

RESUMO — Os autores se propõem a revisar alguns aspectos básicos sobre os prions, alertando sobre a possível participação destes na etiologia de algumas enfermidades degenerativas do sistema nervoso.

Prions

SUMMARY — The authors make a review of the prion biological properties calling special attention for the possible participation of these agents in some neurodegenerative disorders.

O estudo de infecções virais em medicina veterinária foi de grande valor para a compreensão de algumas doenças do sistema nervoso central (SNC) do homem. Björn Sigurdsson⁵⁰, em 1954, introduziu o termo «virose lenta» a partir da descrição detalhada de enfermidades que acometiam o gado ovino na Islândia. A «rida», também conhecida como «scrapie», a «visna» e o «maedi» caracterizavam-se por longo período de incubação, após o qual surgiam manifestações clínicas de curso inexorável para o óbito.

Em 1957 e 1959, Gajdusek e Zigasi³³ e Klatzo et al.³³ descreveram, respectivamente, a forma de expressão clínica do kuru (entidade de elevada incidência na Nova Guiné) e as anomalias morfológicas dele advindas. Em 1959, o patologista veterinário William Hadlow, publicou 27 de maio «The Lancet» carta intitulada «Scrapie and Kuru» na qual diz: «...it might be profitable, in view of veterinary experience with scrapie, to examine the possibility of the experimental induction of kuru in a laboratory primate, for one might surmise that the pathogenetic mechanisms involved in scrapie — however unusual they may be — are unlikely to be unique in the province of animal pathology». A partir desse marco, estudos incessantes foram efetuados no sentido de se determinar o agente transmissor do kuru. Os frutos destes foram colhidos em 1966, quando Gajdusek et al.¹⁵ reproduziram a doença em chimpanzés, inoculando-os com tecido cerebral de pacientes com kuru. A intimidade entre os agentes do scrapie, kuru e doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) foi referida por Gibbs et al.²⁴ e confirmada pelos experimentos de Hadlow et al.²⁸.

Após a criação do termo virose lenta e sua possível ligação com doenças neurais do homem, buscou-se a caracterização do agente do scrapie. Em 1967, Alper et al.² provaram que, após exposição à radiação ultravioleta, cérebros de camundongos com scrapie mantinham o mesmo potencial infectante. Tais autores sugeriram a provável ausência de ácidos nucleicos na estrutura do agente. Dois anos mais tarde, Hunter et al.⁹ advogaram que uma glicoproteína seria a base na constituição do scrapie, tese confirmada por outros^{11,12}.

Gajdusek¹⁷ dividiu os microrganismos ligados à etiopatogenia das infecções lentas do SNC em dois grandes grupos: (a) agentes convencionais — incluem alguns vírus já amplamente conhecidos (vírus do sarampo e rubéola, papovavírus — entre outros); (b) agentes não convencionais — estão incluídos nesta categoria os trans-

Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ): * Professor Adjunto de Neurologia; ** Professor Auxiliar de Neurologia; *** Médico Residente do Serviço de Neurologia.

Dr. José Maurício Godoy — Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ - Av. 28 de Setembro 77, 2º andar - 20551 Rio de Janeiro RJ - Brasil.

missores das encefalopatias espongiformes (kuru, DCJ e scrapie). Marsh et al.³⁹ confirmaram a grande diferença entre esses dois grupos, já que os pertencentes ao segundo mostravam resistência incomum ao calor, radiação ultravioleta, formaldeído e nucleases.

As principais características físico-químicas do scrapie tornaram-se conhecidas no início da década de 80^{42,53,54}. A presença de uma proteína hidrofóbica, necessária para a infectividade foi demonstrada^{56,58}. Essa proteína foi nomeada, por Prusiner, PRION (proteinaceous infectious particle)⁴⁹ e enquadrada na categoria «vírus animal filamentar» por Merz et al.⁴³. Sua sequência de aminoácidos foi desvendada por Prusiner et al.⁵⁵, que a chamaram de proteína PrP 27-30, cujo peso molecular situa-se entre 27000 e 30000 daltons. Esta parece ser a fração fundamental para a infectividade, pois sua concentração é diretamente proporcional ao grau de transmissão⁵¹. Após a purificação da PrP 27-30⁵², utilizando a técnica «Western blot» com anticorpos direcionados contra essa proteína, Oesch et al.⁴⁶ notaram reação com outra proteína de peso molecular entre 33000 e 35000 daltons, denominando-a PrP 33-35^{5c}. A ação da proteinase K converte a PrP 33-35^{5c} em PrP 27-30, sugerindo que a primeira seja o precursor da segunda⁵. Os anticorpos contra a PrP 27-30 também reagiram com outra proteína existente tanto em cérebros normais quanto infectados. Esta foi chamada PrP 33-35^c, que é totalmente degradada pela proteinase K^{3,5,46}. Com a continuidade dos estudos concluiu-se que, em cérebros infectados, encontram-se as três proteínas, enquanto em tecido cerebral normal somente a PrP 33-35^{o6}.

A síntese de RNA mensageiro codificador da PrP (RNAm-PrP) tornou possível a detecção do DNA complementar nos cérebros infectados, criando a idéia de que o sistema de replicação do prion estaria no interior da célula hospedeira^{14,16}. Curiosamente, o RNAm-PrP foi também encontrado, em níveis similares, nos cérebros normais de cobaias¹⁶. A confirmação da hipótese de que a PrP 27-30 seria produzida a partir do DNA do hospedeiro, especialmente nos neurônios³⁴ revolucionou conceitos da biologia molecular e a descoberta da PrP 33-35^c pode auxiliar, de forma capital, na compreensão da etiopatogenia de algumas enfermidades degenerativas do SNC.

Segundo Kretzschmar et al.³⁴, os níveis de RNAm-PrP variam entre os diferentes tipos de neurônios normais, modificando a sua distribuição no estágio pré-clínico da doença, quando são encontrados de forma homogênea. Em 1985, Kingsbury et al.³² sugeriram a existência de um mesmo «locus» genético, em camundongos, determinante do período de incubação do scrapie e da DCJ, haja vista que ambas foram reproduzidas não apenas em primatas não humanos²⁰⁻²² mas, também, em roedores^{13,62}. Mais recentemente, ficou definido esse «locus» responsável pela codificação do RNAm-PrP em camundongos¹², que os autores denominaram «sinc», onde estariam os dois genes, «Pid-1» e «Prn-i». Ambos influenciariam o período de incubação das duas doenças e localizar-se-iam nos cromossomos 17 e 2, respectivamente⁶¹.

Conforme postulado por Gajduseki⁶ e por Prusiner⁵⁰ as encefalopatias espongiformes não desencadeiam resposta imune. A dificuldade na síntese de anticorpos contra a PrP 27-30 pelo hospedeiro seria explicada por tolerância induzida pela PrP 33-35^{o5}, contribuindo para a falha da reação imunológica à infecção lenta, por reconhecimento da PrP 33-35^o como estrutura própria^{46,49}.

As PrP 33-35^o e PrP 33-35^{5c} apresentam mesma sequência de aminoácidos sendo, portanto, codificadas pelo mesmo gene⁶. Por outro lado, a estrutura molecular da PrP 33-35^{5c} facilita a sua polimerização em filamentos e hastes amilóides, fato não observado na PrP 33-35^{o34}^{57,58}. Essa diferença ocorreria como consequência de eventos pós-translacionais⁶. Em 1988, Narang et al.⁴⁵, estudando as estruturas tubulo-filamentares encontradas em cérebros de camundongos infectados pelo agente do scrapie, obtiveram resultados surpreendentes. Os autores, inicialmente, trataram tais estruturas com enzimas proteolíticas, resultando diminuição no calibre dos túbulos (de 50nm para 30nm). Posteriormente, trataram o material com DNAases, obtendo estruturas similares às fibrilas associadas ao scrapie. Com RNAase não houve reação alguma. Finalmente, estas fibrilas reagiram positivamente ao anticorpo para a PrP 27-30, sugerindo que as estruturas encontradas nas encefalopatias espongiformes são bem mais complexas que se acreditava, consistindo de um cilindro externo de proteína, um interno de DNA e, no interior deste, as fibrilas associadas ao scrapie.

Nas encefalopatias espongiformes observamos, como marcas estruturais, a vacuolização e a presença de placas amilóides, sem fenômenos inflamatórios concomitantes.

A presença de vacuolização constitui característica marcante nas infecções provocadas por retrovírus. Com base em tal informação, Goldwater et al.^{5,26} fizeram correlação entre a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e o agente do scrapie, levantando a hipótese de que uma proteína produzida pelo vírus causador da primeira (HIV), por algum mecanismo, ativaria o gene codificador da PrP 27-30, culminando nas alterações anatômicas observadas no encéfalo e medula espinhal de alguns enfermos com SIDA. Contudo, outro grupo de pesquisadores⁷ acredita que qualquer relação entre as sequências de aminoácidos, ou ácidos nucleicos, do HIV e da PrP 27-30, seja apenas casual.

Desde que foram descritas as placas amilóides em tecido cerebral de pacientes com DCJ³³, investigações acabaram por verificar que estas nada mais eram que emaranhados de prions^{4,8,9,40,57}. DeArmond et al.^{1^} demonstraram que a PrP 27-30 se reúne em filamentos que se acumulam no espaço extracelular para formar as referidas placas.

Por tratar-se de proteína de membrana, o prion se aglomera nos microsomas, levando a degeneração do neurônio³⁴, outro achado clássico nesse grupo de moléstias, a despeito de sua raridade no scrapie natural de ovelhas^{34,41}. O acúmulo de rieurofilamentos no interior dos neurônios também constitui fato notório nas encefalopatias espongiiformes³⁴. Esses são sintetizados a partir do RNA mensageiro codificador da proteína glial fibrilar ácida, cujo estímulo para sua produção pode ser a presença de polímeros de prions no tecido neural³⁴.

Alterações bioquímicas ligadas ao metabolismo dos carboidratos foram relatadas na infecção causada pelo agente do scrapie³⁷. Conforme postulado por Kretzschmar et al.³⁴, o prion é uma proteína de membrana e, já em 1969, Adams et al.¹ haviam chamado a atenção para a incorporação de precursores polissacarídicos nas frações de cérebros infectados. A grande concentração de glicoproteínas e oligossacarídeos na composição da membrana celular³⁶ e a ligação íntima do scrapie à membrana citoplasmática^{35,44,59} justificam os resultados encontrados por Mackenzie et al.³⁷. Hunter et al.³⁰ confirmaram a participação dos carboidratos no acoplamento do scrapie à membrana plasmática e, anos mais tarde, detectaram alterações enzimáticas em extrato de tecido cerebral infectado, que se refletiam no ritmo da síntese das glicoproteínas em geral³¹, particularmente aquelas implicadas na formação da estrutura da membrana celular.

A capacidade de adaptação do scrapie a diferentes hospedeiros^{23,38,48} induz a aspectos clínicos diversos daqueles encontrados na doença natural. Prusiner¹⁸ ressaltou que o agente causador do scrapie, após repetidas passagens em um mesmo hospedeiro, tem algumas de suas características naturais modificadas. Isto explicaria a diferença bioquímica entre as PrP 27-30 do homem e de cobaias, já que as duas cadeias peptídicas diferem em 27 aminoácidos⁶. O prion humano responsável pela DCJ, quando inoculado em camundongos, tem suas particularidades alteradas¹⁰.

Da mesma maneira, é possível que o prion possa sofrer variações estruturais no homem, causando moléstias distintas, tais como a DCJ, a síndrome de Gerstmann-Stráussler, o kuru e, talvez, outras enfermidades classificadas como degenerativas do SNC.

REFERÊNCIAS

1. Adams DH, Caspary EA, Fields EJ. The incorporation of (3H) thymidine, (14C) orotic acid, (14C) uridine-diphosphoglucose and (14C) glucosamine into a postribosomal fraction of normal and scrapie-infected mouse brain and spleen. *J Gen Virol* 1969; 4:89.
2. Alpert T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967, 214:764.
3. Barry RA, Kent SBH, McKinley MP, Meyer RK, De Armond SJ, Hood LE, Prusiner SB. Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *J Infect Dis* 1986, 153:848.
4. Barry RA, McKinley MP, Bendheim PE, Lewis GK, De Armond SJ, Prusiner SB. Antibodies to the scrapie protein decorate prion rods. *J Immunol* 1985, 135:603.
5. Barry RA, Prusiner SB. Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. *J Infect Dis* 1986, 154:518.
6. Basler K, Oesch B, Scott M, Westway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weismann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986, 43:47.

7. Bazan JF, Fletterick RJ, Prusiner SB. AIDS virus and scrapie protein genes. *Nature* 1987, 325 : 581.
8. Bendheim PK, Barry RA, De Armond SJ, Stites DP, Prusiner SB. Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature* 1984, 310:418.
9. Bockman JM, Kingsbury DT, McKinley MP, Bendheim PE, Prusiner SB. Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins in human brains. *N Engl J Med* 1985, 312 : 73.
10. Bockman JM, Prusiner SB, Tateishi J, Kingsbury DT. Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion protein : host species-specific epitopes. *Ann Neurol* 1987, 21 : 589.
11. Bolton DC, Meyer RK, Prusiner SB. Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* 1985, 53:596.
12. Bruce ME, Dickinson AG. Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol* 1987, 68 : 79.
13. Chandler RL, Fisher J. Experimental transmission of scrapie to rats. *Lancet* 1963, 2:1165.
14. Chesebro B, Race R, Wehely K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, Garon C, Haase A. Identification of scrapie prion protein-specific in m-RNA in scrapie infected and uninfected brain. *Nature* 1985, 315:331.
15. De Armond SJ, McKinley MP, Barry RA, Braunfeld MB, McColloch JR, Prusiner SB. Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* 1985, 41:221.
16. Gajdusek DC. Slow virus diseases of the central nervous system. *Am J Clin Pathol* 1971, 56:320.
17. Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru. *Science* 1977, 197 : 943.
18. Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966, 209:794.
19. Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative diseases of the central nervous system in New Guinea : the endemic occurrence of «Kuru» in the native population. *N Engl J Med* 1957, 257 : 974.
20. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy) : transmission to chimpanzee. *Science* 1968, 161 : 388.
21. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Infection as the etiology of spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). *Science* 1969, 165 : 1023.
22. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Transmission of scrapie to the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Nature* 1972, 236 : 73.
23. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science* 1973, 182:67.
24. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Latarget R. Unusual resistance to ionizing radiation of viruses of Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Proc Natl Aca Sci USA* 1978, 75:6268.
25. Goldwater PN, Synek BJJ, Koelmeyer TD, Scott PJ. Structures resembling scrapie: associated fibrils in AIDS encephalopathy. *Lancet* 1985, 2 : 447.
26. Goldwater PN, Synek BJJ, Koelmeyer TD, Scott PJ. Scrapie-associated fibrils and AIDS encephalopathy. *Lancet* 1985, 2:1300.
27. Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* 1959, 2:289.
28. Hadlow WJ, Prusiner SB, Kennedy RC. Brain tissue from persons dying of Creutzfeldt-Jakob disease causes scrapie-like encephalopathy in goats. *Ann Neurol* 1980, 8:628.
29. Hunter GD, Gibbons RA, Kimberlin RH, Millson GC. Further studies of the infectivity and stability of extracts and homogenates derived from scrapie affected mouse brains. *J Comp Path* 1969, 79:101.
30. Hunter GD, Millson GC. Glycoprotein biosynthesis in normal and scrapie affected mouse brain. *J Comp Path* 1973, 83:217.
31. Hunter GD, Millson GC. El agente del «scrapie»: posición actual acerca de sua naturaleza. In Waterson AP (ed): *Progresos en Virología Clínica*. Barcelona: Marin, 1978, p 65.
32. Kingsbury DT, Kasper KC, Stites DP, Watson JD, Hogan RN, Prusiner SB. Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Immunol* 1983, 131:491.
33. Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. Pathology of Kuru. *Lab Invest* 1959, 8:799.
34. Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, De Armond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neuron. *Am J Path* 1986, 122:1.
35. Lampert P, Hooks CJ Jr, Gajdusek DC. Altered plasma membranes in experimental scrapie. *Acta Neuropath* 1971, 19:81.
36. Lehninger AL. Carboidratos: estrutura e função biológica. In Lehninger AL (ed): *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1986, p 204.
37. Mackenzie A, Wilson AM, Dennis PF. Further observations changes in scrapie mouse brain. *J Comp Path* 1968, 78 : 489.
38. Marsh RF, Kimberlin RH. Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Infect Dis* 1975, 131 : 104.

39. Marsh RF, Malone TG, Semancik JS, Lancaster WD, Hanson RP. Evidence for an essential DNA component in the scrapie agent. *Nature* 1978, 275 : 146.
40. Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. *Brain* 1981, 104:559.
41. Matthews WB. Slow Infections. In Kennedy PGE, Johnson RT (eds): *Infections of the Nervous System*. London: Butterworths, 1987, p 227.
42. McKinley MP, Masiarz FR Prusiner SB. Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science* 1981, 214:1259.
43. Merz PA, Rohwer RG, Kascask R, Wisniewski HM, Somerville RA, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* 1984, 225:437.
44. Millson GC, Hunter GD, Kimberlin RH. An experimental examination of the scrapie agent in cell membrane mixtures. *J Comp Path* 1971, 81 : 255.
45. Narang HK, Asher DM, Gajdusek DC. Evidence that DNA is present in abnormal tubulo-filamentous structures found in scrapie. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:3575.
46. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Temost P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985, 40:735.
47. Price RW, Navia BA. Infections in AIDS and in other immunosuppressed patients. In Kennedy PGE, Johnson RT (ed): *Infections of the Nervous System*. London: Butterworths, 1987, p 248.
48. Prusiner SB. On prions cause dementia: molecular studies of the scrapie agent. In Appel SH (ed): *Current Neurology*, Vol 4. New York: Wiley, 1982, p 201.
49. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982, 216:136.
50. Prusiner SB. Occasional notes: some speculations about prions, amyloid, and Alzheimer disease. *N Engl J Med* 1984, 310:661.
51. Prusiner SB. Prions and neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 1987, 317:1571.
52. Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 1982, 21 : 6942.
53. Prusiner SB, Groth DF. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of hamster scrapie agent. *Biochemistry* 1980, 19:4883.
54. Prusiner SB, Groth DF, Bildstein C. Electrophoretic properties of the scrapie agent in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77 : 2984.
55. Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 1984, 38:127.
56. Prusiner SB, Groth DF, McKinley MP — Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:4606.
57. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA. Seropie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983, 35:349.
58. Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF. Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78:6675.
59. Semancick JS, Marsh RF, Geelen JLMC, Hanson RP. Properties of the scrapie agent: endomembrane complex from hamster brain. *J Virol* 1976, 18:693.
60. Sigurdsson B — Observations on three slow infections of sheep. *Br Vet* 1954, 110:225, 307,341.
61. Sparkes RS, Simon M, Cohn VH — Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sei USA* 1986, 83:7358.
62. Tateishi J, Ohta M, Koga M. Transmission of chronic spongiform encephalopathy with Kuru plaques for humans to small rodents. *Ann Neurol* 1979, 5 : 581.
63. Zarranz JJ, Rivera-Pomar JM, Salisachs P. Kuru plaques in the brain of two cases with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* 1979, 43:291.