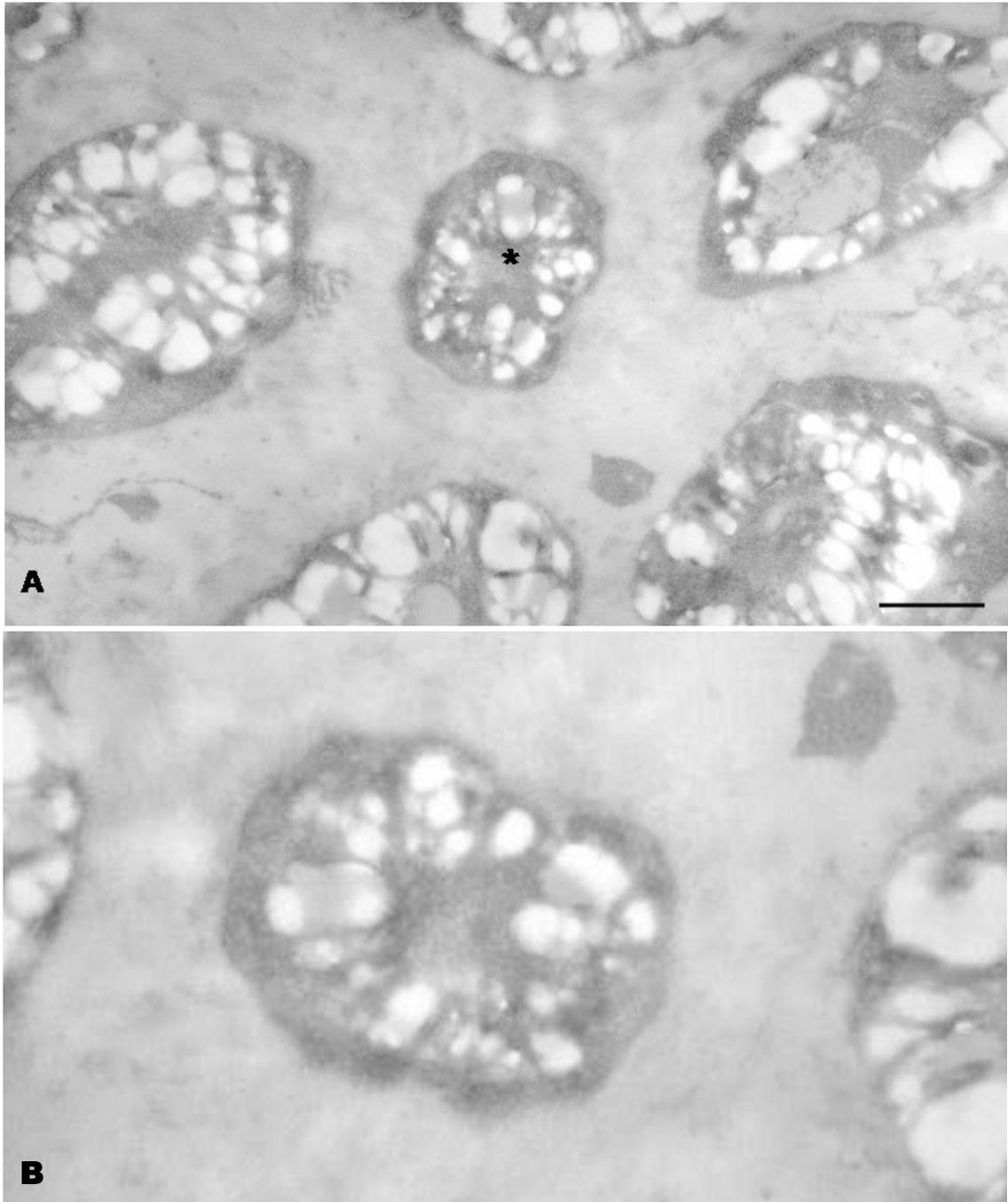


Figura 21. Seção transversal de nervo ciático de rato adulto incluído em resina hidrofílica “Lowicryl”. A e B: mostram a ausência de marcação após a omissão do anticorpo anti-RM e incubação com proteína A acoplada a ouro coloidal. Em B em maior aumento uma CS mielinizante mostra a ausência de partículas de ouro. Barra = 1 μ m.

DISCUSSÃO

Nos últimos 25 anos pouco mais de 100 artigos foram publicados abordando diretamente as funções imunológicas das CS (Zalewski e Silvers, 1980; Karanth e cols., 2006; revisto em Constantin e cols., 1999; Gold e cols., 1999; Wohlleben e cols., 1999; Lewis, 2005). Devido a pouca atenção dada a este tópico, há questões ainda obscuras sobre o curso de distúrbios fisiopatológicos do SNP. Este fato, juntamente com problemas atuais sobre terapias celulares envolvendo transplantes de CS em regiões do SNC, tornam imperiosa a compreensão, pelo menos parcial, de algumas das propriedades imunologicamente ativas das CS. Nesta linha de pensamento, nós nos propusemos a descrever, em CS de culturas primárias e em CS oriundas de uma linhagem tumoral humana de Schwannoma, a expressão e modulação do RM, um receptor do sistema imune inato freqüentemente considerado como envolvido na depuração homeostática, defesa e reparo tecidual (Martinez-Pomares e cols., 2001; Lee e cols., 2002; Linehan, 2005).

A natureza de CS das células ST88-14 foi confirmada através da marcação com a proteína S100, identificador fenotípico de CS (Spreca e cols., 1989). A ocorrência do RM nas células ST88-14 não está relacionada à transformação neoplásica, visto que em nossos ensaios por citometria de fluxo, tanto o percentual de eventos marcados (células Man/BSA positivas) quanto a frequência de expressão por evento foi substancialmente menor que os encontrados em CS de culturas primárias. Esta identidade das células ST88-14 com CS primárias em nosso sistema, juntamente com dados de outros autores para a caracterização de marcadores fenotípicos compatíveis com CS normais, tais como a proteína merlina e MAG (Ryan e cols., 1994; Scherer e Gutmann, 1996; Oliveira e cols., 2003) capacitam as células ST88-14 como um bom modelo para o estudo das propriedades imunológicas e fisiológicas das CS.

Uma proteína com peso molecular compatível com o RM foi encontrada em nossos ensaios de ligação da glicoproteína HRP com extratos de proteínas totais obtidas de macrófagos peritoneais inflamatórios, CS e células ST88-14 e imobilizadas em membranas de nitrocelulose. O mesmo procedimento realizado com um anticorpo anti-cMR em substituição a HRP confirmou a semelhança da proteína de 180 kDa da CS e células ST88-14 com o RM de macrófagos. Estes dados de semelhança de peptídeo(s) c-terminal e de um domínio tipo lectina sugerem, ainda que preliminarmente, uma certa homologia entre uma proteína de CS que se liga a carboidratos tal como o RM de macrófagos. Esta mesma identidade foi encontrada entre macrófagos e células do epitélio pigmentar da retina, tipo celular derivado do tubo neural, enquanto as CS derivam da crista neural, ou seja, são também derivados do ectoderma. No caso de macrófagos e do epitélio pigmentar foi encontrado 100% de identidade entre as regiões N-terminal e transmembranar do RM (Greaton e cols., 1996).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram por microscopia confocal a colocalização da neoglicoproteína Man/BSA e da proteína S100 em células ST88-14. Esses dados se justificam considerando-se que a proteína S100 é estritamente ou majoritariamente citoplasmática e que o RM também é freqüentemente encontrado no citoplasma, principalmente próximo ao núcleo. Este nosso resultado, embora não avaliado em termos percentuais, é compatível com a distribuição de aproximadamente 85% de RM do citoplasma de macrófagos descrito previamente por Pontow e colaboradores (1996). Este percentual, pelo menos no caso dos macrófagos, refere-se à grande afinidade deste receptor por alguns dos seus ligantes, principalmente os carboidratos manose e fucose, aliada à intensa atividade endocítica do RM estimulada após o reconhecimento destes ligantes. Desta forma, pode-se prever, ao menos nas células fixadas previamente à marcação

do receptor, que em condições basais, um número reduzido de RM encontra-se expresso na superfície celular, ao passo que um número majoritário de receptores é encontrado em compartimentos citoplasmáticos. Uma parte destes RM citoplasmáticos estaria possivelmente recém dissociada de seus ligantes e, portanto, dentro de pequenas vesículas e em rota de reciclagem para a superfície celular, enquanto outra parte próxima ao núcleo, estaria em síntese recente sendo, possivelmente, glicosilada em regiões do complexo de Golgi.

O estudo das propriedades imunológicas das CS mostra-se de fundamental importância para o entendimento das agressões (infecções, distúrbios auto-imunes, dentre outras) que afetam o SNP, incluindo traumas, onde ocorre a transecção de nervos. Pode-se prever que qualquer dano por ocasião de traumas mecânicos ou processos patológicos no SNP envolva um sistema eficiente de captação de resíduos celulares endógenos e exógenos, além de moléculas da matriz extracelular, com a finalidade de limitar a extensão destes danos. Este processo sabidamente envolve componentes celulares presentes no micro ambiente do nervo, sendo classicamente atribuída aos macrófagos a participação fundamental nessa limpeza tecidual dos nervos lesionados (Bruck e Friede, 1990). Neste trabalho propomos, com base nos resultados da expressão e modulação do RM, que as CS participam, no mínimo cooperativamente para este processo e atuam, possivelmente, sob influência de agentes pró e anti-inflamatórios, freqüentemente presentes nestes locais de injúria. Estes dados são corroborados por achados recentes que mostram que homogenizados de nervos induzem a produção de MCP-1 por CS, sendo este processo parcialmente reduzido pelo anticorpo de bloqueio para o receptor toll-semelhante 4 (Karanth e cols., 2006). Desta forma, pode-se prever uma ação cooperativa entre as CS e os macrófagos, recém recrutados via MCP-1, durante a reorganização e regeneração de nervos. Os fibroblastos, um outro importante

fagócito não profissional presente no microambiente do nervo, também devem ser considerados como atuantes em lesões de nervos, porém a reduzida capacidade endocítica do RM neste tipo celular poderia ser um fator limitante na execução dessa função. A baixa atividade do RM de fibroblasto foi constatada através de sua discreta endocitose de neoglicoproteínas e pelo extenso tempo de 24h de interação parasito-célula hospedeira, necessário para moderadas taxas de infecção por promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Hespanhol e cols., 2005). Os parasitas do gênero *Leishmania* utilizam o RM para a infecção do hospedeiro, sendo que este processo ocorre em tempos curtos de interação, com imediata indução da fagocitose do parasita após contato do RM de macrófagos com os resíduos manosil presentes na superfície do parasita (Blackwell, 1985).

A marcação das CS primárias e das células ST88-14 com a neoglicoproteína Man/BSA foi intensa, o que é um fato curioso, considerando-se as características dessas células como fagócitos não-profissionais e, portanto, de ação tardia em relação à fagocitose. Comparativamente a outros fagócitos não profissionais do SN (astrócitos, ver Burudi e cols., 1999), as CS primárias e as células ST88-14 apresentaram um padrão de marcação maior ou igual para o RM. A forte atividade de captação do RM em CS foi confirmada em nossos ensaios de saturação do receptor nas células ST88-14 e nas CS primárias, a qual foi alcançada em concentrações elevadas de Man/BSA de 50 e 100 μ g/mL, respectivamente. Estimamos que nossos experimentos tenham englobado a distribuição total do RM celular, tanto da superfície celular como citoplasmático através da prevenção da perda da marcação intracelular ocasionada pela dissociação do complexo Man/BSA e fluorocromo nos compartimentos acídicos do citoplasma. Esta prevenção foi obtida incubando-se as culturas vivas com NH₄Cl previamente à marcação com a

neoglicoproteína, induzindo assim a alcalinização das vesículas ácidas (Amenta e Brocher, 1980).

Em nossos ensaios ultra-estruturais da atividade endocítica do RM em células ST88-14 encontramos um comportamento inusual com a função de fagócito não-profissional, onde observamos uma intensa captação da HRP-Au mesmo em períodos curtos de incubação de 1 a 3h. A HRP é uma glicoproteína desprovida de carboidratos fosforilados, rica em grupos manosil e N-acetilglicosamina e que, por conter dois ligantes de alta afinidade para o RM, tem sido usada freqüentemente para a detecção deste receptor em tecidos normais e parasitados (Straus, 1981; Soeiro e cols., 1999; Hespanhol e cols., 2005). A nossa análise ultra-estrutural, utilizando a HRP como sonda acoplada a ouro coloidal, possibilitou verificar que, em baixa temperatura (4°C), a localização da sonda ficou restrita à superfície celular. Esta afinidade não foi alterada após sucessivas lavagens, indicando que o processo de adesão ocorreu de maneira específica, sendo descartada a possibilidade de adsorção da sonda à superfície celular. Podemos inferir que a adesão da sonda foi capaz de induzir a via de endocitose das CS, sendo que a elevação da temperatura ao nível fisiológico resultou na total internalização das sondas. Surpreendentemente, após 1h de incubação a grande maioria das partículas estava internalizada em pequenas vesículas próximas à face citoplasmática da membrana, ao passo que, após 3h de interação, as partículas foram encontradas agregadas no interior de vesículas no citoplasma, compatíveis com compartimentos de fases mais tardias da endocitose. A falta de outros traçadores, principalmente os relacionados à reciclagem de receptores para a superfície celular, nos impediu uma avaliação direta da origem das vesículas observadas. Desta forma, mais experimentos são necessários para aprofundar os estudos sobre o destino, reciclagem e processamento de sondas durante a endocitose de ligantes via RM em CS.

A ligação do anticorpo anti-cRM na superfície de células de Schwann em cultura foi confirmada por dois outros modelos experimentais: (i) fibras nervosas isoladas pelo “esgarçamento” de nervos e examinadas ao microscópio óptico de fluorescência e confocal e (ii) fibras nervosas in situ, examinadas em cortes ultra-finos à microscopia eletrônica de transmissão. Embora tenhamos realizado um número reduzido de experimentos, os resultados sugerem que o RM é expresso constitutivamente em CS. Ademais, o RM estaria particularmente concentrado no corpo celular das CS e nas regiões para-nodais, isto é, de mielina não compacta, evidenciadas em cortes ultra-finos transversais e em fibras “esgarçadas”, respectivamente.

A colocação do RM com moléculas MHC classe II em CS é compatível com a função proposta para este receptor como agente ativo na clivagem proteolítica de glicoproteínas endógenas e exógenas para posterior acoplagem dos peptídeos gerados a moléculas de MHC classe II em órgãos linfóides e não linfóides (Linehan, 2005). Em nossos experimentos, a colocação de RM e moléculas MHC classe II ocorreu em sítios intracelulares ao redor do núcleo sugerindo uma localização em vesículas endossomais intermediárias anteriores à reciclagem do receptor e, conseqüentemente, antes do processo de hidrólise do ligante nos lisossomos. Além disso, estes nossos dados confirmam o resultado de outros autores para a função das CS como células apresentadoras de antígenos facultativas dependentes de estimulação por $\text{INF-}\gamma$ (Samuel e cols., 1987; Kingston e cols., 1989).

No caso específico dos astrócitos, um tipo de fagócito não profissional da glia central, a apresentação antigênica envolve a expressão do MHC classe II juntamente com as moléculas co-estimulatórias B7 e CD40, sendo este complexo crítico para ativação de linfócitos T. Semelhantemente ao atribuído às CS, a expressão do MHC classe II em astrócitos é dependente da estimulação prévia com

as citocinas TNF- α e INF- γ , sendo esta expressão inibida tanto por agentes pró quanto anti-inflamatórios como TGF- β , INF- β , IL-4, IL-1, norepinefrina, glutamato, peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico (revisto em Dong e Benveniste 2001). Em verdade, é ainda discutido um papel crítico dos astrócitos na condução das respostas Th1 e Th2 no SNC na presença ou não dos estímulos gerados pelas moléculas B7 e CD40 e seus ligantes. Na presença de moléculas co-estimulatórias ocorreria a ativação e proliferação de células T CD4+ favorecendo a inflamação, enquanto a ausência de qualquer delas levaria à apoptose e/ou anergia dos linfócitos T CD4+ modulando negativamente a inflamação (revisto em Dong e Benveniste, 2001). Embora o baixo conhecimento sobre as propriedades imunológicas das CS, um análogo dos astrócitos no SNP, não permita maiores extrapolações para este tipo celular pode-se supor que, de maneira semelhante aos astrócitos, as CS não mielinizantes ou recém desdiferenciadas no fenótipo imaturo atuem como moduladoras das respostas pró ou anti-inflamatórias no SNP.

Em nosso sistema, a expressão do RM em CS mostrou-se eficazmente regulada por agentes moduladores como inicialmente demonstrado em células do sistema fagocítico mononuclear (Shepherd e cols., 1994; Marzolo e cols., 1999) e, mais recentemente, em astrócitos (Burudi e cols., 1999). Esta semelhança entre a regulação do RM de astrócitos e CS pode ser significativa em termos funcionais, considerando-se que as CS, pelo menos no caso das não mielinizantes, são descritas como fenotipicamente análogas aos astrócitos e, portanto, potencialmente capazes de atuar como estes durante as respostas infecciosas e inflamatórias do seu tecido de origem.

O RM é um dos principais receptores PRRs de macrófagos, estando envolvido em mecanismos da ativação celular como o reconhecimento e endocitose de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a transdução de sinais

intracelulares (revisto em Taylor e cols., 2005). A ativação do RM através da ligação com componentes microbianos ou um potencial patógeno dispara uma série de eventos de sinalização intracelular que conduzem a ativação do NF- κ B (Zhang e cols., 2004) e, possivelmente, também da cascata das MAPK (c-Jun N-terminal kinase, p38 e ERK) (Rivera-Marrero e cols., 2002). O resultado desta ativação do RM é a liberação de citocinas e quimiocinas, a produção de intermediários reativos de oxigênio, além de outros elementos também regulados pelos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (Berton e Gordon, 1983; Clohisy e cols., 1987; Rivera-Marrero e cols., 2002; Zhang e cols., 2004). Estas funções para o RM de macrófagos poderiam ser analogamente reproduzidas em CS. Esta proposta é particularmente relevante considerando o baixo conhecimento sobre os mecanismos ativadores constitutivos ou regulados das CS, os quais são responsáveis pela produção de citocinas, receptores da superfície celular, moléculas de adesão celular, além de componentes do citoesqueleto e da matriz extracelular (Bunge e Bunge, 1986; Gold e cols., 1995; Murwani e cols., 1996; Tofaris e cols., 2002). Além disso, respostas miméticas da ativação do NF- κ B via RM de macrófagos, poderiam ser particularmente interessantes no caso do RM de CS, considerando que o NF- κ B neste tipo celular tem sido descrito como um elemento essencial para a progressão da associação CS-axônio dentro do fenótipo mielinizante (Nickols e cols., 2003). Não obstante, recentemente também foi mostrado que o NF- κ B estaria envolvido na eliminação de CS por apoptose após desdiferenciação em CS imaturas induzidas pelo TNF- α (Boyle e cols., 2005). Em resumo, a expressão de RM em CS levanta diversas questões sobre os mecanismos operantes durante os processos fisiológicos de manutenção da homeostasia do nervo e também nas inúmeras interações celulares, além da compreensão das vias de ativação e respostas a agentes infecciosos, inflamatórios e processos auto-imunes que acometem o SNP.

Estas questões seriam também pertinentes no caso de interações glio-gliais por ocasião de transplantes de CS para o SNC.

Uma outra função que tem sido atribuída ao RM é a de prover um mecanismo de depuração e degradação de glicoproteínas séricas no fígado e no baço (Lee e cols., 2002). Estudos com animais nocaute para o RM (RM^{-/-}) mostraram que o nível sérico de proteínas inflamatórias estava elevado devido à redução da depuração das mesmas. Considerando-se que indutores de inflamação levam à regulação negativa do RM, enquanto imunossuppressores causam regulação positiva, os dados mencionados levaram à proposição de que o RM teria um papel fundamental na remoção de agentes inflamatórios (Lee e cols., 2002). Em síntese, a expressão do RM estaria reprimida nos estágios iniciais da inflamação e aumentada na fase de resolução, o que concorreria para limitar danos ao tecido. Uma limitação da duração e/ou amplitude da inflamação poderia ter grande importância no caso do tecido nervoso tanto central quanto periférico, tendo em vista os danos produzidos pela exacerbção da inflamação nos mesmos tecidos (revisto em Perry e cols., 2003).

Em suma, investigações adicionais sobre a expressão do RM em modelos de patologias experimentais infecciosas e inflamatórias do SNP são necessárias para demonstrar o envolvimento deste receptor como um dos mediadores da resposta imune no nervo. Alternativamente, o RM poderia ser fundamental na homeostase do SNP facilitando a eliminação de glicoproteínas manosiladas que possam ser liberadas por ocasião de dano ou morte celular ou até mesmo que necessitem ser renovadas como a AChE.

CONCLUSÕES

1. Células de um Schwannoma ST88-14 e CS de culturas primárias expressam uma proteína RM-semelhante em um estado potencialmente funcional. Por conseguinte, ambos os tipos celulares podem ser modelos úteis em estudos do papel deste receptor em diferentes estados fisiopatológicos do SNP.
2. As CS sofrem influência dos agentes moduladores do RM – dexametasona e INF- γ – alterando as respostas na captação altamente específica de ligantes manossilados.
3. As propriedades de células apresentadoras de antígenos facultativas da CS mostraram-se, no mínimo, parcialmente acopladas ao sistema de endocitose via RM, o que é coerente com a função imunológica proposta para este tipo celular.
4. As CS expressam constitutivamente o RM em regiões de mielina não compacta e, particularmente, abundante em regiões topograficamente homólogas a alças para-nodais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguayo AJ, David S, Bray G. 1981. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: Transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95:231-240.
2. Aloisi F. Immune function of microglia. 2001. *Glia* 36:165-179.
3. Amenta JS, Brocher SC. 1980. Role of lysosomes in protein turnover: catch-up proteolysis after release from NH₄Cl inhibition. *J Cell Physiol* 102:259-266.
4. Armstrong BD, Hu Z, Abad C, Yamamoto M, Rodriguez WI, Cheng J, Tam J, Gomariz RP, Patterson PH, Waschek JA. 2003. Lymphocyte regulation of neuropeptide gene expression after neuronal injury. *J Neurosci Res* 74:240-247.
5. Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 26:149-188.
6. Barradas PC, Cavalcante LA, Gomes FCA, Lima F, Moura Neto V, Trentin AG. As células gliais. In: *Hernandes F Carvalho; Carla Beatriz Collares-Buzato. (Org.). A Célula: uma abordagem multidisciplinar. 1 ed. Barueri, S: Editora Manole Ltda, 2005, v. 1, p. 265-277.*
7. Bartoszewicz ZP, Noronha AB, Fujita N, Sato S, Bo L, Trapp BD, Quarles RH. 1995. Abnormal expression and glycosylation of the large and small isoforms of myelin-associated glycoprotein in dysmyelinating quaking mutants. *J Neurosci Res* 41:27-38.
8. Bartsch U. 2003. Neural CAMS and their role in the development and organization of myelin sheaths. *Front Biosci* 8:477-490.
9. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL. 1999. (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27:62-74.

10. Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ. 2006. Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci* 26:3182-3191.
11. Bergsteinsdottir K, Kingston A, Mirsky R, Jessen KR. 1991. Rat Schwann cells produce interleukin-1. *J Neuroimmunol* 34:15-23.
12. Berton G, Gordon S. 1983. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. *Immunology* 49:705-715.
13. Blackwell JM. 1985. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunol Lett* 11:227-232.
14. Blakemore WF. 1977. Remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted from the sciatic nerve. *Nature* 266:68-69.
15. Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS. 1995. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64:850-858.
16. Bonifati DM, Kishore U. 2006. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol* May 12...
17. Boyle K, Azari MF, Cheema SS, Petratos S. 2005. TNFalpha mediates Schwann cell death by upregulating p75NTR expression without sustained activation of NFkappaB. *Neurobiol Dis* 20):412-427.
18. Brown MC, Lunn ER, Perry VH. 1992. Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons. *J Neurobiol* 23:521-36.
19. Bruck W, Friede RL. 1990. L-fucosidase treatment blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *J Neuroimmunol* 27:217-27.
20. Bunge MB, Bunge RP. 1986. Linkage between Schwann cell extracellular matrix production and ensheathment function. *Ann N Y Acad Sci* 486:241-247.

21. Burudi EME, Régnier-Vigouroux A. 2001. Regional and cellular expression of the mannose receptor in the post-natal developing mouse brain. *Cell Tissue Res* 303:307-317.
22. Burudi EME, Riese S, Stahl PD, Régnier-Vigouroux A. 1999. Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia* 25:44–55.
23. Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Pina Y, Hernandez EP, Cousins SW. 2005. Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 81:38-47.
24. Cambi A, Figdor CG. 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 15:539-546.
25. Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM. 2001. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14661-14668.
26. Clohisy DR, Bar-Shavit Z, Chappel JC, Teitelbaum SL. 1987. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor. *J Biol Chem* 262:15922-15929.
27. Constable AL, Armati PJ, Toyka KV, Hartung HP. 1994. Production of prostanoids by Lewis rat Schwann cells in vitro. *Brain Res* 635:75-80.
28. Constantin G, Piccio L, Bussini S, Pizzuti A, Scarpini E, Baron P, Conti G, Pizzul S, Scarlato G. 1999. Induction of adhesion molecules on human schwann cells by proinflammatory cytokines, an immunofluorescence study. *J Neurol Sci* 170:124-30.
29. Curtis R, Stewart HJ, Hall SM, Wilkin GP, Mirsky R, Jessen KR. 1992. GAP-43 is expressed by nonmyelin-forming Schwann cells of the peripheral nervous system. *J Cell Biol* 116:1455-1464.
30. Czura CJ, Tracey KJ. Autonomic neural regulation of immunity. 2005. *J Intern Med* 257:156-166.

31. D'Antonio M, Michalovich D, Paterson M, Droggiti A, Woodhoo A, Mirsky R, Jessen KR. 2006. Gene profiling and bioinformatic analysis of Schwann cell embryonic development and myelination. *Glia*.53:501-515.
32. Dezawa M. 2002. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anat Sci Int* 77:12-25.
33. Donato, R. 1999. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1450: 191-231.
34. Dong Y, Benveniste EN. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
35. Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, Parmantier E, Mirsky R, Jessen KR. 1999. Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res* 56:334-48.
36. Engering AJ, Cella M, Fluitsma DM, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. 1997. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 417:183-187.
37. Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM. 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158.
38. Faissner A, Kruse J, Nieke J, Schachner M. 1984. Expression of neural cell adhesion molecule L1 during development, in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Brain Res* 317:69-82.
39. Farahani R, Pina-Benabou MH, Kyrozis A, Siddiq A, Barradas PC, Chiu FC, Cavalcante LA, Lai JC, Stanton PK, Rozental R. 2005. Alterations in metabolism and gap junction expression may determine the role of astrocytes as "good samaritans" or executioners. *Glia* 50:351-361
40. Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.
41. Fiete D, Beranek MC, Baenziger JU. 1997. The macrophage/endothelial cell mannose receptor cDNA encodes a protein that binds oligosaccharides

terminating with SO₄-4-GalNAcβ1,4GlcNAcβ or Man at independent sites. Proc Natl Acad Sci U S A 94:11256-261.

42. Fontana A, Erb P, Pircher H, Zinkernagel R, Weber E, Fierz W. 1986. Astrocytes as antigen-presenting cells. Part II: Unlike H-2K-dependent cytotoxic T cells, H-2Ia-restricted T cells are only stimulated in the presence of interferon-gamma. J Neuroimmunol 12:15-28.
43. Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D. 2005. Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. Glia 49:375-384.
44. Gerebtzoff MA. 1963. Histochemical contribution to the theory of saltatory conduction in peripheral and central myelinated fibers. Acta Neurol Belg 63:7-21.
45. Gold R, Archelos JJ, Hartung HP. 1999. Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. Brain Pathol 9:343-360.
46. Gold R, Toyka KV, Hartung HP. 1995. Synergistic effect of IFN-gamma and TNF-alpha on expression of immune molecules and antigen presentation by Schwann cells. Cell Immunol 165:65-70.
47. Greaton CJ, Lane KB, Shepherd VL, McLaughlin BJ. 1996. Sequence homology identified between retinal pigment epithelium and the macrophage mannose receptor. Invest Ophthalmol Vis Sci 37:S910.
48. Greil R, Egle A, Villunger A. 1998. On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. Leuk Lymphoma 31:477-490.
49. Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. 2005. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. J Neurosci 25:3478-3487.
50. Guijarro A, Laviano A, Meguid MM. 2006. Chapter 22: Hypothalamic integration of immune function and metabolism. Prog Brain Res 153:367-405.

51. Haney CA, Sahenk Z, Li C, Lemmon VP, Roder J, Trapp BD. 1999. Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol* 146:1173-1184.
52. Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, Kohno M. 1994. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett* 340:177-180.
53. Hattori A, Tanaka E, Murase K, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, Hayashi K, Kohno M. 1993. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 268:2577-2582.
54. Hespanhol RC, Soeiro MNC, Meuser MB, Meirelles MNSL, Corte-Real S. 2005. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J Histochem Cytochem* 53:35-44.
55. Hoke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW. 2003. Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci* 23:561-567.
56. Jander S, Pohl J, Gillen C, Stoll G. 1996. Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 43:254-259.
57. Jasmin L, Ohara PT. 2002. Remyelination within the CNS: do Schwann cells pave the way for oligodendrocytes? *Neuroscientist* 8:198-203.
58. Jessen KR, Mirsky R. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22:402-410.
59. Jessen KR, Mirsky R. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.
60. Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R. 1990. Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109:91-103.

61. Jessen KR. Glial cells. 2004. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1861-1867.
62. Joseph NM, Mukoyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, Lee KF, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ. 2004. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131:5599-5612.
63. Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M. 1995. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med* 182:1243-1258.
64. Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson PM. 2006. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol* 7. doi: 16828744.
65. Kielian T, Haney A, Mayes PM, Garg S, Esen N. 2005. Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infect Immun* 73:7428-7435.
66. Kingston AE, Bergsteinsdottir K, Jessen KR, Van der Meide PH, Colston MJ, Mirsky R. 1989. Schwann cells co-cultured with stimulated T cells and antigen express major histocompatibility complex (MHC) class II determinants without interferon-gamma pretreatment: synergistic effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor on MHC class II induction. *Eur J Immunol* 19:177-183.
67. Klar A, Baldassare M, Jessell TM. 1992. F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* 69:95-110.
68. Klegeris A, Budd TC, Greenfield AS. 1996. Acetylcholinesterase-induced respiratory burst in macrophages: evidence for the involvement of the macrophage mannose-fucose receptor. *Biochim biophys Acta* 1:159-168.
69. Koeppen AH. 2004. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 220:115-117.
70. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

71. Lane KB, Egan B, Vick S, Abdolrasulnia R, Shepherd VL. 1998. Characterization of a rat alveolar macrophage cell line that expresses a functional mannose receptor. *J Leukoc Biol* 64:345-350.
72. Lee M, Brennan A, Blanchard A, Zoidl G, Dong Z, Taberbero A, Zoidl C, Dent MA, Jessen KR, Mirsky R. 1997. P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively. *Mol Cell Neurosci* 8:336-350.
73. Lee MJ, Calle E, Brennan A, Ahmed S, Sviderskaya E, Jessen KR, Mirsky R. 2001. In early development of the rat mRNA for the major myelin protein P(0) is expressed in nonsensory areas of the embryonic inner ear, notochord, enteric nervous system, and olfactory ensheathing cells. *Dev Dyn* 222:40-51.
74. Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, Feizi T, Langen H, Nussenzweig MC. 2002. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295:1898-1901.
75. Lefkowitz DL, Lincoln JA, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguilevsky N. 1997. Enhancement of macrophage-mediated bactericidal activity by macrophage-mannose receptor-ligand interaction. *Immunol Cell Biol* 75:136-141.
76. Lent R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências. São Paulo: Atheneu, 2001:375-400.
77. Leteux C, Chai W, Loveless RW, Yuen CT, Uhlin-Hansen L, Combarous Y, Jankovic M, Maric SC, Misulovin Z, Nussenzweig MC, Feizi T. 2000. The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin. *Exp Med* 191:1117-1126.
78. Lew DB, Songu-Mize E, Pontow SE, Stahl PD, Rattazzi MC. 1994. A mannose receptor mediates mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells. *J Clin Invest* 94:1855-1863.

79. Lewis RA. 2005. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and other immune-mediated demyelinating neuropathies. *Semin Neurol* 25:217-228.
80. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. 1987. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330:658-659.
81. Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. 1999. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med* 189:1961-1972.
82. Linehan SA. 2005. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs. *BMC Immunology* 6:4 doi:10.1186/1471-2172.
83. Lopez-Herrera A, Liu Y, Rugeles MT, He JJ. 2005. HIV-1 interaction with human mannose receptor (hMR) induces production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) through hMR-mediated intracellular signaling in astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1741:55-64.
84. Lustig M, Zanazzi G, Sakurai T, Blanco C, Levinson SR, Lambert S, Grumet M, Salzer JL. 2001. Nr-CAM and neurofascin interactions regulate ankyrin G and sodium channel clustering at the node of Ranvier. *Curr Biol* 11:1864-1869.
85. Marques, M. J. As Células de Schwann. In: Hernandez F Carvalho; Carla Beatriz Collares-Buzato. (Org.). *A Célula: uma abordagem multidisciplinar*. 1 ed. Barueri, S: Editora Manole Ltda, 2005, v. 1, p. 248-253.
86. Marzolo MP, von Bernhardi R, Inestrosa NC. 1999. Mannose receptor is present in a functional state in rat microglial cells. *J Neurosci Res* 58:387-395.
87. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Valette FM. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41:31-91.
88. Matthieu JM. 1978. Proteins from sciatic-nerve myelin in quaking and jimpy mice. *Biochem J* 173:989-991.

89. Medzhitov R, Janeway CA Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
90. Melzer P, Savchenko V, McKanna J. 2001. Microglia, astrocytes, and macrophages react differentially to central and peripheral lesions in the developing and mature rat whisker-to-barrel pathway: A study using immunohistochemistry for lipocortin1, phosphotyrosine, S100-beta, and mannose receptors. *Exp Neurol* 168:63-77.
91. Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. 2004. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.
92. Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Bluthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA, et al., 1994. Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13:229-246.
93. Murwani R, Hodgkinson S, Armati P. 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 mRNA expression in neonatal Lewis rat Schwann cells and a neonatal rat Schwann cell line following interferon gamma stimulation. *J Neuroimmunol* 71:65-71.
94. Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD. 2003. Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* 6:161-167.
95. Nishimura T, Akiyama H, Yonehara S, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Kosaka K. 1995. Fas antigen expression in brains of patients with Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 695:137-145.
96. Noorman F, Barrett-Bergshoeff MM, Biessen EA, van de Bilt E, van Berkel TJ, Rijken DC. 1997. Cluster mannosides can inhibit mannose receptor-mediated tissue-type plasminogen activator degradation by both rat and human cells. *Hepatology* 26:1303-1310.

97. Okada T, Ichikawa M, Tokita Y, Horie H, Saito K, Yoshida J, Watanabe M. 2005. Intravitreal macrophage activation enables cat retinal ganglion cells to regenerate injured axons into the mature optic nerve. *Exp Neurol* 96:153-163.
98. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* 71:1427-1433.
99. Oppenheim JJ. 2001. Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol* 74:3-8.
100. Pavlov VA, Tracey KJ. 2004. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 61:2322-2331.
101. Perry VH, Newman TA, Cunningham C. 2003. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4:103-112.
102. Peters A, Pelay SL, Webster, HD. The cellular sheaths of neurons. **In: The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells.** W.B. Saunders Company, 1976. pp 181-230.
103. Pontow SE, Blum JS, Stahl PD. 1996. Delayed activation of the mannose receptor following synthesis. Requirement for exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271:30736-30740.
104. Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Stewart PL, Behar SM, Porcelli SA, Brenner MB, Modlin RL, Kronenberg M. 1997. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 6:187-197.
105. Ralay RH, Craft JM, Hu W, Guo L, Wing LK, Van Eldik LJ, Watterson DM. 2006. Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J Neurosci* 26:662-670.
106. Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowitz RA. 1998. Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 64:108-113.

107. Regnier-Vigouroux A. 2003. The mannose receptor in the brain. *Int Rev Cytol* 226:321-342.
108. Reid DM, Perry VH, Andersson PB, Gordon S. 1993. Mitosis and apoptosis of microglia *in vivo* induced by an anti-CR3 antibody which crosses the blood-brain barrier. *Neuroscience* 56:529-533.
109. Reinke E, Fabry Z. 2006. Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides. *Immunol Lett* 104:102-109.
110. Reis-e-Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J Exp Med* 178:509-519.
111. Ritchie JM, Rogart RB. 1977. Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:211-215.
112. Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Ritzenthaler JD, Newburn SA, Roman J. 2002. M. tuberculosis induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282:L546-555.
113. Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C. 1998. Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol* 96:172-178.
114. Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL. 1999. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* 101:47-60.
115. Ryan JJ, Klein KA, Neuberger TJ, Leftwich JA, Westin EH, Kauma S, Fletcher JA, DeVries GH, Huff TF. 1994. Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J Neurosci Res* 37:415-432.
116. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in

the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-400.

117. Samuel NM, Jessen KR, Grange JM, Mirsky R. 1987. Gamma interferon, but not *Mycobacterium leprae*, induces major histocompatibility class II antigens on cultured rat Schwann cells. *J Neurocytol* 16:281-287.
118. Scherer SS, Gutmann DH. 1996. Expression of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, in Schwann cells. *J Neurosci Res* 46:595-605.
119. Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK. 2006. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci.* 29:68-74.
120. Seifert J, Ogawa T, Kurono S, Ito Y. 2000. Syntheses of alpha-dystroglycan derived glycosyl amino acids carrying a novel mannosyl serine/threonine linkage. *Glycoconj J* 17:407-23.
121. Seilheimer B, Persohn E, Schachner M. 1989. Antibodies to the L1 adhesion molecule inhibit Schwann cell ensheathment of neurons in vitro. *J Cell Biol* 109:3095-3103.
122. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. 2002. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22:3052-3060.
123. Sheikh H, Yarwood H, Ashworth A, Isacke CM. 2000. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci* 113:1021-1032.
124. Shepherd VL, Campbell EJ, Senior RM, Stahl PD. 1982. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. *J Reticuloendothel Soc* 32:423-431.
125. Shepherd VL, Cowan HB, Abdolrasulnia R, Vick S. 1994. Dexamethasone blocks the interferon-gamma-mediated downregulation of the macrophage mannose receptor. *Arch Biochem Biophys* 312:367-374.

126. Shepherd VL, Tarnowski BI, McLaughlin BJ. 1991. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1779-1784.
127. Sherman DL, Brophy PJ. 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
128. Soeiro MNC, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MNLS, Araujo-Jorge TC. 1999. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell Struct Funct* 24:139-149.
129. Spiegel I, Adamsky K, Eisenbach M, Eshed Y, Spiegel A, Mirsky R, Scherer SS, Peles E. 2006. Identification of novel cell-adhesion molecules in peripheral nerves using a signal-sequence trap. *Neuron Glia Biol* 2:27-38.
130. Spreca A, Rambotti MG, Rende M, Saccardi C, Aisa MC, Giambanco I, Donato R. 1989. Immunocytochemical localization of S100-beta protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *J Histochem Cytochem* 37:441-446.
131. Stahl P, Gordon S. 1982. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. *J Cell Biol* 93:49-56.
132. Stahl PD, Ezekowitz RA. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 10:50-55.
133. Stahl PD, Rodman JS, Miller MJ, Schlesinger PH. 1978. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1399-1403.
134. Sternberg EM. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6:318-28.
135. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. 1989. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18:671-683.

136. Straus W. 1981. Cytochemical detection of mannose-specific receptors for glycoproteins with horseradish peroxidase as a ligand. *Histochemistry* 73:39-47.
137. Swain SD, Lee SJ, Nussenzweig MC, Harmsen AG. 2003. Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection in vivo. *Infect Immun* 71:6213-6221.
138. Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. 2005. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-94.
139. Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares. 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 26:104-110.
140. Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. 2002. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci.* 22:6696-6703.
141. Turka LA, Goodman RE, Rutkowski JL, Sima AA, Merry A, Mitra RS, Wrone-Smith T, Toews G, Strieter RM, Nickoloff BJ. 1995. Interleukin 12: a potential link between nerve cells and the immune response in inflammatory disorders. *Mol Med* 1:690-699
142. Wagner R, Myers RR. 1996. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience* 73:625-629.
143. Wanner IB, Wood PM. 2002. N-cadherin mediates axon-aligned process growth and cell-cell interaction in rat Schwann cells. *J Neurosci* 22:4066-4079.
144. Wohlleben G, Hartung HP, Gold R. 1999. Humoral and cellular immune functions of cytokine-treated Schwann cells. *Adv Exp Med Biol* 468:151-156.
145. Wrona D. 2006. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 172:38-58.

146. Yang KD, Shaio MF, Wang CL, Wu NC, Stone RM. 1994. Neuroblastoma cell-mediated leukocyte chemotaxis: lineage-specific differentiation of interleukin-8 expression. *Exp Cell Res* 211:1-5.
147. Zalewski AA, Silvers WK. 1980. An evaluation of nerve repair with nerve allografts in normal and immunologically tolerant rats. *J Neurosurg* 52:557-563.
148. Zhang J, Zhu J, Imrich A, Cushion M, Kinane TB, Koziel H. 2004. Pneumocystis activates human alveolar macrophage NF-kappaB signaling through mannose receptors. *Infect Immun* 72:3147-3160.

Schwann and Schwannoma Cells Express a Mannose Receptor-like Protein in a Functional State

Journal:	<i>Journal of Neuroscience Research</i>
Manuscript ID:	jnr-2005-Sep-0426
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	30-Sep-2005
Complete List of Authors:	Baetas-da-Cruz, Wagner; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular Alves, Lucineia; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Micobacterioses Guimarães, Erick V.; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular Santos-Silva, Alessandra; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica C. Chagas Filho Pessolani, MariaCristina V.; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Micobacterioses Barbosa, Helene S.; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular Corte-Real, Suzana; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular Cavalcante, Leny; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica C. Chagas Filho; Academia Brasileira de Ciências,
Keywords:	Neuroimmunology, Immune response, Homeostasis, Glia, Inflammation

powered by ScholarOne
Manuscript Central™

Title: Schwann and Schwannoma Cells Express a Mannose Receptor-like Protein in a Functional State

Authors: Wagner Baetas-Da-Cruz¹, Lucinéia Alves², Erick V. Guimarães¹, Alessandra Santos-Silva³, Maria Cristina V. Pessolani², Helene S. Barbosa¹, Suzana Corte-Real¹, *Leny A. Cavalcante³

Addresses: 1. Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

2. Laboratório de Microbiologia Celular, Departamento de Micobacterioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

3. Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Running Title: Mannose receptor in Schwann cells

* Corresponding author:

Dr. Leny A. Cavalcante, Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
21949-900 Rio de Janeiro, Brazil.

Phone: +55-21-2562-6539

Fax: +55-21-2280-8193

E-mail: Lacav@abc.org.br; e-mail: Leny@biof.ufrj.br

Abstract

The mannose receptor (MR) is a transmembrane glycoprotein that is expressed in several cell types but little or no information is available on Schwann cells (SC). We show that both rodent SC in primary cultures and a human Schwann cell line (ST88-14) bind the exogenous MR ligand neoglycoprotein mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate (man/BSA-FITC) in a highly specific manner. After incubation with man/BSA-FITC, flow cytometry demonstrates 62% positive ST88-14 cells and 90% positive SC cells, a dose-dependent increase in tagged cellular proteins and near total inhibition of binding by 250 mM D-mannose or $\sim 1.1 \mu\text{M}$ of the highly mannosylated protein horseradish peroxidase (HRP). In addition, endogenous lectin binding shows that SC and ST88-14 share a unique HRP-binding protein of about 180 kDA with peritoneal resident macrophages. Ultrastructural analysis of ST88-14 cells after incubation with HRP-colloidal gold without or with subsequent chasing at 37C shows an initial location on the cell surface and temperature- and time-dependent internalization of the probe. Treatment of cultured SC with interferon γ (IFN- γ – 100 U/ml) or dexamethasone (0.1 $\mu\text{g/ml}$) followed by tagging with man/BSA-FITC and analysis by flow cytometry shows down- and upregulation, respectively, of the putative receptor. Our results suggest that Schwann and Schwannoma cells express a MR-like protein in a prospectively functional state and that both types may be useful models for studies regarding the role of this receptor in different infectious/inflammatory states of the peripheral nervous system.

Key words: Neuroimmunology, Immune response, Homeostasis, Glia, Inflammation

Introduction

The mannose receptor (MR) is both a pattern recognition receptor (Stahl and Ezekowitz, 1998) and an adhesion receptor expressed in antigen-presenting cells, being involved in phagocytosis of foreign ligands during early phases of the immune response (for review, see Taylor et al., 2005). MR is a transmembrane glycoprotein of approximately 175 kDa with several domains such as the Ca²⁺-dependent lectin-like carbohydrate recognition domains (CRDs), responsible for the binding to mannose, fucose, and *N*-acetylglucosamine (Fiete et al., 1998; for review, see Martinez-Pomares et al., 2001), constituents of various pathogens and of glycoproteins from different sources (Linehan et al., 2001). MR is able to recognize a wide range of bacteria, fungi and protozoa (Makrides et al., 1983; Wilson and Pearson, 1986; Ezekowitz et al., 1991; Chatterjee and Khoo, 1998; Hwa and Khoo, 2000; Mansour et al., 2002). In summary, MR is a constitutive receptor, which acts as a pivotal molecule of innate immune response and homeostasis, being important for the recognition and internalization of infectious agents, and also of self-antigens (for reviews, see Linehan et al., 2001; Allavena et al., 2004). Nevertheless, the mechanisms by which the MR mediates the immune response in the tissues are still under investigation (for review, see Cambi and Figdor, 2003).

It was previously thought that MR expression was restricted to tissue macrophages including perivascular microglia but it is currently known that it is expressed in other cells such as subsets of endothelial cells, cardiomyocytes, fibroblasts, smooth muscle cells, myeloid cells, and Kaposi sarcoma cells (Lew et al., 1994; Uccini et al., 1997; Soeiro et al., 1999; Linehan et al., 1999; Sheikh et al., 2000; Melzer et al., 2001; Galea et al., 2005; Hespanhol et al., 2005) In addition, MR has been detected in ameboid microglia, retinal pigment epithelium, astrocytes and young neurons both *in vitro* and *in vivo* (Shepherd et al., 1991; Burudi et al., 1999; 2001; Marzolo et al., 1999; for review, see Regnier-

1
2
3 Vigouroux, 2003). However, little information is available on the expression of MR in Schwann cells,
4
5
6 the major glial type of the peripheral nervous system (PNS).
7

8 Schwann cells ensheath all axons in peripheral nerves and are classified into myelinating and
9
10 non-myelinating types, which may interconvert during adult life under the control of TGF β 1 that
11
12 suppresses the expression of genes that characterize the different phenotypes of SC (Bunge et al. 1986;
13
14 Wood et al., 1990; Jessen and Mirsky, 1999; Awatramani et al., 2002). Myelinating Schwann cells
15
16 form insulating sheaths around axons that are comparable in structure and function to those made by
17
18 the oligodendrocytes, a type of cell devoid of MR in the intact adult brain (Burudi et al., 2001). Non-
19
20 myelinating Schwann cells show similarities to astrocytes and are likely to have metabolic and
21
22 mechanical support functions and either type may be able to restore the blood-brain barrier after
23
24 transplantation into brain regions devoid of astrocytes (Felts and Smith, 1996) particularly in the case
25
26 of human cells.
27
28
29
30
31

32 Schwann cells have been considered as immunocompetent cells, able to drive the immune
33
34 response in PNS (Toews et al., 1998; Rutkowski et al., 1999) and, in fact, they can display a large
35
36 repertoire of immune-related properties. Such properties include participation to antigen presentation,
37
38 at least, in some conditions such as in leprosy is which it has been proposed that infected Schwann cells
39
40 process and present antigens of *Mycobacterium leprae* to antigen-specific, inflammatory type 1 T cells
41
42 (Spierings et al., 2000). Furthermore, it has been shown that Schwann cells secrete chemokines and
43
44 anti- and proinflammatory cytokines such as those that initiate the process of Wallerian degeneration
45
46 (Rutkowski et al., 1999; Deprez et al., 2001). Although *in vivo* and *in vitro* studies have confirmed the
47
48 immune capabilities of Schwann cells (Toews et al., 1998; Teare et al., 2004), questions on the
49
50 initiation, regulation and termination of immune response in the PNS are still open.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In view of the potential competence of Schwann cells and, particularly, of an interest in their
4 character of antigen-presenting cells, we have tested the occurrence of MR in primary Schwann cell
5 cultures (SC) and in ST88-14 cells, a human Schwann cell line that expresses some phenotypical
6 markers of normal Schwann cells, including merlin, a protein similar to components of the ezrin,
7 radixin, moesin family (Ryan et al., 1994; Scherer and Gutmann, 1996; Oliveira et al., 2003). We have
8 found specific binding of mannosylated exogenous proteins and recognition of a ~ 180 kDa
9 endogenous protein of SC and ST88-14 cells, presumptively identical to MR of peritoneal resident
10 macrophages. In addition, we have demonstrated that the highly mannosylated HRP protein binds to
11 the surface of ST88-14 and is internalized. Furthermore, we have shown that the MR-like component
12 of Schwann cells is down-modulated by interferon γ (IFN- γ) and up-modulated by dexamethasone,
13 modulators of MR in several cell types, including microglia (Zimmer et al., 2003). The ensemble of our
14 results, thus, suggesting that the MR-like protein of Schwann and Schwann-like cells undergoes traffic
15 compatible with a functional receptor.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and Methods

Primary Schwann cells cultures. SC were obtained from adult Wistar rats according to a modification by P.M. Wood of the procedure described by Morrissey et al. (1991). Briefly, sciatic nerves were harvested in Leibovitz's L 15 Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), fragmented and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) containing heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, Brazil) (D-10). The medium was changed 3 times a week. After 30 days, the nerve fragments were treated with 0.5 mg/ml collagenase type I (Worthington Biochemicals, New Jersey, NJ) and 1 mg/ml dispase II (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) in the CO₂ incubator at 37°C overnight to dissociation. After washes, the cells were cultivated in dishes covered poly-L-lysine (200 µg/mL, Sigma Chemical, St. Louis, MO), in DMEM containing 10% FBS, 100 units/mL penicillin (Invitrogen), 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 2 µM forskolin (Calbiochem, La Jolla, CA), and 20 µg/ml bovine pituitary extract (Biomedical Technologies; Stoughton, MA). After the first passage, Schwann cells were further selected from fibroblasts by an anti-mouse Thy 1.1 antibody (undiluted hybridoma culture supernatant, American Tissue Culture Collection, Manassas, VA) and rabbit complement (Sigma). This resulted in approximately 95% purity Schwann cell cultures as assessed by S100 (DAKO, Carpinteria, CA) immunoreactivity. SC enriched cultures were maintained in a humidified air/CO₂ (95%/5%) atmosphere at 37°C.

Cell line cultures. The ST88-14 tumor cell line was established from malignant Schwannomas (neurofibrosarcomas) from patients with neurofibromatosis type 1 (Ryan et al., 1994), and was generously donated by J.A. Flechter (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf bovine FCS, 1mM glutamine, 1000U/mL penicillin, and 50µg/mL streptomycin. All chemicals were from Sigma. The cells, plated in culture

1
2
3 dishes or cover slips in 24-well plates (Falcon, Franklin Lakes, NJ), were maintained in a humidified
4
5 air/CO₂ (95%/5%) atmosphere at 37°C for 24h.
6
7

8
9
10 *Peritoneal resident macrophages.* Murine macrophages were obtained from adult Swiss mice by
11
12 harvesting of the peritoneal cavity, followed by plating of the cell suspension in 24-well culture dishes
13
14 and incubation in DMEM in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere at 37°C for 1 hr. Afterward,
15
16 non-adherent cells were removed by washing and the adherent cells were cultured in complete medium.
17
18

19
20
21
22 *HRP biotinylation.* Inactivated HRP (Sigma) was labeled with biotin (Sigma) using the FluoReporter
23
24 Mini-biotin XX protein-labeling kit (Molecular Probes, Eugene, OR) according to the manufacturer
25
26 instructions.
27
28

29
30
31
32 *Flow cytometry.* Flow cytometry was performed according to conventional protocols. Confluent
33
34 monolayers of SC or ST88-14 cells were harvested by exposure to 10mM EDTA (Sigma) in pH 7.4
35
36 phosphate buffered saline (PBS) at 37°C for 10 min. After repeated pipetting to ensure a single cell
37
38 suspension, cells were washed three times in Ringer solution and incubated with 6.25, 12.5, 25.0, 50.0,
39
40 and 100.0µg/ml of the neoglycoprotein man/bovine serum albumin-FITC-conjugated (man/BSA-FITC,
41
42 Sigma) diluted in Ringer solution containing 5mM CaCl₂ and 1% BSA plus 0.1% saponin at 37°C for 1
43
44 h. After washed twice in Ringer solution, the cells were maintained on ice until analysis. Controls were
45
46 obtained by the addition of a large excess of D-mannose (250mM) (Hespanhol et al., 2005) or with ~
47
48 1.1 µM (50 µg/mL) HRP diluted in the same labeling solution at 37°C for 40 min, followed by two
49
50 washes in Ringer and incubation with 50µg/ml man/BSA-FITC as described above. After washing, the
51
52 cell suspensions were also kept on ice. Some assays were also performed with cells lightly fixed by 1%
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 paraformaldehyde (Sigma) in PBS at 4°C for 15 min and then incubated with man/BSA-FITC. Samples
4
5 were analyzed on a Becton Dickinson FACsCalibur (Mountain View, CA). Gating was set on large
6
7 granular cells, and 10,000 gated events were collected from each sample. Data were analyzed by using
8
9 WinMDI 2.8 (Seattle, WA).
10
11

12
13
14
15 *Treatment of SC with MR modulators.* In order to investigate the regulation of the presumptive MR in
16
17 SC, cultures were incubated or not with IFN- γ (100 U/ml) or dexamethasone (0.1 μ g/ml) for 18h and
18
19 then tagged with man/BSA-FITC, and analyzed by flow cytometry.
20
21

22
23
24
25 *SDS-PAGE and overlay assay.* Cell extracts were prepared from SC, ST88-14, and peritoneal resident
26
27 macrophages and their protein content was measured by the bicinchoninic acid method. Twenty five μ g
28
29 of protein were loaded on 8.5% SDS-PAGE gels and electrophoresis was performed under non-
30
31 reducing conditions. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and these were blocked
32
33 overnight with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBS/T) and 2% BSA for subsequent
34
35 incubation with biotinylated HRP. Membranes were incubated with biotin-labeled HRP at 2 μ g/ml in
36
37 TBS/T-1% BSA at 37°C for 3 h, washed with TBS/T and incubated with (0.04 μ g/ml) streptavidin-
38
39 HRP conjugate (Sigma) in TBS/T-1% BSA at room temperature for 30 min. The reacting bands were
40
41 developed with 0.03% hydrogen peroxide, using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) as coupler. The
42
43 specificity of the reaction was assessed by omitting biotinylated HRP in control membranes.
44
45
46
47
48
49

50
51 *Detection of mannosylated protein binding and S100 immunocytochemistry.* In order to approach the
52
53 occurrence of MR in SC and ST88-14 cells, a cytochemistry assay with man/BSA-FITC (Sigma)
54
55 binding was performed. Cells adhered on coverslips were fixed in 1% paraformaldehyde (Sigma) at
56
57
58
59
60

1
2
3 4°C for 15 min. After fixation, the samples were washed three times in Ringer solution and incubated
4
5 with 50µg/mL man/BSA-FITC diluted in Ringer solution containing 5mM CaCl₂ and 1% BSA plus
6
7 0.1% saponin at 37°C for 1 h. Controls were obtained by incubation of the cells with 250mM D-
8
9 mannose or ~ 1.1 µM HRP diluted in the same labeling solution followed by washing and incubation
10
11 with 50µg/mL mannosyl/BSA-FITC as described above.
12
13
14

15 For unequivocal characterization of the Schwann-like nature of ST88-14 cells and identification
16
17 of SC from sciatic nerve cultures, cells were treated with a polyclonal brain S100 (Sigma) antibody and
18
19 man/BSA-FITC. For this purpose, fixed cells were washed five times with Tris-buffered saline (TBS) –
20
21 0.1% saponin (Sigma) and blocked with 10% normal goat serum for 30min. After this, the cells were
22
23 incubated overnight with the primary antibody (1:100) in TBS - 0.1% saponin - 1% BSA, washed once
24
25 with PBS-0.3 % Triton X-100 and incubated with a CaCl₂-containing mixture in Ringer solution, with
26
27 1:400 anti-rabbit IgG-Cy3 and man/BSA-FITC (as previously described). In controls experiments, the
28
29 anti-S100 antibody was omitted and the cell nuclei were stained with 0.1µg/mL 4', 6-diamino-
30
31 phenylindole (DAPI – Sigma) or 1 µM TO-PRO (Molecular Probes, Eugene, OR) at room temperature
32
33 for 1 h. After this period, the cells were washed in Ringer solution followed by 0.85% NaCl and the
34
35 coverslips were mounted on slides with 0.1% p-phenylenediamine (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) in
36
37 TBS : glycerol : pH 9.0 carbonate– bicarbonate buffer (1:7:2) and examined in a Zeiss epifluorescence
38
39 photomicroscope or a Meta 510 Zeiss confocal microscope.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 *Ultrastructural cytochemistry.* Due to limitations on cell yield in primary cultures, a follow-up of the
49
50 fate of a putative MR was done in ST88-14 cells only. Living ST88-14 cells adhered to 35mm Petri
51
52 dishes were incubated in HRP coupled to 10 nm colloidal gold (HRP/Au) (Sigma) diluted 1:5 (v/v) in
53
54 Ringer solution containing 5mM CaCl₂ plus 1% BSA at 4°C for 40 min. After incubation, all cultures
55
56
57
58
59
60

1
2
3 were rinsed in the same labeling solution to remove non-adhered particles. Some samples were fixed
4 immediately in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2 at 4°C for 1 h.
5
6 Other cultures were submitted to chase in labeling solution at 37°C for 1 and 3 h. Negative controls
7
8 were obtained by preincubating the cells with 250 mM D-mannose at 4°C for 40min. Cells were
9
10 scraped out of dishes on ice, centrifuged at 900 g for 10min, and post-fixed in 1% osmium tetroxide
11
12 (Sigma) in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 3.5% sucrose at 4°C for 30 min. Cells were then
13
14 washed in the same buffer, dehydrated in acetone, and embedded in PolyBed 812 (Polyscience,
15
16 Philadelphia, PA). Thin sections were obtained in an OmU3 Reichert ultramicrotome, stained with
17
18 aqueous 2% uranyl acetate, and examined in a Zeiss EM 10C transmission electron microscope.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Correlative microscopy of images obtained in phase-contrast optics and S100 immunofluorescence demonstrated that virtually all ST88-14 cells were S100 reactive (not shown) and revealed ~96% purity in our primary SC cultures (Fig. 1A, C).

Schwann and ST88-14 cells bind mannosyl neoglycoprotein. After incubation of fixed cells with man/BSA-FITC in Ca^{2+} -containing medium there was evident labeling, widely distributed on the surface of Schwann cells from primary nerve cultures (Fig. 1B). In fact, occasional S100-negative cells, presumed to be fibroblasts, were labeled by the neoglycoprotein (compare Fig. 1A and 1B), in agreement with the expression of MR in fibroblasts (Sheikh et al. 2000; Hespanhol et al., 2005). Omission of the anti-S100 antibody (Fig. 1D) or incubation of cells with man/BSA and high concentrations of D-mannose (Fig. 1E) eliminated the respective labeling (see also Fig. 1F).

To gather information that may confirm the usefulness of a human Schwann-like cell lineage in pathological models, ST88-14 cells were double-labeled with the mannosyl neoglycoprotein and anti-S100 antibody and examined at the confocal microscope. After incubation of fixed cells with the man/BSA-FITC, there was evident labeling with this marker, widely distributed on the cellular surface (Fig. 2A) and also in the intracellular domain (Fig. 2D, G). At the level of the maximal nuclear diameter, there is intense labeling for man/BSA-FITC in perinuclear regions (Fig. 2D). S100 labeling was localized predominantly in the cytoplasm (Fig. 2E, H) and absent from the membrane (Fig. 2B). Merging of man/BSA-FITC and S100 labeling showed that there is significant co-localization of these markers (Fig. 2F, I) suggesting that a major percentage of the mannosyl-binding protein pool is intracellular. Considerable pixel-to-pixel overlap of man/BSA-FITC and S100, which encompassed several optical sections in the z-series, was observed. Pretreatment of ST88-14 cells with 250mM D-mannose before the incubation with man/BSA-FITC (Fig. 2J, Cf. nuclear staining in Fig. 2L) or ~1.1

1
2
3 μM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HRP (not shown) resulted in virtual absence of this label. Non-specific labeling due to
4
5
6 the secondary antibody was not detected in control sections (Fig. 2K).
7
8
9

10 *Flow cytometry shows high percentages of neoglycoprotein-labeled Schwann and Schwannoma cells.*

11
12 The assays of detection and saturation of the presumptive MR in ST88-14 cells and SC by flow
13
14 cytometry showed a gradual man/BSA-FITC dose-dependent increase in the number of tagged
15
16 receptors (data not shown). The putative MR was efficaciously saturated in ST88-14 cells and SC at
17
18 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ man/BSA concentration (Fig. 3A). Man/BSA-FITC tagging revealed 62% of positive ST88-
19
20 14 cells (Fig. 3A) while the percentage of positive SC cells reached 90% (Fig. 3A). Preincubation of
21
22 ST88-14 cells or SC with $\sim 1.1 \mu\text{M}$ (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HRP (data not shown) or 250mM D-mannose inhibited
23
24 the binding of the man/BSA-FITC (Fig. 3A). Results were essentially identical when the cells were
25
26 first fixed and then labeled with man/BSA-FITC but the intensity of label was weak (data not shown)
27
28 in comparison to that found after tagging of living cells.
29
30
31
32
33
34
35

36 *Schwann and Schwannoma cells and macrophages express an HRP-binding protein of the same*
37
38 *weight.* The overlay assay using HRP as the ligand allowed the identification of a single $\sim 180\text{kDa}$ band
39
40 in ST88-14 cells or SC extracts as also found for peritoneal resident macrophages (Fig. 3B).
41
42
43
44
45

46 *ST88-14 cells take up and internalize the mannosylated ligand HRP.* To initiate studies of the function
47
48 of the putative MR expressed on ST88-14 cells, experiments of HRP/Au internalization were
49
50 performed. Incubation of the cells with HRP/Au at 4°C for 40 min, followed by washing and fixation,
51
52 resulted in numerous HRP/Au particles adhered onto the cellular surface (Fig. 4A). In the chasing
53
54 experiments in which cells were kept in the labeling solution and the temperature was increased to
55
56
57
58
59
60

1
2
3 37°C for 1 h, some gold particles remained adhered to the cellular surface while others were localized
4
5 in membrane invaginations as well as within small vesicles next to the internal face of the plasma
6
7 membrane (Fig. 4B). After 3 h of chase at 37°C, no adhered gold particle was observed on the cellular
8
9 surface (Fig. 4C), but vesicles containing one or more gold particles were seen throughout the
10
11 cytoplasm (Fig. 4C). The specific binding of HRP/Au at the cell surface was clearly demonstrated by
12
13 co-incubation of the cultures with HRP/Au and 250 mM D-mannose, which resulted in an apparently
14
15 major reduction in the number of adhered gold particles in agreement with the flow cytometry data.
16
17
18
19
20
21

22 *An MR-like protein in SC is regulated by IFN- γ and DM.* In subsequent experiments, regulation of MR
23
24 was tested by treatment with mediators of the immune function. SC cultures were stimulated for 18 h
25
26 with IFN- γ or dexamethasone (DM) after which RM expression was determined by flow cytometry
27
28 (Fig. 5). DM induced a substantial increase in the fluorescent signal in comparison to unstimulated SC
29
30 (Gmean: 36.10 ± 0.71 versus 21.31 ± 0.45). In marked contrast, IFN- γ treatment induced a moderate
31
32 reduction in fluorescent signal with respect to control cultures (Gmean: 11.98 ± 0.11 versus 21.31
33
34 ± 0.45).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

In this work, we have described the expression of a putative MR in both rodent SC in primary cultures and in a cell line, derived from a human peripheral sheath tumor, that shows Schwann cell phenotypic markers such as myelin-associated glycoprotein, the Ca²⁺ binding S100 protein, and the merlin protein (Ryan et al., 1994; Scherer and Gutmann, 1996; Oliveira et al., 2003). It should, in fact, be noted that the occurrence of this putative MR is not linked to neoplastic transformation since the proportion of man/BSA-binding cells is lower in ST88-14 than in SC from primary cultures. It is also noteworthy that the putative MR receptor of both Schwann and Schwannoma cells has a molecular weight similar to that of peritoneal resident macrophages. An analogous situation has been known to exist concerning the MR in macrophages and in retinal pigment epithelium, a cell type derived from the neural tube rather than of the neural crest, but also an ectodermic derivative (Greaton et al., 1996). Indeed, there is 100% identity between the N-terminus and transmembrane regions of macrophage and retinal pigment epithelium mannose receptor transcripts.

It is interesting to note that MR is expressed in both normal and dystrophic retinal pigment epithelium with no more than a two-fold difference in the level of expression between the normal and the dystrophic condition (Wilt et al., 1999). In our judgement, it is likely that MR is important for SC function in physiologic or physiopathologic conditions and that the cell line ST88-14 should be a good model to study the immune function of Schwann cells, including the expression of MR, an endocytotic receptor mediating efficient uptake of glycosylated antigens (Linehan, 2005).

The prospective functionality of MR receptor has been inferred from the fate of the mannosylated ligand HRP after uptake by ST88-14 cells. HRP is a glycoprotein devoid of phosphorylated carbohydrates and rich in mannose and N-acetylglycosamine groups (Clarke and Shannon, 1976) that has been usually reported as a label for cytochemical detection of mannosyl binding sites in normal tissue and in parasite-infected cells (Hespanhol et al., 2005; Straus, 1981; Soeiro

1
2
3 et al., 1999). Thus, we used HRP with multiple purposes, namely, as a competitor for man/BSA
4
5 binding assay, as a probe for the molecular mass of the putative MR and as a probe of the localization
6
7 and fate of endogenous lectin(s)/ MR in an electron microscopic approach. We have not investigated
8
9 whether HRP enters recycling endosomes as shown recently for man/polyacrylamide-FITC in
10
11 transfected CHO cells (Su et al., 2005).
12
13
14

15 Both confocal and electron microscopy provided clues to the synthesis or internalization and
16
17 distribution pathway of MR in ST88-14 cells. Double labeling with mannosyl-BSA and S100 showed
18
19 that there is significant co-localization of these markers suggesting that a major percentage of the MR
20
21 cellular pool is intracellular. In HRP/Au ultrastructural experiments, the tracer was found initially
22
23 adhered to the cellular surface and, after chasing and incubation at 37° C (1 – 3h), in membrane
24
25 invaginations and then inside small vesicles. Such invaginations and vesicles are probably early
26
27 endosomes due to their localization near the internal face of the plasma membrane. However, multiple
28
29 times of incubation are necessary in order to provide additional details on the initial steps of MR-
30
31 mediated endocytosis in ST88-14 cells. For instance, longer times could allow the characterization of
32
33 other endosomal compartments such as late endosomes and lysosomes. Thus, studies are needed to
34
35 further characterize the intracellular pathway of MR in ST88-14 cells.
36
37
38
39
40

41 In non-neural systems, it has been proposed that MR acts in the clearance system of proteins
42
43 from the bloodstream and extracellular space (Lansink et al., 1999), enhancing the uptake of lysosomal
44
45 hydrolases, tissue plasminogen activator, neutrophil-derived myeloperoxidases, and collagen
46
47 propeptides (Lee et al., 2002; Pontow et al., 1992). However, a role for Schwann cells in such functions
48
49 may be rather limited under physiological conditions, in view of the occurrence of the perineurial
50
51 blood-nerve-barrier (see also Regnier-Vigouroux, 2003). Nevertheless, it is known that the blood-nerve
52
53 barrier may not be as efficient as the blood-brain barrier and there may be regional differences among
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 different nerves as demonstrated for different regions of the same dorsal root ganglion (Hirakawa et al.,
4
5
6 2004).

7
8 Schwann cells synthesize (and secrete) many neurotrophic and growth factors, cell adhesive
9
10 molecules, basement membrane components as well as several receptors during various stages of life
11
12 (for review, see Jessen and Mirsky, 1999). There is evidence that Schwann cells may promote the
13
14 successful regeneration and restoration of function of damaged nerves in a process that may involve
15
16 their functioning as non-professional phagocytes, by engulfing cell debris, prior to the guidance of
17
18 regrowing processes (Band et al., 1986; Kury et al., 2001; Lilje, 2002; Vedeler and Fitzpatrick-Klove,
19
20 1990). This engulfment of cell debris may require the occurrence of MR, a receptor involved in
21
22 “scavenging” activities such as the killing and ingestion of microorganisms.
23
24
25
26

27 The response of the MR-like pretein in Schwann and Schwann-like cells to the MR
28
29 modulators, IFN- γ and dexamethasone is similar to that of professional and non-professional
30
31 phagocytes including microglia (Marzolo et al., 1999; Zimmer et al., 2003) and antigen-presenting cells
32
33 such as monocyte-derived dendritic cells (Allavena et al., 1998; Longoni et al., 1998; Piemonti et al.,
34
35 1999). An important implication of the MR in Schwann cells concerns their proposed use in
36
37 transplantation for regeneration of lesions of the Central Nervous System (CNS), particularly, those
38
39 accompanied by cavitation. There is evidence that secondary cavitation in CNS lesion involves both the
40
41 complement receptor type 3 b2-integrin and the macrophage MR receptor (Fitch et al. 1999). More
42
43 recently, attempts have been made to clarify the behavioral outcome of using these MR modulators in
44
45 the acute phase of contusive cord lesions followed, after a delay of days, by SC grafts. Although the
46
47 beneficial effects of these therapies were not always additive, there were indications that a combination
48
49 of methylprednisolone and interleukin-10 together with grafts of SC and olfactory ensheathing glia
50
51 may improve behavioral outcome in spinal cord lesions (Pearse et al., 2004). The authors also
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 emphasized the need to understand the action of those protective agents (actually, MR enhancers) –
4
5 interleukin-10 and a glucocorticoid – in the transformation of the milieu of the injured spinal cord as
6
7 such transformation influences the response to transplanted Schwann and other cells.
8
9

10 Our present results reinforce the notion that Schwann cells may have a role in the immune
11
12 response. Although poorly understood, the presumptive immune function of Schwann cells has been
13
14 demonstrated in several PNS pathologies (Rutkowski et al., 1999), for instance, acting as facultative
15
16 antigen-presenting cells during inflammation, in whose course they process and present endogenous
17
18 and exogenous antigens (Lilje, 2002). Thus, the expression of MR can have important implications not
19
20 only for understanding how Schwann cells recognize self or non-self molecules, but also for
21
22 understanding the trigger mechanisms for the production of cytokines by these cells. A cautionary note
23
24 has, however, been provided in a recent study in transfected fibroblasts in which it was claimed that
25
26 MR has no general role in the processing and presentation of antigens (Napper and Taylor, 2004).
27
28
29
30
31

32 In summary, our current study documents for the first time the presence of MR in Schwann
33
34 and Schwann-like cells, thus reinforcing the importance of these cells as models for the possible role of
35
36 the peripheral glia in host defense in infectious diseases, neoplasia, and in other degenerative disorders
37
38 as well as for their participation in cellular therapy.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by the Instituto Oswaldo Cruz, the Graduate Vice-Presidency of Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEPG/UFRJ), the Brazilian Council for Science and Technology (CNPq), and the Rio de Janeiro State Foundation for Research Support (FAPERJ). We are grateful to Bruno Avila, Generval L. Batista, and Sergio Luiz de Carvalho for their excellent technical assistance. We also thank Renata Zardo and Cristiana Soares de Lima for help with electrophoresis and HRP biotinylation, respectively.

References

- Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L. 2004. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* 24:179-192.
- Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. 1998. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 28:359-369.
- Awatramani R, Shumas S, Kamholz J, Scherer SS. 2002. TGF β 1 modulates the phenotype of Schwann cells at the transcriptional level. *Mol Cell Neurosci* 19:307-319.
- Band H, Bhattacharya A, Talwar GP. 1986. Mechanism of phagocytosis by Schwann cells. *J Neurol Sci* 75:113-118.
- Bunge RP, Bunge MB, Eldridge CF. 1986. Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells. *Annu Rev Neurosci* 9:305-328.
- Burudi EME, Riese S, Stahl PD, Régnier-Vigouroux A. 1999. Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia* 25:44-55.
- Burudi EME, Régnier-Vigouroux A. 2001. Regional and cellular expression of the mannose receptor in the post-natal developing mouse brain. *Cell Tissue Res* 303:307-317.

1
2
3
4
5 Cambi A, Figdor CG. 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr*
6
7
8 *Opin Cell Biol* 15:539-546.
9

10
11
12 Chatterjee D, Khoo KH. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: An extraordinary lipoheteroglycan
13
14
15 with profound physiological effects. *Glycobiology* 8:113-120.
16
17

18
19
20 Clarke J, Shannon LM. 1976. The isolation and characterization of the glycopeptides from horseradish
21
22
23 peroxidase isoenzyme C. *Biochim Biophys Acta* 427:428-42.
24
25

26
27 Deprez M, Lubke U, Verlaet M, Debrus S, Delvenne P, Martin JJ. 2001. Detection of cytokines in
28
29
30 human sural nerve biopsies: an immunohistochemical and molecular study. *Acta Neuropathol (Berl)*
31
32
33 101:393-404.
34
35

36
37 Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM. 1991.
38
39
40 Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158.
41
42

43
44 Felts PA, Smith KJ. 1996. Blood-brain barrier permeability of astrocytes-free regions of the Central
45
46
47 Nervous System remyelinated by Schwann cells. *Neuroscience* 73:643-655.
48
49

50
51 Fiete DJ, Beranek MC, Baenziger JU. 1998. A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor
52
53
54 mediates GalNAc-4-SO₄ binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2089-2093.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. 1999. Cellular and molecular mechanisms of
4 glial scarring and progressive cavitation: In vivo and in vitro analysis of inflammation-induced
5
6 secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 19:8182–8198.
7
8
9

10
11
12 Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D. 2005. Mannose receptor
13 expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Glia 49:375-384.

Greaton CJ, Lane KB, Shepherd VL, McLaughlin BJ. 1996. Sequence homology identified between
retinal pigment epithelium and the macrophage mannose receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:S910.

Haltiwanger RS, Lehrman MA, Eckhardt AE, Hill RL. 1986. The distribution and localization of the
fucose-binding lectin in rat tissues and the identification of a high affinity form of the mannose/N-
acetylglucosamine-binding lectin in rat liver. *J Biol Chem* 516:7433-7439.

Hespanhol RC, Soeiro MNC, Meuser MB, Meirelles MNLS, Corte-Real S. 2005. The expression of
mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J.*
Histochem Cytochem 53:35-44.

Hirakawa H, Okajima S, Nagaoka T, Kubo T, Takamatsu T, Oyamada A. 2004. Regional differences in
blood-nerve barrier function and tight-junction protein expression within the rat dorsal root ganglion.
Neuroreport 15:405-408.

1
2
3 Hwa KY, Khoo KH. 2000. Structural analysis of the asparagine-linked glycans from the procyclic
4
5 Trypanosoma brucei and its glycosylation mutants resistant to Concanavalin A killing. Mol Biochem
6
7 Parasitol 111:173-184.
8
9

10
11
12 Jessen KR, Mirsky R. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve
13
14 development. Trends Neurosci 22:402–410.
15
16
17

18
19
20 Kury P, Stoll G, Muller HW. 2001. Molecular mechanisms of cellular interactions in peripheral nerve
21
22 regeneration. Curr Opin Neurol 14:635-639.
23
24
25

26
27 Lansink M, Jong M, Bijsterbosch M, Bekkers M, Toet K, Havekes L, Emeis J, Kooistra T. 1999.
28
29 Increased clearance explains lower plasma levels of tissue-type plasminogen activator by estradiol:
30
31 evidence for potentially enhanced mannose receptor expression in mice. Blood 94:1330-1336.
32
33
34

35
36 Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, Feizi T, Langen H, Nussenzweig
37
38 MC. 2002. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. Science
39
40 295:1898-1901.
41
42
43

44
45 Lew DB, Songu-Mize E, Pontow SE, Stahl PD, Rattazzi MC. 1994. A mannose receptor mediates
46
47 mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells. J Clin Invest
48
49 94:1855-1863.
50
51
52

53
54
55 Lilje O. 2002. The processing and presentation of endogenous and exogenous antigen by Schwann cells
56
57 in vitro. Cell Mol Life Sci 59:2191-2198.
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Linehan SA. 2005. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs.
7
8 BMC Immunology 6:4 doi:10.1186/1471-2172.
9

10
11
12 Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. 1999. Mannose receptor and its putative
13
14 ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor
15
16 by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not
17
18 dendritic cells. J Exp Med 189:1961-1972.
19
20

21
22
23 Linehan SA, Martinez-Pomares L, da Silva RP, Gordon S. 2001. Endogenous ligands of carbohydrate
24
25 recognition domains of the mannose receptor in murine macrophages, endothelial cells and secretory
26
27 cells; potential relevance to inflammation and immunity. Eur J Immunol 31:1857-1866.
28
29
30

31
32
33 Longoni D, Piemonti L, Bernasconi S, Mantovani A, Allavena P. 1998. Interleukin-10 increases
34
35 mannose receptor expression and endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells. Int J Clin Lab
36
37 Res 28:162-169.
38
39

40
41
42
43 Makrides HC, MacFarlane TW. 1983. An investigation of the factors involved in increased adherence
44
45 of *C. albicans* to epithelial cells mediated by *E. coli*. Microbios 38:177-185.
46
47

48
49
50 Mansour MK, Schlesinger LS, Levitz SM. 2002. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans*
51
52 mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. J
53
54 Immunol 168:2872-2879.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Martinez-Pomares L, Linehan SA, Taylor PR, Gordon S. 2001. Binding properties of the mannose
4 receptor. *Immunobiology* 204:527-535.
5
6
7

8
9
10 Marzolo MP, von Bernhardi R, Inestrosa NC. 1999. Mannose receptor is present in a functional state in
11 rat microglial cells. *J Neurosci Res* 58:387-395.
12
13
14

15
16
17 Melzer P, Savchenko V, McKanna J. 2001. Microglia, astrocytes, and macrophages react differentially
18 to central and peripheral lesions in the developing and mature rat whisker-to-barrel pathway: A study
19 using immunohistochemistry for lipocortin1, phosphotyrosine, S100b, and mannose receptors. *Exp*
20 *Neurol* 168:63-77.
21
22
23
24
25
26
27
28

29 Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP. 1991. Isolation and functional characterization of Schwann
30 cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci* 11:2433-2442.
31
32
33
34
35

36 Napper CE, Taylor ME. 2004. The mannose receptor fails to enhance processing and presentation of a
37 glycoprotein antigen in transfected fibroblast. *Glycobiology* 14:7C-12C.
38
39
40
41
42

43 Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. 2003.
44 Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy.
45 *Infect Immun* 71:1427-1433.
46
47
48
49
50

51
52
53 Pearse DD, Marcillo AE, Oudega M, Lynch MP, Wood PM, Bunge MB. 2004. Transplantation of
54 Schwann cells and olfactory ensheathing glia after spinal cord injury: does pretreatment with
55 methylprednisolone and interleukin-10 enhance recovery? *J Neurotrauma* 21:1223-1239.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Piemonti L, Monti P, Allavena P, Leone BE, Caputo A, Di Carlo V. 1999. Glucocorticoids increase the endocytotic activity of human dendritic cells. *Int Immunol* 11:1519-1526.

Pontow SE, Kery V, Stahl PD. 1992. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137:221-244.

Regnier-Vigouroux A. 2003. The mannose receptor in the brain. *Int Rev Cytol* 226:321-342.

Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL. 1999. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* 101:47-60.

Ryan JJ, Klein KA, Neuberger TJ, Leftwich JA, Westin EH, Kauma S, Fletcher JA, DeVries GH, Huff TF. 1994. Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J Neurosci Res* 37:415-432.

Scherer SS, Gutmann DH. 1996. Expression of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, in Schwann cells. *J Neurosci Res* 46:595-605.

Sheikh H, Yarwood H, Ashworth A, Isacke CM. 2000. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci* 113:1021-1032.

Shepherd VL, Tarnowski BI, McLaughlin BJ. 1991. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1779-1784.

1
2
3
4
5
6 Soeiro MNC, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MNSL, Araujo-Jorge TC. 1999. A cardiomyocyte
7
8 mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after
9
10 infection. Cell Struct Funct 24:139-149.
11

12
13
14
15 Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. 2000. Novel mechanisms in the
16
17 immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium*
18
19 *leprae*. Immunol Cell Biol 78:349-355.
20
21

22
23
24
25 Stahl PD, Ezekowitz RA. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host
26
27 defense. Curr Opin Immunol 10:50-55.
28
29

30
31
32 Straus W. 1981. Cytochemical detection of mannose-specific receptors for glycoproteins with
33
34 horseradish peroxidase as a ligand. Histochemistry 73:39-47.
35
36

37
38
39 Su Y, Bakker T, Harris J, Tsang C, Brown GD, Wormald MR, Gordon S, Dwek RA, Rudd PM,
40
41 Martinez-Pomares L. 2005. Glycosylation influences the lectin activities of the macrophage mannose
42
43 receptor. J Biol Chem 27: JBC Papers in Press. Published on June 27, 2005 as Manuscript
44
45 M503457200.
46
47

48
49
50
51 Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and
52
53 immunity through sugar recognition. Trends Immunol 26:104-110.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Teare KA, Pearson RG, Shakesheff KM, Haycock JW. 2004. Alpha-MSH inhibits inflammatory
4 signalling in Schwann cells. *Neuroreport* 15:493-498.
5
6
7

8
9
10 Toews AD, Barrett C, Morell P. 1998. Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for
11 macrophage recruitment following injury to sciatic nerve. *J Neurosci Res* 53:260–267.
12
13
14

15
16
17 Uccini S, Sirianni MC, Vincenzi L, Topino S, Stoppacciaro A, Lesnoni La Parola I, Capuano M,
18 Masini C, Cerimele D, Cella M, Lanzavecchia A, Allavena P, Mantovani A, Baroni CD, Ruco LP.
19 1997. Kaposi's sarcoma cells express the macrophage-associated antigen mannose receptor and develop
20 in peripheral blood cultures of Kaposi's sarcoma patients. *Am J Pathol* 150:929-938.
21
22
23
24
25
26
27

28
29 Vedeler CA, Fitzpatrick-Klove L. 1990. Receptors for immunoglobulin G demonstrated on human
30 peripheral nerve fibres by electron microscopy. *Neurosci Lett* 115:167-170.
31
32
33
34
35

36 Wilson ME, Pearson RD. 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on
37 human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol* 136:4681-4688.
38
39
40
41
42

43 Wilt SD, Greaton CJ, Lutz DA, McLaughlin BJ. 1999. Mannose receptor is expressed in normal and
44 dystrophic retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 69:405-411.
45
46
47
48
49

50 Wood P, Moya F, Eldridge C, Owens G, Ranscht B, Schachner M, Bunge M, Bunge R. 1990. Studies
51 on the initiation of myelination by Schwann cells. *An New York Acad Sci* 605:1-14.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Zimmer H, Riese S, Regnier-Vigouroux A. 2003. Functional characterization of mannose receptor
4
5 expressed by immunocompetent mouse microglia. *Glia* 42:89-100.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Legends to the figures

Figure 1. Fluorescent microscope images showing expression of MR in Schwann cells (SC) cultured from adult sciatic nerve. A shows cultured cells incubated with anti-brainS100 antibody and Cy3-labeled secondary antibody; B shows the same field after incubation with man/BSA-FITC. C shows the DAPI-stained cell nuclei of this field. Notice, by comparing A, B, C that all S100+ cells in A and occasional S100-negative cells (remaining fibroblasts) are labeled with the neoglycoprotein in B. D, E and F show another field after omission of anti-S100 (D), incubation with 250 mM D-mannose prior to man/BSA-FITC (E) and merged image of DAPI staining and phase contrast optics. Bar = 50 μ m.

Abbreviation: man/BSA-FITC = mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate.

Figure 2. Confocal microscope images showing expression of MR and brain S100 in a human Schwann (ST88-14) cell line. The three top rows show images of a cell, taken from different optic planes, selected from z-series. Columns show man/BSA-FITC binding (left-hand column), S100 immunoreactivity (middle), and their co-localization (right-hand column). The top row represents an optic plane at or near the free surface of the membrane whereas the two following rows show two planes through the nucleus (nuclear maximal diameter in D, E, F). The bottom row shows another cell, stained with TO-PRO (L), treated with man/BSA-FITC plus D-mannose (J), and Cy3-labeled secondary antibody only (K). These results are representative of five separate experiments. Bar (for A-L) = 20 μ m. Abbreviation: man/BSA-FITC = mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3. Figure 3. MR expression in a Schwann cell lineage and in Schwann cells from primary cultures. A-B. Flow cytometric analysis of the expression of MR in ST88-14 cells (A) and SC (B). The analysis was performed in the specified region (R1). Cells were incubated with man/BSA-FITC at 50 mg/mL (shaded histogram) or at the same concentration after preincubation of the cells with 250mM D-mannose for 40 minutes (unshaded histogram). Data are representative of three separate experiments. (C). Proteins from crude extracts of resident peritoneal resident macrophages, ST88-17 cells, and SC were separated by 8.5 % SDS-PAGE under non-reducing conditions and blotted onto nitrocellulose membranes. Nitrocellulose transfers were overlaid with 2.0 µg/mL biotinylated HRP followed by streptavidin-peroxidase conjugate and revealed with H₂O₂ and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC). Arrow points to the ~180 kDa band.

Figure 4. Figure 4. Ultrastructural analysis showing the localization of MR in ST88-14 cells after incubation with the ligand (HRP) without and with chasing at different time intervals. A. Incubation of cells with HRP/Au at 4C for 40 min reveals numerous gold particles restricted to the cell membrane (arrows). B. After washing of HRP/Au and a gradual increase of the temperature to 37°C, maintained for 1 hr, gold particles are still found at the cell surface (arrows) and become abundant in membrane invaginations (thick arrow) as well as within small vesicles (arrowheads) next to the internal face of the plasma membrane. C. After chasing for 3 hr at 37C, virtually all gold particles are found in small vesicles (arrows), indicating MR internalization. The inset is a high magnification view with arrows pointing to some of the numerous HRP/Au-containing vesicles. Bars = 0.5µm.

Figure 5. Figure 5. Regulation of MR expression in SC by interferon-γ (IFN- γ) and dexamethasone (DM). Cells were preincubated with IFN- γ or DM for 18 h or left untreated. All cells were incubated

1
2
3 with man/BSA-FITC at 50 $\mu\text{g/mL}$, with controls for neoglycoprotein labeling being preincubated with
4
5 250 mM D-mannose (D-man) for 40 minutes. IFN- γ induced about 42% decrease whereas DM
6
7 induced 71% increase in the fluorescent signal. The experiment was performed three times and
8
9 quantitative analysis carried out on the geometric means of the data.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

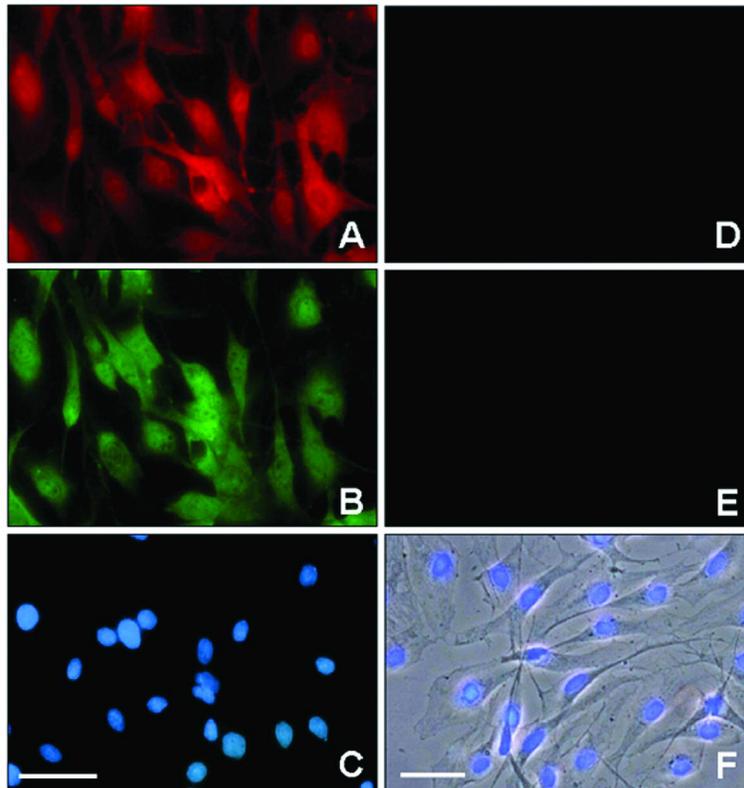


Figure 1. Fluorescent microscope images showing expression of MR in Schwann cells (SC) cultured from adult sciatic nerve. A shows cultured cells incubated with anti-brain S100 antibody and Cy3-labeled secondary antibody; B shows the same field after incubation with man/BSA-FITC. C shows the DAPI-stained cell nuclei of this field. Notice, by comparing A, B, C that all S100+ cells in A and occasional S100-negative cells (remaining fibroblasts) are labeled with the neoglycoprotein in B. D, E and F show another field after omission of anti-S100 (D), incubation with 250 mM D-mannose prior to man/BSA-FITC (E) and merged image of DAPI staining and phase contrast optics. Bar = 50 μ m. Abbreviation: man/BSA-FITC = mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate.

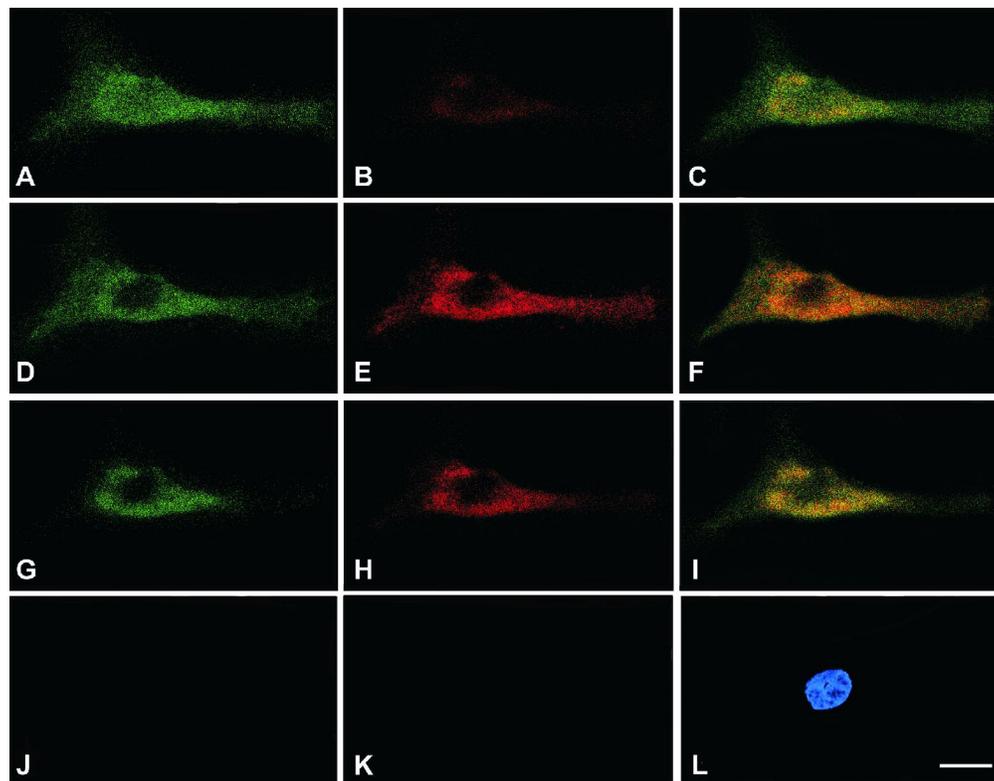


Figure 2. Confocal microscope images showing expression of MR and brain S100 in a human Schwann (ST88-14) cell line. The three top rows show images of a cell, taken from different optic planes, selected from z-series. Columns show man/BSA-FITC binding (left-hand column), S100 immunoreactivity (middle), and their co-localization (right-hand column). The top row represents an optic plane at or near the free surface of the membrane whereas the two following rows show two planes through the nucleus (nuclear maximal diameter in D, E, F). The bottom row shows another cell, stained with TO-PRO (L), treated with man/BSA-FITC plus D-mannose (J), and Cy3-labeled secondary antibody only (K). These results are representative of five separate experiments. Bar (for A-L) = 20 μ m. Abbreviation: man/BSA-FITC = mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate.

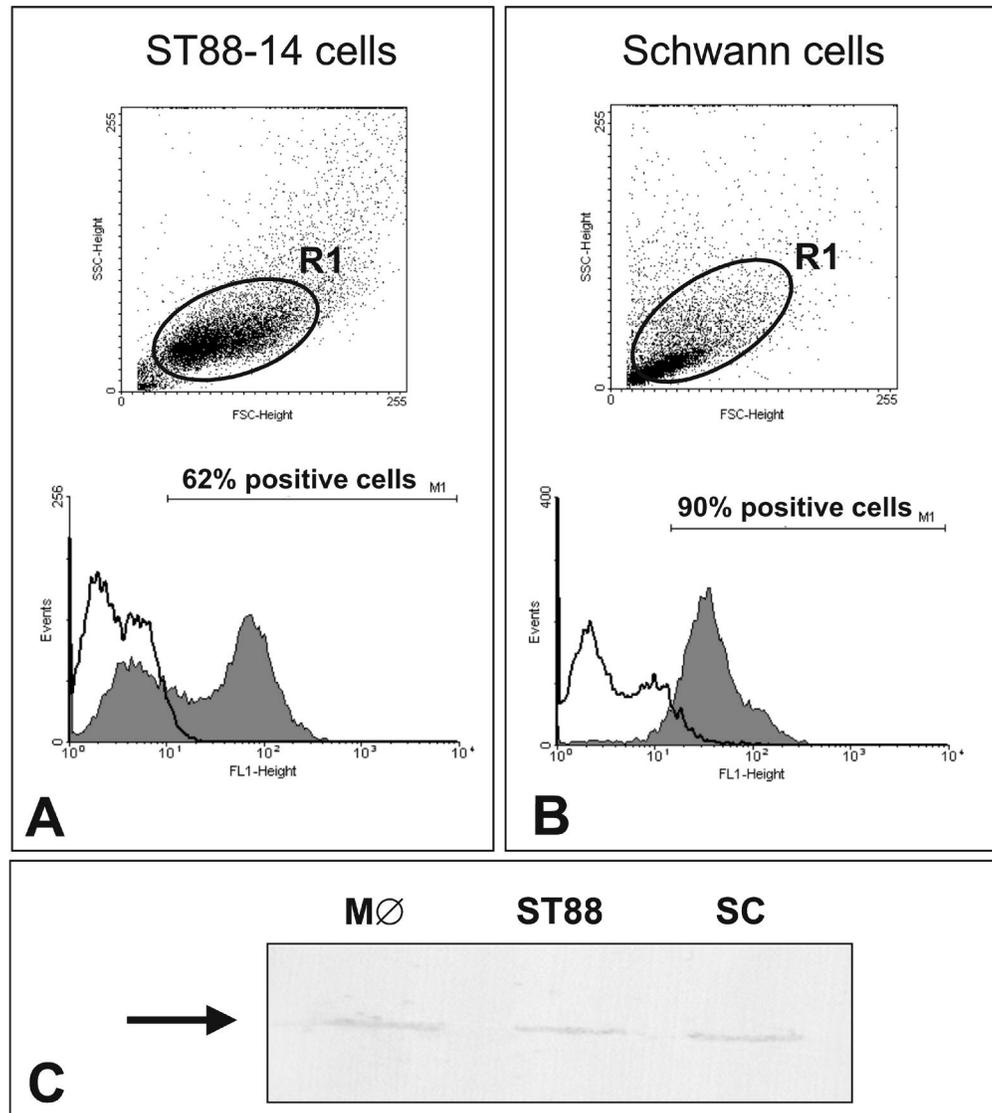


Figure 3. MR expression in a Schwann cell lineage and in Schwann cells from primary cultures. A-B. Flow cytometric analysis of the expression of MR in ST88-14 cells (A) and SC (B). The analysis was performed in the specified region (R1). Cells were incubated with man/BSA-FITC at 50 mg/mL (shaded histogram) or at the same concentration after preincubation of the cells with 250mM D-mannose for 40 minutes (unshaded histogram). Data are representative of three separate experiments. (C). Proteins from crude extracts of resident peritoneal resident macrophages, ST88-17 cells, and SC were separated by 8.5 % SDS-PAGE under non-reducing conditions and blotted onto nitrocellulose membranes.

Nitrocellulose transfers were overlaid with 2.0 μ g/mL biotinylated HRP followed by streptavidin-peroxidase conjugate and revealed with H₂O₂ and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC). Arrow points to the \sim 180 kDa band.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

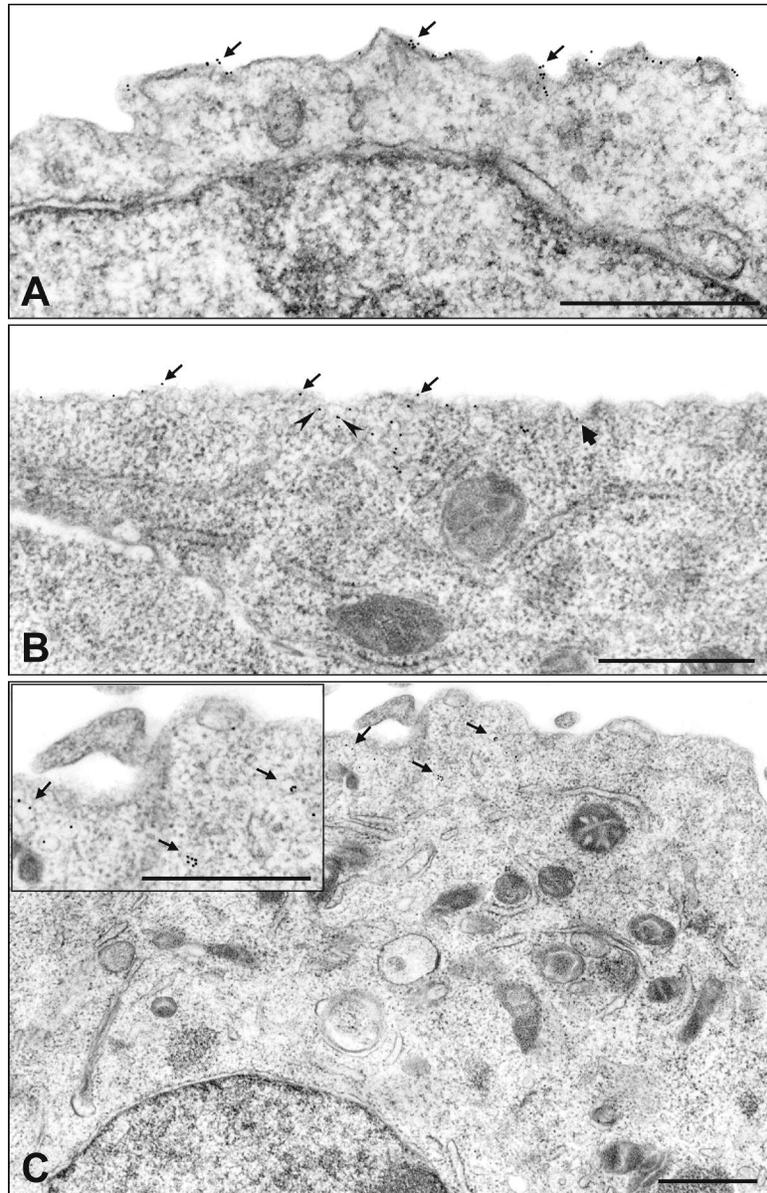


Figure 4. Ultrastructural analysis showing the localization of MR in ST88-14 cells after incubation with the ligand (HRP) without and with chasing at different time intervals. A. Incubation of cells with HRP/Au at 4°C for 40 min reveals numerous gold particles restricted to the cell membrane (arrows). **B.** After washing of HRP/Au and a gradual increase of the temperature to 37°C, maintained for 1 hr, gold particles are still found at the cell surface (arrows) and become abundant in membrane invaginations (thick arrow) as well as within small vesicles (arrowheads) next to the internal face of the plasma membrane. **C.** After chasing for 3 hr at 37°C, virtually all gold particles are found in small vesicles (arrows), indicating MR internalization. The inset is a high magnification view with arrows pointing to some of the numerous HRP/Au-containing vesicles. Bars = 0.5 μ

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

m.

For Peer Review

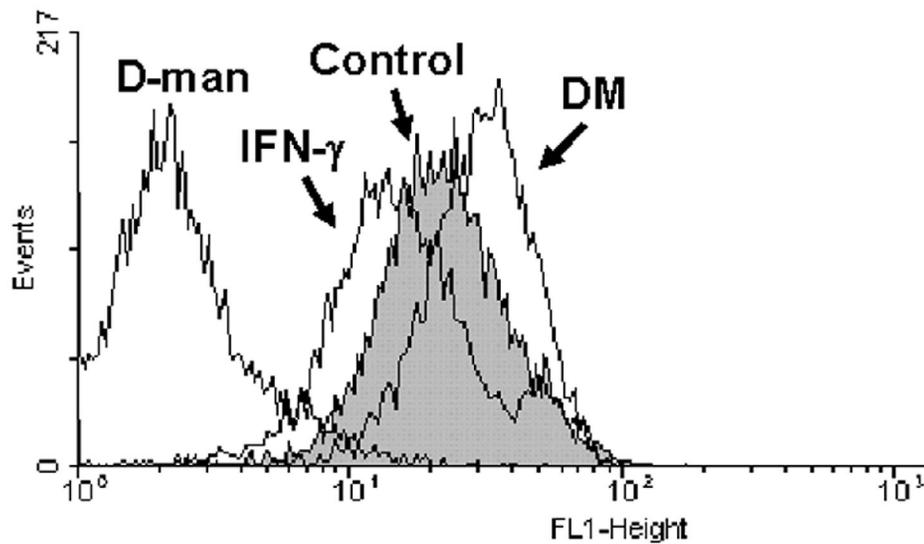


Figure 5. Regulation of MR expression in SC by interferon- γ (IFN- γ) and dexamethasone (DM). Cells were preincubated with IFN- γ or DM for 18 h or left untreated. All cells were incubated with man/BSA-FITC at 50 μ g/mL, with controls for neoglycoprotein labeling being preincubated with 250 mM D-mannose (D-man) for 40 minutes. IFN- γ induced about 42% decrease whereas DM induced about 71% increase in the fluorescent signal. The experiment was performed three times and quantitative analysis carried out on the geometric means of the data.