

EDGARD GRANER

**CARACTERIZAÇÃO DE UM RECEPTOR PARA O PRION
ATRAVÉS DA TEORIA DA HIDROPATICIDADE
COMPLEMENTAR DOS AMINO ÁCIDOS. EVIDÊNCIAS
DA INTERAÇÃO PRION-LAMININA.**

*Este exemplar foi
devidamente corrigido
de acordo com as
resoluções CCPG 1036/83
03/06/96
Sergio*

Tese apresentada ao Curso de Biologia
e Patologia Buco-Dental (Área de Patologia),
Faculdade de Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. **RICARDO RENZO BRENTANI**
Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, S.P.

Piracicaba - S.P.
1996

G765c

28220/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	G 765c
V. E.	
T. N.º	63/28.220
PROG.	66.7/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/08/96
N.º CPO	

CM-0009142 2-1

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

G765c Graner, Edgard.
 Caracterização de um receptor para o prion através da teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos. Evidências da interação prion-laminina / Edgard Graner. - Piracicaba : [s.n.], 1996.
 122f. : il.
 Orientador : Ricardo Renzo Brentani.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
 I. Degeneração do sistema nervoso. 2. Receptores nervosos. I. Brentani, Ricardo Renzo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
 19.CDD - 616.07
 - 611.0188

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Degeneração do sistema nervoso	616.07
2. Receptores nervosos	611.0188



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 24/05/96, considerou o candidato aprovado.

1. Ricardo Renzo Brentani

2. Gyorgy M. Bohm

3. Mari Armelin

4. Ana M. Tsanaclis

5. Sérgio Roberto Peres Line

Dedico este trabalho

a meus pais, Murilo e Elisabete
e à minha esposa Renata

Ao professor Ricardo R. Brentani,
pela orientação e pelos ensinamen-
tos científicos e humanos.

Agradeço aos amigos Adriana F.
Mercadante, Sandro J. de Souza, Vilma R.
Martins e Sílvio S. Veiga pela
participação essencial na realização
deste trabalho.

Ao professor Oslei P. de Almeida,
pela confiança, apoio e estímulo
constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo Sandro J. de Souza pelo estímulo e dedicação à minha formação.

À Vilma Regina Martins pela excelente orientação e participação ativa nos experimentos aqui apresentados.

À Dra. Luísa L. Villa, Dr. Andrew Simpson, Dr. Humberto Torloni e todos os colegas do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela convivência, sugestões e proveitosas discussões.

À Dra. Ana M. Tsanaclis e Ângela Logullo pelas excelentes sugestões.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Oslei P. de Almeida, Lourenço Bozzo, Sérgio R. P. Line, Jacks J. Júnior, Márcio A. Lopes e Ricardo D. Colleta pelo constante estímulo e apoio.

Ao Lionel C. Bethancourt de Sousa pelo excelente trabalho fotográfico.

À Sueli Nonogaki pelo esmero nas reações imunohistoquímicas

Aos amigos Roberto e Mathilde N. dos Santos, pelo acolhimento em São Paulo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Introdução	01
Revisão da literatura	03
<i>Scrapie</i>	03
Encefalopatia bovina espongiforme	06
Kuru	08
Doença de Creutzfeldt Jakob	10
Insônia familiar fatal	13
Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	14
Prions	19
Presença de DNA ou RNA nas partículas infecciosas	23
O gene que codifica o prion	24
A proteína prion	26
RNAs mensageiros de prion	28
Transformação de PrPc em PrPsc	30
Estudos em animais transgênicos	35
Proteínas ligantes de prion	38
Laminina	39
Hidropaticidade complementar	40
A proteína anti-prion	48
Objetivos	50
Material e métodos	51
Dedução do peptídeo complementar	51

Peptídeo complementar.....	52
Soro anti-peptídeo complementar.....	52
Soro anti-laminina	53
Soro anti-prion	53
Extrato protéico total de cérebro de camundongos.....	55
Preparação de membrana celular de cérebro de camundongos	55
Cultivo de células de neuroblastoma de camundongo (N2a)	57
Extrato protéico de células N2a	57
Precipitações dos extratos protéicos com sulfato de amônio	58
Fracionamento de proteínas através de géis de poliacrilamida-SDS.....	59
Focalização isoelétrica das proteínas do extrato protéico total e da preparação de membrana plasmática de cérebros de camundongos.....	59
Western blots	61
Ensaio de ligação entre a proteína de 60-66 kDa e o PrPc ("overlay")	62
Marcação de PrPsc com iodo 125.....	63
Ensaio de ligação ("overlay") entre o PrPsc marcado com iodo 125 e laminina	64
Imunohistoquímica	65
Imunofluorescência e microscopia confocal	66

Resultados	68
Reconhecimento de uma proteína de 60-66 kDa pelo soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA	68
Focalização isoelétrica seguida de SDS-PAGE e Western blot	71
Purificação parcial dos reagentes usando precipitações com sulfato de amônio	74
Ensaio de ligação entre a proteína de 60-66 kDa e o PrPc	74
Detecção da proteína de 60-66 kDa em cultura primária de neurônios de camundongos e em cérebros de camundongos e ratos	79
Detecção de laminina no cérebro de camundongos e ratos	80
Ensaio de ligação entre laminina e prion.....	90
Discussão	92
Caracterização da proteína de 60-66 kDa	92
Distribuição da proteína de 60-66 kDa no cérebro de camundongos e ratos	101
Participação da laminina na formação das placas amilóides de PrP.....	104
Conclusões	107
Resumo	108

Summary109

Referências bibliográficas110

ABREVIACÕES

α -	anticorpo
β -APP -	proteína precursora de amilóide
BCIP -	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA -	albumina sérica bovina
BSE -	encefalopatia bovina espongiforme
CJD -	doença de Creutzfeldt-Jakob
cpm -	contagem por minuto (leitura de emissão de radiao)
DAB -	3,3 diaminobenzidina tetrahydrocloreto
DLPC -	complexo detergente-lipídeo- proteína
DMEM -	meio Eagle modificado por Dulbecco
EHS -	tumor Engelbreth-Holm-Swarm
FFI -	insnia familiar fatal
FITC -	anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína
FTIR -	espectroscopia de transformao infra-vermelha de Fourier

GFAP -	proteína acídica glial fibrilar
gp -	glicoproteína
GPI -	glicosilfosfatidilinositol
GSS -	doença de Gerstmann-Sträussler Scheinker
H ₂ O ₂ -	peróxido de hidrogênio
HEPES -	ácido hidroxietil-piperazina-N- 2-etano-sulfônico
kb -	mil pares de bases
kDa -	quilodaltons
KLH -	hemocianina - "keihole limpet hemocyanin"
LDL -	lipoproteína de baixa densidade
N2a -	células de neuroblastoma de camundongo
NBT -	"nitro blue tetrazolium chloride"
NGF -	fator de crescimento neural
p/V -	proporção peso/volume
PAS -	ácido periódico de Schiff
PBS -	salina tamponada com fosfato
PMSF -	fenilmetilsulfonil fluoreto
Prn-p	gene que codifica a proteína prion

PrP 27-30 -	fragmento do prion após proteólise
PrPc -	prion celular
PrPsc -	prion <i>scrapie</i>
RGD -	peptídeo arginil-glicil- aspartato
RITC -	anticorpo conjugado com isotiocianato de rodamina
SDS -	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE -	eletroforese em gel de poliacrilamida
TBST -	salina tamponada com Tris-HCl, contendo 0,05% de Tween 20
Tris -	Tris (hidroximetil) aminometano
v/v -	proporção volume/volume

RESUMO

RESUMO

Prions são partículas protéicas infecciosas, compostas por uma isoforma anormal (PrPsc) de uma proteína expressa constitutivamente no sistema nervoso central (PrPc), que causam doenças neurodegenerativas no homem e em animais. Estas doenças são caracterizadas pela deposição de material amilóide, degeneração espongiiforme do tecido cerebral e perda neuronal (PRUSINER e cols., 1991).

Baseado na presença de uma fase aberta de leitura na fita de DNA complementar àquela que codifica o PrPc e na teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos (BLALOCK e SMITH, 1984), este trabalho descreve uma proteína de 60-66 kDa, presente na membrana celular de neurônios e células gliais de camundongos e ratos. Para isto utilizou-se um soro produzido em camundongos através da imunização com o peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA, deduzido a partir da fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrPc. Foi demonstrado também, através de experimentos de ligação *in vitro*, que esta proteína tem a capacidade de se ligar ao PrPc.

A distribuição da proteína de 60-66 kDa no cérebro de camundongos e ratos foi estudada através de reações imunohistoquímicas, que mostraram positividade principalmente no hipocampo, tálamo e nas células de Purkinje do cerebelo, áreas do cérebro frequentemente afetadas pelas doenças causadas por prions, sugerindo sua participação na patogênese destas doenças. A glicoproteína de membrana basal laminina também foi detectada nestas mesmas regiões do cérebro, assim como a capacidade de interação desta com PrPsc demonstrada através de experimentos de ligação *in vitro*. Estes dados sugerem a participação desta proteína de matriz extracelular na formação dos depósitos amilóides das doenças causadas por prions.

Palavras chave: Degeneração do sistema nervoso, receptores nervosos.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Prions são partículas infecciosas causadoras de doenças neurodegenerativas no homem (kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob - CJD, doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker - GSS e insônia familiar fatal - FFI) e em animais (*scrapie*, encefalopatia bovina espongiforme, encefalopatia transmissível do visão e doença debilitante crônica), formadas por uma forma anormal e insolúvel (denominada de prion *scrapie* - PrPsc) de uma proteína expressa constitutivamente no sistema nervoso central (prion celular - PrPc). As doenças provocadas pelos prions em humanos são os únicos exemplos conhecidos até o momento de alterações ao mesmo tempo hereditárias e infecciosas (PRUSINER, 1991).

A transformação do PrPc em PrPsc ocorre através da conversão de regiões da proteína prion ricas em alfa-hélices para estruturas beta-pregueadas (GASSET e cols., 1992; PAN e cols., 1993), causando o seu acúmulo sob a forma de agregados insolúveis, com características de amilóide, em várias regiões do cérebro (PRUSINER e cols., 1982; DeARMOND e cols., 1994; GAMBETTI e cols., 1995; MASTERS e RICHARDSON, 1978).

Na fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrPc foi encontrada uma fase aberta de leitura (GOLDGABER, 1991) cujos RNAs mensageiros foram detectados em vários tecidos (HEWINSON e

cols., 1991). De acordo com a teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos, proposta por BLALOCK e SMITH (1984) e segundo a qual os amino ácidos codificados por fitas de DNA complementares podem interagir entre si, a proteína codificada pela fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrPc teria a capacidade de se ligar ao PrPc, participando de alguma forma na patogênese das doenças causadas pelos prions.

O presente trabalho caracteriza bioquimicamente e descreve a distribuição da proteína codificada pela fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrPc no cérebro de camundongos e ratos, além de demonstrar a sua capacidade de ligação com o PrPc. A interação desta proteína de superfície neuronal com o PrPc sugere seu papel como receptor de PrPc.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

A degeneração e a deposição de material amilóide no sistema nervoso central são características comuns de algumas doenças que atingem o homem (kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob - CJD, doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker - GSS e insônia familiar fatal - FFI) e animais (*scrapie*, encefalopatia bovina espongiforme, encefalopatia transmissível do visão e doença debilitante crônica). Destas, CJD, GSS e FFI são os únicos exemplos conhecidos até o momento de doenças humanas hereditárias e ao mesmo tempo infecciosas.

Embora a etiologia deste grupo de doenças tenha permanecido obscura durante muitos anos, sendo atribuída à infecção por vírus ou viróides, sabe-se hoje que elas são causadas pelo acúmulo intracerebral progressivo de uma proteína extremamente insolúvel conhecida como prion (PRUSINER, 1991).

SCRAPIE

O *scrapie* é uma doença neurodegenerativa causada por prions, conhecida há mais de 200 anos, que afeta cabras e

ovelhas. Os animais comprometidos por esta doença apresentam excitabilidade, coceira, ataxia e paralisia, morrendo em pouco tempo. A etiologia do *scrapie* ficou desconhecida durante muito tempo, apesar da suspeita da participação de algum tipo de vírus.

As observações de alguns pesquisadores, mostrando que os descendentes do cruzamento entre ovelhas portadoras de *scrapie* com animais normais eram mais suscetíveis à doença, sugeriram a possibilidade de transmissão maternal e lateral da doença. No entanto, não foi possível detectar a presença do agente infeccioso no útero, ovário e glândulas mamárias de ovelhas clinicamente doentes. Além do mais, o cruzamento entre animais normais e animais infectados parece resultar sempre em uma prole normal. Para testar a possibilidade de transmissão maternal do *scrapie*, embriões de ovelhas inoculadas com PrPsc foram transplantados para animais normais ou vice-versa, sendo que a doença não se desenvolveu em nenhum deles, mesmo após um período de 5 anos de acompanhamento. Por outro lado, o inóculo direto, em animais controle, resultou em mais de 50% de infecção (revisado por PRUSINER, 1991).

Injetando-se por via subcutânea extratos protéicos provenientes de cérebros de ovelhas infectadas em ovelhas pertencentes a 24 raças diferentes, viu-se que algumas raças apresentavam uma alta incidência da doença (72-78%), enquanto que outras não a desenvolviam ou tinham um

prolongado período de incubação. Da mesma forma, o cruzamento entre animais provenientes de duas populações distintas de ovelhas de uma determinada raça, uma suscetível à infecção via subcutânea e intracerebral e outra resistente, sugeriu que o tempo de incubação estaria relacionado com um gene autossômico dominante (revisado por PRUSINER, 1991).

A patogênese do *scrapie* começou a ser elucidada com a recente observação de que o gene que codifica o prion está localizado no genoma do hospedeiro e com a purificação e caracterização bioquímica das partículas infecciosas causadoras da doença (PRUSINER e cols., 1982; BASLER e cols., 1986). Assim como a CJD e a GSS, a doença das ovelhas provavelmente é infecciosa e ao mesmo tempo hereditária. GOLDMAN e cols. (1990), observaram um polimorfismo no codon 171 do gene que codifica o prion de ovelhas da raça Suffolk, o qual resulta em substituição de um resíduo de arginina por um de glicina em um dos alelos.

Além do *scrapie* que atinge cabras e ovelhas, outras doenças semelhantes são provocadas por prions em outros animais, como o visão (encefalopatia transmissível do visão), cervos e antílopes (doença crônica debilitante) e gatos domésticos (encefalopatia espongiforme felina). No gado bovino os prions causam a encefalopatia bovina espongiforme, descrita a seguir.

ENCEFALOPATIA BOVINA ESPONGIFORME

A encefalopatia bovina espongiforme (BSE) (também conhecida como "doença da vaca louca") é uma doença do sistema nervoso central de bovinos provocada por prions, que surgiu no Reino Unido por volta de 1986. Em 1987 foram confirmados 9 casos da doença, enquanto que até o final de 1994 já tinham sido registrados 138.359 casos (WELLS e WILESMITH, 1995).

A epidemia provavelmente se iniciou no ano de 1981, quando foram introduzidas vísceras de carneiros e ovelhas na ração do gado britânico. Alguns estudos confirmaram experimentalmente esta via de infecção, mostrando transmissão de BSE para camundongos e também para o gado bovino através da alimentação (revisado por PRUSINER, 1991). A possibilidade de transmissão desta doença do gado para o homem provocou uma grande redução na importação de carne britânica, principalmente pela França e Alemanha, causando sérios problemas econômicos para o Reino Unido.

Não está determinado, até o momento, se o consumo de derivados do gado infectado (produtos alimentícios ou farmacêuticos) pode transmitir esta doença para o homem. No entanto, estudos realizados em hamsters têm demonstrado a possibilidade de infecção via oral, sendo esta 10^9 vezes

menos eficiente que a contaminação pelo inóculo intracerebral (PRUSINER, 1985). A transmissão entre espécies ocorre apenas em um número extremamente reduzido de animais que apresentam um tempo de incubação muito prolongado (SCOTT e cols., 1989).

As alterações microscópicas observadas na BSE são semelhantes às do *scrapie* e estão restritas ao sistema nervoso central. Observa-se vacuolização da substância cinzenta e resposta astrocítica, vacuolização do neuropilo, presença de vacúolos dentro do pericário do neurônio e perda neuronal. A vacuolização afeta ainda a substância cinzenta dos segmentos cervical, torácico e lombar da medula espinhal. Parece não haver uma correlação direta entre a quantidade de neurônios com vacuolização no pericário e a severidade da perda neuronal. A formação de placas amilóides não é característica desta doença, sendo os acúmulos de prion detectáveis através de imunohistoquímica (WELLS e WILESMITH, 1995). Os acúmulos intraneuronais de prion geralmente coincidem com a presença de vacuolização do pericário (JEFFREY e cols., 1992).

A hipótese mais plausível para a etiologia da BSE é a exposição do gado ao prion proveniente de ovelhas e carneiros portadores de *scrapie*, embora exista a possibilidade de ocorrência natural da doença. Trabalhos analisando o risco de ocorrência de BSE estão sendo atualmente conduzidos nos EUA, Argentina e Espanha, tendo-

se em vista alguns relatos esporádicos da doença fora do Reino Unido.

KURU

O kuru é uma doença neurológica que atingiu, na década de 50, nativos do grupo lingüístico Fore e tribos vizinhas, em Papua Nova Guiné. A palavra kuru significa tremer, no dialeto Fore (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957).

A maioria das evidências indica que o kuru se disseminou neste conjunto de tribos devido a prática de rituais canibalísticos, principalmente por mulheres e crianças, que tinham o costume de comer as vísceras (inclusive o cérebro) de seus parentes mortos como demonstração de respeito (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957; MATHEWS e cols., 1968). Até o momento não foi identificada nenhuma mutação específica no gene que codifica o prion destes pacientes. Provavelmente, durante os rituais canibalísticos ocorreu a ingestão de vísceras de algum portador de CJD (GAJDUSEK, 1977).

A doença tem um curso clínico bastante rápido (3 a 6 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas), caracterizando-se inicialmente por ataxia progressiva acompanhada de tremores no tronco, cabeça e extremidades,

que se intensificam durante a atividade física, diminuindo durante o repouso e desaparecendo durante o sono. Os tremores e a ataxia aumentam após alguns meses, quando os pacientes começam a apresentar dificuldades para andar e para permanecerem sentados. No início da doença a inteligência parece normal, porém a fala torna-se, com o passar do tempo, de difícil compreensão (disartria) e as funções intelectuais alteradas. Contrações dos músculos faciais, alterações emocionais, agressividade e hostilidade são características das fases mais avançadas da doença. Quando o paciente não pode mais se locomover, aparecem as incontinências urinária e fecal, a fala desaparece completamente (no entanto evidências de que o paciente está consciente são observadas através de seus movimentos oculares e da emissão de sons incompreensíveis). Dificuldades de deglutição e mastigação surgem então, levando o paciente (deixado geralmente sem ajuda no interior de cabanas) a um quadro grave de inanição, úlceras de decúbito e pneumonia, que culmina com o seu óbito. Outras alterações sistêmicas (sanguíneas, hepáticas ou no líquido cérebro-espinhal) não foram encontrada nestes pacientes portadores de kuru (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957).

Os aspectos histopatológicos do kuru são semelhantes aos de CJD e GSS, isto é, presença de alterações espongiiformes, astrogliose e deposição de placas amilóides na maioria dos casos ("kuru plaques"), principalmente no

cerebelo e no sistema extra-piramidal. O corno anterior da medula espinhal, as olivas inferiores, o tálamo e os núcleos da ponte também são afetados (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957; KLATZO e cols., 1959).

Com a extinção do canibalismo nestas tribos por volta de 1960, houve uma rápida redução na incidência do kuru. Um fato interessante é que, de centenas de crianças órfãs nascidas de mães portadoras de kuru por volta de 1957, nenhuma apresentou a doença até hoje. Isto mostra que as crianças das tribos afetadas pelo kuru não foram infectadas pelas suas mães através da placenta ou do leite materno (PRUSINER, 1993). Como o tempo de incubação é bastante prolongado, alguns indivíduos que praticaram o canibalismo naquela época estão apresentando hoje os sintomas da doença.

DOENÇA DE CREUTZFELDT-JAKOB

Os primeiros casos de uma doença neurodegenerativa humana chamada de doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), foram relatados em 1920 por H.G. Creutzfeldt e em 1921 por A. Jakob (revisado por RICHARDSON e MASTERS, 1995).

Vários autores foram capazes de demonstrar que a CJD pode ser transmitida com sucesso para animais de

laboratório, como macacos (GIBBS e cols., 1968; GAJDUSEK e cols., 1966), cobaias (MANUELIDIS e cols., 1975), camundongos (TATEISHI cols., 1979) e hamsters (MANUELIDIS e cols., 1978).

A transmissibilidade da CJD entre seres humanos também já foi descrita (DUFFI e cols., 1974): uma paciente com 55 anos de idade se infectou através de um transplante de córnea proveniente de um doador com CJD, apresentando dezoito meses depois, letargia, ataxia e rápida deterioração neurológica. Esta via de transmissão de CJD foi posteriormente confirmada em estudos com animais de laboratório, através do inóculo de córneas de hamsters infectados em cérebros de hamsters normais (MARSH e HANSON, 1975). Injeções de hormônio de crescimento, implantação de eletrodos intracerebrais e enxertos de dura-mater também já foram relacionados à transmissão de CJD (revisado por PRUSINER, 1993).

Aproximadamente 15% dos casos de CJD têm caráter familiar autossômico dominante, sendo os demais casos esporádicos (MASTERS e cols., 1981). Portanto, a CJD é, ao mesmo tempo, uma doença hereditária e infecciosa.

A CJD afeta igualmente homens e mulheres com idade média de 60 anos, que apresentam como sintomas mais comuns desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos. Uma em cada 10^6 pessoas por ano são diagnosticadas com CJD, sendo que 80% dos pacientes morrem

dentro de 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, enquanto os demais exibem um curso clínico de vários anos (RICHARDSON e MASTERS, 1995).

Microscopicamente, a CJD se caracteriza pela tríade morte neuronal, gliose e alterações espongiiformes (MASTERS e RICHARDSON, 1978). A detecção imunohistoquímica de depósitos de PrPsc pode ser útil para o diagnóstico diferencial entre alguns casos de CJD, GSS e a doença de Alzheimer. Entretanto, como menos de 10% dos casos típicos de CJD apresentam estes depósitos amilóides, este tipo de diferenciação é difícil (LANTOS e cols., 1992). A imunodeteção de PrPsc através de Western Blot, por ser mais sensível e específica do que a imunohistoquímica, tem sido muito útil para confirmar o diagnóstico histopatológico dos casos de CJD em que não existe a deposição de material amilóide (SERBAN e cols., 1990).

As regiões do cérebro mais afetadas pela doença são o corpo estriado, o tálamo e o cerebelo. As lesões cerebelares de CJD e de kuru parecem estar associadas à contaminação por vias periféricas. Como o kuru, onde o agente infeccioso é adquirido através da ingestão de vísceras de seres humanos durante rituais canibalísticos, alguns casos de CJD estão associados ao tratamento com hormônio de crescimento e gonadotrofina provenientes de extratos de hipófises humanas (RICHARDSON e MASTERS, 1995).

Dentre as mutações observadas no gene que codifica a proteína prion, localizado no braço curto do cromossomo 20, proveniente de pacientes portadores de CJD, a mais freqüente (correspondendo a 60% das mutações) ocorre no codon 200 e está associada à forma mais típica da doença (BROWN, 1992; BROWN e cols., 1994). Mutações nos codons 178 e 210 parecem estar associadas a alterações semelhantes. As mutações nos codons 198 e 217 estão presentes em uma forma variante de CJD semelhante à GSS ("GSS-like CJD"), onde se observa deposição simultânea do amilóide de prion e do β 4-amilóide, sendo este último característico da doença de Alzheimer (RICHARDSON e MASTERS, 1995). Uma mutação no codon 105 também foi descrita por KITAMOTO e cols. (1993) em pacientes portadores desta forma de CJD semelhante à GSS.

INSÔNIA FAMILIAL FATAL

A insônia familiar fatal (FFI) foi descrita pela primeira vez em 1986 (LUGARESI e cols., 1986) e está associada a uma mutação no codon 178 do gene que codifica a proteína prion (uma substituição de um resíduo de ácido aspártico por um resíduo de asparagina). Esta mesma mutação já havia sido anteriormente descrita em pacientes com CJD.

Na literatura existem relatos desta mutação no codon 178 em 16 diferentes famílias. Destas, 9 apresentam FFI e 7 CJD. Cinco novas famílias provavelmente portadoras de FFI estão atualmente em estudo (GAMBETTI e cols., 1995).

Clinicamente a FFI é caracterizada por distúrbios do sono e dos sistemas autônomo, endócrino e motor (LUGARESI e cols., 1986). A doença se manifesta em média aos 48 anos de idade e a sua duração é de cerca de 13 meses (GAMBETTI e cols., 1995). O primeiro sinal observado nestes pacientes é uma progressiva redução no tempo de sono, associada à redução ou desaparecimento do sono não REM ("rapid eye movement"). O sono REM pode também estar acentuadamente reduzido ou até mesmo ausente.

Microscopicamente, a FFI se caracteriza por perda de neurônios e astrogliose no tálamo, particularmente nos núcleos ventral anterior e médio-dorsal. Pode também ocorrer envolvimento cortical, dependendo do tempo de duração da doença (MANETTO e cols., 1992).

DOENÇA DE GERSTMANN-STRAÜSSLER-SCHEINKER

A doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) é uma alteração autossômica dominante rara do sistema nervoso central, caracterizada principalmente por anormalidades

motoras e intelectuais. Foi descrita pela primeira vez no início deste século em uma família de Viena, conhecida como "família H".

Segundo os primeiros relatos de Gerstmann, em 1928, (revisado por GHETTI e cols., 1995), uma mulher de 25 anos de idade, pertencente à família de Viena, apresentava ataxia cerebelar e tremores severos nos membros superiores e inferiores. O agravamento do quadro clínico levou a dificuldades de locomoção e a distúrbios da fala. A paciente apresentava ainda irritabilidade, comportamento descontrolado e redução de sua capacidade intelectual, falecendo seis anos após o início da doença. O pai, o avô e o bisavô da paciente apresentaram sintomas parecidos.

Em outro trabalho, publicado em 1936, Gerstmann descreveu os aspectos histopatológicos observados nesta mesma paciente (revisado por GHETTI e cols., 1995). Um achado bastante interessante foi a deposição de uma substância amorfa, com características de amilóide, nas camadas molecular e granular do cerebelo, córtex cerebral, substância branca e gânglios basais, associada à proliferação glial. Estavam também presentes buracos no córtex cerebral, o que se denominou alteração espongiforme. Estudos histopatológicos em outros membros da família H revelaram perda de fibras e núcleos na porção basilar da ponte, redução no tamanho do núcleo cerebelar profundo, com perda de fibras eferentes e atrofia do pedúnculo cerebelar

superior, além de dilatação dos axônios das células de Purkinje (GHETTI e cols., 1995). Análise microscópica de material proveniente de membros de outras famílias afetadas demonstraram que a deposição de material amilóide é um achado constante, ao contrário da degeneração espongiiforme (MASTERS e cols., 1981). Estas placas amilóides reagem positivamente com anticorpo anti-prion em reações imunohistoquímicas (KITAMOTO e cols., 1987).

Formas variantes de GSS (revisadas por GHETTI e cols., 1995):

1- mutação no codon 102 (P102L): esta é a mutação mais freqüente nos pacientes portadores de GSS, encontrada em cerca de 32 famílias estudadas provenientes de nove países diferentes (EUA, Canadá, Reino Unido, Alemanha, França, Áustria, Itália, Israel e Japão). Os pacientes portadores desta mutação desenvolvem a doença entre a quarta e sexta década de vida, apresentando uma síndrome cerebelar progressiva e lenta. A deterioração mental e comportamental ocorre nos estágios tardios da doença. Microscopicamente, observa-se depósitos de material amilóide no cerebelo e no córtex cerebral, associados à alterações espongiiformes.

2- **mutação no codon 105 (P105L)**: os pacientes com esta mutação manifestam a doença entre a quarta e quinta década de vida, caracterizada clinicamente por hiperreflexia nos membros inferiores e sinal de Babinski. Histologicamente observa-se a deposição de PrPsc no córtex cerebral (principalmente córtex motor), corpo estriado, tálamo e na camada molecular do cerebelo.

3- **mutação no codon 117 (A117V)**: esta mutação foi descrita em pacientes de uma família francesa e de duas famílias inglesas. A doença se manifestou entre 19 e 64 anos de idade, com um curso clínico de aproximadamente 2 a 6 anos. É caracterizada por demência pré-senil associada a sinais extra-piramidais, parkinsonismo e ataxia. Os depósitos de material amilóide, associados à degeneração espongiiforme, foram observados espalhados pelo cérebro (córtex, gânglio basal, tálamo), estando ausentes no cerebelo.

4- **mutação no codon 145 (Y145STOP)**: mutação observada em uma paciente japonesa, que apresentou perda de memória ao redor dos 38 anos de idade, com sinais de demência. Microscopicamente, detectou-se grande quantidade de

depósitos amilóides no córtex cerebral e cerebelar. Alterações espongiiformes estavam ausentes neste caso.

5- mutação no codon 198 (F198S): esta mutação foi descrita em pacientes de uma família norte americana com demência, ataxia e parkinsonismo. Depósitos de material amilóide foram observados no cérebro e cerebelo, associados à perda neuronal no neocórtex e tálamo, além de destruição das células de Purkinje do cerebelo. Os neuritos localizados nas proximidades do material amilóide reagiram positivamente com anticorpos contra β 4APP, no entanto, a deposição de β 4 amilóide tem sido detectada somente nos pacientes com idade avançada.

6- mutação no codon 217 (Q217R): presente em dois pacientes pertencentes a uma família norte americana. Um deles começou a apresentar sinais de depressão aos 47 anos de idade, seguidos de deficiência de memória e ataxia progressiva, falecendo aos 67 anos. O outro paciente com esta mutação no codon 217 desenvolveu alucinações auditivas aos 66 anos de idade, seguidas de demência e sinais parkinsonianos, falecendo com 72 anos de idade. Microscopicamente, os achados foram semelhantes aos dos pacientes com a mutação F198S, com depósitos de amilóide no

cérebro e cerebelo associados à deposição de $\beta 4$ amilóide, característico da doença de Alzheimer.

PRIONS

A transmissão do *scrapie* das cabras e ovelhas para animais de laboratório facilitou o estudo do agente etiológico. A partir dos cérebros de hamsters experimentalmente infectados, que desenvolvem com rapidez a doença, foi possível a purificação e caracterização bioquímica da partícula causadora do *scrapie*.

PRUSINER e cols. (1982) conseguiram purificar a partícula infecciosa dos cérebros de animais de laboratório infectados através de extrações com detergentes, proteólise limitada, centrifugação diferencial e sedimentação através de gradiente descontínuo de sacarose. O material obtido mostrou-se extremamente insolúvel, com características típicas de amilóide (coloração pelo vermelho Congo e PAS e birrefringência sob microscopia de luz polarizada). Em microscopia eletrônica de transmissão, o agente infeccioso purificado apresentou-se como pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e formato irregular (10 a 20 nm de diâmetro por 100 a 200 nm de comprimento). Com o mesmo protocolo de purificação, material semelhante, do

ponto de vista bioquímico e microscópico, foi extraído do cérebro de pacientes portadores de CJD (PRUSINER e cols., 1982; PRUSINER e cols., 1983). Demonstrou-se posteriormente (McKINLEY e cols., 1991) que o uso de inibidores de proteinases durante a purificação do agente infeccioso impede a formação das estruturas alongadas e birrefringentes, sugerindo que a proteólise é um pré-requisito para a agregação e insolubilidade do material.

Partículas infecciosas purificadas foram então utilizadas na produção de anticorpos monoclonais. Curiosamente, estes anticorpos reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, presente tanto nos cérebros de animais de laboratório normais como nos de animais infectados (OESCH e cols., 1985; BARRY e PRUSINER, 1986). O sequenciamento dos amino ácidos da extremidade amino terminal da proteína presente nas partículas infecciosas permitiu a síntese de peptídeos, que foram usados para imunizar coelhos. O anti-soro obtido destes animais foi capaz de reconhecer a mesma proteína de 33-35 kDa (BARRY e PRUSINER, 1986), sugerindo que a proteína presente nas partículas infecciosas do scrapie é um componente do cérebro de animais normais.

O reconhecimento de uma proteína normal, pelos anticorpos produzidos contra a proteína presente nas partículas infecciosas, demonstrou que estas últimas são agregados insolúveis, com aspecto de amilóide e resistentes

à proteólise, formados a partir de uma proteína precursora expressa normalmente no cérebro.

O tratamento com proteinases, durante a purificação, resulta em proteólise parcial, removendo os primeiros 67 amino ácidos da porção amino terminal da proteína extraída dos cérebros de animais infectados ou de pacientes com CJD ou GSS, reduzindo seu peso molecular de 33-35 kDa para 27-30 kDa (OESCH e cols., 1985). GABIZON e cols. (1988) demonstraram, através da solubilização das partículas infecciosas, que esta resistência à degradação proteolítica não é uma consequência da formação das placas amilóides, mas sim uma característica intrínseca da proteína infecciosa.

Em 1982, foi proposto por PRUSINER o termo prion ("proteinaceous infectious particle") para denominar estas proteínas. A proteína expressa constitutivamente no sistema nervoso central foi chamada de prion celular (PrP^C), enquanto que a depositada no cérebro dos animais infectados foi denominada de prion *scrapie* (PrP^{Sc}). Após a digestão proteolítica do PrP^{Sc} tem-se uma forma truncada, chamada de PrP 27-30 (OESCH e cols., 1985). Foi demonstrado posteriormente (STAHL e cols., 1987) que o PrP^C é uma proteína de superfície celular, ligada à face externa da membrana plasmática dos neurônios por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

O estudo das propriedades químicas do PrP foi facilitado pela solubilização dos agregados de PrP 27-30, extraídos do cérebro de animais de laboratório portadores de *scrapie*, sem reduzir o seu poder de infecção. Inicialmente, várias técnicas foram usadas para a solubilização das partículas, como o uso de detergentes, de sais, alterações de pH e sonicação, todas sem sucesso (BOLTON e cols., 1984; MCKINLEY e cols., 1986). Outros métodos, como a desnaturação térmica, o uso de SDS, de fortes agentes caotrópicos e de ácidos ou bases foram eficientes para a dissolução das partículas, no entanto, reduziram seu poder de infecção (PRUSINER e cols., 1981; PRUSINER, 1991).

GABIZON e cols. (1987) conseguiram padronizar condições ideais para a solubilização do PrP 27-30, em solução de detergente (deoxicolato de sódio) e fosfolipídeos (fosfatidilcolina), produzindo os chamados DLPCs ("detergent-lipid-protein-complexes"), que aumentam de 10 a 100 vezes a capacidade de infecção do material. Os fosfolipídeos funcionam como um meio hidrofóbico ideal para proteínas de membrana celular como o prion. Segundo os mesmos autores, a proporção correta para a dissolução do PrP 27-30 em DLPCs é de 4000 moléculas de fosfolipídeo para uma de prion, na qual não se observa nenhuma partícula, em microscopia eletrônica de transmissão.

A solubilização do PrP 27-30 foi útil também para a caracterização de proteínas ligantes de prion, em ensaios de ligação *in vitro* (descritos adiante) (OESCH e cols., 1990; OESCH, 1994).

PRESENÇA DE DNA OU RNA NAS PARTÍCULAS INFECCIOSAS

A incorporação do PrP 27-30 em DLPCs facilitou também a procura de DNA ou RNA nas partículas infecciosas. Acredita-se atualmente que o agente etiológico do *scrapie* e das doenças humanas associadas (CJD, GSS e FFI) não contém material genético.

GABIZON e cols. (1987) demonstraram que o tratamento de PrP 27-30 dissolvido em DLPCs com nucleases (DNase e RNase) e Zn^{2+} não é capaz de alterar o seu poder de infecção. Em outros experimentos, estes autores observaram que, mesmo adicionando-se as nucleases durante a formação dos DLPCs, não ocorria redução da infectividade do material. A radiação ultravioleta também mostrou-se ineficaz para inativar a infectividade do PrP 27-30 nos agregados insolúveis ou dissolvidos em DLPCs (GABIZON e cols., 1988). De acordo com os experimentos anteriores, MEYER e cols. (1990) não conseguiram detectar ácidos nucleicos específicos nas preparações purificadas de PrP

27-30, através de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pela prata.

Por outro lado, o tratamento prolongado do PrP 27-30 com enzimas proteolíticas reduziu significativamente o poder de infecção. Esta redução foi proporcional ao tempo de digestão e à concentração das enzimas proteolíticas (GABIZON e cols., 1988).

Portanto, os dados até o momento mostram que as partículas infecciosas são exclusivamente formadas por proteínas (PrP 27-30 e PrPsc).

O GENE QUE CODIFICA O PRION

O sequenciamento dos amino ácidos da porção amino-terminal do PrP 27-30 possibilitou a síntese de oligonucleotídeos e a clonagem do gene que codifica a proteína prion, a partir de cDNAs de hamsters normais e infectados (BASLER e cols., 1986). Este fato comprovou que a partícula infecciosa é realmente codificada por um gene do hospedeiro, o qual está localizado no braço curto do cromossomo 20 do homem e no cromossomo 2 do camundongo (OESCH e cols., 1985; CHESEBRO e cols., 1985). O gene que codifica o prion também encontra-se presente no genoma de

invertebrados como nematódeos, drosófila e também de leveduras (DIENER, 1987).

A análise detalhada da seqüência nucleotídica deste gene mostrou que ele é formado por dois exons, separados por um intron com aproximadamente 10 kb (Fig. I). O primeiro exon tem 56-82 pares de bases e o segundo cerca de 2 kb, onde está contida toda a fase aberta de leitura (BASLER e cols., 1986). Este tipo de estrutura gênica não permite a síntese de dois produtos protéicos distintos a partir de "splicing" alternativo. De fato, os RNA mensageiros para o prion apresentam um único tamanho (2,1 kb) e parece não existir variação em sua quantidade no cérebro de animais infectados, durante as várias fases da doença (OESCH e cols., 1985). Estes achados, juntamente com o sequenciamento da extremidade amino terminal do PrPc e do PrPsc, mostrando seqüências idênticas de amino ácidos (TURK e cols., 1988), sugerem que as diferenças entre o PrPc e o PrPsc são provenientes de modificações pós-traducionais.

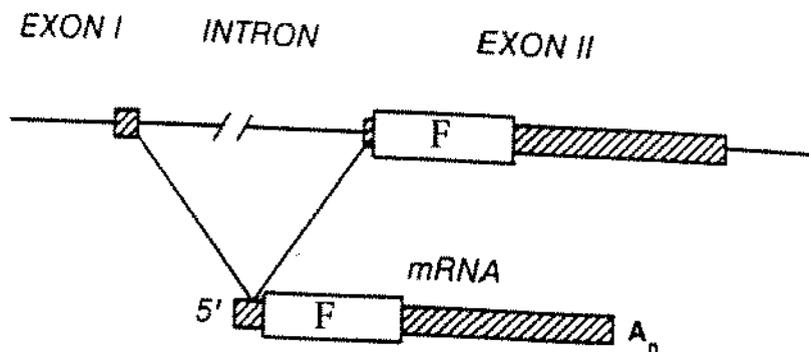


Figura I - Representação esquemática da organização do gene que codifica a proteína prion. F - fase aberta de leitura (modificado de PRUSINER e cols., 1991).

A PROTEÍNA PRION

Dentre as fases abertas de leitura do gene que codifica o prion já sequenciadas, estão a do homem, de hamsters, camundongos, ratos, cabras e galinhas (KRETZCHMAR e cols., 1986; BASLER e cols., 1986; LOCHT e cols., 1986; WESTAWAY e cols., 1987; LIAO e cols., 1987; GOLDMAN e

cols., 1990; HARRIS e cols., 1991). Todas elas codificam proteínas de aproximadamente 250 amino ácidos, com um peptídeo sinalizador de 22 amino ácidos na extremidade amino terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 amino ácidos na porção carboxi-terminal, o qual é removido durante a adição de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Depois de traduzida, a proteína prion sofre uma série de modificações pós-traducionais como: adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso (codons 181 e 197 do prion de hamster), formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214, remoção do peptídeo sinal da porção amino terminal da proteína e remoção do peptídeo hidrofóbico da extremidade carboxi-terminal, seguida da adição da âncora de GPI (Fig. II) (PRUSINER, 1991).

Como já salientado anteriormente, o PrP 27-30 é resultante da digestão limitada pela proteinase K, que remove os primeiros 67 amino ácidos do PrPsc. Esta característica do PrPsc permite a sua separação do PrPc, visto que este último é sensível à digestão

RNAs MENSAGEIROS DE PRION

A expressão do gene que codifica o prion parece ser variável durante as várias etapas do desenvolvimento, como demonstrado por vários trabalhos realizados através de hibridização *in situ* (McKINLEY e cols., 1987; MOBLEY e cols., 1988; MANSON e cols., 1992; HARRIS e cols., 1993).

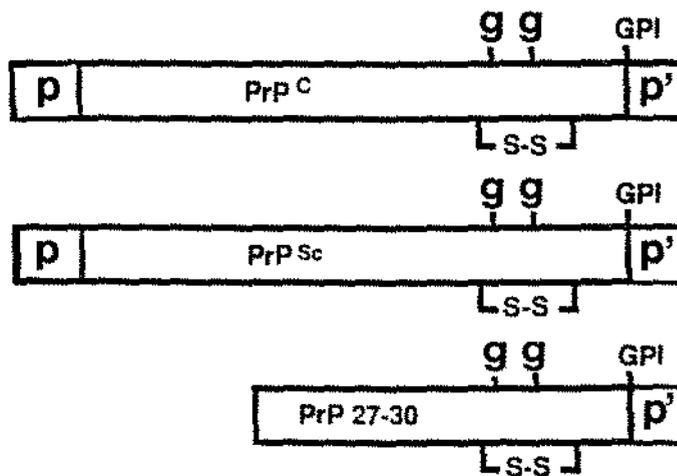


Figura II - Representação esquemática da proteína prion. g - sítios de glicosilação (codons 181 e 197), S-S - ponte dissulfeto entre os resíduos 179 e 214, GPI - âncora de GPI, p - peptídeo sinalizador, p' - peptídeo hidrofóbico, removido após a adição da âncora de GPI (modificado de PRUSINER, 1991).

No camundongo, o RNA mensageiro da proteína prion (PrP mRNA) pode ser detectado no tubo neural a partir do décimo terceiro dia de vida intra-uterina, aumentando de quantidade após o nascimento. Estes mensageiros foram encontrados também nos neurônios do neocortex, nas células de Purkinje do cerebelo, no hipocampo, na medula espinhal, em gânglios periféricos e nervos, além de neurônios do epitélio olfatório e da retina (KRETZCHMAR e cols., 1986; McKINLEY e cols., 1987).

Em hamsters, os níveis de PrP mRNA parecem estar sob a regulação do fator de crescimento neural (NGF) (MOBLEY e cols., 1988), sugerindo uma possível participação do prion no desenvolvimento e diferenciação neural. No entanto, o fato de outros tecidos como intestino, rim, lâmina dental e membranas extra-embrionárias também produzirem estes mensageiros pode indicar uma função celular mais ampla (MANSON e cols., 1992).

HARRIS e cols. (1993), estudando a distribuição de PrP mRNAs através de hibridização *in situ*, foram capazes de detectá-los em neurônios colinérgicos e não colinérgicos de várias regiões do sistema nervoso central de galinhas, a partir do sexto dia de vida intra-uterina: telencéfalo, hipocampo, tálamo, hipotálamo, trato óptico, células de Purkinje do cerebelo e medula espinhal. Além do sistema nervoso central, os mensageiros para o prion foram

observados na retina, intestino, coração e gânglios da raiz dorsal.

TRANSFORMAÇÃO DE PrPc EM PrPsc

Após a sua síntese, o PrPc sofre modificações pós-traducionais no complexo de Golgi (glicosilação, adição da âncora de GPI), sendo transportado para a superfície externa da membrana plasmática, onde é fixado pela âncora de GPI. Este transporte, segundo alguns autores (CAUGHEY e cols., 1989; BORCHELT e cols., 1990), leva cerca de uma hora, em células de neuroblastoma de camundongo (N2a) em cultura. Os mesmos autores demonstraram que o PrPc é removido da superfície celular por endocitose. SHYNG e cols. (1993) observaram que moléculas de PrPc realizam um ciclo entre a superfície celular e as vesículas de endocitose e que o processo de endocitose em células N2a é mediado por vesículas revestidas externamente por uma proteína fibrosa chamada clatrina (SHYNG e cols., 1994). Estas vesículas têm 50 a 100 nm de diâmetro e participam, além da endocitose de complexos ligante-receptor, do transporte de proteínas do complexo de Golgi para a superfície celular (ROBINSON, 1994).

Outros trabalhos, também realizados em células N2a infectadas com o PrPsc, mostraram que este se acumula principalmente no citoplasma, dentro de lisosomas (McKINLEY e cols., 1991; TARABOULOS e cols., 1990). Lisosomas pleomórficos contendo acúmulos de PrPsc também foram observados em neurônios de camundongos infectados (LASZLO e cols., 1992). Foi demonstrado ainda que a remoção do PrPc da superfície celular com fosfolípases ou proteinases bloqueia a formação de PrPsc em células N2a infectadas, sugerindo que o PrPsc é derivado de um precursor localizado na membrana plasmática (CAUGHEY e RAYMOND, 1991; BORCHELT e cols., 1992).

Como salientado anteriormente, o PrPsc, extraído de animais de laboratório infectados ou de pacientes, apresenta algumas características peculiares como a formação de agregados insolúveis e resistência a proteólise. PRUSINER, em 1989, propôs que o PrPsc, quando introduzido em células normais, seria capaz de converter moléculas de PrPc em PrPsc através da formação de dímeros. Segundo este autor, a ligação do PrPsc ao PrPc poderia impor uma mudança de conformação neste último, transformando-o em outra molécula de PrPsc. O exato mecanismo desta conversão não está ainda esclarecido. No entanto, a idêntica seqüência de amino ácidos destas duas proteínas e o fato de que o PrP 27-30 é o principal

componente das partículas do agente infeccioso sugerem que este último é uma isoforma do PrPc.

A detecção de moléculas de PrPsc na superfície celular sugere que a transformação do PrPc em PrPsc pode também ocorrer neste local, assim como dentro de lisosomas (CAUGHEY e RAYMOND, 1991). Provavelmente, o PrPsc é internalizado pela célula da mesma maneira que o PrPc e induz a formação de novas moléculas de PrPsc no interior dos lisosomas. A resistência à proteólise do PrPsc deve favorecer seu acúmulo nos lisosomas, levando à morte neuronal.

O mecanismo de conversão de PrPc para PrPsc começou a ser esclarecido com o estudo de peptídeos sintéticos. A análise das seqüências de amino ácidos do PrPc de diversos animais e do homem mostrou que quatro regiões da molécula são compatíveis com a estrutura em alfa-hélice. GASSET e cols. (1992) sintetizaram quimicamente peptídeos correspondentes a estas regiões e estudaram suas propriedades físicas através de espectroscopia de transformação infra-vermelha de Fourier (FTIR). Os peptídeos estudados foram: H1 (resíduos de 109 a 122), H2 (129 a 140), H3 (178 a 191) e H4 (202 a 218). Destes, H1, H3 e H4 apresentaram características peculiares, como insolubilidade em solução aquosa, formação de estruturas beta-pregueadas detectáveis nas análises de FTIR, formação de fibrilas amilóides birrefringentes sob microscopia de

polarização e coloração com vermelho Congo, além de formação de agregados ultraestruturalmente semelhantes às partículas infecciosas purificadas do cérebro de animais de laboratório. Segundo os autores, estes achados indicam que a transformação do PrPc em PrPsc pode envolver a conversão de estruturas em alfa-hélice para estruturas beta-pregueadas (Fig. III). A alta insolubilidade do PrPsc, sua resistência à proteólise e a tendência à polimerização estão de acordo com esta hipótese.

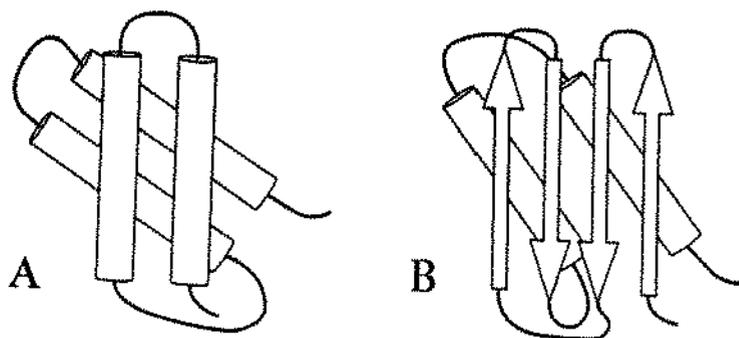


Figura III - A - esquema mostrando a provável disposição das estruturas em alfa-hélice do PrPc (cilindros). B - transformação de alfa-hélices em estruturas beta-pregueadas (setas) (modificado de PRUSINER, 1995).

PAN e cols. (1993) demonstraram que a conversão de alfa-hélices em estruturas beta-pregueadas consiste na alteração primária das doenças provocadas por prions. Estes autores desenvolveram um protocolo não desnaturante para a purificação de PrP^c, com o objetivo de comparar a sua estrutura secundária com a do PrP^{sc} através de FTIR. Os resultados mostraram que o PrP^c tem um perfil característico de proteínas ricas em alfa-hélice (42% alfa-hélice e 3% beta-pregueada), enquanto que o PrP^{sc} (43% beta-pregueada e 30% alfa-hélice) e o PrP 27-30 (54% beta-pregueada e 21% alfa-hélice) são ricos em estruturas beta-pregueadas. Observaram, ainda, sob microscopia eletrônica de transmissão, que o PrP^c e o PrP^{sc} apresentam-se como agregados amorfos, ao passo que o PrP 27-30 forma estruturas alongadas e irregulares compatíveis com amilóide. Os autores comentam que este tipo de transformação na estrutura protéica já é bem conhecido em outros modelos. Por exemplo, o centro de reação do fotosistema II que, quando exposto a luz, muda sua conformação de alfa-hélice para estruturas beta-pregueadas; a gp 120 do vírus tipo I da AIDS que, em solução aquosa, apresenta-se na forma de cadeias beta-pregueadas e, quando ligada ao CD4, converte-se em alfa-hélices; e as serpinas ativadas proteoliticamente que se transformam de estruturas

beta-pregueadas em alfa-hélices. Outro exemplo importante é o peptídeo β A4 das placas amilóides da doença de Alzheimer, derivado de uma região rica em alfa-hélices da proteína precursora de amilóide (β -APP).

A reação de neurônios em cultura incubados com pequenos peptídeos sintéticos, correspondentes à sequência de diferentes regiões do PrPsc do cérebro de pacientes portadores de GSS (resíduos de 58 a 150), foi estudada por FORLONI e cols. (1993). Estes autores observaram que a exposição crônica de neurônios, provenientes do hipocampo de rato, ao peptídeo 106-126 do PrPsc causa morte celular e que este mesmo peptídeo forma agregados insolúveis com todas as características de material amilóide.

ESTUDOS EM ANIMAIS TRANSGÊNICOS

A especificidade entre espécies observada na transmissão das doenças causadas por prions tem sido estudada através da produção de camundongos transgênicos. SCOTT e cols. (1989) inocularam camundongos transgênicos Tg(SHaPrP)Mo, que expressavam prion de hamster, com PrPsc de hamsters, e observaram que os animais que produziam pouco RNA mensageiro para o prion de hamster apresentavam um tempo de incubação mais prolongado do que os camundongos

com grande quantidade destes mensageiros. Os animais que, por algum motivo, não estavam produzindo os mensageiros para o prion de hamster mostraram períodos de incubação extremamente longos. Este trabalho mostrou uma correlação inversa entre os níveis de RNA mensageiros e o tempo de incubação da doença. Os autores sugeriram ainda que a origem do inóculo determina o tipo de PrPsc produzido pelo animal infectado, pois camundongos transgênicos expressando o gene do prion de hamster e infectados com PrPsc de hamster produziam PrPsc deste mesmo animal. Da mesma maneira, inoculando-se estes camundongos transgênicos com PrPsc de camundongos, detectavam-se moléculas de PrPsc de camundongo.

Embora exista a possibilidade de infecção de camundongos não transgênicos com PrPsc de hamster, este é um processo muito lento e ineficiente (PATTISON, 1965).

A origem do inóculo também determina a distribuição anatômica das alterações espongiiformes e das placas amilóides. Camundongos expressando prion de hamster e inoculados com PrPsc de hamster desenvolvem intensa alteração espongiiforme na substância cinzenta do hipocampo, tálamo, córtex cerebral e tronco cerebral, além de apresentarem numerosas placas amilóides nas regiões subcalosas e paraventriculares. Estes aspectos são semelhantes aos observados em hamsters infectados com PrPsc de hamsters (DeARMOND e cols., 1987). Por outro lado, os

mesmos camundongos transgênicos infectados com PrPsc de camundongos exibiram alterações espongiiformes mais suaves e espalhadas pela substância cinzenta e branca, além de poucas placas amilóides, como é característico dos camundongos não transgênicos. SCOTT e cols. (1993) produziram também camundongos transgênicos expressando prions quiméricos, com seqüências de amino ácidos de PrPc de camundongos e de hamster. Estes animais puderam ser facilmente infectados com PrPsc de hamsters.

HSIAO e cols. (1994) produziram camundongos transgênicos que expressavam a mutação P101L (substituição de uma prolina por uma leucina na posição 101), correspondente à mutação no codon 102 do PrPc humano na GSS. Estes animais desenvolveram alterações neurológicas espontaneamente, como vacuolização do hipocampo e do neocortex e deposição de material amilóide, principalmente no cerebelo.

A remoção do gene do prion de camundongos (BUELER e cols., 1992) não impediu o desenvolvimento normal destes animais (Prn-p 0/0), os quais foram cuidadosamente acompanhados por um período de 2 anos. Como esperado, estes camundongos se tornaram completamente resistentes à infecção. Os camundongos portadores do gene do prion em um único alelo (Prn-p 0/+) foram suscetíveis à infecção, porém com um tempo de incubação bastante prolongado.

COLLINGE e cols. (1994) demonstraram que os animais Prn-p 0/0 não eram tão normais quanto aparentavam, exibindo com o passar do tempo alterações na função sináptica, com depressão do fenômeno hipocampal denominado potenciação de longa duração, relacionado com os processos de memória e de aprendizado.

PROTEÍNAS LIGANTES DE PRION

OESCH e cols. (1990 e 1994) demonstraram a interação do prion com outras proteínas através de ensaios de ligação *in vitro*. PrPc e PrPsc marcados com iodo 125 e dissolvidos em DLPCs foram incubados com membranas de nitrocelulose contendo as proteínas do cérebro de hamsters separadas eletroforéticamente. Desta maneira foram identificadas várias proteínas ligantes de prion com 45, 50, 56, 64, 72 e 110 kDa. Estes autores purificaram e sequenciaram o ligante de 45 kDa, mostrando que este corresponde à proteína glial acídica fibrilar (GFAP), um componente do citoesqueleto de astrócitos. As outras proteínas ligantes não foram caracterizadas até o momento.

LAMININA

A laminina é o protótipo de uma família de glicoproteínas encontradas nas membranas basais, associadas ao colágeno tipo IV, a proteoglicanas e ao nidogênio. Sua molécula é composta por três cadeias polipeptídicas distintas, denominadas A (400 kDa), B1 (210 kDa) e B2 (200 kDa), arranjadas na forma de uma cruz assimétrica com dois braços curtos e um longo. A laminina foi inicialmente purificada do tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), no qual ocorre a síntese de grande quantidade de membranas basais. A laminina participa de processos como regulação de adesão, crescimento e diferenciação celular (TIMPL e cols., 1979).

Vários receptores celulares para laminina já foram descritos, dentre os quais incluem-se as integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 7\beta 1$), proteínas de 67 e 110 kDa e um condroitin-sulfato, que parece estar associado às integrinas $\alpha 7\beta 1$ em células de melanoma humano em cultura (MEL 85) (KLEINMAN e cols., 1991; VEIGA e cols., 1996).

Além de suas propriedades adesivas, a laminina é capaz de induzir o crescimento de neuritos em cultura de neurônios provenientes do sistema nervoso central ou periférico (ENGVALL e cols., 1986). YAMAMOTO e cols. (1988) demonstraram, através de imunohistoquímica em microscopia

de luz e eletrônica de transmissão, a presença de laminina (neuro-laminina) no interior de neurônios do sistema nervoso central de ratos e de camundongos (hipocampo, neocortex, tálamo e células de Purkinje do cerebelo). Estes autores sugeriram que a laminina pode ser produzida por estes neurônios, tendo algum papel no desenvolvimento e na manutenção do sistema nervoso, e que alterações durante a síntese ou a utilização anormal desta glicoproteína podem estar relacionadas com a patogênese de doenças neurodegenerativas.

HIDROPATICIDADE COMPLEMENTAR

O termo hidropaticidade, segundo KYTE e DOOLITTLE (1982), significa afinidade por água. Estes autores calcularam o coeficiente de hidropaticidade de cada amino ácido com base nas suas propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas (Tabela I). Os amino ácidos hidrofóbicos têm coeficientes de hidropaticidade positivos, enquanto que os amino ácidos hidrofílicos, coeficientes negativos. Os amino ácidos com grupos R não carregados e parcialmente hidrofílicos apresentam coeficientes próximos ao zero.

Segundo a teoria da hidropaticidade complementar, proposta por BLALOCK e SMITH (1984), existe uma tendência

para que os codons que codificam amino ácidos hidrofóbicos sejam complementados por codons que codificam amino ácidos hidrofílicos, e vice-versa. Da mesma maneira, os codons para amino ácidos hidrofílicos não carregados são complementados por codons codificadores de amino ácidos semelhantes. Baseados neste princípio, os mesmos autores sugeriram que amino ácidos codificados por fitas de DNA complementares poderiam interagir entre si. Tal hipótese já havia sido feita anteriormente por BIRO (1981), o qual sugeriu que fitas complementares de DNA de um mesmo locus codificariam peptídeos interagentes.

As bases moleculares destas interações hidrofóbico-hidrofílico ainda não foram completamente esclarecidas. A possibilidade de interação química entre amino ácidos hidrofóbicos e hidrofílicos já foi discutida na literatura (BRENTANI, 1988; BRENTANI, 1990). Segundo NEMETHY e SHERAGA (1962), ligações espontâneas podem acontecer entre amino ácidos hidrofóbicos e a cadeia carbônica lateral de amino ácidos hidrofílicos. BURLEY e PETSKO (1988), por sua vez, consideram as interações amino-aromáticas como modelos de interação hidrofóbico-hidrofílico. A formação de copolímeros entre amino ácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (ácido glutâmico/leucina e arginina/alanina) foi observada através de métodos físico-químicos (POLAND e SHERAGA, 1967; ROOT-BERNSTEIN, 1982).

A interação entre peptídeos complementares (peptídeos codificados por fitas de DNA complementares) foi primeiramente demonstrada em hormônios como o ACTH (BOST e cols., 1985), angiotenssina II (ELTON e cols., 1988), endorfina (CARR e cols., 1986) e vasopressina (LU e cols., 1991). A cada ano aumenta a quantidade de peptídeos complementares interagentes descritos na literatura, sendo conhecidos até o momento cerca de quarenta exemplos (revisado por BARANYI e cols., 1995), listados na Tabela II.

Teoricamente, um peptídeo codificado pela fita de DNA complementar à seqüência que codifica o sítio de ligação de uma proteína ligante possui a conformação do seu receptor e vice-versa. Um exemplo disto é o peptídeo complementar aos resíduos 22 a 27 da insulina, que é capaz de inibir a ligação desta com adipócitos por competir com os receptores destas células (KNUTSON, 1988).

Os anticorpos dirigidos contra peptídeos complementares são importantes ferramentas para a caracterização de proteínas interagentes (receptor-ligante), ou seja, aquelas que contêm em suas estruturas regiões com conformação semelhante à dos peptídeos complementares (GORCS e cols., 1986; CARR e cols., 1986; BRENTANI, 1988; SOUZA e BRENTANI, 1992). Além disto, estes anticorpos podem apresentar alguma atividade biológica, como acontece com os anticorpos contra o peptídeo

complementar ao ACTH, que, por apresentarem regiões com conformação semelhante à do hormônio, estimulam a síntese de corticosterona por células adrenais de camundongo (BOST e cols., 1985). Outro exemplo são os anticorpos contra o peptídeo complementar à γ -endorfina, que diminuem os níveis de AMP cíclico em uma linhagem celular híbrida neuroblastoma-glioma (CARR e cols., 1986). Em ambos os exemplos citados acima os anticorpos mimetizam a ação das proteínas ligantes.

Nosso grupo, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, tem aplicado o princípio da hidropaticidade complementar dos aminoácidos para a caracterização de interações entre proteínas. BRENTANI e cols. (1988) e PASQUALINI e cols. (1989) demonstraram que o peptídeo teórico WTVPTA, deduzido a partir da fita de DNA complementar àquela que codifica a seqüência RGD da fibronectina (sítio de ligação da fibronectina a seus receptores integrínicos), é capaz de inibir a ligação desta proteína a células tumorais. Os anticorpos contra este mesmo peptídeo reconhecem as integrinas $\alpha 5\beta 1$ e GPIIb/IIIa. Confirmando estes achados, SOUZA e cols. (1992) observaram que anticorpos contra a integrina GPIIb/IIIa, produzidos em grande quantidade nos pacientes portadores de púrpura trombocitopênica idiopática, reconhecem o peptídeo teórico WTVPTA.

SOUZA e BRENTANI (1992) deduziram os peptídeos teóricos TKKTLRT e SSNTLRS a partir da fita de DNA complementar àquela que codifica a região das cadeias $\alpha 2$ e $\alpha 1$ do colágeno tipo I clivada pela collagenase (resíduos de glicina 772 até glicina 778). Estes peptídeos têm um perfil de hidropaticidade muito parecido com o do peptídeo SQNPVQP, presente nas proximidades do sítio catalítico da collagenase de fibroblasto. Neste trabalho, os autores demonstraram que os anticorpos contra o peptídeo TKKTLRT são capazes de reconhecer collagenase de fibroblasto, comprovando que a seqüência SQNPVQP corresponde ao sítio de ligação da collagenase de fibroblasto no colágeno. A interação entre a seqüência SSNPIQP da collagenase de neutrófilo humano (que apresenta o mesmo perfil de hidropaticidade que a seqüência SQNPVQP da collagenase de fibroblasto) e o colágeno tipo I está sendo caracterizada em nosso laboratório.

GILBERT (1978) propôs, com a "exon shuffling theory", que os genes hoje existentes são mosaicos formados pela recombinação de exons primitivos. De acordo com a teoria deste autor, BRENTANI (1988; 1990) sugeriu que a fita "anti-sense" de DNA poderia ser incluída em eventos de recombinação gênica, sendo este um dos mecanismos responsáveis pela criação de proteínas interagentes. É possível especular que o sítio de ligação da collagenase nas cadeias do colágeno tipo I possa ter se originado a partir

da fita de DNA complementar àquela que codifica as cadeias do colágeno, sendo transportadas para o atual gene da collagenase (SOUZA e BRENTANI, em preparação).

Um fato importante é que a fita de DNA complementar ou "anti-sense" apresenta potencial codificador (ALFF-STEINBERG, 1984; OHNO, 1988). Várias fases abertas de leitura já foram encontradas na fita complementar de DNA (BRENTANI, 1988; 1990). Por exemplo, complementar ao gene *myc* existe um outro gene, chamado de *cym*, que parece regular a atividade da proteína *myc* (ARMSTRONG e KRYSTAL, 1992). ADELMAN e cols. (1987) descobriram uma fase aberta de leitura na fita complementar ao gene que codifica o hormônio liberador de corticotropina.

Complementar ao gene da proteína prion (PrPc) também existe uma fase aberta de leitura (GOLDGABER, 1991), comprovadamente transcrita (HEWISON e cols., 1991). A caracterização da proteína codificada pela fita de DNA complementar ao gene da proteína prion é o principal objetivo do presente trabalho.

**Tabela I - Coeficiente de hidropaticidade dos amino ácidos
(KYTE e DOOLITTLE, 1982)**

Alanina	(A)	+ 1,8
Ácido aspártico	(D)	- 3,5
Ácido glutâmico	(E)	- 3,5
Arginina	(R)	- 4,5
Asparagina	(N)	- 3,5
Cisteína	(C)	+ 2,5
Fenilalanina	(F)	+ 2,7
Glicina	(G)	- 0,4
Glutamina	(Q)	- 3,5
Histidina	(H)	- 3,2
Isoleucina	(I)	+ 4,5
Leucina	(L)	+ 3,7
Lisina	(K)	- 3,9
Metionina	(M)	+ 1,9
Prolina	(P)	- 1,6
Serina	(S)	- 0,9
Tirosina	(Y)	- 1,3
Treonina	(T)	- 0,7
Triptofano	(W)	- 0,9
Valina	(V)	+ 4,2

Tabela II - Exemplos descritos na literatura de interação entre peptídeos complementares (BARANYI e cols., 1995)

Peptídeos complementares a:

ACTH

Angiotenssina/ receptor de Angiotenssina

Anticorpo anti-idiotípico para proteína básica mielina/
receptor de células T

Anticorpo auto-reativo T15

Anticorpos idiotípicos

Arginina vasopressina

β -endorfina

Bradicinina

Cistatina

Endotelina maior

Fator de crescimento epidérmico

Fibrinogênio

Fibronectina

Fragmento neurofisina da arginina vasopressina

γ -endorfina

Hormônio estimulador de melanócitos

Hormônio liberador de hormônio de crescimento

Hormônio liberador de hormônio luteinizante

Insulina

Interferon- β

Interleucina-1 β

Interleucina-2

Peptídeo mimético de cálcio

Peptídeo ribonuclease S

Peptídeo terminal gastrina

Prolactina ovina

Proteína c-Raf

receptor de dopamina

Receptor de encefalina

Receptor de laminina

Receptor de vasopressina

Receptor do fator oostático regulador de em mosquito

Receptor nicotínico

Receptor opiáceo

Somatostatina

Substância P

Vitronectina

A PROTEÍNA ANTI-PRION

A fase aberta de leitura existente na fita de DNA complementar ao gene do prion foi descoberta por GOLDGABER em 1991, durante a análise, por meio de um programa de computador, das seqüências de DNA da fita "anti-sense". Este autor observou também que existe uma correlação inversa entre o perfil de hidropaticidade dos amino ácidos deduzidos a partir da seqüência "anti-sense" e o perfil dos amino ácidos do PrPc. Assim, codons para amino ácidos com coeficiente de hidropaticidade positivos (hidrofóbicos) no PrP são complementados por codons para amino ácidos com coeficiente negativo (hidrofílicos) e vice-versa. Isto está de acordo com a teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos proposta por BLALOCK e SMITH (1984).

GOLDGABER (1991) sugere, em seu trabalho, que a fase aberta de leitura na fita "anti-sense" do gene do PrP pode ter alguma importância biológica, com base nas seguintes observações: 1- ela possui o mesmo tamanho que a fase aberta de leitura do gene do PrP; 2- as diferenças observadas na seqüência nucleotídica do gene do PrP de diversos animais não produzem codons de parada na fita de DNA complementar; 3- as mutações nos codons 178 e 200 observadas em pacientes com CJD não resultam em

substituição de amino ácidos na proteína codificada pela fita complementar, como ocorre com as mutações nos codons 102 e 117 de pacientes com GSS; 4- a presença de codons de iniciação de tradução no início desta fase aberta de leitura.

HEWINSON e cols. (1991), de acordo com os achados de GOLDGABER, detectaram moléculas de RNA correspondentes a fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrP em vários tecidos (cérebro, fígado, pulmão, linfonodos, coração, músculo e baço). Estes RNAs mensageiros foram posteriormente detectados em cérebros de camundongos que tiveram o gene que codifica o prion deletado (Prn-p 0/0) (MOSER e OESCH, 1993). Os mesmos autores sugerem que os RNAs mensageiros encontrados podem ter origem em outro locus, sendo altamente homólogos aos mensageiros gerados pela fita de DNA complementar ao gene que codifica o prion.

Como proposto por BLALOCK e SMITH (1984), a proteína codificada pela fita de DNA complementar ao gene do prion pode ter uma conformação que permita sua interação com o PrPc. Se isto for verdade, esta proteína poderia atuar como um receptor celular para o prion.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

1) Caracterizar bioquimicamente, através da teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos, a proteína codificada pela fita de DNA complementar ao gene da proteína prion.

2) Descrever a distribuição anatômica desta proteína e da glicoproteína de membrana basal laminina no cérebro de camundongos e ratos, através de imunohistoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Dedução do peptídeo complementar

O peptídeo 106-126 do PrP humano é capaz de reproduzir, em cultura de células, todas as características do PrPsc, sendo neurotóxico e formando agregados insolúveis com características de material amilóide, enquanto que um peptídeo menor, correspondendo aos resíduos 106-114 do PrP humano não apresenta estas características (FORLONI e cols., 1993). SHYING e cols. (1995) demonstraram, através da construção de proteínas PrP mutantes, que a seqüência de amino ácidos 117-135 do PrP de galinha é necessária para que ocorra a endocitose do PrP. Esta seqüência corresponde aos resíduos 105-122 do PrP humano. O fato dos resíduos localizados dentro da seqüência 106-126 serem importantes para a internalização do PrP, por neurônios de camundongos em cultura, sugere que o sítio de ligação para um provável receptor neuronal de PrP esteja contido dentro desta região. Considerando estes dados e fundamentados na teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos, deduzimos o peptídeo teórico usado neste trabalho (HVATKAPHHGPCRSSA) a partir da seqüência de nucleotídeos complementar àquela que codifica o peptídeo 114-129 do PrP humano (BASLER e cols., 1986).

A figura 1 mostra a correlação inversa entre o perfil de hidropaticidade dos amino ácidos do peptídeo teórico e o perfil dos amino ácidos da seqüência 114-129 do PrPc humano. Segundo a teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos, o peptídeo deduzido pode apresentar a mesma conformação do sítio de ligação de uma proteína (possivelmente um receptor) ao PrPc e ao PrPsc.

Peptídeo complementar

O peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA, conjugado com hemocianina (KLH - "keyhole limpet hemocyanin"), foi sintetizado pela Neosystem (Strasbourg, France).

Soro anti-peptídeo complementar

Injetou-se o peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA conjugado a KLH em camundongos Balb-c com 12 semanas de idade. Na primeira imunização, 50 µg do peptídeo, misturados com igual volume de adjuvante completo de Freund (Sigma), foram injetados via intraperitoneal. As imunizações seguintes foram realizadas em intervalos de 14 dias, com a mesma quantidade de peptídeo

misturada em igual volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Após a quarta imunização os animais foram sangrados e os soros estocados em alíquotas de 20 μ l a -20 °C.

Soro anti-laminina

Obteve-se o soro anti-laminina através da imunização de um coelho fêmea da raça Neozelandesa com laminina purificada do tumor murino EHS (LINE e cols., 1990).

Soro anti-prion

O soro anti-prion R073, produzido em coelho, foi gentilmente cedido pelo Dr. Albert Taraboulos (Molecular Biology, Hadassah Medical School, Israel).

Figura 1 - A - Peptídeo neurotóxico, B - peptídeo não neurotóxico e C - peptídeo necessário para a endocitose do PrP. D - Seqüência de nucleotídeos que codifica o peptídeo 114-129 do PrPc humano e sua seqüência complementar, a partir da qual foi deduzido o peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA. E - Correlação inversa entre os perfis de hidropaticidade dos resíduos 114-129 do PrP humano (●) e do peptídeo teórico (□).

Extrato protéico total de cérebro de camundongos

Para a obtenção dos cérebros, foram sacrificados 10 camundongos Balb-c com cerca de 2 meses de idade através da inalação excessiva de éter etílico. A seguir, estes foram lavados e homogeneizados em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 1 mM de aprotinina, 1 mM de leupeptin, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e 1 mM de benzamidina. O material foi então centrifugado a 12.000 g durante 30 minutos e o sobrenadante recolhido e estocado a -70 °C. Todas as etapas da preparação deste extrato foram feitas a 4 °C. Os extratos de cérebros de ratos (*Wistar Norvegicus albinus*) foram feitos da mesma maneira.

Preparação de membrana celular de cérebro de camundongos

Preparou-se o extrato de membrana celular de cérebros de camundongos Balb-c de acordo com ARVAN e cols. (1983). Vinte cérebros de animais com cerca de 2 meses de idade foram homogeneizados em solução tampão contendo 10 mM de ácido N-2-hidroxietyl-piperazina-N-2-etano-sulfônico (HEPES) pH 7,4, 0,5 mM

de $MgCl_2$, 1 mM de leupeptin, 1mM de PMSF, 1 mM de benzamidina. O material foi então centrifugado a 600 g durante 15 minutos para remoção de debris, sendo o sobrenadante diluído 5 vezes, no mesmo tampão com 0,7 mM de EDTA. A seguir, uma nova centrifugação foi feita, sobre um "colchão" de sacarose a 0,3 M, a 105.000 g durante uma hora. Ressuspendeu-se o "pellet" em solução a 1,38 M de sacarose e centrifugou-se sob uma solução a 0,3 M de sacarose por 105.000 g durante uma hora. O material depositado na interface foi coletado e ressuspendido em solução com 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 120 mM de NaCl, 1 mM de leupeptin, 1mM de PMSF, 1 mM de aprotinina e 1 mM de benzamidina e armazenado em alíquotas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Foi considerada como fração de proteínas citoplasmáticas o sobrenadante resultante da homogeneização dos cérebros em solução 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl, 1 mM de leupeptin, 1 mM de PMSF, 1 mM de aprotinina e 1 mM de benzamidina e centrifugação a 105.000 g durante uma hora.

Através de microscopia eletrônica de transmissão, confirmou-se a presença de fragmentos de membrana plasmática nesta preparação. Para isto, centrifugou-se novamente 1 ml desta preparação a 105.000 g, sendo o "pellet" fixado em solução de glutaraldeído a 0,5% por 24 horas e pós fixado em tetróxido de ósmio a 1%. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina e os ultrafinos com acetato de uranila e citrato de chumbo. As observações e documentações foram feitas em um microscópio Zeiss EM-10 (FOP - UNICAMP).

Cultivo de células de neuroblastoma de camundongo (N2a)

Células N2a (gentilmente cedidas pela Dra. Mari S. Armelin - IQ-USP) foram cultivadas em garrafas plásticas descartáveis estéreis (Falcon), contendo DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco - Sigma) com 15% de soro fetal bovino (Cultilab, S.P.), a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de umidade (estufa Forma Scientific).

Extrato protéico de células N2a

Garrafas de 75 cm² contendo uma monocamada confluyente de células N2a foram lavadas 3 vezes com PBS estéril. A seguir, removeram-se as células da garrafa em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 1 mM de aprotinina, 1 mM de leupeptin, 1 mM de PMSF e 1 mM de benzamidina) com o auxílio de um raspador descartável (Costar). O material foi então centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante aliqotado e estocado a -70 °C.

Precipitações dos extratos protéicos com sulfato de amônio

Com o objetivo de purificar parcialmente nossos reagentes, separando a proteína de 60-66 kDa do PrPc, também presente nos extratos protéicos, foram feitas sucessivas precipitações com sulfato de amônio. Para determinar em qual concentração de sulfato de amônio (Reagen) precipitam o PrPc e a proteína de 60-66 kDa realizamos o tratamento do extrato protéico total de cérebro de camundongos com diferentes concentrações de sulfato de amônio (30, 45, 50, 55, 65, e 70%), durante uma hora a 4 °C sob agitação suave, seguido de centrifugação por 10.000 g por 10 minutos e ressuspensão dos "pellets" em solução com Tris-HCl pH 7,4 e 120 mM de NaCl. As proteínas contidas nestes "pellets" foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. Detectou-se, através de Western blot, a presença do PrPc na fração de 30% e da proteína de 60-66 kDa nas frações precipitadas a partir de 55%.

Levando isto em consideração, submeteu-se então o extrato protéico total de cérebro de camundongos à precipitações sucessivas com sulfato de amônio. As proteínas menos solúveis foram separadas com 30% (dentre as quais o PrPc). Após a centrifugação o "pellet" foi ressuspendido em solução contendo Tris-HCl pH 7,4 e 120 mM de NaCl e estocado a -70 °C. A operação

foi repetida no sobrenadante com 45% (para retirar as proteínas que precipitam entre 30 e 45%) e depois com 55% (para precipitar a proteína de 60-66 kDa), sendo os "pellets" ressuspensos e armazenados a -70 °C.

Fracionamento de proteínas através de géis de poliacrilamida-SDS

Separaram-se eletroforéticamente as proteínas em géis de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE). As soluções protéicas foram aplicadas no gel misturadas com um tampão de amostra redutor (62 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 40% de glicerol, 0,2% de azul de bromofenol e 200 mM de 2-mercaptoetanol), após fervura durante 5 minutos (LAEMMLI, 1970).

Focalização isoeletrica das proteínas do extrato protéico total e da preparação de membrana plasmática de cérebros de camundongos

Para a separação das proteínas pelo seu ponto isoeletrico, foram utilizados tubos de vidro de 13 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro, preenchidos com solução contendo 5,5g de uréia

(BRL), 2 ml de NP-40 (Sigma) a 10% (v/v), 1,33 ml de mistura de acrilamida (Bio-Rad) a 30% (p/v), 2 ml de água deionizada, mistura de anfolitos (Pharmacia): 400 μ l de anfolito pH 5,0-8,0 e 100 μ l de anfolito pH 3,0-10, 15 μ l de solução de persulfato de amônio (Bio-Rad) a 10% (p/v) e 10 μ l de Temed (Sigma). Depois de polimerizados no interior dos tubos, os géis foram montados em uma cuba para focalização isoeletrica (BRL), a qual mantém a extremidade inferior dos tubos de vidro mergulhadas em solução 0,085% de ácido fosfórico e a extremidade superior em contato com solução 0,080% de hidróxido de sódio. Na extremidade superior de cada tubo, aplicou-se 50 μ l de tampão de amostra (1,14 g de uréia, 0,4 ml de NP-40 a 10% (v/v), 20 μ l de anfolito pH 3,0-10 e 80 μ l de anfolito pH 5,0-8,0, 2 ml de água deionizada) e 50 μ l de tampão de superfície (0,72 g de uréia, 0,4 ml de NP-40 a 10% (v/v), 20 μ l de anfolito pH 3,0-10, 80 μ l do anfolito pH 5,0-8,0 e 2 ml de água deionizada). Pré-corridas de equilíbrio, sem as amostras, foram feitas durante três períodos de 30 minutos consecutivos a 200, 300 e 400 volts respectivamente. Em seguida, retirou-se a mistura de tampão de amostra e tampão de superfície da extremidade superior dos tubos e aplicaram-se as proteínas dissolvidas em 50 μ l de tampão de amostra mais 50 μ l de tampão de superfície. Os tubos foram completados com solução de NaOH 0,080%, sendo a focalização realizada a 400 volts durante 16

horas. Para separar as proteínas pelo seu peso molecular, os géis cilíndricos foram cuidadosamente retirados dos tubos de vidro com auxílio de seringa plástica contendo PBS e aplicados em SDS-PAGE a 10% (segunda dimensão).

Western blots

Nos ensaios de Western blot, as proteínas previamente separadas através de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 μm - Schleicher & Schuell) durante a noite a 25 volts, em tampão de transferência (39 mM de glicina, 48 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Para verificação da eficiência da transferência, usou-se corante Ponceau (Sigma). As membranas foram então bloqueadas (durante 2 horas) com TBST (150 mM de NaCl, 20 mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico) e incubadas com anticorpos primários (anti-HVATKAPHHGPCRSSA 1:200 e anti-prion 1:2000) diluídos em TBST à temperatura ambiente durante 2 horas. As membranas, após 3 lavagens de 10 minutos com TBST, foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (Sigma), diluídos 1:1000 em TBST, por 1 hora a temperatura ambiente. Após uma nova série de lavagens, as reações foram reveladas com tampão de revelação contendo 5-bromo-4-cloro-

3-indolil fosfato (BCIP) e "nitro blue tetrazolium chloride" (NBT) (BRL). Nos Western blots quimioluminescentes, os anticorpos secundários utilizados eram conjugados com peroxidase, sendo as reações reveladas com a solução reveladora do "kit" "ECL Western blotting analysis system" (Amershan), seguidas de exposição a filmes radiográficos Kodak.

Ensaio de ligação entre a proteína de 60-66 kDa e o PrPc ("overlay")

As frações precipitadas com 30% (que contém PrP e não contém a proteína de 60-66 kDa) e com 55% (que contém a proteína de 60-66 kDa e não contém PrPc) foram separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE a 10% (utilizou-se 200 µg de proteína por canaleta) e transferidas para nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram então bloqueadas com solução com 120 mM de NaCl, 20 mM de Tris e 0,05% de Tween 20 (TBST modificado) contendo 5% de leite desnatado liofilizado e incubadas por três horas a temperatura ambiente da seguinte maneira:

1- as tiras de nitrocelulose contendo as proteínas precipitadas com 30% de sulfato de amônio foram incubadas com as

proteínas precipitadas com 55% de sulfato de amônio em solução (para depois serem incubadas com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA), e

2- as membranas contendo as proteínas precipitadas com 55% de sulfato de amônio foram incubadas com a fração de 30% em solução (para posterior tratamento com o soro anti-prion).

Após este período de incubação, as tiras de nitrocelulose foram então lavadas 3 vezes com TBST modificado, por 10 minutos, e incubadas com os respectivos anticorpos primários durante duas horas à temperatura ambiente (anti-HVATKAPHHGPCRSSA, diluído 1:200, nas membranas com as proteínas precipitadas com 30% e anti-prion R073, diluído 1:1000 em TBST modificado, nas membranas contendo o precipitado de 55%). Após uma nova série de lavagens foi feita uma incubação de 1 hora com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, à temperatura ambiente, seguida de nova lavagem. A revelação foi feita com o revelador quimioluminescente (Amershan).

Marcação do PrPsc com iodo 125

5µg de PrPsc, gentilmente cedido pelo Dr. Albert Taraboulos (Molecular Biology, Hadassah Medical School, Israel) foram

marcados com 0,5 μ Ci de iodo 125 (Amershan) utilizando-se iodo-beads (Pierce), durante 15 minutos sob suave agitação. Separou-se a proteína marcada do iodo livre através de precipitação com 9 volumes de etanol por 30 minutos e centrifugação em microcentrífuga durante 20 minutos. Ressuspendeu-se o "pellet" em solução de DLPC ("detergent lipid protein complex"), descrita a seguir.

Ensaio de ligação ("overlay") entre o PrPsc marcado com iodo 125 e laminina

A incorporação do PrPsc marcado (5×10^7 cpm/mg) em DLPCs foi realizada de acordo com OESCH e cols. (1990). Resumidamente, dissolveu-se o PrPsc marcado (0,1-0,5 μ g/ml) em solução contendo 10 mM de Tris HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100 e 1mg/ml de L- α -lecitina (DLPC), através de sonicação por um período de 20 minutos (sonicador INPEC eletrônica). Os "dot-blots" foram realizados em membranas de nitrocelulose contendo 10 μ g de proteínas imobilizadas (laminina não desnaturada, laminina desnaturada termicamente, fibronectina e albumina sérica bovina - BSA), bloqueadas com TBST mais 5% de leite desnatado liofilizado durante 2 horas. Estas membranas foram então incubadas com solução contendo 5×10^4 cpm/ml de PrPsc

marcado dissolvido em DLPC mais 0,5% de leite liofilizado, por 12 horas à temperatura ambiente e lavadas em TBST com 0,01% de DLPC por 4 horas à temperatura ambiente. Os autoradiogramas foram revelados após 24 horas a -70°C .

Imunohistoquímica

Para as análises imunohistoquímicas, 3 camundongos Balb-c e 3 ratos Wistar adultos foram sacrificados pela inalação excessiva de éter etílico, seus cérebros removidos cuidadosamente e imediatamente fixados em solução de Carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 48 horas. As peças foram então seccionadas em "fatias" de cerca de 2mm de espessura, no sentido coronal, e incluídas em parafina para a realização de cortes semi-seriados $4\mu\text{m}$ de espessura. A peroxidase endógena foi bloqueada com H_2O_2 a 5% por 10 minutos e os cortes a seguir incubados com ácido cítrico pH 6,0 durante 20 minutos em forno de microondas. Logo após, realizou-se o bloqueio com soro de cavalo (diluído a 1:50 em PBS pH 7,4) durante 20 minutos à temperatura ambiente, seguido de incubação com os anticorpos primários, diluídos em PBS pH 7,4 (anti-HVATKAPHHGPCRSSA 1:200 e anti-laminina 1:2000), a 4°C durante 16 horas. Após 3 lavagens de 3 minutos cada em PBS, os cortes foram incubados com os anticorpos

secundários biotinilados (diluídos a 1:200 em PBS) durante 30 minutos a 37 °C e novamente lavados. Incubou-se o complexo avidina-peroxidase (Vectastain Elite ABC kit - Vector Laboratories) diluído a 1:800 em PBS a 37°C por 30 minutos, seguido de nova série de lavagens em PBS. As reações foram então reveladas com solução contendo 0,04% de diaminobenzidina - DAB (Sigma) em PBS acrescida a solução 1:1000 de H₂O₂ 30%. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Nas lâminas utilizadas como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por soro não imune de camundongo ou coelho.

Imunofluorescência e microscopia confocal (experimentos realizados pelos Drs. Vivaldo Moura Neto e José Garcia-Abreu - Programa de Biofísica Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ)

Neurônios provenientes do mesencéfalo de camundongos com 14 dias de idade, cultivados durante 24 horas em DMEM-F12 (Gibco) complementado com glicose, glutamina, bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino, foram incubados por uma hora com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA (diluído 1/100 no meio de cultura). A seguir, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,6 por 30 minutos, lavadas rapidamente

com Triton X-100 0,1% em PBS e incubadas por 12 horas com um anticorpo monoclonal contra β -tubulina III (1/100) (Sigma). Seguiu-se incubação com anticorpos secundários conjugados com fluoresceína (FITC) ou rodamina (RITC) durante 2 horas. As observações e fotografias foram realizadas em microscópio Zeiss Axioplan e em microscópio Zeiss Laser (LSM 310).

RESULTADOS

RESULTADOS

I- Reconhecimento de uma proteína de 60-66 kDa pelo soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA

Os anticorpos produzidos em camundongos contra o peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA foram capazes de reconhecer uma proteína de 60-66 kDa, em extratos protéicos de cérebros de camundongos, de ratos ou de células de neuroblastoma de camundongo em cultura (N2a). A figura 2 (canaletas 1,3 e 5) mostra o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA reagindo com os extratos protéicos de cérebro de camundongo, separados em SDS-PAGE a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose, em ensaios de Western blot. No extrato protéico total e na fração citoplasmática, a banda mais proeminente foi de 60 kDa, enquanto que na preparação de membrana plasmática detectou-se uma banda com peso molecular um pouco maior, com 63-66 kDa. Na altura de 63-66 kDa, foi também observada uma banda tênue em Western blots realizados com as proteínas dos extratos totais revelados através de quimioluminescência.

A mesma proteína foi reconhecida pelo nosso soro nos extratos protéicos totais feitos com cérebros de ratos (Fig. 3) e com células de neuroblastoma de camundongo em cultura - N2a (Fig. 4)

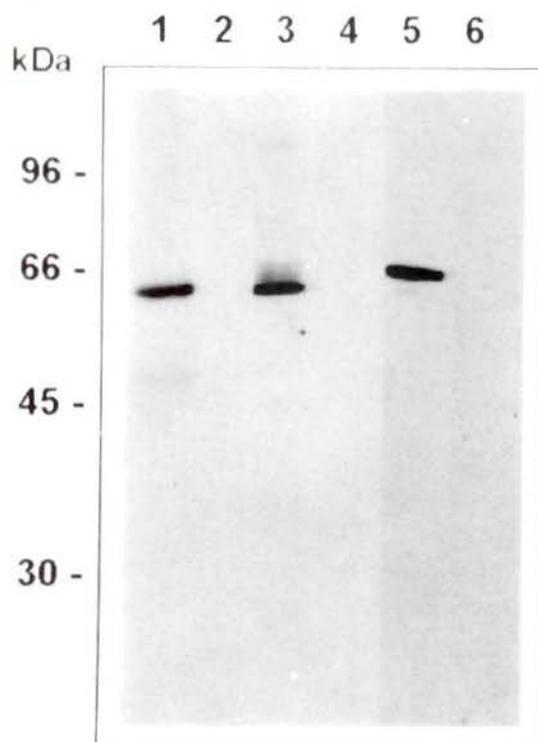


Figura 2 - Western blot quimioluminescente realizado com proteínas do extrato protéico total (1), da preparação de proteínas citoplasmáticas (3) e da preparação de membrana (5) de cérebros de camundongos, separadas em SDS-PAGE 10% em condições redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA. Nas canaletas 2, 4 e 6 utilizou-se soro normal de camundongo como controle das reações. Neste experimento evidenciou-se uma banda na altura de 60 kDa no extrato protéico total e na preparação de proteínas citoplasmáticas e outra com 63-66 kDa na preparação de membrana plasmática.

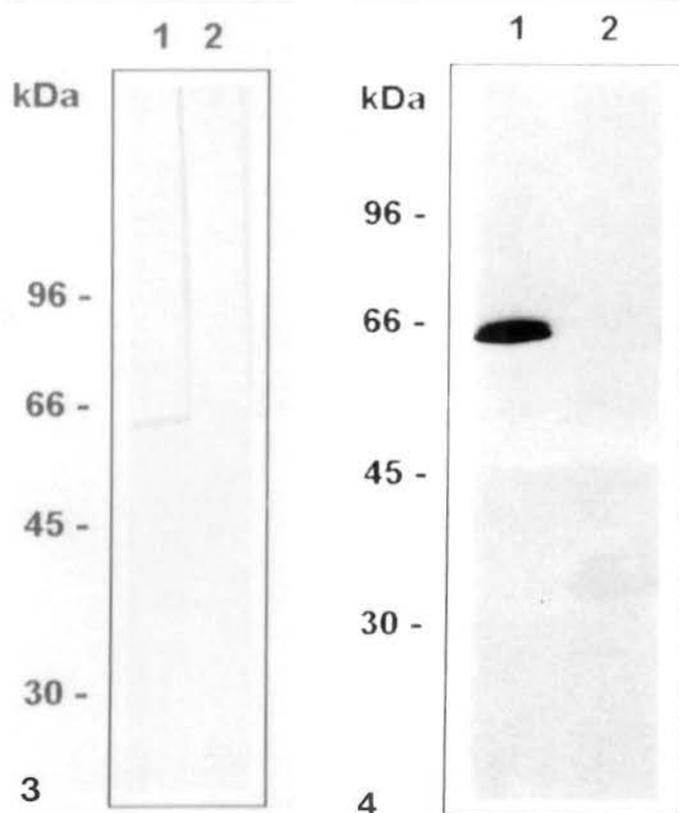


Figura 3- Western blot realizado com proteínas de extrato total de cérebros de ratos, separadas em SDS-PAGE 10% em condições redutoras e transferidas para nitrocelulose. Na canaleta 1 a membrana foi incubada com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA e na canaleta 2 com soro normal de camundongo, como controle negativo desta reação. Os anticorpos secundários utilizados são conjugados com fosfatase alcalina e a revelação feita com NBT e BCIP.

Figura 4- Western blot quimioluminescente para detecção da proteína de 60-66 kDa no extrato protéico total de células de neuroblastoma de camundongo em cultura (N2a) (canaleta 1). Na canaleta 2, a membrana de nitrocelulose foi incubada com soro normal de camundongo.

II - Focalização isoelétrica seguida de SDS-PAGE e Western blot

Para melhor caracterizar a proteína de 60-66 kDa, realizou-se a separação bidimensional das proteínas do extrato protéico total e da preparação de membrana plasmática de cérebros de camundongos primeiramente pelo ponto isoelétrico, seguida de separação pelo peso molecular (SDS-PAGE a 10%).

A figura 5-A mostra as proteínas do extrato total (cerca de 500 μ g) separadas pelo ponto isoelétrico e pelo peso molecular, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau. A realização de um ensaio de Western blot sobre esta membrana, usando como anticorpo primário o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA, evidenciou duas bandas com pontos isoelétricos bastante próximos: a primeira com pI 6,9 e 60 kDa e segunda com pI 6,8 e 63-66 kDa (Fig. 5- B e C).

Quando as proteínas das preparações de membrana plasmática foram submetidas a este mesmo protocolo de separação pela carga elétrica e pelo peso molecular, o soro contra o peptídeo complementar reconheceu apenas uma das bandas identificadas no experimento anterior, com pI 6,8 e 63-66 kDa (Fig. 6- A, B e C).



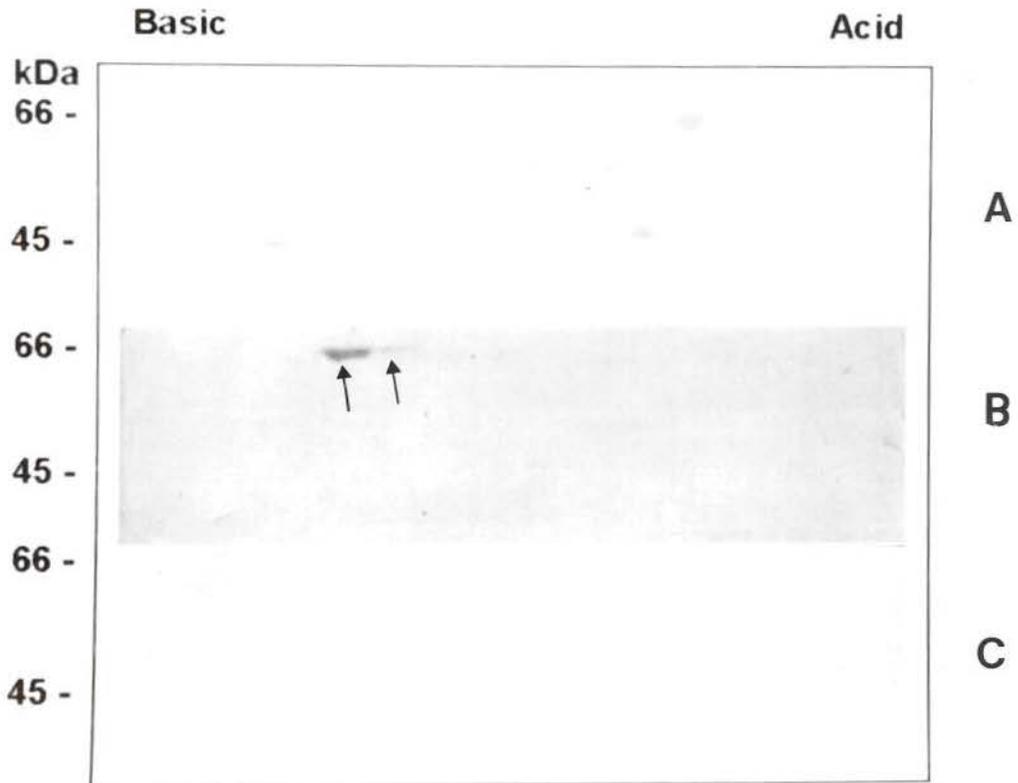


Figura 5- A- Proteínas do extrato total de cérebros de camundongos separadas pelo ponto isoelétrico e pelo peso molecular, transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau. B- Western blot realizado sobre a mesma membrana de nitrocelulose mostrada em A, com o soro anti-HVATKAPHHGCRSSA. Note a presença de duas bandas (setas) com pontos isoelétricos bastante próximos, sendo uma mais básica, com pI 6,9 e cerca de 60 kDa e a outra com pI 6,8 e 63-66 kDa. C- Controle negativo com soro normal de camundongo. Os anticorpos secundários usados são conjugados com fosfatase alcalina e revelação feita com NBT e BCIP.

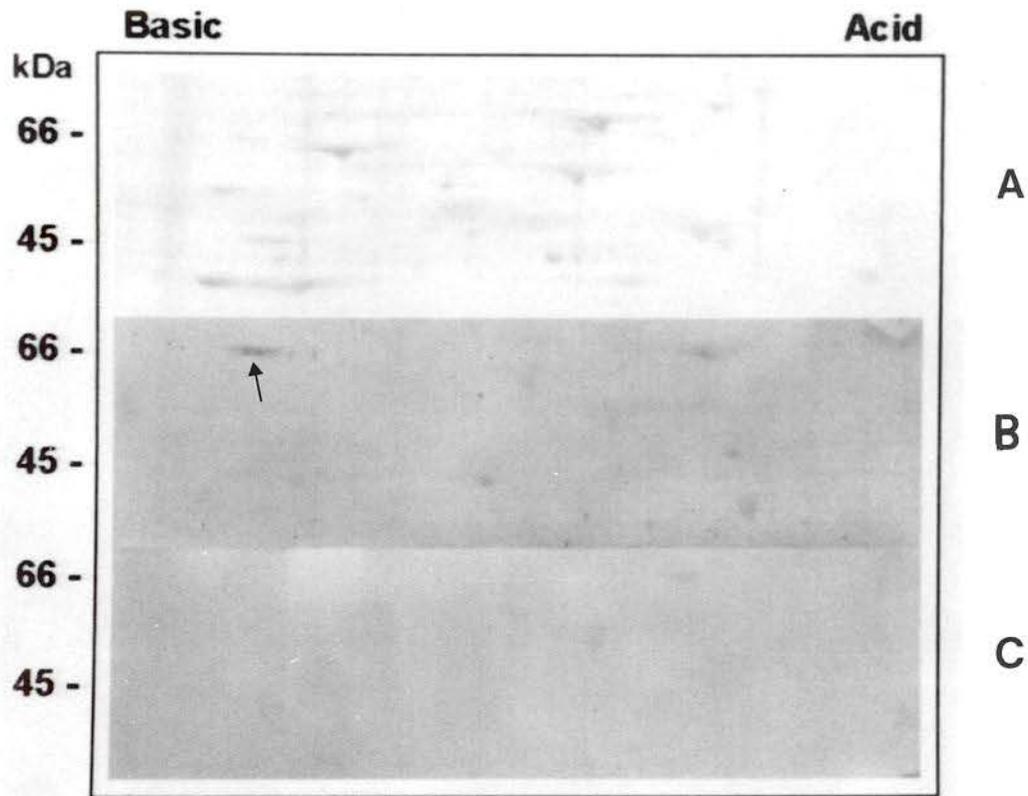


Figura 6- A- Proteínas da preparação de membrana plasmática separadas pelo ponto isoelétrico e pelo peso molecular, transferidas para nitrocelulose e coradas com Ponceau. B- Western blot realizado sobre a mesma membrana de nitrocelulose mostrada em A com o soro contra o peptídeo complementar, evidenciando uma banda (seta) com pI 6,8 e 63-66 kDa. C- Controle do experimento, no qual incubou-se membrana de nitrocelulose contendo as proteínas de membrana, separadas da mesma maneira, com soro normal de camundongo. Como no experimento anterior, os anticorpos secundários utilizados são conjugados com fosfatase alcalina e a reação revelada com NBT e BCIP.

III- Purificação parcial dos reagentes usando precipitações com sulfato de amônio

Visando a obtenção de extratos protéicos enriquecidos com a proteína de 60-66 kDa ou com PrPc, foram realizadas sucessivas precipitações do extrato total de cérebro de camundongo com sulfato de amônio, seguidas de separação das proteínas precipitadas através de SDS-PAGE e transferência para membranas de nitrocelulose.

A figura 7 mostra a presença da proteína de 60-66 kDa nas frações precipitadas a partir de 55% de sulfato de amônio. O PrPc precipitou em 30% de sulfato de amônio, numa fração contendo as proteínas menos solúveis (Fig. 8).

IV- Ensaio de ligação entre a proteína de 60-66 kDa com o PrPc

Tendo-se em mãos as proteínas parcialmente purificadas através de precipitações com sulfato de amônio, ou seja, o PrPc e a proteína de 60-66 kDa em frações separadas do extrato de cérebro de camundongos, partimos para a caracterização da ligação entre a proteína reconhecida pelo soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA e o PrPc. Como descrito anteriormente, incubaram-se membranas de nitrocelulose contendo as proteínas precipitadas em 30% de

sulfato de amônio (que contém o PrPc) com as proteínas precipitadas em 55% em solução (contendo a proteína de 60-66 kDa), seguida de incubação com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA. No experimento inverso, tiras de nitrocelulose com as proteínas precipitadas em 55% de sulfato de amônio foram incubadas com a fração de 30% em solução, sendo a seguir tratadas com o soro anti-prion R073.

Neste experimento, o soro contra o peptídeo complementar reconheceu bandas com peso molecular ao redor de 30 kDa nas membranas contendo a fração de 30% (que só tem o PrPc). Da mesma maneira, o soro anti-prion R073 reconheceu proteínas na altura de 63-66 kDa nas membranas com a fração de 55% (as quais continham a proteína de 60-66 kDa) (Fig. 9). É interessante observar que o PrPc se ligou preferencialmente à banda de 63-66 kDa, a qual está presente em maior quantidade nas preparações de membrana plasmática (ver Fig. 2).

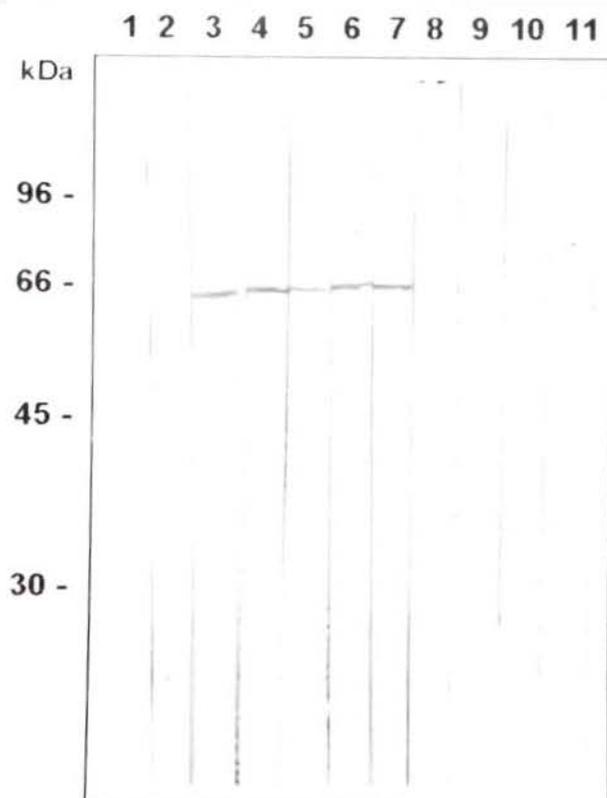


Figura 7- Western blots realizados sobre membranas de nitrocelulose contendo as proteínas precipitadas em várias concentrações de sulfato de amônio e seus respectivos sobrenadantes, separadas através de SDS-PAGE 10% em condições redutoras e incubadas com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA. Os anticorpos secundários usados são conjugados com fosfatase alcalina e a revelação feita com NBT e BCIP. As canaletas de 1 a 5 representam os "pellets" das precipitações com 45, 50, 55, 65, e 70% de sulfato de amônio. Note que a proteína reconhecida pelo soro contra o peptídeo complementar está presente a partir de 55% (canaleta 3). As reações realizadas sobre os sobrenadantes estão nas canaletas de 6 a 10, mostrando que a proteína de 60-66 kDa foi detectada somente nos sobrenadantes de 45 e 50%. Como controle positivo do experimento, a canaleta 11 mostra uma reação com o mesmo soro sobre as proteínas do extrato protéico total de cérebro de camundongos.

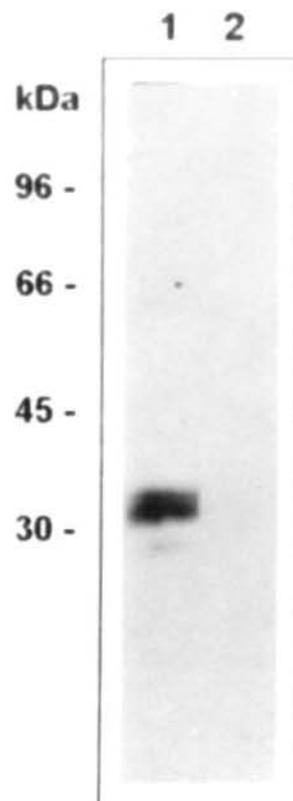


Figura 8- Os "pellets" obtidos nas precipitações do extrato protéico total de cérebros de camundongos com 30% de sulfato de amônio (canaleta 1) e com 55% (canaleta 2) foram separados em SDS-PAGE 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. A seguir as membranas foram incubadas com o soro anti-prion R073 e as reações reveladas através de quimioluminescência. Note a presença de bandas correspondentes ao PrPc na altura de 33-35 kDa.

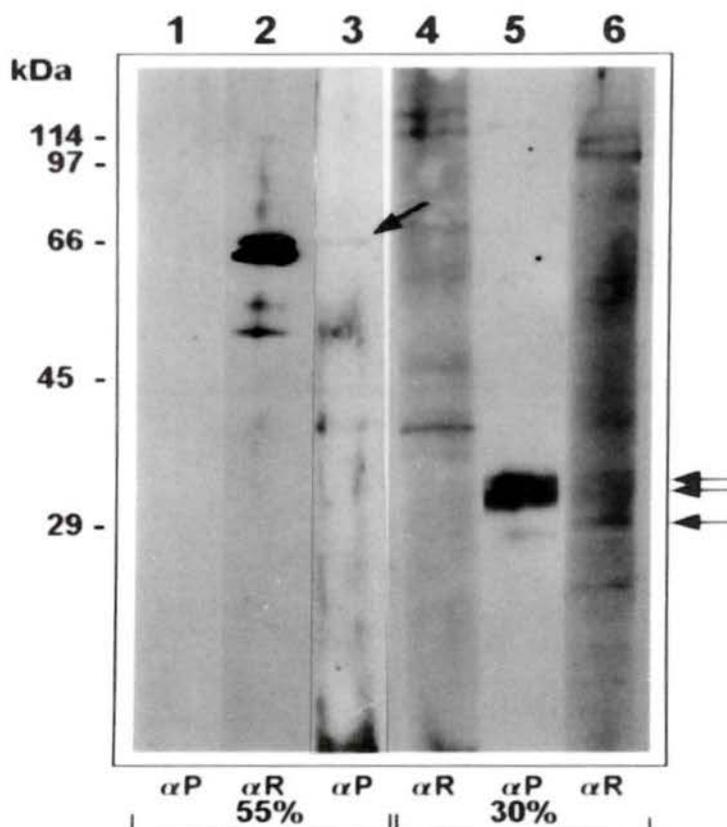


Figura 9- Ensaio de ligação entre a proteína de 60-66 kDa e o PrPc. 1 a 3- membranas de nitrocelulose contendo as proteínas precipitadas com 55% de sulfato de amônio tratadas com o soro anti-prion (1), com o soro contra a proteína de 60-66 kDa (2) e com o soro anti-prion após incubação com as proteínas precipitadas em 30% de sulfato de amônio em solução (3). As canaletas 4 a 5 representam tiras de nitrocelulose com as proteínas precipitadas em 30%, incubadas com o soro contra a proteína de 60-66 kDa (4), com o soro anti-prion (5) e com o soro anti-peptídeo após incubação com uma solução contendo as proteínas precipitadas com 55% de sulfato de amônio (6). Os anticorpos secundários usados neste experimento são conjugados com peroxidase e as reações reveladas através de quimioluminescência.

V- Detecção da proteína de 60-66 kDa em cultura primária de neurônios de camundongos e em cérebros de camundongos e ratos

Sobre os neurônios mesencefálicos de camundongo, em cultura primária, foram realizadas reações de imunofluorescência indireta, através de dupla marcação com fluoresceína ou rodamina. Foi observada intensa positividade nestes neurônios com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA (evidenciada com fluoresceína) (Fig. 10) e com o soro anti- β -tubulina III (revelada com rodamina). A detecção de β -tubulina III foi feita com o objetivo de confirmar a linhagem neuronal da cultura primária utilizada neste estudo.

As reações de imunofluorescência realizadas com o soro contra o peptídeo complementar, em cultura primária de neurônios de camundongo, e observadas através de microscopia confocal mostraram que a proteína de 60-66 kDa está presente na membrana plasmática destas células (Fig. 11). Confirmando as observações feitas nas imunofluorescências, as reações imunohistoquímicas realizadas em cortes histológicos de cérebro de camundongos e de ratos, usando o mesmo soro, mostraram alguns neurônios com um padrão de marcação típico de membrana celular (Fig. 12).

As reações imunohistoquímicas feitas com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA em cortes de cérebro de camundongos e ratos, mostraram que a distribuição da proteína de 60-66 kDa é similar

nestes animais (Fig. 13). Neurônios positivos foram encontrados em várias regiões do cérebro, sendo as reações mais intensas observadas no cerebelo e no hipocampo. No cerebelo, praticamente todas as células de Purkinje foram fortemente coradas, exibindo reação positiva tanto no pericário do neurônio como nos prolongamentos celulares. Algumas células de Purkinje positivas puderam ser observadas no interior da camada granulosa do cerebelo, a qual foi totalmente negativa em todos os cortes estudados (Fig. 14). As reações imunohistoquímicas nos neurônios hipocampais foram mais fracas e homogêneas do que as do cerebelo (Fig. 15). Algumas células gliais foram também positivas para a proteína de 60-66 kDa, assim como feixes nervosos que compõe o corpo caloso (Fig. 16).

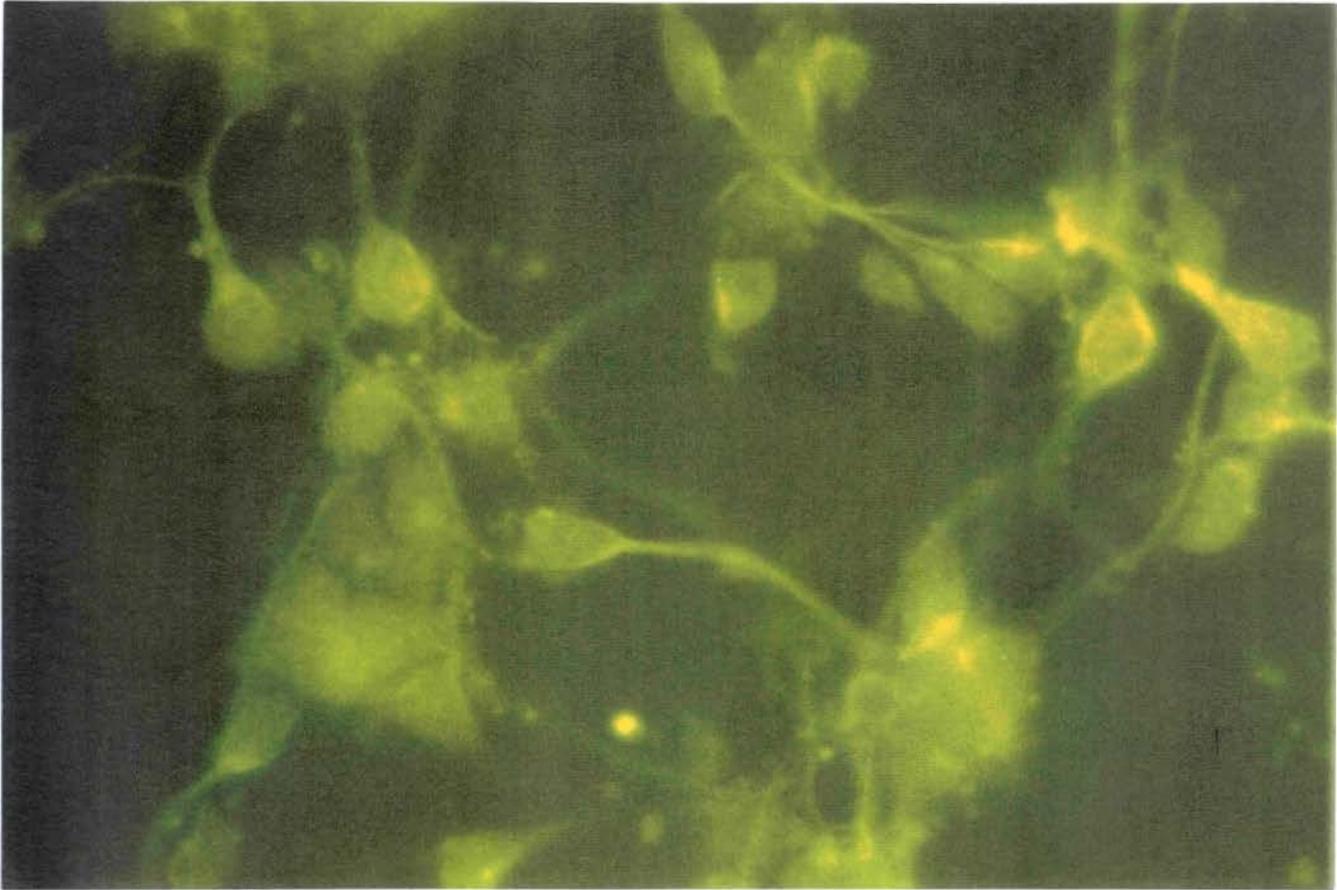
VI- Detecção de laminina no cérebro de camundongos e ratos

As reações imunohistoquímicas feitas com o soro anti-laminina mostraram forte marcação nos neurônios do hipocampo e nas células de Purkinje do cerebelo, coincidentes com as regiões positivas com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA. Em todos os cortes estudados, as reações imunohistoquímicas para evidenciação de laminina foram mais intensas e homogêneas do que aquelas para a evidenciação da proteína de 60-66 kDa, com positividade no pericário e alguns prolongamentos celulares (Fig. 17 e 18).

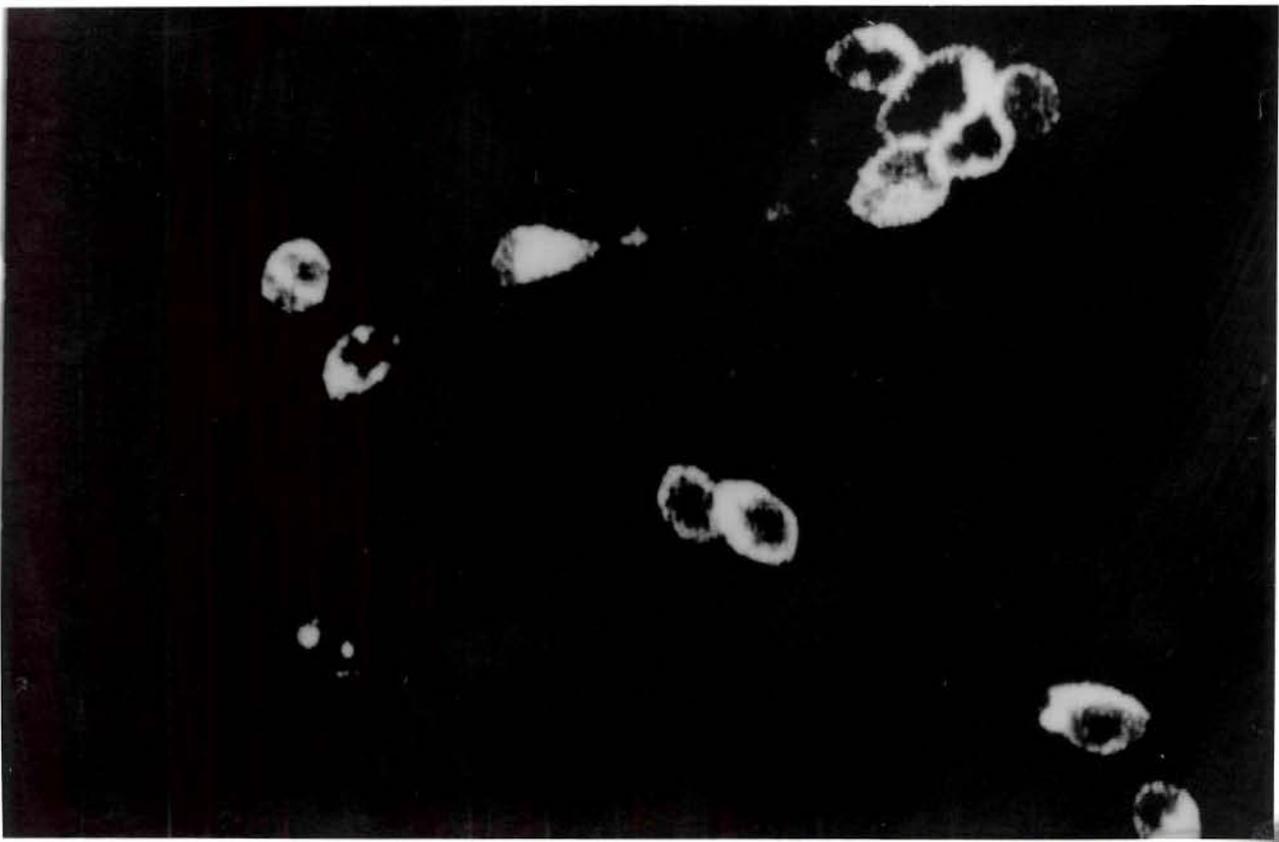
Laminina de vasos sangüíneos foi também muito bem evidenciada por esta técnica.

Figura 10- Imunofluorescência indireta realizada em cultura primária de neurônios de camundongo, mostrando a reatividade destas células com o soro contra o peptídeo teórico, revelada com fluoresceína. (X1000) (experimento realizado em colaboração com Dr. Vivaldo Moura-Neto e Dr. José Garcia-Abreu, Programa de Biofísica Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ).

Figura 11- Imunofluorescência realizada em cultura primária de neurônios de camundongos utilizando-se o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA e observada através de microscopia confocal, mostrando positividade na membrana plasmática (este experimento foi realizado em colaboração com Dr. Vivaldo Moura-Neto e Dr. José Garcia-Abreu, Programa de Biofísica Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ).



10



11

Figura 12- A - Reação imunohistoquímica para a detecção da proteína de 60-66 kDa em corte de cérebro de camundongo, mostrando neurônios do tálamo positividade na membrana celular e prolongamentos; B - controle negativo da reação, onde o anticorpo primário foi substituído por soro normal de camundongo (X1000).

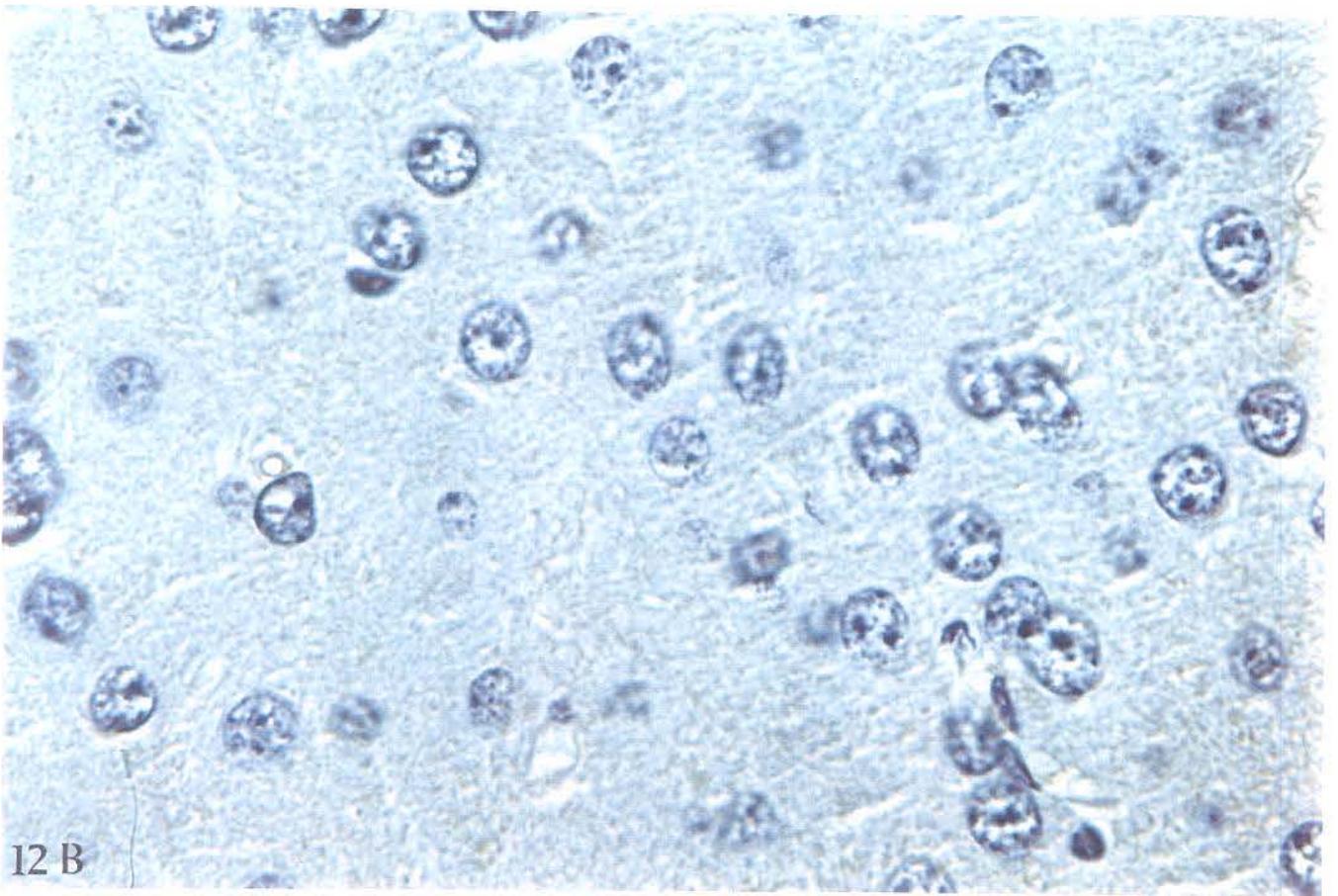
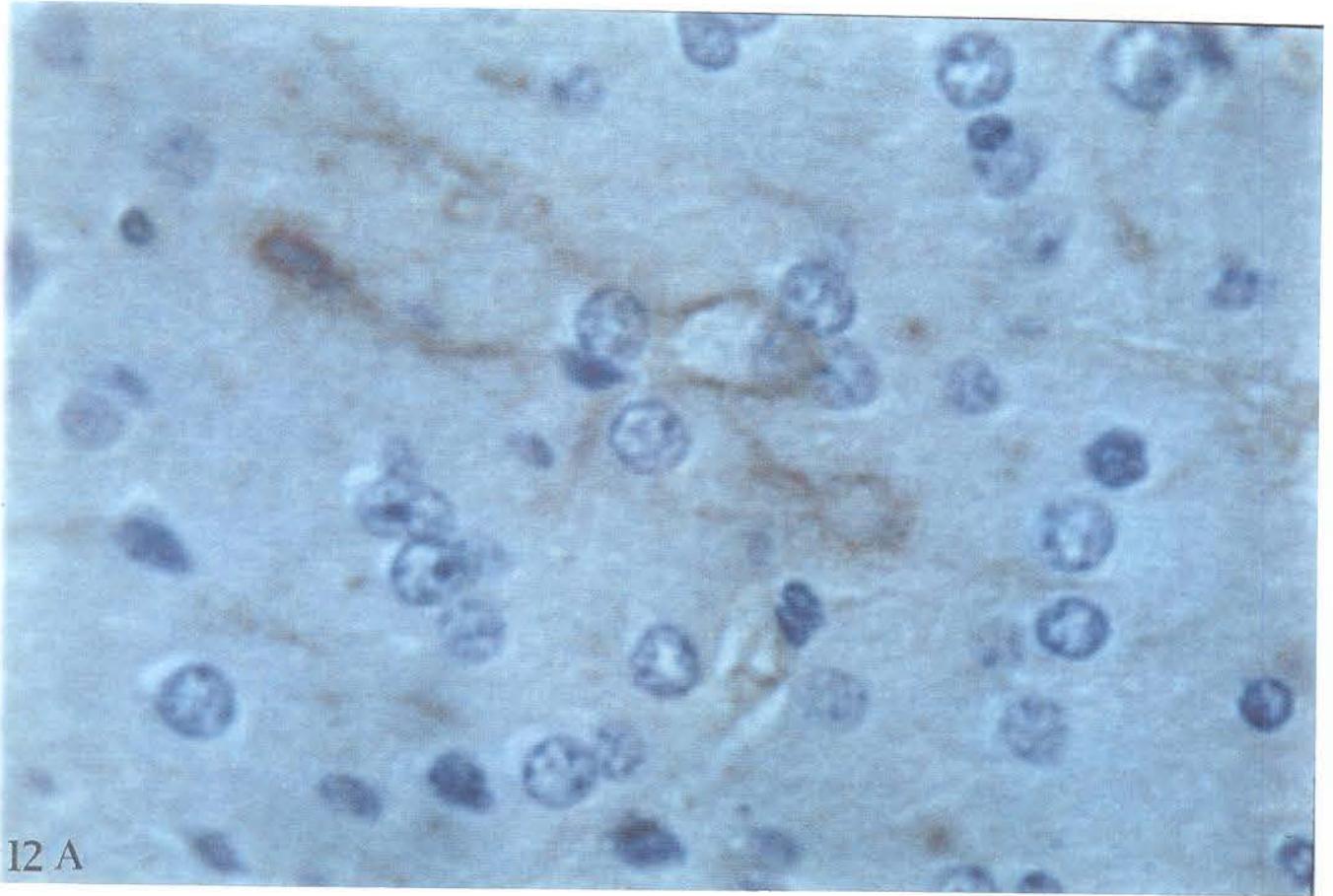


Figura 13- Distribuição esquemática da proteína reconhecida pelo soro produzido contra o peptídeo complementar em cortes coronais de cérebro de camundongos e ratos, realizada a partir das reações imunohistoquímicas.

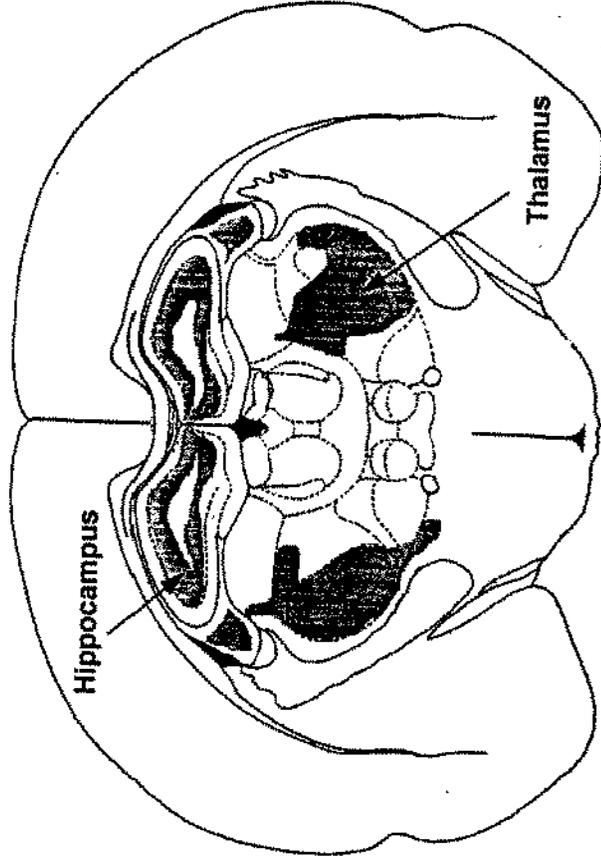
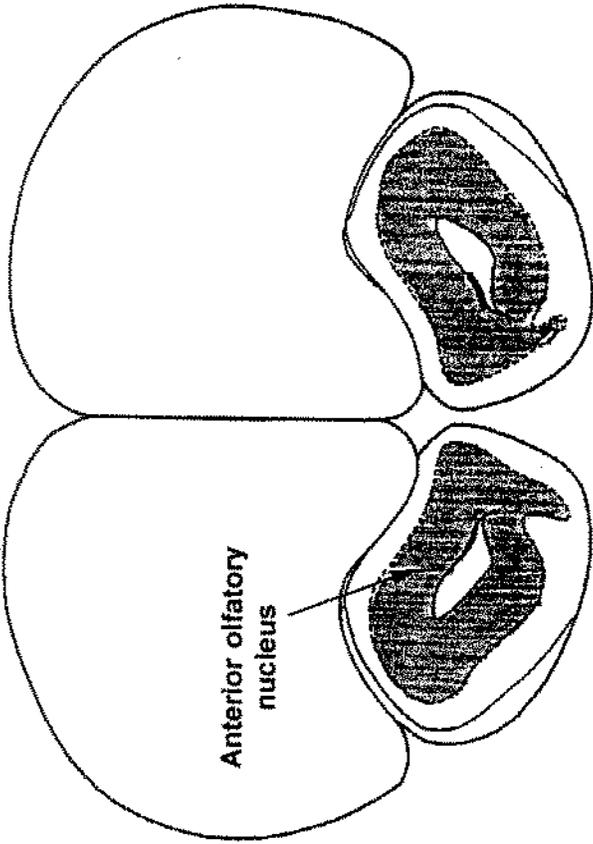
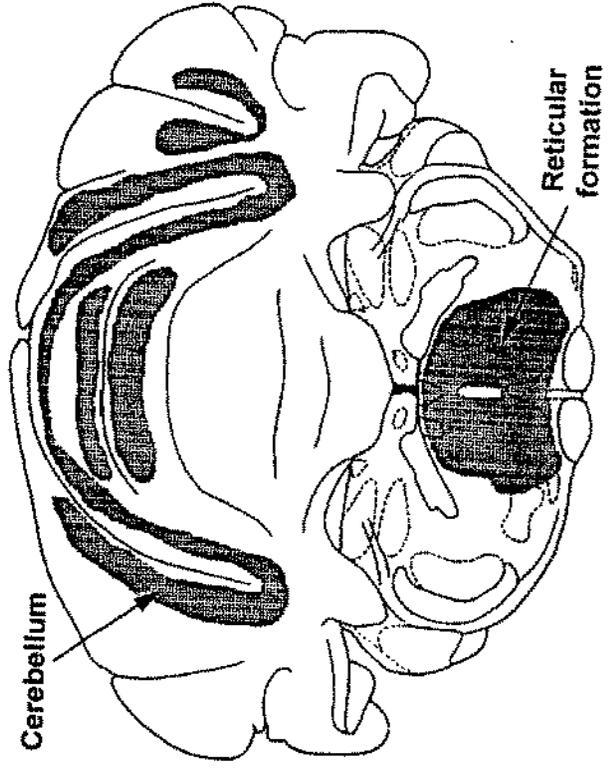
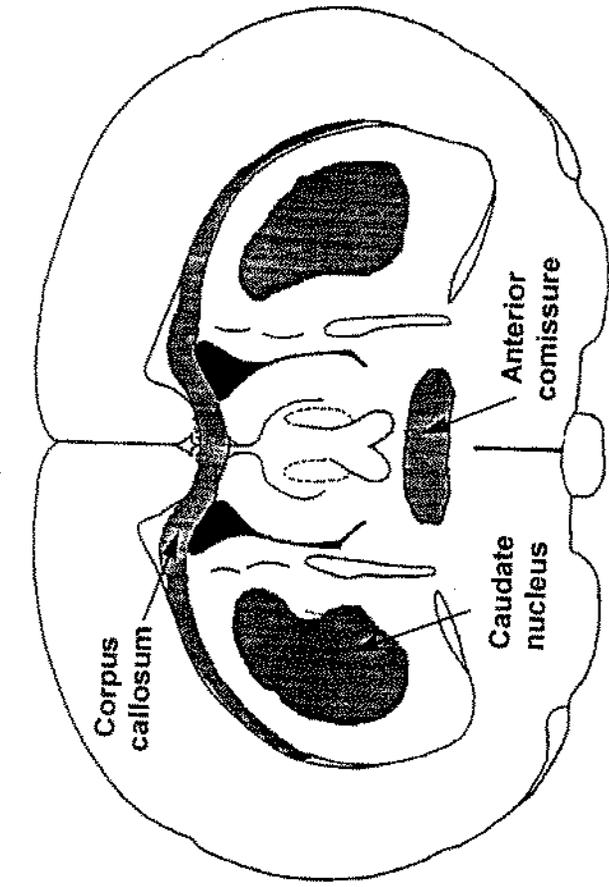
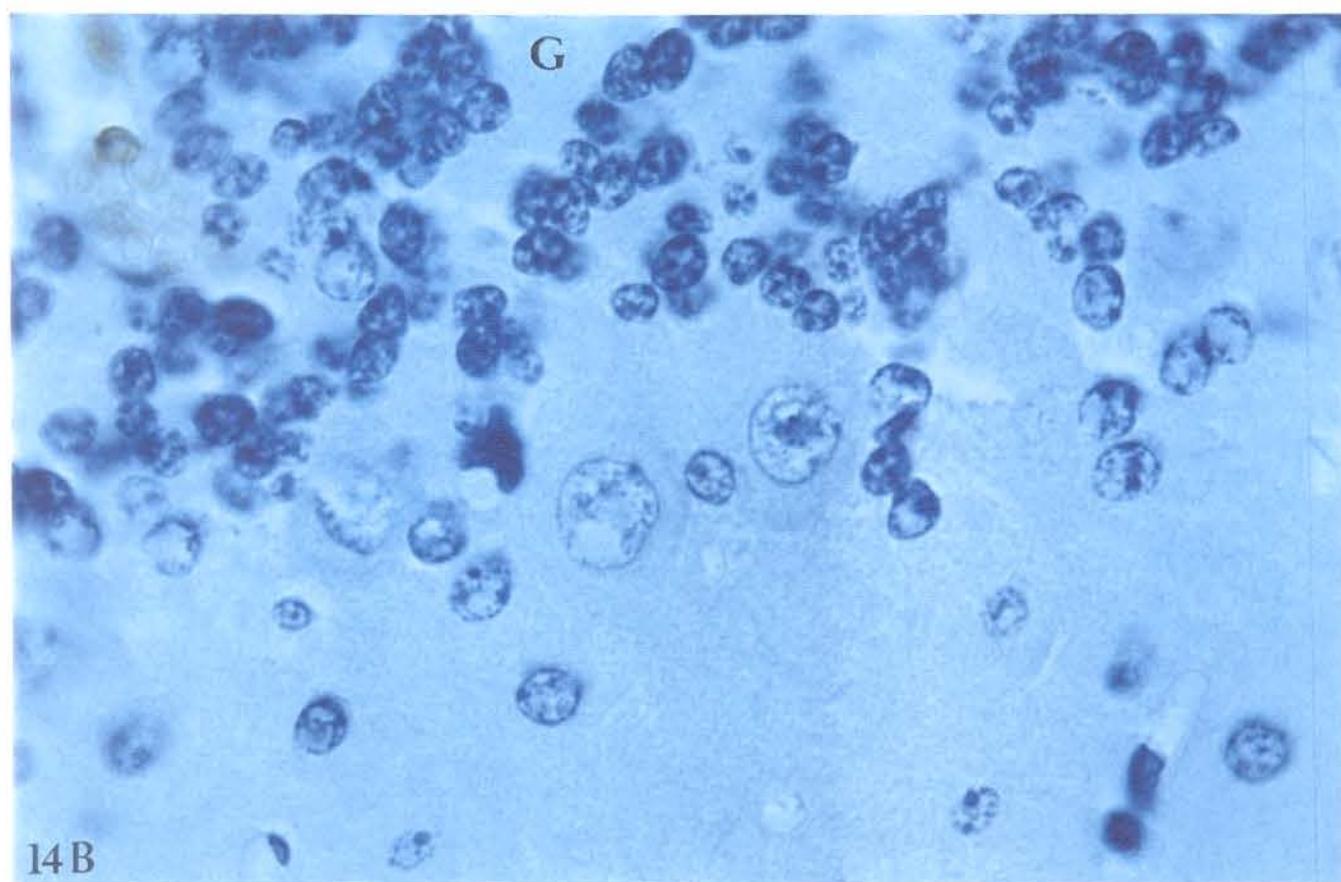
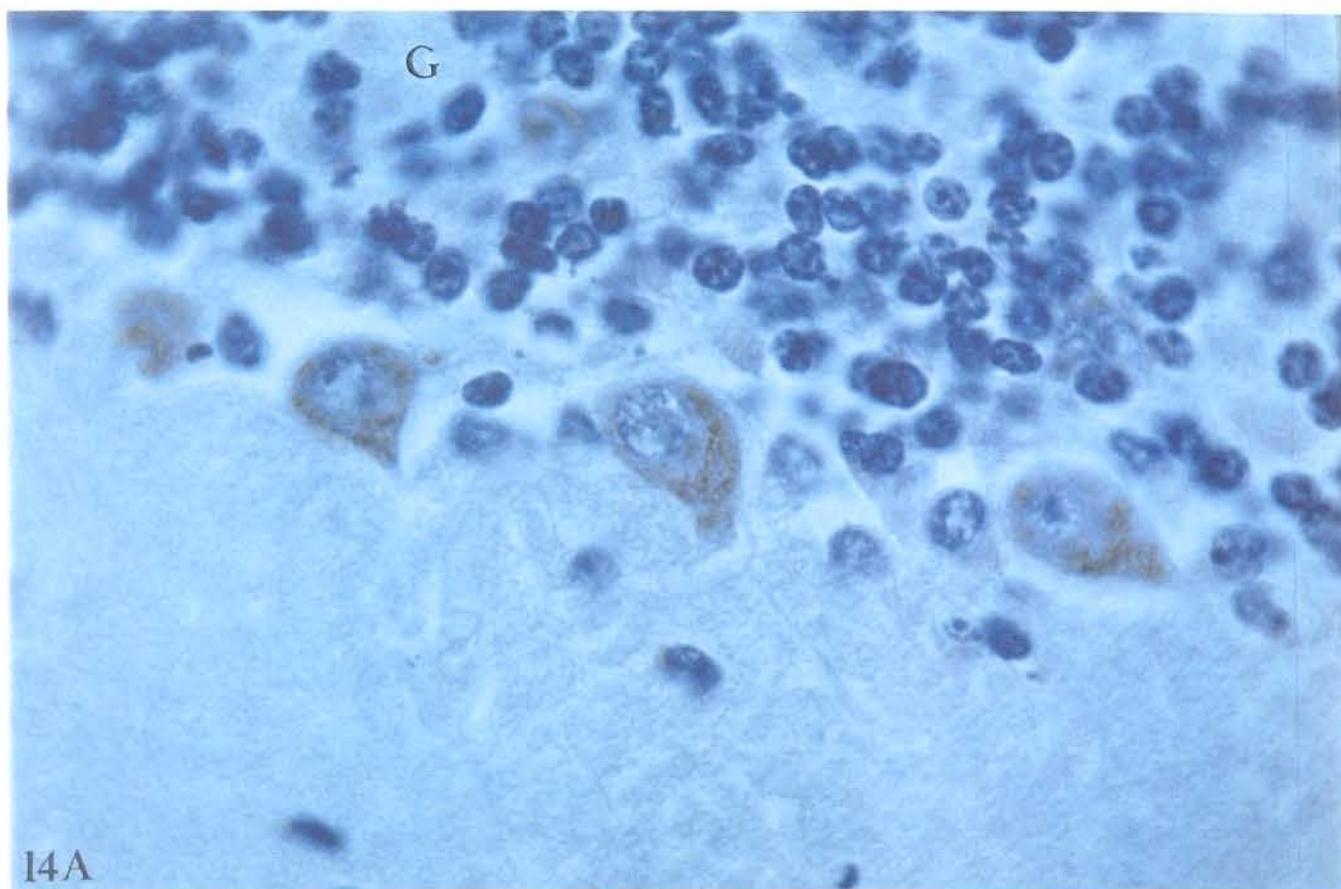


Figura 14- A - Reação imunohistoquímica para evidenciação da proteína de 60-66 kDa no cerebelo de rato. Note a intensa marcação positiva nas células de Purkinje, delimitando a camada granulosa do cerebelo (G). B - controle negativo da reação, onde o anticorpo primário foi substituído por soro normal de camundongo (X1000).



I4A

I4B

Figura 15- A - Evidenciação da proteína de 60-66 kDa em neurônios do hipocampo de rato; B - controle negativo da reação, com soro normal de camundongo (X1000).

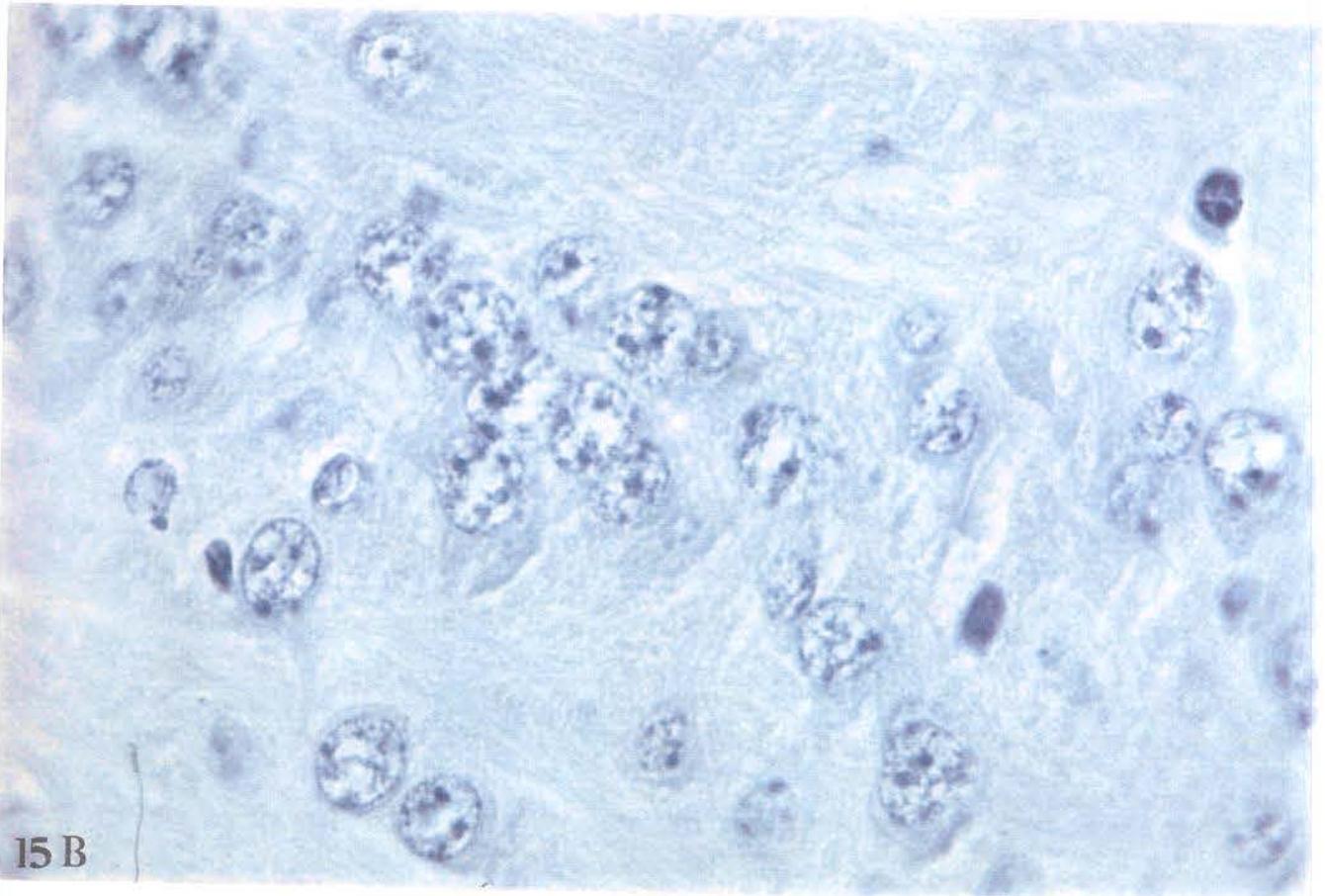
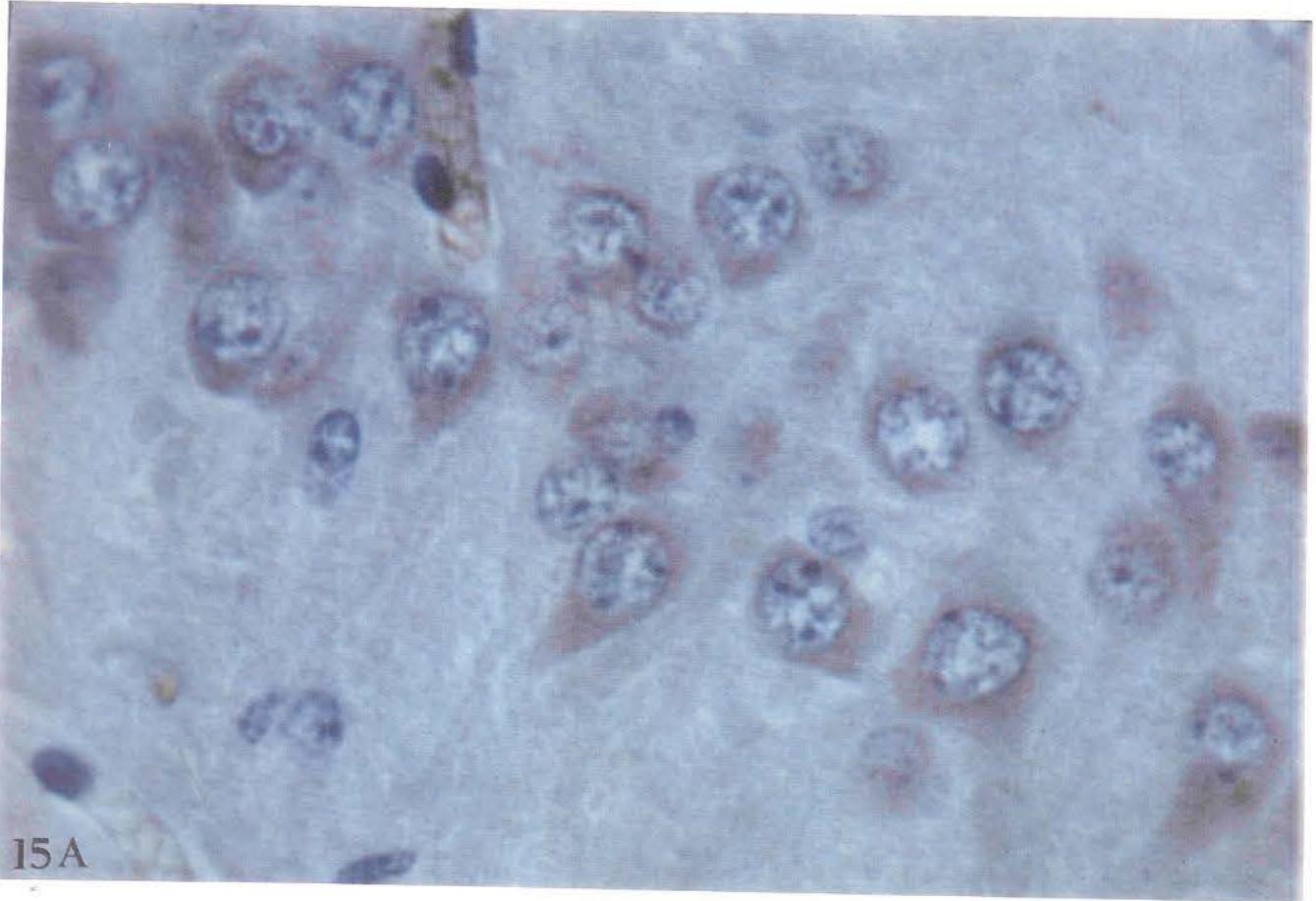
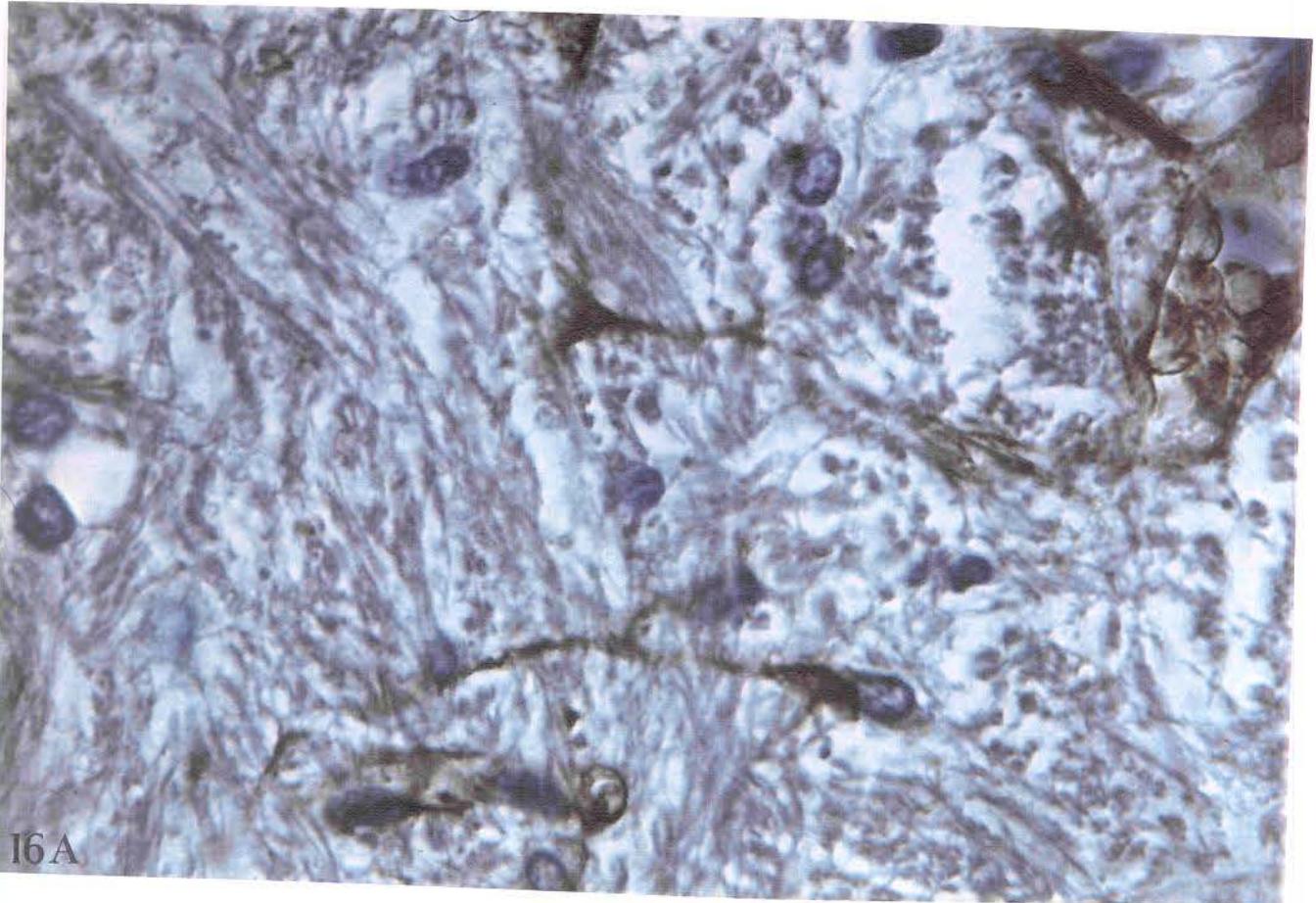
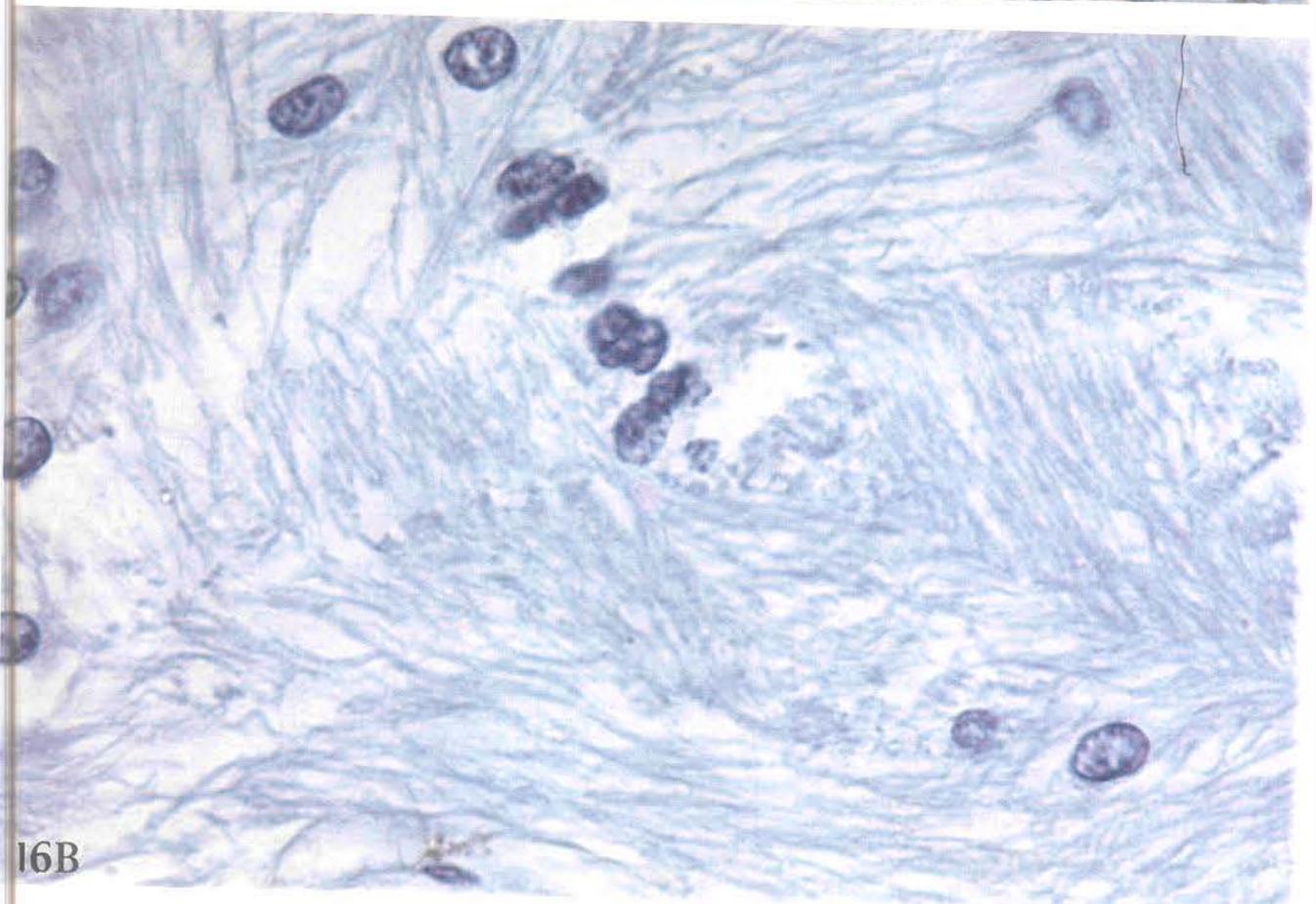


Figura 16- A - Reação imunohistoquímica para evidenciação da proteína de 60-66 kDa mostrando positividade em células gliais; B - controle negativo da reação, com soro normal de camundongo (X1000).

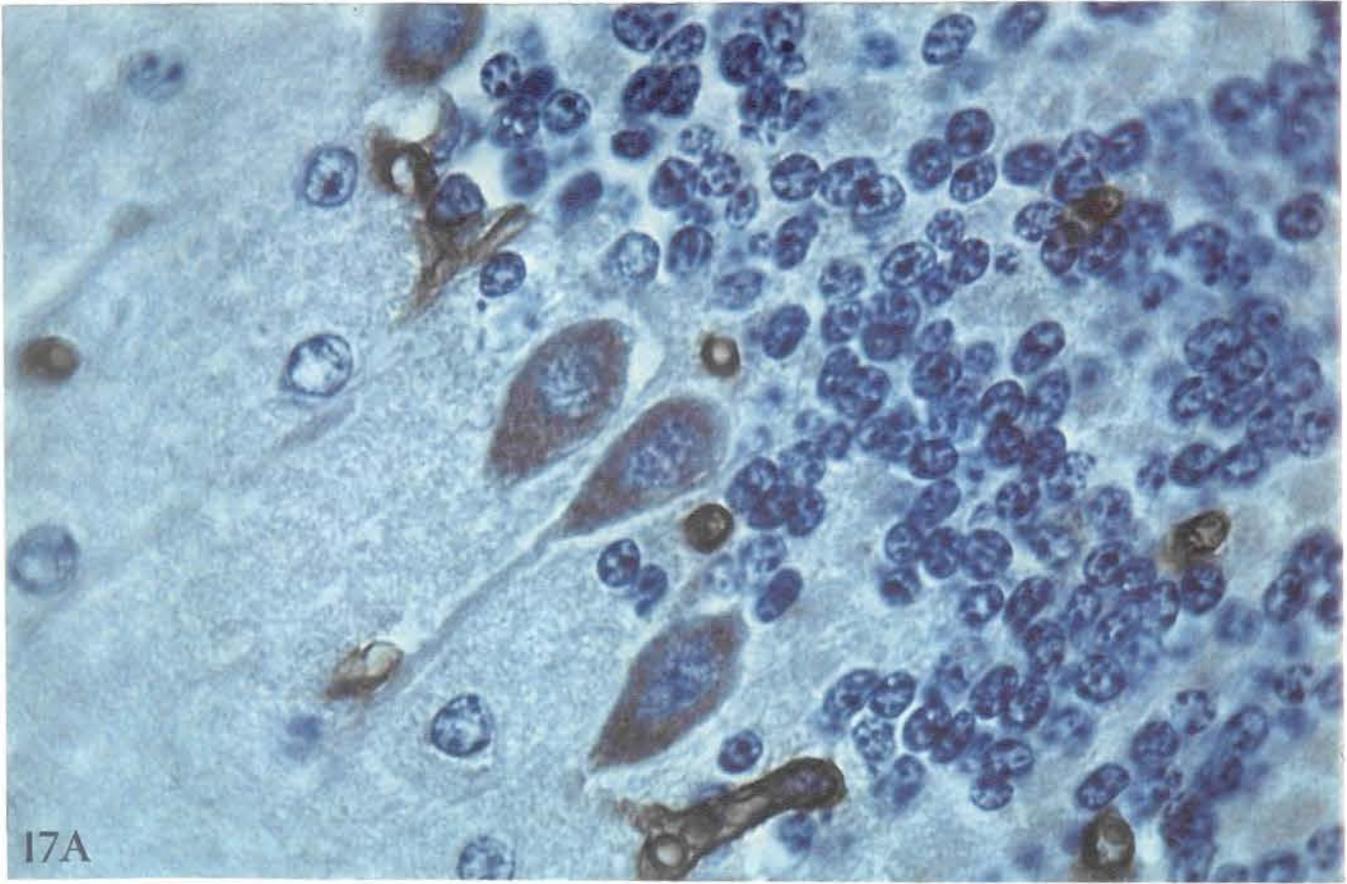


16A

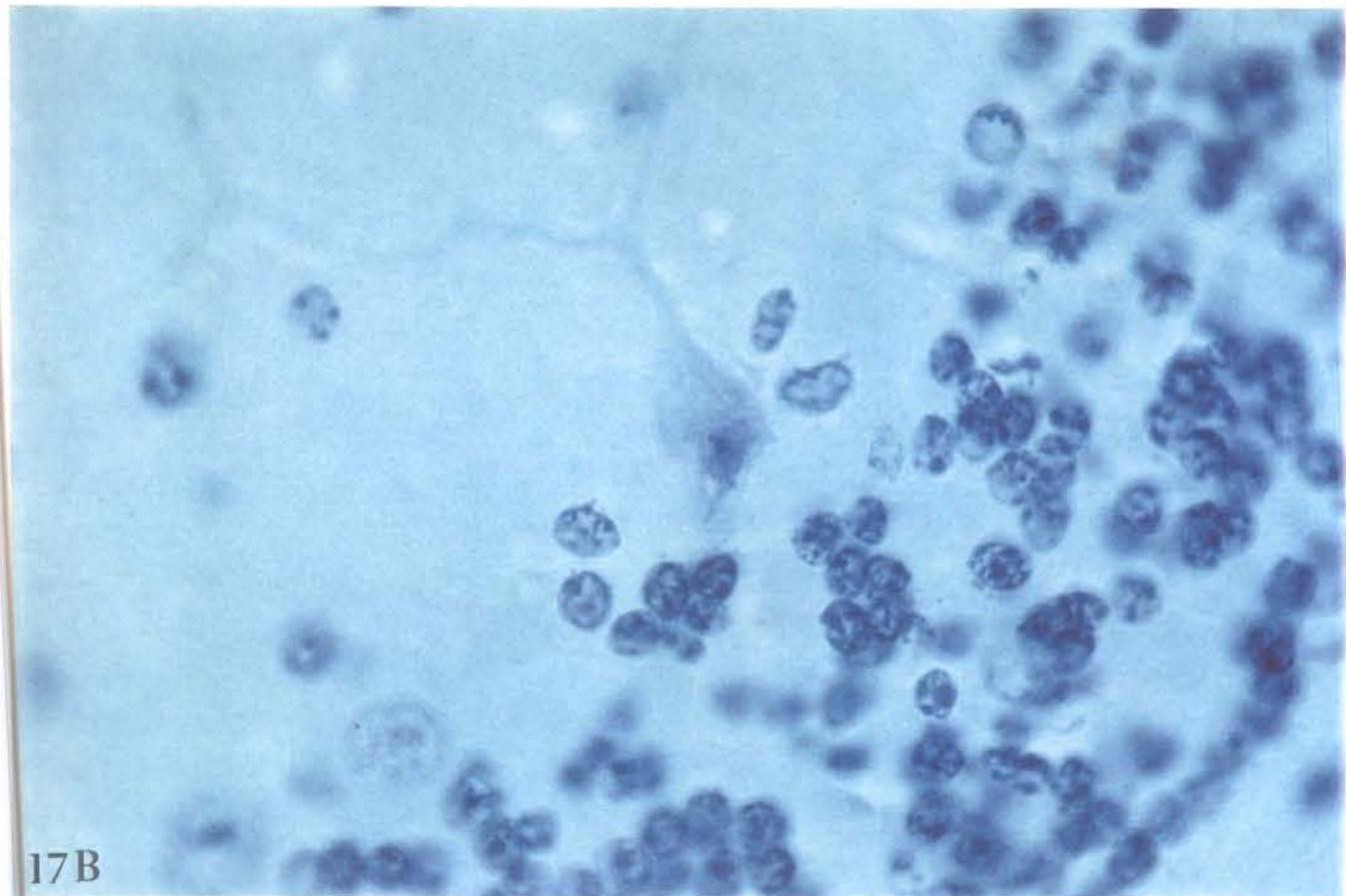


16B

Figura 17- A - Reação imunohistoquímica para detecção de laminina no cerebelo de rato, mostrando intensa positividade no pericário e prolongamentos das células de Purkinje e também em pequenos vasos sanguíneos; B - controle negativo da reação, com soro normal de coelho (X1000).

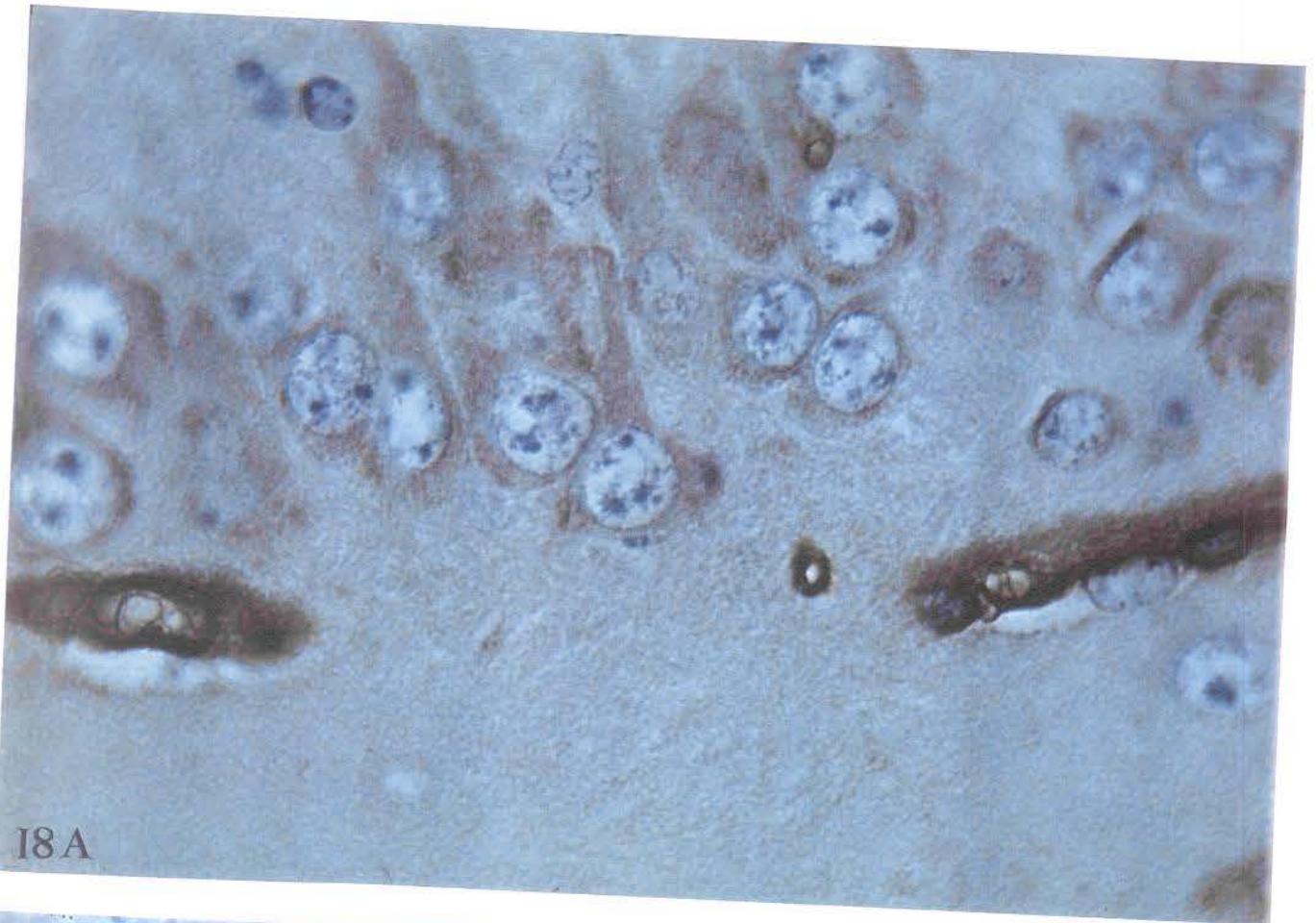


17A

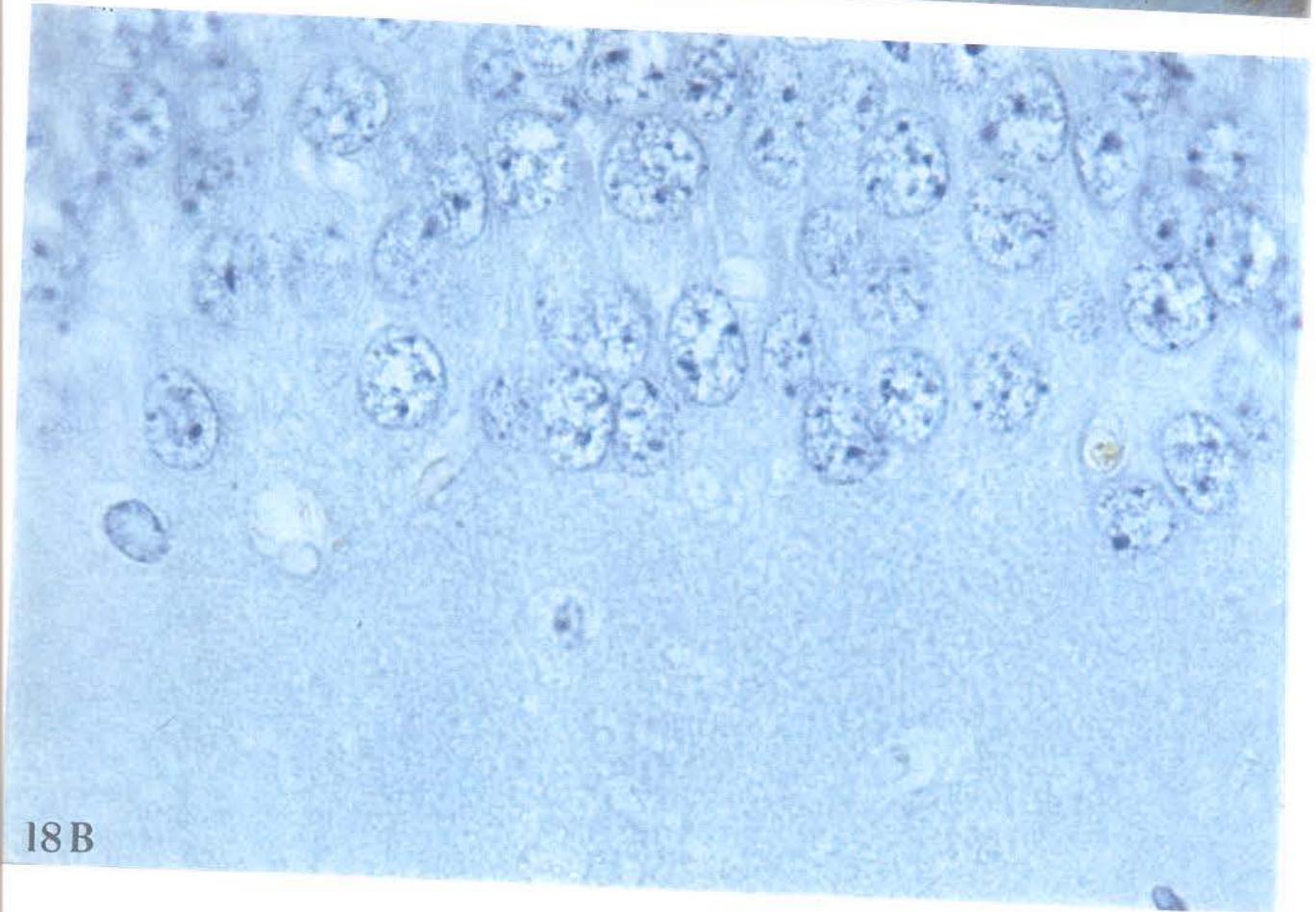


17B

Figura 18- A - Imunolocalização de laminina em neurônios do hipocampo de ratos e em vasos sanguíneos; B - controle negativo da reação com soro normal de coelho (X1000).



18A



18B

VII- Ensaio de ligação entre o PrPsc e laminina

A detecção de laminina e da proteína de 60-66 kDa nos neurônios hipocâmpais e nas células de Purkinje do cerebelo, através das reações imunohistoquímicas, nos levou a testar a possibilidade de interação entre laminina e PrPsc. Para isto laminina termicamente desnaturada e não desnaturada, purificada de EHS, foi adsorvida em membranas de nitrocelulose e incubada com o PrPsc marcado com I 125 e dissolvido em DLPCs. Os autoradiogramas mostraram que somente laminina não desnaturada foi capaz de se ligar ao PrPsc (Fig. 19).

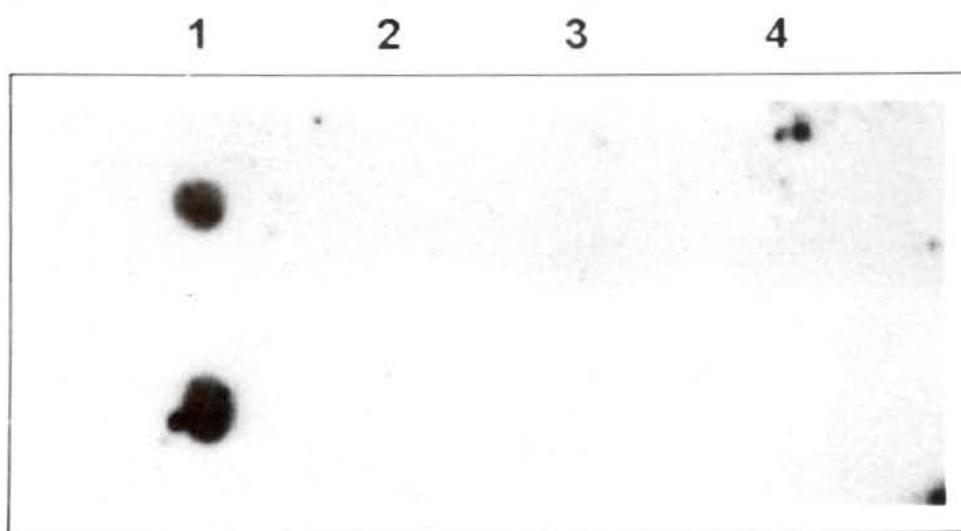


Figura 19- "Dot-blot" realizado com o PrPsc purificado marcado com iodo 125, evidenciando a ligação entre este e a proteína de membrana basal laminina. 1- laminina não desnaturada; 2- laminina termicamente desnaturada; 3- fibronectina; 4- BSA (o experimento foi feito em duplicata).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Caracterização da proteína de 60-66 kDa

A existência de uma fase aberta de leitura na fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrP e a detecção de seus transcritos em diversos tecidos (GOLDGABER, 1991; HEWINSON e cols., 1991), levou-nos à procura do seu produto protéico. A abordagem utilizada no presente trabalho foi inteiramente baseada na teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos, proposta por BLALOCK e SMITH (1984).

A participação da fita complementar de DNA na evolução das proteínas interagentes foi discutida na literatura por BRENTANI (1988). Um exemplo disto é a região rica em prolinas da molécula da colagenase de fibroblasto (onde está contida a seqüência SQNPVQP, sítio de ligação desta enzima ao colágeno tipo I) que pode ter se originado a partir da fita de DNA complementar aos genes que codificam as cadeias do colágeno (SOUZA e BRENTANI, em preparação). Segundo os autores, um exon do gene do colágeno pode ter sofrido duplicação e uma das cópias introduzidas no gene da colagenase de maneira invertida, ou seja, o que era "anti-sense" no gene que codifica uma cadeia do colágeno passou a ser "sense" no gene que codifica a colagenase. Um fenômeno semelhante pode ter ocorrido no gene do PrP, ou seja, através de "exon shuffling" (GILBERT, 1978; LONG e cols., 1995) a fase aberta de leitura

da fita "anti-sense" teria sido introduzida em outro gene, na fita "sense". Isto explicaria o fato da proteína por nós caracterizada apresentar 60-66 kDa ao invés de 33-35 kDa, pois as fases abertas de leitura das fitas "sense" e "anti-sense" do gene do PrP têm o mesmo tamanho. Em apoio a esta hipótese, os RNAs mensageiros correspondentes à fita de DNA "anti-sense" ao gene que codifica o prion também puderam ser detectados em camundongos que tiveram este gene deletado (PrP 0/0) (MOSER e OESCH, 1993).

De acordo com a teoria de BLALOCK e SMITH (1984), GOLDGABER (1991) demonstrou que o perfil de hidropaticidade dos amino ácidos codificados a partir da fita de DNA complementar ao gene que codifica o PrP é o inverso do perfil de hidropaticidade dos amino ácidos do PrP. Neste trabalho nós utilizamos um peptídeo teórico, deduzido a partir da seqüência nucleotídica complementar àquela que codifica o PrP humano, como ferramenta para a identificação de uma proteína receptora de PrP. Para isto consideramos os seguintes aspectos: 1) o peptídeo sintético correspondente aos resíduos 106-126 do PrP humano apresenta características similares ao PrPsc, sendo tóxico para neurônios em cultura e formando precipitados com aspecto amilóide (FORLONI e cols., 1993); 2) um peptídeo menor contendo os resíduos 106-114 do PrP humano não se comporta como o peptídeo 106-126 em cultura de neurônios, não sendo neurotóxico nem formando amilóide (FORLONI e cols., 1993); 3) através da construção de proteínas PrP mutantes foi demonstrado que a seqüência de amino ácidos 117-135 do PrP de galinha (correspondente aos

resíduos 105-122 do PrP humano) é essencial para o processo de endocitose (SHYNG e cols., 1995). Portanto, optamos pela síntese de um peptídeo contendo a seqüência deduzida a partir da fita de DNA complementar àquela que codifica os amino ácidos 114 a 129 do PrP humano. Uma vez que o peptídeo 114-129 é necessário para a endocitose do PrP (SHYNG e cols., 1995), acreditamos que o mesmo funcione como sítio de ligação do PrP à uma proteína receptora.

O perfil de hidropaticidade de uma seqüência de amino ácidos pode determinar a sua conformação (BRENTANI, 1990; SOUZA e cols., 1992). Desta maneira, peptídeos com perfis de hidropaticidade semelhantes podem apresentar uma conformação espacial semelhante, mesmo que a seqüência primária de amino ácidos seja diferente (BRENTANI, 1990). Portanto, os anticorpos produzidos através da imunização de camundongos Balb-c com o peptídeo sintético HVATKAPHHGPCRSSA (deduzido a partir da fita "anti-sense" àquela que codifica os resíduos 114-122 do PrP) deveriam ser capazes de reconhecer uma proteína que contenha, em sua estrutura, uma região com a conformação parecida à deste peptídeo. Esta região conformacionalmente parecida com o peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA seria o sítio de ligação desta proteína à seqüência 114-129 do PrP. De fato, estes anticorpos foram capazes de reconhecer uma proteína com peso molecular ao redor de 60 kDa, em extratos protéicos totais de cérebros de camundongos, de ratos e de células de neuroblastoma murino em cultura (N2a), e outra com 63-66 kDa nas preparações de membrana plasmática purificada a partir de cérebros de camundongo. É interessante

notar que a proteína de 63-66 kDa foi também detectada nos extratos protéicos totais, porém em menor quantidade que nas preparações de membrana plasmática. Estes achados sugerem a existência de duas isoformas da proteína reconhecida pelo soro produzido contra o peptídeo teórico, sendo uma forma citoplasmática e a outra de membrana. A presença desta proteína na membrana plasmática de células provenientes de cérebro de camundongo reforça a hipótese de que ela possa atuar como um receptor para moléculas de PrP.

As proteínas de superfície celular ligadas à membrana plasmática por meio de âncora de GPI, como o PrP (STAHL e cols., 1987), não apresentam um domínio intracitoplasmático, sendo incapazes de induzir a formação das vesículas encapadas de clatrina. Dentre elas, incluem-se antígenos de superfície dos linfócitos (como por exemplo o CD4), moléculas de adesão celular e receptores (CROSS, 1990). Estas proteínas não apresentam um domínio intracitoplasmático, sendo portanto incapazes de induzir a formação das vesículas encapadas de clatrina. Alguns autores têm associado a internalização das proteínas presas à membrana por âncora de GPI à invaginações de membrana plasmática denominadas de cavéolas (ANDERSON, 1993). No entanto, SHYNG e cols. (1994) demonstraram, através de imunomarcção em microscopia eletrônica de transmissão, em células N2a, que a internalização do PrPc ocorre através das vesículas encapadas de clatrina. Este fato sugere a necessidade de uma outra proteína no processo de endocitose, contendo um domínio intracitoplasmático capaz de induzir a formação destas vesículas. Receptores transmembrânicos, como

os para transferrina, LDL e manose-6-fosfatase, são endocitados através de vesículas encapadas de clatrina. A formação destas últimas é dependente de um domínio intracitoplasmático do receptor contendo resíduos de tirosina (TROWBRIDGE, 1991). Para checar a possível participação da proteína de 60-66 kDa na endocitose do PrP, uma alternativa interessante seria a realização de imunomarcação em microscopia eletrônica de transmissão, utilizando-se o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA. Com este procedimento, seria possível evidenciar a proteína de 60-66 kDa no interior das vesículas encapadas de clatrina. Se a hipótese de que a proteína de 60-66 kDa atua como um receptor de PrP for verdadeira, esta poderia participar da endocitose tanto do PrPc como do PrPsc, visto que ambos possuem a mesma seqüência primária de amino ácidos (TURK e cols., 1988), o que levaria à formação dos depósitos intracelulares de PrPsc e conseqüente morte neuronal.

As duas isoformas da proteína reconhecida pelo soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA nos cérebros de camundongos foram também observadas através da separação das proteínas pelos seus pontos isoelétricos. Estes experimentos mostraram que a forma citoplasmática tem pI 6,9, enquanto que a proteína de membrana plasmática pI 6,8. Poder-se-ia especular que as diferenças de peso molecular e de carga elétrica destas proteínas estejam refletindo diferentes padrões de glicosilação ou fosforilação. Uma diferença no estado de fosforilação poderia sugerir o envolvimento da proteína reconhecida pelo nosso soro na transdução de sinais do meio

extracelular para o meio intracelular, como ocorre com os receptores de superfície celular. No entanto, para elucidar esta questão é necessária uma caracterização bioquímica mais detalhada desta proteína.

Em nosso trabalho, a presença da proteína reconhecida pelos anticorpos produzidos contra o peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA na membrana celular foi confirmada através de ensaios de imunofluorescência indireta em culturas primárias de neurônios de camundongos, estudadas com o auxílio de microscópio confocal. Estes experimentos mostraram um padrão de marcação nitidamente de membrana plasmática. Da mesma maneira, neurônios com intensa positividade na membrana celular foram observados nas reações de imunoperoxidase, realizadas em cortes de cérebro de camundongos e ratos. É importante lembrar que, nestas reações imunohistoquímicas, grande parte dos neurônios positivos exibiu também marcação no pericário e nos prolongamentos celulares. Isto está de acordo com os nossos ensaios de Western blot, nos quais foi possível detectar a proteína de 60 kDa em extratos protéicos totais e preparações de proteínas citoplasmáticas, e a proteína de maior peso molecular (63-66 kDa) em preparações de membrana plasmática e, em menor quantidade, nos extratos protéicos totais. Estes dados apoiam a teoria de que a isoforma de 63-66 kDa funciona como um receptor para o PrP (MARTINS e cols., submetido).

Segundo SHYNG e cols. (1994), a internalização do PrP não é um processo exclusivo dos neurônios. Estes autores demonstraram que células gliais em cultura primária expressam

o PrP, internalizando-o também através das vesículas encapadas de clatrina. No presente trabalho nós pudemos observar algumas células gliais positivas, em reações imunohistoquímicas com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA, sugerindo que estas também expressam a proteína de 60-66 kDa.

Diversas proteínas com capacidade de ligação com PrPc e com o PrPsc já foram descritas (OESCH e cols., 1990). Apesar disto, nenhuma delas foi caracterizada como um receptor para o PrP. Dentre as proteínas ligantes de PrP, a única caracterizada até o momento é uma proteína de 45 kDa denominada GFAP (proteína acídica glial fibrilar), componente do citoesqueleto de astrócitos (OESCH e cols., 1990). Recentemente, GOMI e cols. (1995) observaram que camundongos que não expressam GFAP apresentam um desenvolvimento aparentemente normal, sem alterações no sistema nervoso central. Estes autores inocularam estes mesmos animais com PrPsc e detectaram alterações neurológicas semelhantes aos animais que expressam normalmente GFAP, demonstrando que esta proteína não participa da patogênese das doenças provocadas pelo PrP. A capacidade de ligação da proteína reconhecida pelo soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA ao PrPc foi demonstrada neste trabalho através do experimentos de ligação *in vitro*, os quais evidenciaram a interação entre a isoforma de 63-66 kDa com o PrPc. Vale a pena ressaltar que, apesar de nossos ensaios de ligação *in vitro* terem sido realizados com as proteínas do extrato protéico total de cérebros de camundongos, a ligação ocorreu com a isoforma de membrana, presente em pequena quantidade nestas preparações.

Todos os nossos experimentos de ligação *in vitro* com a proteína de 60-66 kDa foram realizados com o PrPc, presente nas frações do extrato de cérebro de camundongo precipitadas com 30% de sulfato de amônio, e não com o PrPsc. Entretanto, como a transformação do PrPc em PrPsc pode ocorrer na superfície celular (CAUGHEY e RAYMOND, 1991; BORCHELT, e cols., 1992) e grande parte dos depósitos de PrPsc ser encontrada no citoplasma (TARABOULOS e cols., 1990; MCKINLEY e cols., 1991,; LASZLO e cols., 1992), pode-se especular que o mesmo receptor seja utilizado para a entrada do PrPc e do PrPsc nas células. Os dados até o momento indicam que a transformação do PrPc em PrPsc ocorre devido à conversão de regiões do PrP ricas em alfa-hélices em estruturas beta-pregueadas (GASSET e cols., 1992; PAN e cols., 1993). Dentre as regiões da molécula do PrP envolvidas neste processo, inclui-se a seqüência a partir da qual deduzimos o nosso peptídeo teórico. Como salientado anteriormente, a seqüência de amino ácidos 105-122 do PrP humano parece ser essencial para a sua endocitose, sendo o nosso peptídeo teórico deduzido a partir da fita de DNA complementar àquela que codifica este peptídeo. Alterações conformacionais nesta região do PrP (provavelmente a seqüência reconhecida pelo receptor) poderiam dificultar ou até mesmo impedir a ligação entre o PrPsc e seu receptor. No entanto, como a conversão do PrPc em PrPsc envolve a formação de dímeros PrPc-PrPsc (PRUSINER, 1989), pode-se pensar na internalização destes dímeros via proteína de 60-66 kDa, logo após a sua formação na superfície neuronal. Isto daria início à transformação em

cadeia de outras moléculas de PrPc presentes no interior das vesículas de endocitose e à produção dos acúmulos intracelulares de PrPsc.

A favor deste ponto de vista, TELLING e cols. (1995) observaram que camundongos transgênicos que expressavam PrP humano eram resistentes à infecção por PrPsc humano extraído de pacientes portadores de CJD. No entanto, camundongos transgênicos que expressavam somente o PrP humano (que tiveram o gene que codifica o PrP de camundongo inativado) eram suscetíveis à infecção. Estes autores sugeriram que o PrPc destes camundongos estaria inibindo de alguma forma a transformação do PrPc humano em PrPsc, provavelmente através da ligação com uma terceira proteína, denominada por estes autores de proteína X. A competição entre o PrPc de camundongo e o PrPc humano por um receptor estaria dificultando a infecção pelo PrPsc humano.

A caracterização de um receptor de superfície neuronal para o prion pode vir a ser de grande importância para o diagnóstico das doenças priônicas e até mesmo para a prevenção dos acúmulos intra e extracelulares de amilóide. Por exemplo, diferenças na expressão do receptor durante o desenvolvimento da doença ou entre diferentes indivíduos podem permitir o diagnóstico precoce; peptídeos sintéticos ou outras substâncias podem atuar bloqueando os receptores, impedindo ou diminuindo a velocidade de internalização do PrPsc e conseqüentemente de formação das placas amilóides.

Distribuição da proteína de 60-66 kDa no cérebro de camundongos e ratos

Através de hibridização *in situ*, vários autores demonstraram quais regiões do cérebro de roedores expressam o PrPc. Dentre estas, destacam-se as células de Purkinje do cerebelo, os neurônios do hipocampo, neocortex, medula espinhal, gânglios periféricos e nervos, além de neurônios do epitélio olfatório e da retina (KRETZCHMAR e cols., 1986; MCKINLEY e cols., 1987). Em cérebros de galinhas, os RNAs mensageiros para o PrPc também foram detectados em várias partes do sistema nervoso central, a partir do sexto dia de vida intra-uterina, dentre as quais incluem-se o telencéfalo, hipocampo, tálamo, hipotálamo, células de Purkinje do cerebelo e medula espinhal. A distribuição dos RNAs mensageiros de PrP no sistema nervoso central de galinhas é semelhante à distribuição da proteína PrP. Reações imunohistoquímicas com um anticorpo monoclonal produzido contra os resíduos 213-224 do PrP mostraram intensa positividade em várias regiões do cérebro, principalmente nas células de Purkinje do cerebelo (HARRIS e cols., 1993).

No presente trabalho, nós demonstramos que a proteína de 60-66 kDa está distribuída de maneira similar nos cérebros de camundongos e ratos adultos normais, principalmente no cerebelo, hipocampo, tálamo, formação reticular, núcleo olfatório e corpo caloso. As reações imunohistoquímicas foram mais intensas nas células de Purkinje do cerebelo, as quais foram praticamente todas positivas, e nos neurônios

hipocampais. Um padrão de marcação típico de membrana celular foi observado em alguns neurônios do tálamo. Este padrão de distribuição da proteína de 60-66 kDa no cérebro coincide, pelo menos em parte, com as áreas do cérebro que expressam normalmente o PrPc (células de Purkinje do cerebelo, hipocampo e tálamo)

Nossas reações de imunoperoxidase para a detecção da proteína de 60-66 kDa mostraram que ela está presente em regiões do cérebro afetadas pelas doenças causadas por PrP em animais de laboratório e no homem. Camundongos transgênicos inoculados com diferentes amostras de PrPsc de hamsters mostraram um padrão diferente de distribuição dos acúmulos intracerebrais de PrPsc, de acordo com amostra inoculada (DeARMOND e cols., 1994). Por exemplo, quando os camundongos transgênicos foram infectados com uma amostra de PrPsc de hamster denominada Me7H houve a formação de depósitos amilóides no hipotálamo, enquanto que os animais infectados com as amostras Sc237 ou 139H mostraram acúmulos de PrPsc no tálamo, hipocampo e neocortex. Camundongos transgênicos que expressavam uma proteína PrP quimérica (PrP de camundongo com cinco substituições por resíduos do PrP de hamster, nos codons 108, 111, 138, 154 e 165) também foram facilmente infectados pelo PrPsc de hamster Sc237. Estes animais exibiram alterações espongiiformes e acúmulos de PrPsc no hipocampo, dentre outras áreas, mostrando a importância da seqüência primária de amino ácidos na especificidade entre espécies (SCOTT e cols., 1993). Nos pacientes portadores de GSS, as placas amilóides de PrP são encontradas

principalmente no cerebelo (onde ocorre severa destruição das células de Purkinje), no córtex cerebral, neocórtex e hipocampo, estando associadas à alterações espongiiformes, morte neuronal e astrocitose (GHETTI e cols., 1995). Em pacientes com kuru ou CJD as placas amilóides de PrP são detectadas quase que exclusivamente no córtex cerebelar, enquanto que nos casos de FFI ocorre destruição neuronal restrita ao tálamo (GAMBETTI e cols., 1995). KRETZSCHMAR e cols. (1991) observaram, através de imunohistoquímica, a deposição de PrPsc na camada granular do cerebelo de um paciente com CJD. No presente trabalho a proteína de 60-66 kDa não foi detectada nesta região do cerebelo.

Segundo HASHIMOTO e cols. (1992) as placas amilóides de PrP, presentes nas camadas molecular e granular do cerebelo de pacientes portadores de CJD, são compostas tanto de PrP 27-30 como de PrPsc. Estes autores conseguiram detectar os depósitos de PrP com anticorpos produzidos contra peptídeos sintéticos correspondentes às porções amino- ou carboxi-terminal do PrP. Vale a pena lembrar que os primeiros 67 amino ácidos da porção amino-terminal do PrPsc são perdidos após proteólise, transformando-o em PrP 27-30.

Os resultados do presente trabalho mostraram que a expressão da proteína de 60-66 kDa ocorre em estruturas do cérebro que expressam o PrPc e que podem estar envolvidas nas doenças provocadas por PrP (GRANER e cols., em preparação). Estes dados, juntamente com a observação de que a proteína de 60-66 kDa é capaz de se ligar à moléculas de PrPc em ensaios

in vitro, sugerem a participação desta na patogênese destas doenças.

Participação da laminina na formação das placas amilóides de PrP

Nas reações imunohistoquímicas para evidenciação de laminina em cortes histológicos de cérebro de camundongos e ratos pudemos observar intensa positividade nas células de Purkinje do cerebelo e nos neurônios do hipocampo, regiões do cérebro que também expressam a proteína de 60-66 kDa. Estes resultados estão de acordo com YAMAMOTO e cols. (1988) que, estudando a distribuição de laminina no cérebro de ratos, foram capazes de detectá-la nestas mesmas áreas. A expressão simultânea de laminina e da proteína de 60-66 kDa pelos neurônios do cerebelo e do hipocampo nos levou a especular a possível participação da laminina na formação e deposição do amilóide de PrP. Nossos experimentos de ligação *in vitro*, realizados com PrPsc purificado marcado com iodo 125, mostraram claramente que ocorre uma interação entre o PrPsc e a laminina.

Componentes de membrana basal, como proteoglicano heparan sulfato e laminina são detectados no tecido nervoso principalmente nas fases de desenvolvimento ou em áreas de injúrias (GIFTOCHRISTOS e cols., 1988; HERKEN e cols., 1990;). Está bem estabelecido que várias proteínas de matriz extracelular fazem parte da composição dos depósitos

amilóides encontrados na doença de Alzheimer, como proteoglicano heparan sulfato, laminina, colágeno tipo IV e fibronectina (HOWARD e PILKINGTON, 1990; PERLMUTTER e cols., 1991,). Nos depósitos amilóides das doenças causadas por PrP, além de PrPsc, já foi detectado proteoglicano heparan sulfato (SNOW e cols., 1989). NARINDRASORASAK e cols. (1992) demonstraram que a laminina é capaz de se ligar à membros da família APP ("β-amyloid precursor protein"), um grupo de proteínas transmembrânicas precursoras do amilóide da doença de Alzheimer, encontradas no cérebro e também em outros tecidos. Segundo estes autores, a laminina se liga com alta afinidade aos APPs 695, 751 e 770. KIBBEY e cols. (1993) demonstraram que a seqüência de amino ácidos IKVAV, presente no braço longo da cadeia A da molécula de laminina, é capaz de se ligar ao APP. O peptídeo IKVAV é capaz de estimular o crescimento de neuritos, induz a formação de metástases, estimula a síntese de colagenase e a ativação do plasminogênio, aumenta a vascularização tumoral e estimula a angiogênese *in vitro* (KIBBEY e cols., 1993).

Os resultados do presente trabalho mostraram a co-localização da proteína de 60-66 kDa e de laminina em neurônios do cerebelo e do hipocampo, regiões do cérebro afetadas durante as doenças causadas por PrP. A interação entre a laminina e o PrPsc também ficou evidente, sugerindo a participação desta proteína de matriz extracelular na formação e deposição das placas amilóides de PrP. Para verificar se esta interação ocorre *in vivo*, estamos iniciando um estudo imunohistoquímico em cortes de cérebro coletado de

pacientes que morreram de CJD, com objetivo de detectar laminina nos depósitos amilóides de PrP.

Concluindo, neste trabalho nós caracterizamos uma proteína de 60-66 kDa presente em células do sistema nervoso central de camundongos, ratos e também em células de neuroblastoma de camundongo em cultura, através da teoria da hidropaticidade complementar dos amino ácidos. Esta proteína está presente na membrana plasmática de neurônios e é capaz de se ligar especificamente ao PrPc em experimentos *in vitro*, sugerindo fortemente um papel de receptor para o PrP. Através das reações imunohistoquímicas, demonstramos que a proteína de 60-66 kDa é encontrada nas mesmas áreas do cérebro que expressam o PrP e que são afetadas durante as doenças provocadas por PrPsc, em animais de laboratório e no homem. Finalmente, foi demonstrada a capacidade de interação entre a glicoproteína de membrana basal laminina e o PrPsc, fato que aponta a participação desta na formação do amilóide de PrP.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- 1) Este trabalho identifica uma proteína de 60-66 kDa, reconhecida pelo soro produzido contra um peptídeo teórico deduzido a partir da fita de DNA complementar ao gene que codifica o prion, presente na superfície de neurônios e de células gliais e com capacidade de ligação ao PrPc *in vitro*, indicando um possível papel de receptor celular para o prion.

- 2) As reações imunohistoquímicas mostraram a proteína de 60-66 kDa principalmente no hipocampo, tálamo e cerebelo de camundongos e de ratos, regiões do cérebro freqüentemente afetadas pelas doenças causadas por prions no homem e em outros animais, sugerindo a sua participação na patogênese deste tipo de doença neurodegenerativa.

- 3) O PrPsc é capaz de se ligar à laminina, que está presente nas mesmas áreas do cérebro de camundongos e de ratos que expressam a proteína de 60-66 kDa, o que indica a sua participação na formação e deposição das placas de amilóide de prion.

SUMMARY

SUMMARY

Prions are slow infectious pathogens which cause transmissible neurodegenerative diseases in both humans (kuru, Creutzfeldt-Jacob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome and familial fatal insomnia) and animals (scrapie, bovine spongiform encephalopathy, transmissible mink encephalopathy and chronic wasting disease). The infectious prion protein (PrP^{Sc}) is an isoform of a cell membrane glycoprotein (PrP^C) with unknown function. PrP^{Sc} probably induces conformational changes in PrP^C resulting in intra and extracellular deposition of insoluble proteinaceous material. This material contains both protease resistant PrP (PrP 27-30) and PrP^{Sc}, shows amyloid properties (Congo red staining and birefringence under polarization microscopy) and induces vacuolar degeneration of the brain (PRUSINER, 1991).

In this work we demonstrated the existence of a 60-66 kDa neuron surface protein that binds prions *in vitro*, using the complementary hydrophathy concept (BLALOCK e SMITH, 1984). This protein was detected in mouse and rat brain, by immunoperoxidase technique, in the thalamus, hippocampus and Purkinje cells of the cerebellum, regions of the brain where PrP^{Sc} accumulates in prion diseases both infectious or inherited. This fact suggests a role for the 60-66 kDa protein in the pathogenesis of prion diseases. The same regions of the brain were strongly positive for the basement membrane glycoprotein laminin. In addition, we demonstrated that purified PrP^{Sc} binds to nondenaturated laminin in ligand blot assays.

Our results suggest that the 60-66 kDa cell surface protein can play a role in the prion internalization and that laminin possibly mediates the PrP amyloid formation and deposition.

Key words: neurodegenerative diseases, neuroreceptors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMAN, J.P.; BOND, C.T.; DOUGLASS, J. e HERBERT, E. Two mammalian genes transcribed from opposite strands of the same DNA locus. *Science* 235: 1514-1517, 1987.
- ALFF-STEINBERG, C. Codon usage in homo-sapiens: evidence for a coding pattern on the non-coding strand and evolutionary implication of dinucleotide discrimination. *J. Theor. Biol.* 124: 85-95, 1984.
- ANDERSON, R.G.W. Plasmalemmal caveolae and GPI anchored membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 647-652, 1993.
- ARMSTRONG, B.C. e KRYSTAL, G.W. Isolation and characterization of complementary DNA for N-cym, a gene encoded by DNA strand opposite to N-myc. *Cell Growth Differ.* 3:385-390, 1992.
- ARVAN, P.; CAMERON, R.S. e CASTLE, J.D. Secretory membranes of the rat parotid gland: preparation and comparative characterization. *Meth. Enzimol.* 98: 75-87, 1983.
- BARANYI, L.; CAMPBELL, W.; OHSHIMA, K.; FUJIMOTO, S.; BOROS, M. e OKADA, H. The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nature Medicine* 1: 894-901, 1995.
- BARRY, R.A. e PRUSINER, S.B. Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. *J. Infect. Dis.* 154:518-521, 1986.
- BASLER, K.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. e WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428, 1986.
- BIRO, J. Comparative analysis of specificity in protein-protein interactions. *Medical Hypotheses*, 7: 969, 1981.
- BLALOCK, J. e SMITH, E.M. Hydropathic anti-complementarity of aminoacids based on the genetic code. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 203-207, 1984.
- BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P. e PRUSINER, S.B. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry*, 23: 5898-5906, 1984.

- BORCHELT, D.R.; SCOTT, M.; TARABOULOS, A.; STAHL, N. e PRUSINER, S.B. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 110: 743-752, 1990.
- BORCHELT, D.R.; TARABOULOS, A. e PRUSINER, S.B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 6188-6199, 1992.
- BOST, K.L.; SMITH, E.M. e BLALOCK, J.E. Similarity between the corticotrophin (ACTH) receptor and a peptide encoded by an RNA that is complementary to ACTH mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1372-1375, 1985.
- BRENTANI, R.R. Biological implications of the complementary hydropathy of amino acids. *J. theor. Biol.* 135: 495-499, 1988.
- BRENTANI, R.R. Complementary peptides and the evolution of interacting polypeptides. *J. Mol. Evol.* 3: 239-243, 1990.
- BRENTANI, R.R.; RIBEIRO, S.F.; POTOENJACK, P.; PASQUALINI, R.; LOPES, J.D. e NAKAIE, C. Characterization of the cellular receptor of fibronectin through a hydrophobic complementary approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 364-367, 1988.
- BROWN, P. The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Rev. Neurol.* 148: 317-327, 1992.
- BROWN, P., GIBBS, C.J.Jr.; RODGERS-JOHNSON, P.; ASHER, D.M.; SULIMA, M.P.; BACOTE, A.; GOLDFARB, L.G. e GAJDUSEK, D.C. Human spongiform encephalopathy: The National Institute of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* 35: 513-529, 1994.
- BUELER, H.; FISHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DEARMOND, S.J.; AGUET, M. e WEISSMANN, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582, 1992.
- BURLEY, S.K. e PETSKO, G.A. Weak interactions in proteins. In: Anfinsen, C.B.; Edsall, J.T.; Richards, F.M.; Gisenberg, D.S. eds. *Advances in protein chemistry* 39: 125-189, 1988.
- CARR, D.J.J.; BOST, K.L. e BLALOCK, J.E. An antibody to a peptide specified by an RNA that is complementary to γ -endorphin mRNA recognizes an opiate receptor. *J. Neuroimmunol.* 12: 329-337, 1986.

- CAUGHEY, B. e RAYMOND, G.J. The scrapie associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266: 18217-18223, 1991.
- CAUGHEY, B.; RACE, R.E.; ERNST, D.; BUCHMEIER, M.J. e CHESEBRO, B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.* 63: 175-181, 1989.
- CHESEBRO, B.; RACE, R.; WEHRLY, K.; NISHIO, J.; BLOOM, M.; LECHNER, D.; BERGSTROM, S.; ROBBINS, K.; MAYER, C.; KEITH, J.M.; GARON, C. e HAASE, A. Identification of scrapie prion protein-specific RNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315: 331-333, 1985.
- COLLINGE, J.; WHITTINGTON, M.A.; SIDLE, K.C.L.; SMITH, C.J.; PALMER, M.S.; CLARKE, A.R. e JEFFREYS, J.G.R. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297, 1994.
- CROSS, G.A.M. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 1-39, 1990.
- DEARMOND, S.J.; MOBLEY, W.C.; DEMOTT, D.C.; BARRY, R.A.; BECKSTEAD, J.H. e PRUSINER, S.B. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 37: 1271-1280, 1987.
- DEARMOND, S.J.; YANG, S-L.; CAYETANO-CANLAS, J.; GROTH, D. e PRUSINER, S.B. The neuropathological phenotype in transgenic mice expressing different prion protein constructs. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 343: 415-423, 1994.
- DIENER, T.O. PrP and the nature of the scrapie agent. *Cell* 49: 719-721, 1987.
- DUFFY, P.; WOLF, J.; COLLINS, G.; DEVOE, A.; STREETEN, B. e COWEN, D. Possible person to person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 290: 692-693, 1974.
- ELTON, T.S.; DION, L.D.; BOST, K.L., OPARIL, S. e BLALOCK, J.E. Purification of an angiotensin II binding protein by using antibodies to a peptide encoded by angiotensin II complementary RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2518-2522, 1988.

- ENGVALL, E.; DAVIS, G.E.; DICKERSON, K.; RUOSLAHTI, E.; VARON, S. e MANTHORPE, M. Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: localization of the neurite-promoting site. *J. Cell Biol.* 103: 2457-2465, 1986.
- FORLONI, G.; ANGERETTI, N.; CHIESA, R.; MANZANI, E.; SALMONA, M.; BUGIANI, O. e TAGLIAVINI, F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-546, 1993.
- GABIZON, R.; MCKINLEY, M.P. e PRUSINER, S.B. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4017-4021, 1987.
- GABIZON, R.; MCKINLEY, M.P.; GROTH, D.F. e PRUSINER, S.B. Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6617-6621, 1988.
- GABIZON, R.; MCKINLEY, M.P.; GROTH, D.F.; KENAGA, L. e PRUSINER, S.B. Properties of scrapie prion liposomes. *J. Biol. Chem.* 263: 4950-4955, 1988.
- GAJDUSEK, D.C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197: 943-960, 1977.
- GAJDUSEK, D.C. e ZIGAS, V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N. Eng. J. Med.* 257: 974-978, 1957.
- GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.JR. e ALPERS, M. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209: 794-796, 1966.
- GAMBETTI, P.; PARCHI, P.; PETERSEN, R.B.; CHEN, S.G. e LUGARESI, E. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: Clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol.* 5: 43-51, 1995.
- GASSET, M.; BALDWIN, M.A.; LOYD, D.H.; GABRIEL, J-M.; HOLTZMAN, D.M.; COHEN, F.; FLETTERICK, R. e PRUSINER, S.B. Predicted α -helical regions of the prion protein when synthesized as peptide form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10940-10944, 1992.
- GHETTI, B.; DLOUHY, S.R.; GIACONE, G.; BUGIANI, O.; FRANGIONE, B.; FORLONE, M.R. e TAGLIAVINI, F. Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol.* 5: 61-75, 1995.

- GIBBS, C.J.JR.; GAJDUSEK, D.C.; ASHER, D.M.; ALPERS, M.P.; BECK, E.; DANIEL, P.M. e MATHEWS, W.B. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform-encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161: 388-389, 1968.
- GIFTOCHRISTOS, N. e DAVID, S. Laminin and heparan sulphate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting. *J. Neurocytol.* 17: 385-397, 1988.
- GILBERT, W. Why gene in pieces? *Nature* 271: 501-503, 1978
- GOLDGABER, D. Scientific correspondence. *Nature* 351: 106, 1991.
- GOLDMANN, W.; HUNTER, N. e FOSTER J.D. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2476-2480, 1990.
- GOMI, H.; YOKOYAMA, T.; FUJIMOTO, K.; IKEDA, T.; KATOH, A.; ITOH, T. e ITOHARA, S. Mice devoid the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron.* 14: 29-41, 1995.
- GORCS, T.J.; GOTSSCHALL, P.E.; COY, D.H. e ARIMURA, A. Possible recognition of the GnRH receptor by an antiserum against a peptide encoded by nucleotide sequence complementary to mRNA of a GnRH precursor peptide. *Peptides* 7: 1137-1145, 1986.
- HARRIS, D.A.; FALLS, D.L.; JOHNSON, F.A.L. e FISCHBACH, G.D. A prion like protein from chicken brain copurifies with a acetylcholine receptor inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7664-7668, 1991
- HARRIS, D.A.; LELE, P. e SNIDER, W.D. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4309-4313, 1993.
- HASHIMOTO, K.; MANNEN, T. e NUKINA, N. Immunohistochemical study of kuru plaques using antibodies against synthetic prion protein peptides. *Acta Neuropathol.* 83: 613-617, 1992.
- HERKEN, R.; GOTZ, W. e THIES, M. Appearance of laminin, heparan sulphate proteoglycan and collagen type IV during initial stages of vascularisation of neuroepithelium of the mouse embryo. *J. Anat.* 169: 189-195, 1990.
- HEWINSON, R.G.; LOWINGS, J.P.; DAWSON, M.D. e WOODWARD, M.J. Scientific correspondence. *Nature* 352: 291, 1991.

- HOWARD, J. e PILKINGTON, G.J. Antibodies to fibronectin bind to plaques and other structures in Alzheimer's disease and control brain. *Neurosci. Lett.* 118: 71-76, 1990.
- HSIAO, K.K.; GROTH, D.; SCOTT, M.; YANG, S-L.; SERBAN, H.; RAPP, D.; FOSTER, D.; TORCHIA, M.; DEARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9126-9130, 1994.
- JEFFREY, M.; HALLIDAY, W.G. e GOODSIR, C.M. A morphometric and immunohistochemical study of the vestibular nuclear complex in bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 84: 651-657, 1992.
- KIBBEY, M.C.; JUCKER, M.; WEEKS, B.S.; NEVE, R.C.; VAN NOSTRAND, W.E. e KLEINMAN, H.K. β -amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10150-10153, 1993.
- KITAMOTO, T.; AMANO, N.; TERAO, Y.; NAKAZATO, Y.; ISSHIKI, T.; MIZUTANI, T. e TATEISHI J. A new inherited prion disease (PrP-Pl05L mutation) showing spastic paraparesis. *Ann. Neurol.* 34:808-813, 1993.
- KITAMOTO, T.; OGOMORI, K.; TATEISHI, J. e PRUSINER, S.B. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* 57: 230-236, 1987.
- KLATZO, I.; GAJDUSEK, D.C. e ZIGAS, V. Pathology of kuru. *Lab. Invest.* 8: 799-847, 1959.
- KLEINMAN, H.K.; WEEKS, B.S.; CANNON, F.B.; SWEENEY, T.M.; SEPHEL, G.C.; CLEMENT, B.; ZAIN, M.; OLSON, M.O.J. e JUCKER, M. Identification of a 110 kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 320-325, 1991.
- KNUTSON, V.P. Insulin binding peptide. *J. Biol. Chem.* 263: 14146-14151, 1988.
- KRETZSCHMAR, H.A.; KITAMOTO, T.; DOERR-SCHOTT, T.; MEHRAEIN, P. e TATEISHI, J. Diffuse deposition of immunohistochemically labelled prion protein in the granular layer of the cerebellum in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 82: 536-540, 1991.

- KRETZSCHMAR, H.A.; STOWRING, L.E.; WESTAWAY, D.; STUBBLEBINE, W.H.; PRUSINER, S.B. e DEARMOND, S.J. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5:315-324, 1986.
- KYTE, J. e DOOLITE, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- LANTOS, P.L.; MCGILL, I.S.; JANOTA, I.; DOEY, L.J.; COLLINGE, J.; BRUCE, M.T.; WHATLEY, S.A.; ANDERTON, B.H.; CLINTON, J.; ROBERTS, G.W. e ROSSOR, M.N. Prion protein immunocytochemistry helps to establish the true incidence of prion diseases. *Neurosci. Lett.* 147: 67-71, 1992.
- LASZLO, L.; LOWE, J.; SELF, T.; KENWARD, N.; LANDON, M.; McBRIDE, T.; FARQUHAR, C.; McCONNELL, I.; BROWN, J.; HOPE, J. e MAYER, J. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.* 166: 333-341, 1992.
- LIAO, Y.C.; TOKES, Z.; LIM, E.; LACKEY, A.; WOO, C.H.; BUTTON, J.D. e CLAWSON, G.A. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. *Lab. Invest.* 57: 370-374, 1987.
- LINE, S.R.P.; SABBAGA, J.; VEIGA, S.S.; POTOČNJAK, P. e BRENTANI, R.R. Identification and characterization of highly conserved antigenic determinants in the laminin molecule. *Braz. J. med. biol. Res.* 23: 841-855, 1990.
- LOCHT, C.; CHESEBRO, B.; RACE, R. e KEITH, J.M. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6372-6376, 1986.
- LONG, M.; SOUZA, S.J. e GILBERT, W. Evolution of the intron-exon structure of eukariotic genes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 774-778, 1995.
- LU, F.X.; AIYAR, N. e CHAIKEN, I. Affinity capture of (Arg8) vasopressin-receptor complex using immobilized antisense peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3642-3646, 1991.
- LUGARESI, E.; MEDORI, R.; MONTAGNA, P.; BARUZZI, A.; CORTELLI, P.; LUGARESI, A.; TINUPER, P.; ZUCCONI, M. e GAMBETTI, P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New Eng. J. Med.* 315: 997-1003, 1986.

- MANETTO, V.; MEDORI, R.; CORTELLI, P.; MONTAGNA, P.; BARUZZI, A.; HAUW, J.; RANCRUEL, G.; VANDERHAEGHEN, J.J.; MAILLEUX, P.; BUGIANI, O.; TAGLIAVINI, F.; BOURAS, C.; RIZZUTO, N.; LUGARESI, E. e GAMBETTI, P. Fatal familial insomnia: clinical and pathological study of five new cases. *Neurology* 42: 312-319, 1992.
- MANSON, J.; WEST, J.D.; THOMSON, V.; McBRIDE, P.; KAUFMAN, M.H. e HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115: 117-122, 1992.
- MANUELIDIS, E.; GORGACZ, E.J. e MANUELIDIS, L. Interspecies transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to Syrian hamsters with reference to clinical syndromes and strains of agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3422-3436, 1978.
- MANUELIDIS, E.; KIM, J.; ANGELO, J. e MANUELIDIS, L. Serial propagation of Creutzfeldt-Jakob disease in guinea-pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 223-227, 1975.
- MARSCH, R.F. e HANSON, R.P. Transmissible mink encephalopathy infectivity of corneal epithelium. *Science* 87: 656, 1975.
- MARTINS, V.R.; SOUZA, S.J.; GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; GARCIA-ABREU, J.; MOURA-NETO, V. e BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion receptor. Submetido.
- MASTERS, C.L. e RICHARDSON, E.P.JR. Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. *Brain* 101: 333-344, 1978.
- MASTERS, C.L.; GAJDUSEK, D.L. e GIBBS, C.J.JR. The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. *Brain* 104: 535-558, 1981.
- MATHEWS, J.D.; GLASSE, R. e LINDENBAUM, S. Kuru and cannibalism. *Lancet*: 449-452, 1968.
- McKINLEY, M.P.; BRAUNFELD, M.B.; BELLINGER, C.G. e PRUSINER, S.B. Molecular characterization of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J. Infect. Dis.* 154: 110-120, 1986.
- McKINLEY, M.P.; HAY, B.; LINGAPPA, V.R.; LIEBEBURG, I. e PRUSINER, S.B. Developmental expression of prion protein gene in brain. *Dev. Biol.* 121: 105-110, 1987.

- McKINLEY, M.P.; MEYER, R.; KENAGA, L.; RAHBAR, F.; COTTER, R.; SERBAN, A. e PRUSINER, S.B. Scrapie prion rod formation *in vitro* requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J. Virol.* 65: 1440-1449, 1991.
- McKINLEY, M.P.; TARABOULOS, A.; KENAGA, L.; SERBAN, D.; STIEBER, A.; DEARMOND, A.; PRUSINER, S.B. e GONATAS, N. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.* 65: 622-630, 1991.
- MEYER, N.; ROSENBAUM, V.; SCHMIDT, B.; GILLES, K.; MIRENDA, C.; GROTH, D.; PRUSINER, S.B. e RIESNER, D. Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 72: 37-49, 1990.
- MOBLEY, W.C.; NEVE, R.L.; PRUSINER, S.B. e McKINLEY, M.P. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9811-9815, 1988.
- MOSER, M. e OESCH, B. An anti-prion protein? *Nature* 362: 213-214, 1993.
- NARINDRASORASAK, S.; LOWERY, D.E.; ALTMAN, R.A.; GONZALES-DE-WHITT, P.A.; GREENBERG, B.D. e KISILEVSKY, R. Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.* 67: 643-652, 1992.
- NEMETHY, G. e SCHERAGA, H.A. The structure of water and hydrophobic bonding in proteins III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 1773-1789, 1967.
- OESCH, B. Characterization of PrP binding proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 343: 443-445, 1994.
- OESCH, B.; TEPLow, D.B.; STAHL, N.; SERBAN, D.; HOOD, L.E. e PRUSINER, S.B. Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 29: 5848-5855, 1990.
- OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; McKINLEY, M.P.; KENT, S.B.H.; AEBERSOLD, R.; BARRY, R.A.; TEMPST, P.; TEPLow, D.B.; HOOD, L.E.; PRUSINER, S.B. e WEISSMANN, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.

- OHNO, S. Universal rule for coding sequence construction: TA/CG deficiency-TG/CT excess. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 9630-9634, 1988.
- PAN, K-M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R.J. e COHEN, F.E. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966, 1993.
- PASQUALINI, R.; CHARMONE, D.F. e BRENTANI, R.R. Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein IIb-IIIa complex through a hydrophobic complementary approach. *J. Biol. Chem.* 264: 14566-14570, 1989.
- PATTISON, I.H. Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In: Gajdusek, D.C.; Gibbs, C.J.Jr. e Alpers, M.P. eds. *Slow, latent and temperate virus infections*, NINDB Monograph 2. Washington D.C.: U.S. Government Printing: 249-257, 1965.
- PERLMUTTER, L.S.; BARRON, E.; SAPERIA, D. E CHUI, H.C. Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 30: 673-681, 1991.
- POLAND, D. e SCHERAGA, H.A. In: Fasman, G. ed. *Polyaminoacids*. New York: Marcel Dekker: 481-483, 1967.
- PRUSINER, S.B. Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol.* 50: 1129-1153, 1993.
- PRUSINER, S.B. Molecular biology and transgenetics of prion diseases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 397-438, 1991.
- PRUSINER, S.B. Scrapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:345-374, 1989.
- PRUSINER, S.B. The prion diseases. *Scientific American* 272: 30-37, 1995.
- PRUSINER, S.B.; BOLTON, D.C.; GROTH, D.F.; BOWMAN, K.A.; COCHRAN, S.P. e MCKINLEY, M.P. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21: 6942-6950, 1982.
- PRUSINER, S.B.; COCHRAN, S.P. e ALPERS, M.P. Transmission of scrapie in hamsters. *J. Infect. Dis.* 152: 971-978, 1985.

- PRUSINER, S.B.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; COCHRAN, S.P.; BOWMAN, K.A. e KASPER, K.C. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4606, 1981.
- PRUSINER, S.B.; MCKINLEY, M.P.; BOWMAN, K.A.; BOLTON, D.C.; BENDHEIN, P.E.; GROTH, D.F. e GLENER, G.G. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349-358, 1983.
- RICHARDSON, E.P.Jr. e MASTERS, C.L. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrP^{Sc} in the nervous system. *Brain Pathol.* 5: 33-41, 1995.
- ROBINSON, M.S.; The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 538-544, 1994.
- ROOT-BERSTEIN, R.S. Amino acid pairing. *J. Theor. Biol.* 94:885-894, 1982.
- SCOTT, M.; FOSTER, D.; MIRENDA, C.; SERBAN, D.; COUFAL, F.; WALCHLI, M.; TARCHIA, M.; GROTH, D.; CARLSON, G.; DEARMOND, S.J.; WESTAWAY, D. e PRUSINER, S.B. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59: 847-857, 1989.
- SCOTT, M.; GROTH, D.; FOSTER, D.; TORCHIA, M.; YANG, S-L.; DEARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73: 979-988, 1993.
- SEITELBERGER, F. Sträussler's disease. *Acta Neuropathol* 7: 341-343, 1981.
- SERBAN, D.; TARABOULOS, A.; DEARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology* 40: 110-117, 1990.
- SHYNG, S-L.; HEUSER, J.E. e HARRIS, D.A. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin coated pits. *J Cell Biol.* 125: 1239-1250, 1994.
- SHYNG, S-L.; HUBER, M.T. e HARRIS, D.A. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268: 15922-15928, 1993.

- SHYNG, S-L.; MOULDER, K.J.; LAESKO, A. e HARRIS, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 270: 14793-14800, 1995.
- SOUZA, S.J. e BRENTANI, R.R. Collagen binding site in collagenase can be determined using the concept of sense-antisense peptide interactions. *J. Biol. Chem.* 267: 13763-13767, 1992.
- SOUZA, S.J.; SABBAGA, J.; D'AMICO, E.; PASQUALINI, R. e BRENTANI, R.R. Anti-platelet autoantibodies from ITP patients recognize an epitope in GPIIb/IIIa deduced by complementary hydrophathy. *Immunology* 75: 17-22, 1992.
- STAHL, N.; BORCHELT, D.R.; HSIAO, K.K. e PRUSINER, S.B. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-240, 1987.
- TARABOULOS, A.; SERBAN, D. e PRUSINER, S.B. Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently-infected cultured cells. *J. Cell Biol.* 110:2117-2132, 1990.
- TATEISHI, J.; OHTA, M.; KOGA, M.; SATO, Y. e KUROIWA, Y. Transmission of spongiform encephalopathy with kuru plaques from humans to small rodents. *Ann. Neurol.* 5: 581-584, 1979.
- TELLING, G.C.; SCOTT, M.; MASTRIANNI, J.; GABIZON, R.; TORCHIA, M.; COHEN, F.E.; DEARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995.
- TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P.G.; RENNARD, R.I.; FOIDART, J-M. e MARTIN, G. Laminin, a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254: 9933-9937, 1979.
- TROWBRIDGE, I.S. Endocytosis and signals for internalization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 634-641, 1991.
- TURK, E.; TEPLow, D.B.; HOOD, L.E. e PRUSINER, S.B. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.* 176: 21-30, 1988.
- VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GREMSKI, W.; PORTIONATTO, M.A.; NADER, H.B. e BRENTANI, R.R. Detection and biochemical characterization of Mel-85-LBM. A cell surface laminin binding chondroitin sulfate proteoglycan in human melanoma cell Mel 85. Submetido.

- WELLS, G.A.H. e WILESMITH, J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 5: 91-103, 1995.
- WESTAWAY, D.; GOODMAN, P.A.; MIRENDA, C.A.; MCKINLEY, M.P.; CARLSON, G.A. e PRUSINER, S.B. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51:651-662, 1987.
- YAMAMOTO, T.; IWASAKI, Y.; YAMAMOTO, H.; KONNO, H. e ISEMURA, M. Intraneuronal laminin-like molecule in the central nervous system: demonstration of its unique differential distribution. *J. Neurol. Sci.* 84: 1-13, 1988.