

Ovelhas, vacas loucas, priões, e o resto...(parte II)



G.J.M. Cabrita

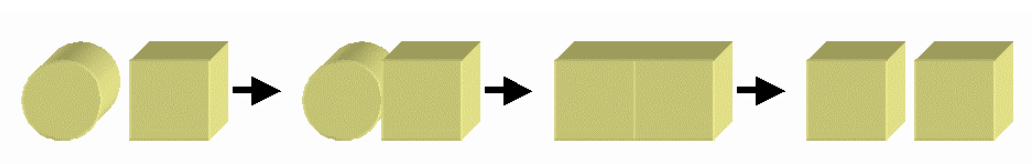
BioEngineering Research Group, Instituto Superior Técnico
Universidade Técnica de Lisboa

Editado por: Rui Gomes

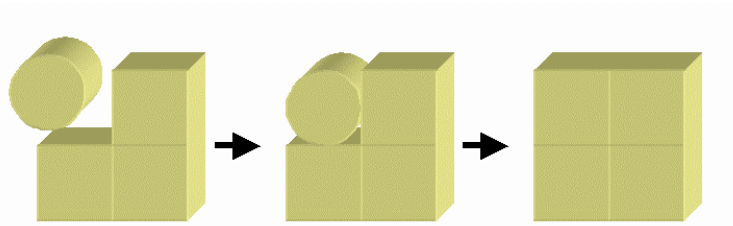
Mecanismo da infecção priónica

Desde a observação de que o agente da *scrapie* era muito resistente à radiação UV [32] e da subsequente inferência que provavelmente não incluiria material genético [54] que se começaram a elaborar teorias acerca do seu mecanismo de infecção. Uma das primeiras tentativas de explicação surge em 1967 [56], em que várias hipóteses são delineadas [80]: (a) uma proteína que induz a transcrição do seu próprio gene; (b) uma proteína que auto-propaga uma modificação covalente; ou (c) uma proteína que auto-propaga uma alteração de conformação. Actualmente, pensa-se que será esta última hipótese a mais provável. Dentro desta hipótese surgem dois mecanismos [81]:

- a) segundo o modelo do “heterodímero”, a PrP^{Sc} monomérica (■) formará um heterodímero com a PrP^C (●), catalisando a sua conversão em PrP^{Sc} e subsequente libertação, sendo a posterior agregação de PrP^{Sc} considerada um processo secundário;



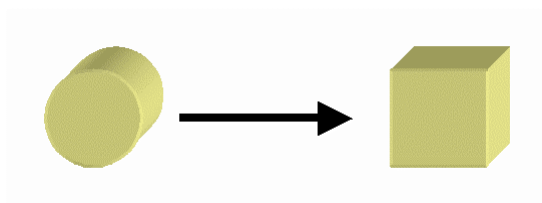
- b) no modelo da “polimerização” seriam oligómeros de PrP^{Sc} (■) a condensar monómeros de PrP^C (●) concomitantemente com a sua conversão em PrP^{Sc}, num processo semelhante a uma cristalização.



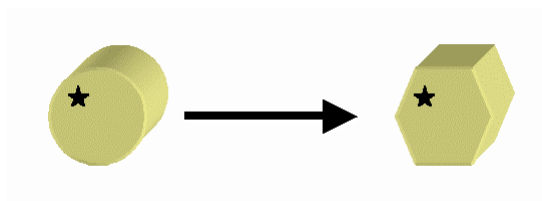
Este último modelo é apoiado por observações em que a conversão *in vitro* de PrP^C em PrP^{Sc} só é conseguida quando se utilizam agregados de PrP^{Sc} de elevado peso molecular [82]. Outros estudos tendem a postular a existência de uma proteína *chaperone* provisoriamente denominada proteína X [83], que ajudaria na conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, embora esta proteína ainda não tenha sido identificada.

Qualquer que seja o mecanismo de conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, este poderá ocorrer em três casos:

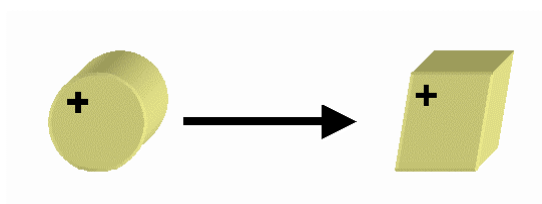
- a) Conversão esporádica espontânea de uma PrP^C normal:



- b) Conversão de um mutante congénito com maior propensão para alteração de conformação:

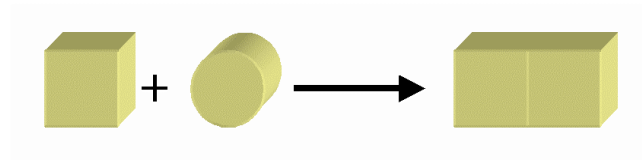


- c) Conversão de um mutante hereditário com maior propensão para alteração de conformação:

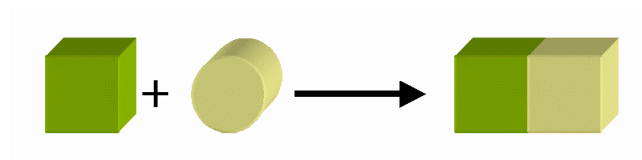


Em qualquer destas situações, esta conversão dar-se-á sempre com muito reduzida eficiência, mas o produto PrP^{Sc} resultante será já capaz de propagar a sua alteração de conformação a outras PrP^C normais. Esta subsequente propagação da infecção num organismo poderá acontecer de dois modos:

a) Propagação por “infecção interna” de uma PrP de conformação alterada:



b) Propagação por “infecção externa” de uma PrP de outro organismo com a sua conformação alterada:



De notar que a mesma PrP^C pode assumir conformações diferentes, dependendo da proteína de conformação alterada que inicia o processo. Este processo será tão mais eficiente quanto maior for a semelhança das proteínas, isto é, o processo a) será mais rápido do que o processo b). E a acumulação gradual de agregados de PrP^{Sc} está directamente dependente dos níveis de expressão de PrP^C, o que fornece uma explicação para os tempos de incubação longos da doença. Assim, quanto mais PrP^{Sc} estiver presente inicialmente, menor será o tempo de incubação da doença. No entanto, é de frisar que estes processos são muito lentos, dada a sua baixa eficiência, o que determina os tempos longos de incubação da doença.

E é a acumulação de PrP^{Sc} no tecido nervoso que leva à patologia das TSEs. A presença do prião em quantidades cada vez maiores vai destruindo progressivamente os neurónios, formando as características placas amilóides que conferem a aparência esponjiforme aos tecidos. Estudos recentes [84] indicam que a acumulação de proteína em patologias neurodegenerativas inibe o processo celular de degradação proteica, levando a uma concentração cada vez mais elevada de proteína e causando a apoptose (morte celular). A nível funcional, a destruição do tecido cerebral conduz ao distúrbio dos processos controlados cerebralmente, sendo a morte o ponto de descontrolo irreversível.

Processos de transmissão

Depois de se elucidarem os mecanismos propostos para a génese da doença, surge como consequência a questão acerca de como se transmitem estas doenças. Como pode a proteína infecciosa PrP passar de um organismo a outro?

Obviamente, um dos mecanismos de transmissão destas doenças é por hereditariedade, como já foi descrito. Na natureza, pensa-se que a transmissão da doença se faça através do contacto com a

placenta (e seus fluidos) de um animal infectado [85]. Actualmente também se assume que a BSE foi transmitida aos bovinos a partir da alimentação com carcaças de ovelhas contaminadas com *scrapie* [85], embora existam algumas opiniões díspares que pretendem atribuir o surto de BSE a contaminação com insecticidas em cuja composição se contavam organofosfatos [86].

Nas patologias humanas, a transmissão por contágio não está documentada. Vias já observadas de transmissão (revistas em [87]) incluem o canibalismo (no caso do *kuru*), transplantes de córnea, utilização de eléctrodos de implantação cerebral, transfusão de hormonas pituitárias e transplantes de *dura mater*, tudo a partir de doadores, ou equipamento em contacto com pacientes, que sofriam de CJD. A possibilidade de transmissão a partir do sangue e produtos derivados ainda não foi estabelecida, embora também ainda não tenha sido completamente excluída.

De notar que a transmissão laboratorial de TSEs entre espécies é um processo pouco eficaz com tempos de incubação mais longos, que se encurtam ao longo de passagens sucessivas dentro da mesma espécie [88].

Existem outros priões?

Para tentar responder a esta pergunta é necessário definir com mais precisão quais são os critérios para se classificar uma proteína como prião (proteína infecciosa), de modo a distingui-la de vírus e plasmídeos [80]. No entanto, estes critérios destinam-se essencialmente a identificar potenciais priões em organismos unicelulares:

- a) **Curabilidade reversível:** mesmo conseguindo-se eliminar completamente o prião do organismo, deve ser sempre possível ao organismo saudável originar esporadicamente de novo o prião, sem interferência externa.
- b) **Indução do aparecimento do prião por sobre-expressão da proteína:** quanto mais moléculas proteicas normais existirem que possam dar origem a priões, maior será a probabilidade da conversão.
- c) **Relação entre fenótipos da presença do prião e da mutação da proteína:** é necessária a existência do gene que codifica a proteína, dado que o prião não pode existir sem este. Mas o fenótipo correspondente à presença do prião deve ser igual ao fenótipo no qual a proteína que lhe dá origem sofreu uma mutação que a tornou inactiva, pois em ambas as situações a função que a proteína normal deveria desempenhar não é possível. (Obviamente, este critério não se pode aplicar a um organismo multicelular, mas apenas a cada uma das células que o compõem).

Estes critérios serviram de base à identificação de priões em leveduras [89], tais como [URE3] e [PSI], priões respectivamente das proteínas Ure2p, e Sup35p em *Saccharomyces cerevisiae*, ou [Het-s], um prião da proteína [Het-s*] no fungo *Podospora anserina* (revistos em [80]). Recentemente [90], utilizou-se inclusivamente o prião [PSI] para demonstrar que diferenças conformacionais de priões com a mesma sequência contribuem para a barreira que limita a propagação de priões entre espécies.

Curiosamente, no já mencionado estudo de ratos *knock-out* para o gene *Prnp*, pensou-se que a razão pela qual os ratos pareciam sobreviver sem problemas seria devido à substituição da função da PrP por uma outra proteína. Uma possível explicação desta observação pode estar na recente descoberta de um novo gene que se localiza perto do gene *Prnp*, designado *Prnd*. O produto deste gene é uma proteína denominada *doppel* (Dpl), que apresenta uma homologia de 25% com a extremidade carboxílica da PrP do rato [91]. No entanto, Dpl não se comporta como um prião, e isto poderá fornecer pistas para a elucidação da função biológica de PrP. Há já quem proponha [92] que a função de uma contrabalança a da outra no equilíbrio do *stress* oxidativo...

Doenças de Priões

Embora de um modo geral já tenham sido mencionadas as diversas patologias causadas pela agregação de PrP no tecido cerebral, interessa agora sistematizar toda esta variedade e relacionar cada uma das patologias com dados genéticos da PrP.

Doenças em humanos

As doenças humanas de priões (revistas em [78]) têm uma incidência mundial de cerca de 1 para 10^6 por ano nos casos esporádicos, e de 1 para 10^7 - 10^8 por ano nos casos de doença familiar. De um modo geral, as doenças esporádicas aparecem a partir dos 60+ anos e desenvolvem-se rapidamente (em média de 4 a seis meses), enquanto que as hereditárias aparecem a uma idade mais jovem e arrastam-se durante um período mais longo. Um polimorfismo comum no códon 129 de *Prnp* parece funcionar como um factor de predisposição genética. Nesta posição encontram-se codificado quer o aminoácido metionina (Met), quer a valina (Val), e estudos sugerem que a homozigotia deste códon (Met/Met ou Val/Val) é um factor de risco para doenças de priões. De notar que este factor não antecipa a doença, apenas indica uma predisposição para tal.

Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD)

Sendo esta a doença de priões mais comum, a CJD pode ocorrer esporadicamente (sCJD, *sporadic CJD*) em 85 a 90% dos casos, sendo 10 a 15% transmitidos hereditariamente (fCJD, *familial CJD*) e os restantes 0 a 5% resultantes de transmissão iatrogénica (iCJD). Entre os vários sintomas iniciais da doença contam-se a fadiga, a falta de apetite ou de sono, a perda de memória, ou a ataxia. A doença, que aflige pessoas com uma média de idades de cerca de 60 anos, progride rapidamente com perda progressiva das capacidades cognitivas (demência), e mioclono¹ e ataxia mais frequentes. Na fase final da doença o paciente encontra-se imobilizado e mudo, com espasmos ocasionais. Entre os primeiros sintomas e a morte medeiam geralmente 4 a 5 meses, para a sCJD, e cerca de um ano e meio para a fCJD. O exame patológico ao tecido cerebral revela espongiose (vacuolização) difusa com poucas ou nenhuma placas amilóides de PrP.

Como se mencionou antes, a homozigotia no códon 129 de *Prnp* é um factor de predisposição para a CJD (e outras HSEs (*human spongiform encephalopathies*)), mas não implica que a doença se desenvolva, e além desta característica genética, a sCJD não apresenta nenhuma outra. Entre as cerca de 100 famílias afectadas por fCJD, têm-se reconhecido várias mutações no gene da PrP, das quais a mudança de um glutamato (Glu) para uma lisina (Lys) no códon 200 (Glu200Lys, ou E200K) é a mais frequente. A segunda mutação mais comum é a D178N, que altera um aspartato para uma asparagina, mas na fCJD esta mutação está sempre associada à homozigotia Val129. Na iCJD verificou-se que cerca de 60% dos pacientes apresentavam homozigotia Met129.

Insónia Familiar Fatal (FFI, Fatal Familiar Insomnia)

Também esta doença apresenta uma variante hereditária (FFI) e uma esporádica (FI, *fatal insomnia*). Os sintomas característicos são a insónia, que pode durar de semanas a meses, e os pacientes têm uma média de idades por volta dos 50 anos. Com o progredir da doença observa-se disautonomia², ataxia, mioclono e demência ligeira. A morte advém ao final de um a dois anos. O tecido cerebral apresenta uma vacuolização reduzida (ou mesmo ausente), restrita ao tálamo ou ao lobo temporal.

Enquanto que na FI não existem mutações responsáveis pelo fenótipo, nas nove famílias que apresentam FFI observa-se a mutação D178N (tal como em alguns casos de fCJD), mas neste caso

¹ Movimento involuntário, tique.

² Disfunção do sistema nervoso autónomo, o sistema que controla funções inconscientes tais como a cardiovascular, a gastrointestinal, a urinária, a regulação da temperatura corporal, etc.

associada sempre à homozigotia Met129. Dado que ambas as doenças apresentam a mesma forma conformacional de PrP^{Sc}, este é mais um indício de que é a conformação de PrP e não a sua sequência a determinar o fenótipo da doença.

Síndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

Esta é mais uma doença hereditária que começa a afectar as vítimas ainda antes dos 50 anos, na qual os primeiros sintomas são ataxia e disartria³, ao que se segue muitas vezes a demência no estado terminal da doença, e cuja duração ronda entre dois a dez anos. A morte advém normalmente de infecções secundárias, como a pneumonia de aspiração, devidas a um deglutimento deficiente. O tecido cerebral apresenta depósitos de placas amilóides através de todo o córtex, embora com vacuolização reduzida.

A mutação genética mais comum associada a cerca de 50 famílias afligidas por esta doença é uma mudança de prolina para leucina P102L, embora outras mutações sejam também conhecidas.

Kuru

A “morte risonha” (significado da palavra *kuru*) era uma doença confinada a uma tribo da Papua Nova-Guiné que se transmitia por canibalismo, tendo sido a primeira descrição de uma HSE. Os sintomas incluíam ataxia, tremores e degeneravam muitas vezes em demência, ao final de cerca de um ano, seguindo-se então a morte [93]. Com a proibição do canibalismo em 1958, a doença foi gradualmente desaparecendo.

A origem desta doença provavelmente nunca será descoberta (possivelmente terá começado a partir de um caso esporádico), e sabe-se que afligia vítimas entre os 29 e os 60 anos, deixando nos seus tecidos uma espongiose difusa com cerebrais depósitos densos de placas amilóides típicos, as “placas *kuru*”.

Variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD; nvCJD, new variant of Creutzfeldt-Jakob Disease; síndrome de Will-Ironside)

Esta é a tristemente famosa variante da CJD, cujo primeiro caso surgiu em 1995 e parece assinalar uma passagem entre espécies de uma doença priónica, neste caso de bovinos para humanos. Os sintomas característicos desta patologia são distintamente diferentes da sCJD ou da FI: anormalidades psiquiátricas, depressão, ataxia, ilusões sensoriais e mioclono. A idade média

³ Enfraquecimento ou imobilização dos músculos envolvidos na fala.

observada até ao momento é de 27 anos, com um desenvolvimento crónico de 9 a 38 meses, levando invariavelmente à morte. Um exame patológico ao tecido cerebral revela vacuolização profusa e placas amilóides semelhantes às do *kuru*.

Curiosamente, até ao momento todas as vítimas de vCJD apresentavam homozigotia Met129, sugerindo uma maior susceptibilidade deste genótipo à doença. Por outro lado, talvez os homozigóticos Val129 apresentem uma patologia diferente... Mas é encorajador saber que o número de casos se tem mantido reduzido até ao momento, o que poderá indicar que não estaremos à beira de uma epidemia de grandes proporções.

Doença de Alpers (Síndrome de Alpers, polidistrofia progressiva infantil, doença de Christensen-Krabbe)

Esta é uma doença rara que ocorre em crianças e recém-nascidos, caracterizando-se por uma degenerescência progressiva do sistema nervoso, tendo-se revelado uma patologia autossómica recessiva em alguns casos. Os sintomas incluem espasmos, desenvolvimento retardado do neonato tanto a nível cerebral como muscular, rigidez dos membros e demência, podendo incluir mioclono. Muitas das vítimas sofrem também de disfunção crónica do fígado (causando icterícia), o que conduz a crise hepática (cirrose). Não existe cura para esta doença, que leva à morte da criança dentro dos primeiros dez anos de vida, normalmente devido a falha da função hepática [94, 95].

Embora esta doença seja normalmente classificada como uma patologia de deficiência mitocondrial [96], ainda não foi encontrada uma mutação constante em todos os casos documentados, sendo possível que várias patologias estejam a ser diagnosticadas sob o mesmo nome [97], havendo também quem considere alguns casos como uma manifestação de doença priónica. Inclusivamente, já foi relatada a transmissibilidade desta doença a hamsters a partir do tecido cerebral de uma criança com esta patologia [98].

Doenças em animais

Em animais (revistas em [85]), a doença está representada essencialmente em ovinos, onde é conhecida há mais de 250 anos, e recentemente em bovinos, com o surto de BSE em 1986 que até ao final de 2000 já vitimou mais de 180 000 animais. Também são conhecidos alguns casos de TSEs noutros animais, tais como felídeos, martas e vários ungulados exóticos.

Scrapie

Foi a primeira doença de priões a ser descoberta, e é uma doença endémica em algumas regiões da Europa. Aflige ovelhas e cabras, causando-lhes mudanças de comportamento, fazendo-os raspar-se e coçar-se contra objectos fixos. Com o desenvolvimento da doença podem apresentar ataxia, perda de peso, ingestão excessiva de líquidos, tremores e convulsões, e os animais morrem num intervalo de 1 a 6 meses. O tecido cerebral apresenta vacuolização e perda neuronal.

No gene da PrP de ovelhas, parecem ser de particular importância os códões 136, 154 e 171 para determinar a susceptibilidade à doença. Nomeadamente, tem sido observado [99] que a homozigotia RR171 (o códão 171 tem polimorfismo para glutamina (Q), arginina (R), ou histidina (H)) confere resistência à doença, enquanto QQ171 confere susceptibilidade, e neste caso a homozigotia AA136 (o códão 136 tem polimorfismo para alanina (A) ou valina (V)) é menos susceptível do que a VV136, ou a heterozigotia VA136. Assim, estão em curso programas de selecção genética de rebanhos que apresentem a homozigotia RR171 como meio de erradicar a doença, ou pelo menos com o fim de aumentar a resistência dos ovinos.

Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE, Bovine Spongiform Encephalopathy)

Uma das TSEs mais conhecida, a BSE começou a manifestar-se em 1985 no Reino Unido (e em Portugal em 1990, com um animal importado), atingindo um pico de cerca de 35 000 casos em 1993 (máximo em Portugal de 170 casos em 1999), e começando a decrescer desde então, muito provavelmente devido à interdição, a partir de 1988, de alimentar bovinos com farinhas de origem animal (provenientes da reciclagem de restos de animais mortos em matadouros, nomeadamente ovinos e bovinos). Se bem que actualmente o número de ocorrências de animais infectados seja baixo (cerca de 1300 casos no Reino Unido no ano 2000, e um total de cerca de 500 casos em Portugal desde 1990, onde os primeiros casos de bovinos não importados ocorreram em 1994 [100]), ainda não se sabe se a doença é endémica, isto é, se pode ocorrer transmissão horizontal entre animais de modo a transmitir a epidemia em níveis reduzidos.

Os sintomas desta doença incluem apreensão progressiva, hiperestesia⁴ e ataxia, e começam a manifestar-se a partir dos 4 a 5 anos de idade, levando invariavelmente à morte do bovino em 1 a 6 meses. O exame patológico ao cérebro revela uma vacuolização muito semelhante à da *scrapie*, com uma uniformidade bastante regular em todos os casos observados, o que sugere uma origem

⁴ Aumento anormal da sensibilidade a estímulos sensoriais.

comum para a epidemia de BSE. Até ao momento, não foram determinadas predisposições genéticas em bovinos para a contracção de BSE [101, 102].

Doença do Desgaste Crónico (CWD, Chronic Wasting Disease)

Esta doença rara infecta veados (*Odocoileus spp.*) e cervos (*Cervus spp.*) domésticos e selvagens, e tem sido observada essencialmente nos EUA. Foi observada pela primeira vez em 1967, caracterizando-se por animais que apresentam uma perda de peso crónica, apatia, depressão e ataxia, entre outros sintomas, morrendo os animais afectados num intervalo de seis meses desde o aparecimento dos primeiros sintomas. O exame ao cérebro revela vacuolização e placas amilóides, em tudo semelhantes à patologia de outras TSEs.

A causa desta TSE e o seu modo de transmissão não são conhecidos, surgindo principalmente no Colorado e Wyoming. Pensa-se que será uma doença natural, esporádica, com transmissão horizontal e possivelmente maternal [103].

Encefalopatia Transmissível da Marta (TME, Transmissible Mink Encephalopathy)

A marta, um animal criado em quintas para a produção de casacos de peles nos EUA, Canadá e outros países, sofre de uma TSE rara que foi detectada pela primeira vez nos EUA em 1947. Os sintomas compreendem progressivamente ataxia, espasmos, e finalmente auto-mutilação, sonolência e imobilidade, que conduzem à morte do animal num intervalo de 1 a 6 semanas. Quando examinado, o tecido cerebral apresenta vacuolização.

Pensa-se que a doença seja transmitida por alimentação com carnes contaminadas de ovinos, embora a infecção por via oral não se tenha mostrado eficiente [104].

Encefalopatia Espongiforme Felina (FSE, Feline Spongiform Encephalopathy)

A FSE foi diagnosticada pela primeira vez em 1990 no Reino Unido, num gato doméstico. Desde então, têm sido observados quase 90 casos naquele país, com um máximo de 16 casos em 1994 [105], incluindo observações em felídeos de cativeiro tais como chitas, leões, pumas, ocelotes e tigres. Os sintomas incluem ataxia, tremores, perda de peso e dilatação da pupila. O tecido cerebral evidencia normalmente a presença de PrP^{Sc} em testes imunohistoquímicos.

A causa provável terá sido contaminação por meio de alimentação com carne de origem bovina. Curiosamente, surgiu também o relato de um caso em Itália de um homem e o seu gato apresentarem ambos uma infecção de TSE, que no homem veio revelar-se ser sCJD e no gato um novo tipo de FSE [106], não estando nenhum deles relacionado com BSE.

Encefalopatia de Ungulados Exóticos (EUE, Exotic Ungulate Encephalopathy)

A EUE tem-se observado essencialmente em animais pertencentes a jardins zoológicos do Reino Unido, tais como o bisonte (*Bison bison*), a vaca ankole (*Bos taurus taurus ankole*), o kudu (*Tragelaphus strepticeus*), o niala (*Tragelaphus angasi*), o antílope africano (*Taurotragus oryx*), e várias espécies de oryx (*Oryx dammah*, *Oryx gazella*, *Oryx leucoryx*). Os sintomas são muito semelhantes aos da BSE, e pensa-se que estes animais também terão sido contaminados por meio de alimentação com farinhas de carnes contaminadas.

(Continua no próximo número)