

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



G.J.M. Cabrita

BioEngineering Research Group, Instituto Superior Técnico
Universidade Técnica de Lisboa

Editado por: Rui Gomes

Saúde Pública

É chegada a altura de nos interrogarmos acerca das consequências práticas de tudo o que foi exposto acima. A maior parte das preocupações dizem respeito à BSE, e nomeadamente ocorre perguntar se há perigo de contágio, se é seguro comer carne de vaca (ou outras...), como se pode diagnosticar a doença (tanto em animais como em seres humanos), se há terapias ou não, e quais as perspectivas de futuro...

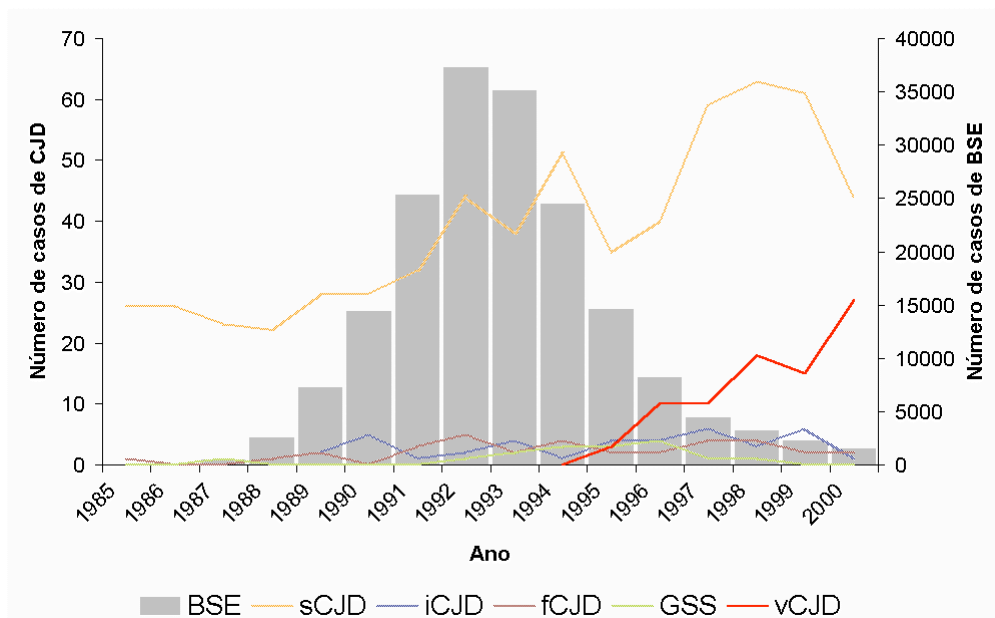


Figura 6: Gráfico da evolução de casos de TSEs humanas e da BSE no Reino Unido. De notar o aumento de casos de vCJD, que poderá indicar que se aproxima uma epidemia de casos (dados retirados de www.who.int e de www.oie.int)...

Testes diagnósticos

Uma das características inerentes a este tipo de doenças é que uma dada vítima pode já estar a desenvolver a patologia muito antes de se evidenciarem os primeiros sinais clínicos. Isto apresenta dois grandes problemas, o primeiro em termos de contenção da doença em animais, de modo a evitar o contágio a outros animais ou a humanos que os consumam, e o segundo em termos de poder diagnosticar a doença em humanos o mais depressa possível para permitir o seu acompanhamento e tentar a minimização dos seus efeitos.

Como já foi exposto, há vários indícios que levam à suspeição de um caso de TSE, nomeadamente perturbações neurológicas, psicológicas e psicossomáticas, tais como demência, problemas atípicos de movimento, ou doença psiquiátrica de começo tardio. Mas estes distúrbios neurológicos podem facilmente ser confundidos com os sintomas de outras doenças do foro neurobiológico, tais como a doença de Alzheimer, demências frontotemporais ou com corpos de Lewy, doença de Kufs adulta, doença de Huntington, ataxias espinocerebelares, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, entre outras [78]. Para se obter um diagnóstico mais preciso, é necessário associar as observações clínicas à observação histológica, e no caso de CJD, recorrer também a um electroencefalograma (EEG).

Até há bem pouco tempo, a única maneira de confirmar um diagnóstico de TSE em pessoas tem sido através de uma biopsia ao tecido cerebral (uma prática cirúrgica arriscada), ou por meio de um diagnóstico *post mortem*, sempre para um exame histológico. Uma análise genética ao gene *Prnp* podia ajudar a atribuir um diagnóstico se existisse uma mutação, mas não era suficiente como ferramenta de decisão. Em animais, a situação era semelhante: a detecção da doença começava com a observação de comportamentos estranhos dos animais, mas a confirmação era sempre feita *post mortem*, por meio de exames histológicos para observação das placas amilóides, em conjunto com ensaios de inoculação em ratos para determinar a infectividade dos tecidos.

No entanto, nestes últimos anos têm começado a surgir no mercado alternativas baseadas na utilização de anticorpos. Essencialmente, estes testes baseiam-se na característica de a PrP^{Sc} ser resistente à proteólise pela proteinase K, enquanto que a PrP^C é sensível. Assim, ao utilizar-se esta enzima numa amostra de tecido cerebral homogeneizada, é possível detectar-se a presença de PrP^{Sc} por meio de um ensaio imunoquímico, dado que uma PrP^C degradada já não é passível de ser detectada. Actualmente, pelo menos três testes utilizam este princípio: o ensaio da Prionics AG baseia-se num *western blot*, enquanto que os da Enfer Ltd. e da CEA (*Commissariat à l'Énergie Atomique*, comercializado pela BioRad) se baseiam num ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Inclusivamente, o teste desenvolvido pela CEA alega conseguir detectar PrP^C em níveis

ainda sub-clínicos [107], isto é, quando a infecção ainda não produz sinais visíveis, embora se tenha sempre de obter uma amostra de tecido cerebral. Outras vias exploram a detecção de PrP^{Sc} no fluido cerebrospinal (CSF, *cerebrospinal fluid*), que é mais acessível para diagnóstico do que o tecido cerebral, e mais uma vez se baseia na detecção espectroscópica de anticorpos marcados com moléculas fluorescentes [108]. Com este método já foi possível detectar pela primeira vez PrP^{Sc} em CSF de pacientes com CJD. E também já foi reportada [109] a existência de anticorpos que distinguem entre as formas PrP^C e PrP^{Sc} do príão, o que permitirá a concepção de diagnósticos mais precisos.

Um outro método promissor, que permitiu a identificação de PrP^{Sc} no sangue de ovelhas com *scrapie* [110], baseia-se na detecção de príões que competem com um péptido marcado com um composto fluorescente na ligação a anticorpos, indicando a variação de fluorescência a presença da PrP^{Sc}, o que poderá abrir as portas a um diagnóstico baseado numa amostra sanguínea.

Perigos e precauções

O maior perigo associado às TSEs reside na possibilidade de contágio entre espécies por meio do consumo de tecidos contaminados, uma vez que a doença não é contagiosa através do ar ou do contacto com pessoas ou animais que sofram da doença.

Até ao momento, não foram relatados casos de contágio por meio de transfusão sanguínea, e actualmente crê-se que também esta via de contágio é altamente improvável; no entanto, como medida preventiva, actualmente em alguns países não é permitida a doação de sangue a membros de famílias onde se tenha observado uma TSE. Como já foi referido, para seres humanos há também a possibilidade de contágio iatrogénico, embora esta tenha uma probabilidade muito reduzida dada a baixa incidência de CJD, e também devido à maior atenção dada actualmente pelos médicos à manipulação e desinfectação de material que tenha estado em contacto com tecidos potencialmente infecciosos. Embora os príões sejam notavelmente resistentes aos processos normais de esterilização, tais como o cozimento, a lavagem ou a fervura, a imersão de material previamente em contacto com tecidos potencialmente contagiosos numa solução 1M de NaOH (ou em lixívia concentrada) durante uma hora, seguido de autoclavagem (121°C, 30min), é um dos métodos actualmente recomendados para a desinfectação [111].

Assim sendo, resta o perigo do consumo de carnes contaminadas... Em primeiro lugar, cabe mencionar que em mais de dois séculos de existência comprovada de *scrapie* nunca se observou a transmissão desta patologia ao ser humano, o que leva a crer que a carne de ovino infectado não

consegue quebrar a barreira de espécie, sendo portanto segura. Até ao momento, a única espécie que se confirma ser infecciosa é a bovina, o que conduz à questão inevitável: é seguro comer carne de vaca?

Para responder, é preciso elucidar as medidas que foram tomadas para a contenção e erradicação da BSE. Desde o seu aparecimento no Reino Unido em 1986, cedo se questionou acerca da sua transmissibilidade a humanos. Embora ainda nada levasse a crer que fosse transmissível ao ser humano, dois anos depois a utilização de restos de bovinos deixou de ser reciclada para alimentação bovina, e ainda dois anos a seguir será interdita na alimentação de todos os animais, acima de tudo como medida preventiva de contágio de mais bovinos. Como o período de incubação médio da BSE é de 4 a 5 anos, foi de esperar que a incidência máxima de infecção tivesse ocorrido em 1993, como veio a acontecer. Como medidas de contenção da doença, sempre que se encontravam animais infectados numa manada, toda a manada era abatida e incinerada, mesmo que isso correspondesse muito provavelmente à eliminação de cerca de 95% de animais saudáveis. Deste modo, a probabilidade de um animal passar ao controle da infecção era bastante reduzida, e reduz-se cada vez mais [112], dado que o tempo médio de vida de uma vaca é de 6 a 7 anos, tendo-se já renovado uma geração. Além disso, o perigo maior está no consumo de tecidos de elevada infectividade, tais como tecido nervoso, medula óssea e córnea (tecidos normalmente utilizados na manufactura de carnes picadas e enchidos), ou de média infectividade, como o intestino ou o baço, e não em carne proveniente de tecido muscular. Uma medida adicional consistiu em abater o gado a uma idade máxima de 30 meses, pois verificou-se que os animais com esta idade não tinham tempo suficiente para produzir príões em doses consideradas infecciosas. O leite bovino também é considerado seguro, dado nunca se ter observado infectividade proveniente deste fluido [105].

Então como chegou a BSE a Portugal? A via mais provável terá sido a importação de farinhas para alimentação animal do Reino Unido, que apesar de terem sido banidas no início dos anos 90, a sua utilização continuou possivelmente por ignorância ou incredulidade acerca dos seus perigos. No entanto, os controlos descritos acima para confinamento da epidemia no Reino Unido também se aplicaram no nosso país desde a mesma altura.

Um perigo adicional estará em vacinas e outros produtos farmacêuticos preparados em bovinos para injeção em humanos, e que poderão por consequência conter algum nível de infectividade, mas também estes produtos actualmente já estão a ser substituídos por outros produzidos utilizando tecnologia do DNA recombinante, o que poderá assegurar a sua inocuidade... Alternativamente, utilizam-se bovinos provenientes de países onde não existe registo de BSE... No entanto, a última palavra será sempre para o consumidor, que deverá decidir se consumir ou não.

Curas e terapias, que futuro?

Actualmente, não existe cura para as TSEs. No entanto, existem já várias linhas de investigação que estão a tentar alcançar alguns resultados num futuro próximo, o que poderá vir a ser de importância fundamental caso se venham a verificar as previsões catastrofistas de uma epidemia de vCJD (Fig. 6).

Têm sido descobertas várias drogas que conseguem prolongar o tempo de incubação da *scrapie* em ratos de laboratório ou em linhas celulares destes roedores, tais como o sulfato de dextrano [113] e o polissulfato de pentosano [114] (poli-anióes), a anfotericina B [115] e um seu derivado [116, 117], e a antraciclina [118] (antibióticos), porfirinas e ftalocianinas [119] (compostos pirrólicos), o vermelho do Congo (um corante poli-aniónico) [120], agentes lisosomotrópicos e inibidores de proteases de cisteína [121], e poliaminas [122]. No entanto, embora se pense que interajam na formação de PrP^{Sc}, para a maior parte destes compostos desconhece-se o mecanismo de actuação, o que torna difícil uma abordagem racional no desenvolvimento de drogas mais eficazes. Além disso, alguns destes compostos são tóxicos, ou só actuam se administrados antes da infecção ou pouco tempo depois.

Outras abordagens mais racionais incluem o desenho de moléculas que inibam ou revertam a transição entre PrP^C e PrP^{Sc}. Enquanto um grupo de investigadores conseguiu desenhar um péptido que estabiliza hélices α , baseado na região de PrP que muda de hélice α para folha β , e que por consequência inibe a transição de PrP^C para PrP^{Sc}, revertendo também PrP^{Sc} para PrP^C [123], um outro grupo baseou-se numa região de PrP que interage putativamente com a proteína X [124], e procurou moléculas que se ligam a esta zona, encontrando duas que o fazem, inibindo a transição de PrP^C para PrP^{Sc} com reduzida toxicidade, mas também com baixa eficiência [125]. No entanto, as pesquisas continuam...

Alguns grupos pretendem evitar que os príões infecciosos cheguem ao sistema nervoso central (SNC), e como se sabe que os príões se propagam em células dendríticas celulares antes de chegarem ao SNC, os investigadores inactivaram temporariamente aquelas células [126, 127], observando que este procedimento atrasava o desenvolvimento da doença.

Mas talvez a solução esteja na injeção de anticorpos que reajam contra a PrP^{Sc}, os quais talvez já desencadeiem uma resposta do sistema imunitário. Uma abordagem deste tipo já teve algum sucesso na terapia contra a doença de Alzheimer [128, 129].

Ou talvez a resposta se encontre nas leveduras... Recentemente [130], descobriu-se nestes fungos uma proteína que consegue curar as células contra os seus próprios príões. Existirá um análogo em humanos?...

Bibliografia

1. Brown, P. and R. Bradley, *1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy*. Bmj, 1998. **317**(7174): p. 1688-92.
2. M'Gowan, J.P., *Investigation into the disease of sheep called "Scrapie"*. 1914, Edinburgh: Blackwood.
3. Journal of the House of Commons, 1755. **27**: p. 87.
4. Leopoldt, J.G., *Nützliche und auf die erfahrung gegründete, in Einleitung zu der landwirthschaft, fünf Theile*. 1759, Christian Friedrich Günthern: Berlin. p. 348.
5. Matravers, P.o.W., J. Bridgeman, and M. Ferguson-Smith, *The BSE Inquiry Report*, <http://www.bseinquiry.gov.uk/index.htm>, 2000
6. Sarraet, M., *Un cas de tremblante sur un boeuf*. Revue médicale vétérinaire, 1883. **7**: p. 310-312.
7. Polo, J.M., *Historia y clasificación de las enfermedades priónicas humanas*. Rev Neurol, 2000. **31**(2): p. 137-41.
8. Creutzfeldt, H.G., *Über eine eigenartige herdformige erkrankung des zentralnervensystems*. Zeitschr Gesamte Neurol Psychiatrie, 1920. **57**: p. 1-18.
9. Jakob, A.M., *Über eine der multiplen sklerose klinisch nahestende erkrankung des zentralnervensystems (spatische pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen befund*. Med Klin, 1921. **13**: p. 372-376.
10. Kirschbaum, W.R., *Zwei eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems nach art der spastischen pseudosklerose (Jakob)*. Zeitschrift für die gesamte neurologie und psychiatrie, 1924. **92**: p. 175-220.
11. Gerstmann, J., E. Sträussler, and I. Scheinker, *Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns*. Z Neurol, 1936. **154**: p. 736-762.
12. Cuillé, J. and P.L. Chelle, *La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?* Comptes Rendus Acad Sci [Series D] (Paris), 1936. **203**: p. 1552-1554.
13. Gajdusek, D.C. and V. Zigas, *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population*. N Engl J Med, 1957. **257**: p. 974-978.
14. Hadlow, W.J., *Scrapie and Kuru*. Lancet, 1959. **2**: p. 289-290.
15. Klatzo, I., D.C. Gajdusek, and V. Zigas, *Pathology of kuru*. Lab Invest, 1959. **8**(799-847).
16. Gajdusek, D.C., C.J.J. Gibbs, and M. Alpers, *Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees*. Nature, 1966. **209**: p. 794-796.
17. Gibbs, C.J.J., *et al.*, *Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee*. Science, 1968. **161**: p. 388-389.
18. Roos, R.P., D.C. Gajdusek, and C.J. Gibbs, Jr., *The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain, 1973. **96**: p. 1-20.
19. Masters, C.L., D.C. Gajdusek, and C.J. Gibbs, *Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies*. Brain, 1981. **104**: p. 559-588.
20. Duffy, P., *et al.*, *Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease*. N Engl J Med, 1974. **290**: p. 692-693.
21. Wells, G.A.H., *et al.*, *A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle*. Vet Rec, 1987. **121**: p. 419-420.
22. Lugaresi, E., *et al.*, *Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei*. N Engl J Med, 1986. **315**(16): p. 997-1003.
23. Medori, R., *et al.*, *Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene*. N Engl J Med, 1992. **326**(7): p. 444-9.
24. Will, R.G., *et al.*, *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK*. Lancet, 1996. **347**(9006): p. 921-5.
25. Collinge, J., *et al.*, *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 685-90.
26. Bruce, M.E., *et al.*, *Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 498-501.
27. Hill, A.F., *et al.*, *The same prion strain causes vCJD and BSE*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 448-50, 526.
28. Schonberger, L.B., *New variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy*. Infect Dis Clin North Am, 1998. **12**(1): p. 111-21.

29. Scott, M.R., *et al.*, *Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15137-42.
30. Merz, P.A., *et al.*, *Abnormal fibrils from scrapie-infected brain*. Acta Neuropathol, 1981. **54**(1): p. 63-74.
31. Sigurdsson, B., *Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics*. Br Vet J, 1954. **110**: p. 341-354.
32. Alper, T., D.A. Haig, and M.C. Clarke, *The exceptionally small size of the scrapie agent*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **22**(3): p. 278-84.
33. Diener, T.O., *Is the scrapie agent a viroid?* Nat New Biol, 1972. **235**(59): p. 218-9.
34. Marte, M. and M. Pitzurra, [*Discovery of viroids and possible relationship with human and veterinary medicine*]. Ann Sclavo, 1975. **17**(6): p. 817-32.
35. Borrás, M.T., *et al.*, *Inability to transmit scrapie by transfection of mouse embryo cells in vitro*. J Gen Virol, 1982. **58**(Pt 2): p. 263-71.
36. Diener, T.O., M.P. McKinley, and S.B. Prusiner, *Viroids and prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(17): p. 5220-4.
37. Dickinson, A.G. and G.W. Outram, *Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis*. Ciba Found Symp, 1988. **135**: p. 63-83.
38. Narang, H.K., *Evidence that scrapie-associated tubulofilamentous particles contain a single-stranded DNA*. Intervirology, 1993. **36**(1): p. 1-10.
39. Narang, H.K., D.M. Asher, and D.C. Gajdusek, *Evidence that DNA is present in abnormal tubulofilamentous structures found in scrapie*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3575-9.
40. Narang, H.K., *Scrapie-associated tubulofilamentous particles in human Creutzfeldt- Jakob disease*. Res Virol, 1992. **143**(6): p. 387-95.
41. Narang, H.K., *Evidence that homologous ssDNA is present in scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, and bovine spongiform encephalopathy*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **724**: p. 314-26.
42. Narang, H.K., *Evidence that single-stranded DNA wrapped around the tubulofilamentous particles termed "nemaviruses" is the genome of the scrapie agent*. Res Virol, 1998. **149**(6): p. 375-82.
43. Liberski, P.P., *"Tubulofilamentous particles" are not scrapie-specific and are unrelated to tubulovesicular structures*. Acta Neurobiol Exp, 1995. **55**(3): p. 149-54.
44. Manuelidis, E.E., *et al.*, *Immortality of cell cultures derived from brains of mice and hamsters infected with Creutzfeldt-Jakob disease agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(3): p. 871-5.
45. Manuelidis, L., G. Murdoch, and E.E. Manuelidis, *Potential involvement of retroviral elements in human dementias*. Ciba Found Symp, 1988. **135**: p. 117-34.
46. Murdoch, G.H., *et al.*, *Potential retroviral RNAs in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Virol, 1990. **64**(4): p. 1477-86.
47. Akowitz, A., T. Sklaviadis, and L. Manuelidis, *Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(6): p. 1101-7.
48. Hogenhout, S., *The Spiroplasma web page*, <http://www.oardc.ohio-state.edu/spiroplasma/>, 2000
49. Bastian, F.O., *Spiroplasma-like inclusions in Creutzfeldt-Jakob disease*. Arch Pathol Lab Med, 1979. **103**(13): p. 665-9.
50. Megraud, F., L.B. Gamon, and G.J. McGarrity, *Characterization of Spiroplasma mirum (suckling mouse cataract agent) in a rabbit lens cell culture*. Infect Immun, 1983. **42**(3): p. 1168-75.
51. Bastian, F.O., D.M. Purnell, and J.G. Tully, *Neuropathology of Spiroplasma infection in the rat brain*. Am J Pathol, 1984. **114**(3): p. 496-514.
52. Kotani, H., D. Phillips, and G.J. McGarrity, *Malignant transformation of NIH-3T3 and CV-1 cells by a helical mycoplasma, Spiroplasma mirum, strain SMCA*. In Vitro Cell Dev Biol, 1986. **22**(12): p. 756-62.
53. Braig, H.R. and H. Diringer, *Scrapie: concept of a virus-induced amyloidosis of the brain*. Embo J, 1985. **4**(9): p. 2309-12.
54. Alper, T., *et al.*, *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?* Nature, 1967. **214**(90): p. 764-6.
55. Pattison, I.H., *Resistance of the Scrapie Agent to Formalin*. J Comp Pathol, 1965. **75**(159-64).
56. Griffith, J.S., *Self-replication and scrapie*. Nature, 1967. **215**(105): p. 1043-4.
57. Pattison, I.H. and K.M. Jones, *The possible nature of the transmissible agent of scrapie*. Vet Rec, 1967. **80**(1): p. 2-9.
58. Diringer, H., *et al.*, *Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein*. Nature, 1983. **306**(5942): p. 476-8.
59. McKinley, M.P., D.C. Bolton, and S.B. Prusiner, *A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion*. Cell, 1983. **35**(1): p. 57-62.
60. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.
61. Rohwer, R.G., *Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation*. Nature, 1984. **308**(5960): p. 658-62.

62. Bellinger-Kawahara, C., *et al.*, Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology*, 1987. **160**(1): p. 271-4.
63. Bellinger-Kawahara, C., *et al.*, Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation. *J Virol*, 1987. **61**(1): p. 159-66.
64. Taylor, D.M., *Inactivation of prions by physical and chemical means*. *J Hosp Infect*, 1999. **43 Suppl**: p. S69-76.
65. Brown, P., *et al.*, New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3418-21.
66. Prusiner, S.B., *et al.*, Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, 1982. **21**(26): p. 6942-50.
67. Chesebro, B., *et al.*, Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie- infected and uninfected brain. *Nature*, 1985. **315**(6017): p. 331-3.
68. Oesch, B., *et al.*, A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 1985. **40**(4): p. 735-46.
69. Carlson, G.A., *et al.*, Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, 1986. **46**(4): p. 503-11.
70. Dickinson, A.G., V.M.H. Meikle, and H. Fraser, Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol*, 1968. **78**: p. 293-299.
71. Hope, J., *et al.*, The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *Embo J*, 1986. **5**(10): p. 2591-7.
72. Collinge, J., *et al.*, Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 1994. **370**(6487): p. 295-7.
73. Brown, D.R., *et al.*, The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 1997. **390**(6661): p. 684-7.
74. Bueler, H., *et al.*, Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature*, 1992. **356**(6370): p. 577-82.
75. Bueler, H., *et al.*, Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 1993. **73**(7): p. 1339-47.
76. Prusiner, S.B., *et al.*, Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(22): p. 10608-12.
77. Prusiner, S.B., *et al.*, Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 1990. **63**(4): p. 673-86.
78. Mastrianni, J.A. and R.P. Roos, *The prion diseases*. *Semin Neurol*, 2000. **20**(3): p. 337-52.
79. Hsiao, K.K., *et al.*, Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 9126-30.
80. Wickner, R.B., *et al.*, Prions in *Saccharomyces* and *Podospora spp.*: protein-based inheritance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(4): p. 844-61, table of contents.
81. Ter-Avanesyan, M.D. and V.V. Kushnirov, Prions: infectious proteins with genetic properties. *Biochemistry (Mosc)*, 1999. **64**(12): p. 1382-90.
82. Caughey, B., *et al.*, Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, 1995. **2**(12): p. 807-17.
83. Telling, G.C., *et al.*, Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 1995. **83**(1): p. 79-90.
84. Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito, Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 2001. **292**(5521): p. 1552-5.
85. Brun, A., J. Castilla, and J.M. Torres, *Encefalopatías espongiiformes transmisibles en animales*. *Rev Neurol*, 2000. **31**(2): p. 133-7.
86. Purdey, M., *The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part 1: Mechanisms for a chemically induced pathogenesis/transmissibility*. *Med Hypotheses*, 1996. **46**(5): p. 429-43.
87. Johnson, R.T. and C.J. Gibbs, Jr., *Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(27): p. 1994-2004.
88. Gasset, M. and D. Westaway, *Los priones y su biología*. *Rev Neurol*, 2000. **31**(2): p. 129-32.
89. Wickner, R.B., *[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 1994. **264**(5158): p. 566-9.
90. Chien, P. and J.S. Weissman, *Conformational diversity in a yeast prion dictates its seeding specificity*. *Nature*, 2001. **410**(6825): p. 223-7.
91. Moore, R.C., *et al.*, Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*, 1999. **292**(4): p. 797-817.
92. Wong, B.S., *et al.*, Induction of HO-1 and NOS in Doppel-Expressing Mice Devoid of PrP: Implications for Doppel Function. *Mol Cell Neurosci*, 2001. **17**(4): p. 768-775.
93. Prusiner, S.B., *The prion diseases*. *Sci Am*, 1995. **272**(1): p. 48-51, 54-7.
94. *NINDS Alpers' Disease Information Page*, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, http://www.ninds.nih.gov/health_and_medical/disorders/altersdisease_doc.htm, 2001

95. *Alpers syndrome*, MedTerms.com, <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=8931>, 2001
96. Galvan-Manso, M., *et al.*, *Epilepsia mioclónica progresiva como manifestación de una forma tardía de síndrome de Alpers*. Rev Neurol, 2000. **31**(11): p. 1036-9.
97. Martínez-Mena, J.M., *et al.*, *Estudio neurofisiológico en el síndrome de Alpers*. Rev Neurol, 1998. **26**(149): p. 70-4.
98. Manuelidis, E.E. and L.B. Rorke, *Transmission of Alpers' disease (chronic progressive encephalopathy) produces experimental Creutzfeldt-Jakob disease in hamsters*. Neurology, 1989. **39**(5): p. 615-21.
99. O'Doherty, E., *et al.*, *Detection of polymorphisms in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep*. Vet Rec, 2000. **146**(12): p. 335-8.
100. *Office International des Epizooties - Organisation Mondiale de la Santé Animale*, <http://www.oie.int>, 2000
101. Hunter, N., *et al.*, *Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland*. Vet Rec, 1994. **135**(17): p. 400-3.
102. Neibergs, H.L., *et al.*, *Polymorphism analysis of the prion gene in BSE-affected and unaffected cattle*. Anim Genet, 1994. **25**(5): p. 313-7.
103. Spraker, T.R., *et al.*, *Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (Odocoileus hemionus), white-tailed deer (Odocoileus virginianus) and Rocky Mountain elk (Cervus elaphus nelsoni) in northcentral Colorado*. J Wildl Dis, 1997. **33**(1): p. 1-6.
104. Marsh, R.F. and W.J. Hadlow, *Transmissible mink encephalopathy*. Rev Sci Tech, 1992. **11**(2): p. 539-50.
105. *The Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK*, <http://www.maff.gov.uk/>, 2000
106. Zanusso, G., *et al.*, *Simultaneous occurrence of spongiform encephalopathy in a man and his cat in Italy*. Lancet, 1998. **352**(9134): p. 1116-7.
107. Deslys, J.P., *et al.*, *Screening slaughtered cattle for BSE*. Nature, 2001. **409**(6819): p. 476-8.
108. Bieschke, J., *et al.*, *Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5468-73.
109. Korth, C., *et al.*, *Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 74-7.
110. Schmerr, M.J., *et al.*, *Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy*. J Chromatogr A, 1999. **853**(1-2): p. 207-14.
111. *WHO infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies*, . 1999, World Health Organisation, Department of Communicable Disease Surveillance and Response: Geneva. p. 40.
112. Brown, P., *et al.*, *Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(1): p. 6-16.
113. Ehlers, B. and H. Diringer, *Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen*. J Gen Virol, 1984. **65**(Pt 8): p. 1325-30.
114. Farquhar, C., A. Dickinson, and M. Bruce, *Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies*. Lancet, 1999. **353**(9147): p. 117.
115. Pocchiari, M., P. Casaccia, and A. Ladogana, *Amphotericin B: a novel class of antiscrapie drugs*. J Infect Dis, 1989. **160**(5): p. 795-802.
116. Adjou, K.T., *et al.*, *MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(12): p. 2810-2.
117. Demaimay, R., *et al.*, *Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9685-9.
118. Tagliavini, F., *et al.*, *Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters*. Science, 1997. **276**(5315): p. 1119-22.
119. Caughey, W.S., *et al.*, *Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12117-22.
120. Caughey, B. and R.E. Race, *Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red*. J Neurochem, 1992. **59**(2): p. 768-71.
121. Doh-Ura, K., T. Iwaki, and B. Caughey, *Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4894-7.
122. Supattapone, S., *et al.*, *Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14529-34.
123. Soto, C., *et al.*, *Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides*. Lancet, 2000. **355**(9199): p. 192-7.
124. Kaneko, K., *et al.*, *Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10069-74.

125. Perrier, V., *et al.*, *Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 6073-8.
126. Montrasio, F., *et al.*, *Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1257-9.
127. Mabbott, N.A., *et al.*, *Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 719-20.
128. Janus, C., *et al.*, *A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 979-82.
129. Morgan, D., *et al.*, *A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 982-5.
130. Chacinska, A., *et al.*, *Ssb1 chaperone is a [PSI +] prion-curing factor*. Curr Genet, 2001. **39**(2): p. 62-67.