

Prions: Uma revisão de suas propriedades bioquímicas e das características patológicas das encefalopatias espongiformes transmissíveis

Anderson Luiz Pena da Costa ^{1*}, **Antonio Carlos Souza da Silva Júnior** ²

¹*Biólogo, Mestrando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá. Macapá-AP Brasil. E-mail: pena.biologo@gmail.com*

**Autor para correspondência*

²*Pesquisador, Mestre em Ciências da Saúde, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. Macapá-AP Brasil. E-mail: jr_bio2005@yahoo.com.br*

RESUMO. Prions são proteínas associadas a vários distúrbios neurodegenerativos infecciosos, como o tremor epizootico, o kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob, a síndrome de Gerstmann-Straussler e a insônia familiar fatal, cujos agentes etiológicos têm a capacidade de "contornar" a barreira das espécies e infectar o homem e os animais e vice-versa, ocorrendo inevitavelmente a doença após a exposição dentro de um intervalo de tempo que é variável em espécies intermediárias, sendo esta característica e a natureza proteica desses agentes etiológicos, únicos no contexto das doenças infecciosas, considerando também, o fato de que são apenas parte de um organismo e não um organismo completo como bactérias, fungos e parasitas. Neste artigo de revisão serão expostos os aspectos bioquímicos dos prions em suas duas conformações estruturais PrP^C e PrP^{SC}, bem como aspectos gerais da patogênese e epidemiologia das doenças priônicas.

Palavras chave: doenças neurodegenerativas, prions, proteínas infecciosas

Prions: a review of their biochemical properties and the pathological features of the transmissible spongiform encephalopathies

ABSTRACT. Prions are proteins associated with various infectious neurodegenerative disorders, such as scrapie, kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Straussler syndrome and fatal familial insomnia, whose etiological agents have the ability to "bypass" the barrier of species and infecting man and animals and vice versa, occurring the disease after exposure within a time interval that is variable in intermediate species, being this characteristic and the protein nature of these unique etiological agents in the context of infectious diseases, considering the fact that they are only part of an organism and not a complete organism like bacteria, fungi and parasites. In this review article will be exposed the biochemical aspects of prions in their two structural conformations PrP^C and PrP^{SC}, as well as general aspects of the pathogenesis and epidemiology of prion diseases.

Keywords: infectious proteins, prions, neurodegenerative diseases

Introdução

As Proteínas Prions celulares (PrP^C) são proteínas periféricas codificadas por genes conhecidos como PRNP que ocorrem em vertebrados e são ausentes em invertebrados (MALÁGA-TRILLO; SOLIS, 2006). Sendo este gene ativo no cérebro e em outros tecidos,

representando a PrP^C 0,1 % total do sistema nervoso central, onde encontram-se ligadas à superfície dos neurônios (RIENSNER, 2003). São proteínas cuja função precisa, ainda não é totalmente conhecida e elucidada, mas acredita-se que seja associada ao transporte de Cu²⁺ para dentro das células, a sinalização celular, a

formação de sinapses e proteção celular (MANDUJANO et al., 2006).

Além de serem proteínas estruturais dos organismos, existindo em baixas concentrações nos sistemas biológicos, proteínas do tipo príon quando na conformação PrP^{Sc} (forma alterada estruturalmente da PrP^C) são associadas às doenças neurodegenerativas de prognóstico delicado e progressivo, que afetam homens e animais de forma totalmente divergente da natureza convencional das doenças infecciosas clássicas causadas por agentes infecciosos microbianos (DEAMOND; BOUZAMONDO, 2002) que são constituídos por biomoléculas (proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos) que fornecem subsídios para adesão, invasão e reprodução do agente etiológico dentro do hospedeiro, estabelecendo uma relação desarmônica entre os dois organismos na qual os agentes etiológicos se beneficiam do hospedeiro, prejudicando-o, havendo convalescença apenas após tratamento, que envolve a morte dos patógenos com drogas antimicrobianas adequadas (COSTA; SILVA-JÚNIOR, 2017; SIQUEIRA, 2004).

Ressaltando que doenças que possuem agentes etiológicos microbianos sempre ativam o sistema imunológico do hospedeiro, desencadeando em uma resposta inflamatória que pode ser fraca ou muito intensa, fato que não é observado em príons (RIENSNER, 2003).

As doenças causadas por príons podem ser transmitidas por contato direto ou ingestão de carne contaminada, por hereditariedade (fato que contribuiu para a elucidação do caráter proteico do agente infeccioso) e mutações espontâneas no gene codificante da PrP^C. São doenças relativamente lentas, que requerem um período de incubação que pode variar de 3 a 5 meses para se manifestar ou até mesmo anos (PEDERSON, 2002). Apresentando todas as doenças priônicas como característica em comum, a formação de lesões no sistema nervoso central que são causadas por agregados de PrP^{Sc} que tendem a aumentar devido ao fato de que a proteína PrP^{Sc} converte as proteínas na isoforma normal (PrP^C) para a isoforma infecciosa, induzindo as células nervosas à apoptose, formando lesões de textura espongiforme e com isso resultando em mudanças de temperamento, descoordenação motora, demência, insônia permanente, atrofia muscular e pneumonia, que progressivamente resultam na morte (MANDUJANO et al., 2006).

Havendo também hipóteses alternativas de que quando a PrP^{Sc} no sistema nervoso central induz a atividade de certas enzimas que modificam a estrutura da PrP^C convertendo-a à PrP^{Sc} (RIENSNER, 2003). Nos tópicos a seguir serão trabalhados aspectos bioquímicos e estruturais dos príons, assim como técnicas de caracterização das formas PrP^C e PrP^{Sc} e métodos diagnósticos visto que não existe cura para as doenças causadas por príons.

Material e Métodos

Esta revisão baseou-se na metodologia proposta por (COOPER, 1988) e tem como foco a análise de dados experimentais e descritos na literatura sobre a natureza bioquímica dos príons, a patogênese e características das encefalopatias espongiformes, com o objetivo de levantar dados generalistas sobre a biologia estrutural da PrP tanto no estado de saúde, quanto no estado patológico observados a partir de um perspectiva científica sobre aspectos centrais e pivotantes abordados na literatura, sendo a organização do trabalho apresentada de forma conceitual e dirigida ao público das ciências biológicas e da saúde.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi realizado um levantamento de material literário nos bancos de dados do Google e do Google Acadêmico com os termos príon, príon disease, encefalopatias espongiformes transmissíveis, transmissible spongiform encephalopathies e prpsc, que resultou na obtenção de inúmeros trabalhos sobre o tema, das quais 46 que foram lidos e analisados, sendo em seguida selecionados 40 trabalhos para compor esta revisão

Resultados e Discussão

Os trabalhos analisados e selecionados para compor o escopo desta revisão encontram-se resumidos conforme o quadro abaixo, sendo discutido nos tópicos posteriores aspectos bioquímicos e patológicos dos príons e de algumas doenças que causam.

Descoberta dos Prions

Em 1997, o Dr Stanley B. Prusiner ganhou o prêmio Nobel em fisiologia e medicina devido à

sua descoberta da natureza proteica dos prions (proteinaceous infectious particles), que são definidos como agentes infecciosos causadores de encefalite espongiforme ou buracos no cérebro com consistência de uma esponja (MALÁGA-TRILLO; SOLIS, 2006).

Prusiner em seus estudos para determinar que proteínas eram os agentes etiológicos das encefalites espongiformes precisou realizar vários estudos de inativação e performance sistemática, utilizando não apenas métodos convencionais químicos e físicos, mas também adotou vários procedimentos enzimáticos tendo os resultados de seus ensaios divididos em dois grupos: 1) Ensaios realizados com o emprego de endonucleases não inativaram a capacidade infecciosa; 2) Ensaios realizados com o emprego de proteases inativaram a capacidade infecciosa (RIENSNER, 2003).

A partir desses resultados, Prusiner concluiu que o agente infeccioso do scrapie (doença infecciosa causada por príons que afeta ovelhas) não era um vírus pois não apresentava ácidos nucleicos, mas sim um agente infeccioso de caráter proteico, que ele denominou príon. Mas análises de maior sensibilidade e precisão foram necessárias a partir do isolamento da proteína para confirmar a, até então, hipótese (FERNÁNDEZ-BORGES; CASTILLA, 2011).

Propriedades Bioquímicas da PrP^C

A PrP^C é uma proteína extremamente hidrofóbica insolúvel em solventes orgânicos, com peso molecular de aproximadamente 33-35 Kda. É amplamente conhecida quimicamente, mas carece de informação quanto a sua importância biológica, sendo atribuído à ela papéis fisiológicos importantes como transporte de Cu²⁺ e Zn²⁺ para dentro das células nervosas (WALTER et al., 2007), transdução da sinalização celular, formação de sinapses e função neuroprotetora, assim como funções reguladoras tanto pro como anti apoptose (CAETANO et al., 2008; FALSIG et al., 2008).

O produto final após a tradução do gene para PrP^C possui 231 amino ácidos, sendo os amino ácidos 1-23 clivados como sinal peptídico durante o tráfego da molécula e os amino ácidos 232-253 são substituídos por âncoras glicosilfosfatidilinositol, que ancoram a proteína à membrana externa celular (RIENSNER, 2003). Segundo Rudd et al. (2001), as âncoras de

glicosilfosfatidilinositol, quando modificadas com ácido siálico, talvez proveja mobilidade à PrP^C na bicamada fosfolipídica, possivelmente tornando possível a translocação da proteína entre células do sistema nervoso.

Os resíduos Asn 181 e 197 carregam grupos glicosil contendo ácido siálico altamente ramificados. Podendo a PrP^C ser isolada basicamente em três formas: 1) Forma não glicosilada; 2) Forma com um grupo glicosil; e 3) Forma com dois grupos glicosil (ARAMAN et al., 2017).

Nos resíduos Cys 179 e 214 são formadas pontes dissulfeto (MAITI; SUREWICZ, 2000) e associado de forma não covalente com a proteína, há evidências que mostram que PrP^C altamente purificada pode apresentar interações intermoleculares com lipídios (esfingomiélna, alfa-hidroxícerebrosídeo e colesterol), não havendo interferência do tipo de lipídio associado com a proteína, mas apresentando significância em caso de ser necessário determinar a origem do príon (RIENSNER, 2003; PRUSINER, 1967).

Além de lipídios, também são observadas interações intermoleculares entre príons e açúcares poliméricos constituídos de ligações α 1,4 e ramificações 1,4,6 de poliglicose que proveem estabilidade à molécula proteica (DUMPITAK et al., 2005).

Propriedades Bioquímicas da PrP^C Recombinante

Devido à pouca concentração de PrP^C disponível nos organismos, em testes usados em laboratório para análise, estratégias para obtenção em maior quantidade desta proteína foram adotadas; como a utilização do ramster sírio (*Mesocricetus auratus*) como um animal experimental, de onde fragmentos peptídicos da PrP^C e a sequência de DNA foram primeiramente determinados a partir de dados presentes em uma biblioteca de cDNA e depois em uma biblioteca genômica (BASLER et al., 1986).

Permitindo dessa forma a produção da PrP^C em maior escala, porém houve problemas com as primeiras PrP^C recombinantes, devido ao fato de que o ambiente redutor do citosol bacteriano desnatura as pontes dissulfeto da PrP^C, que são essenciais para a estabilidade da proteína (TOMPA et al., 2002).

Porém, a perda das ligações dissulfeto em PrP^C recombinante pode ser reconstituída em condições oxidantes (8M ureia ou 5M Cloreto de guanidina) e dialisada do gradiente desnaturante. Dentre os tipos celulares, células eucariontes possuem grande importância para obtenção de prions com estruturas mais similares às encontradas em condições biológicas devido ao fato de possuírem organelas membranosas capazes de efetuar modificações pós tradução. Entretanto células CHO (epitélio de ovário de ramster - *Cricetulus griseus*) transformadas não apresentaram resultado significativo quando comparado com as PrP^C produzidas por *E. coli* (RIENSNER, 2003).

Propriedades Bioquímicas da PrP^{SC}

A forma infecciosa PrP^{SC} não apresenta diferenças em termos de composição química quando comparado com a forma normal PrP^C, porém apresenta diferenças de caracteres estruturais (MALÁGA-TRILLO; SOLIS, 2006) que influenciam em suas propriedades físico-químicas como solubilidade, formação de fibrila, (propriedades diretamente relacionadas ao desenvolvimento de lesões cerebrais por conta do acúmulo de PrP^{SC} no tecido nervoso) e resistência a proteinase K, que é um parâmetro laboratorial para diferenciação entre as formas PrP^C e PrP^{SC}, devido a formação de agregados observados na forma infecciosa que conferem maior resistência a proteinase K (McKINTOSH et al., 2003), por desfavorecer energeticamente a ligação enzima substrato devido aumento da concentração de substrato.

Ainda a respeito da resistência à proteinase da isoforma mal-dobrada da PrP, Chen et al. (2000) demonstraram que a hidrólise enzimática da PrP^{SC} oriunda de casos comprovadamente fruto de mutações no gene da PrP geram diferentes fragmentos peptídicos que sugerem a existência de distintos conformeros da PrP^{SC}, sendo confirmado em seus estudos que a proteinase possui como sítio de ação o resíduo 97 na PrP^{SC} presente na insônia familiar fatal e o resíduo 82 na doença de Creutzfeldt-Jakob, e na síndrome de Gerstmann-Straussler.

Amostras de PrP^{SC} coradas com vermelho do congo apresentam estruturas fibrilares com fluorescência similares às que são encontradas em seções de cérebros de animais infectados,

chamados de fibras associadas de scrapie antes da descoberta dos prions (RIENSNER, 2003).

Diferenças Estruturais Entre a PrP^C e a PrP^{SC}

As diferenças entre as duas formas de proteína prion como mostrado acima não são de caráter químico, mas sim estrutural. Na qual observa-se que a PrP de forma generalista possui três alfa hélices e uma pequena folha beta antiparalela (análise comparativa das proteínas prion em humanos e ramsters), sendo a PrP^C constituída de 42% de estrutura secundária na forma de alfa hélice, enquanto a PrP^{SC} apresenta 30% de alfa-hélice e 43% de folha-beta (PAN et al., 1993).

Segundo estudos apontados por Riensner (2003) sobre a conformação transicional da PrP, a termodinâmica da isoforma infecciosa é mais estável que a forma isoforma normal da proteína prion, não sendo totalmente elucidado por que a isoforma PrP^{SC} não ocorre com maior frequência na natureza. Porém, uma hipótese amplamente aceita para a conservação da PrP^C em sua forma nativa é a distribuição entre as fases aquosas e lipídicas que previnem transições espontâneas (McKINTOSH et al., 2003).

Nguyen et al. (1995) demonstraram por meio de difração de raio-x e microscopia eletrônica, que a formação de folhas beta no processo de conversão da PrP^C → PrP^{SC} em células de hamster sírio envolvem três posições: 113-120, 109-122 e 90-145, e por meio da difração de raio-x, também foi analisado que o mecanismo autocatalítico de replicação, possivelmente envolva a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias beta antiparalelas dos domínios ricos em alanina e a interface de ligação entre a PrP^C e a PrP^{SC}, que favorecem a formação de folhas beta na isoforma PrP^C (INOUE; KIRSCHNER, 2003).

Entretanto, o processo de conversão da PrP^C → PrP^{SC} em meio biológico também é influenciado pelo perfil de glicosilação proteica, na qual os resíduos glicosilados possam atuar como fatores de proteção contra as doenças priônicas em função das propriedades estereoquímicas que os açúcares conferem à PrP^C no meio biológico, sendo observado que prions RML para se replicarem em ratos requerem a

presença da isoforma PrP^C não glicosilada, enquanto que a propagação de príons SC 237 em hamsters requerem a presença da PrP^C diglicosilada, indicando que a interação da PrP^{SC} com diferentes glicofomas da PrP^C regulam a eficiência do processo de replicação autocatalítica da PrP^{SC} de maneira específica entre diferentes espécies (NISHINA et al., 2006).

Também é observado *in vitro*, que o perfil de glicosilação da PrP^{SC} nativa influencia no grau de precipitação mediada por anticorpos monoclonais contra beta-PrP humana recombinante (KHALILI-SHIRAZI et al., 2005), sugerindo que a glicosilação das isoformas é um aspecto fundamental para a patogênese das doenças priônicas, assim como também em papéis biológicos ainda não elucidados da isoforma normal desta proteína nos vertebrados.

Aspectos Gerais das Patologias Causadas por Príons em Humanos e Animais

Doenças causadas por príons são de caráter neurodegenerativo, incuráveis e afetam tanto humanos como animais. Elas podem ser de origem esporádicas, infecciosa ou hereditária (ASANTE et al. 2002), na qual todos os casos em que há mutações no gene da PrP resultam em uma proteína mal dobrada e infecciosa que são classificadas como mutações de ganho de função (CAETANO et al., 2008).

As doenças humanas vinculadas à PrP^{SC} afetam de forma predominante o cérebro, onde são observadas, a nível macroscópico lesões de consistência esponjosa após a autópsia e, a nível tecidual, a formação de vacuolização esponjiforme (formação de vacúolos no tecido nervoso central), perda neuronal e proliferação astrogliar (com ou sem formação de placas amyloids), na qual a intensidade dos achados histopatológicos se intensificam com a progressão da doença (FERNÁNDEZ-BORGES; CASTILLA, 2011).

Tanto em humanos como em animais, o período de incubação é longo, vindo os indivíduos afetados a apresentarem os principais sintomas das encefalopatias espongioformes em intervalos de tempo que variam de meses à décadas, sendo em humanos, o quadro patológico caracterizado genericamente por ataxia, tremor generalizado, perda de coordenação, alterações da memória, disfunções motoras, perda das habilidades

cognitivas, demência progressiva e inevitavelmente a morte; sendo o quadro apresentado por ovinos, bovinos, caprinos e felinos, bastante similar, incluindo: perda da coordenação motora, comportamento irritadiço, prurido e gradativamente, com a intensificação dos sintomas, a morte (MANDUJANO et al., 2006).

As doenças priônicas em seres humanos, se diferenciam de acordo com a origem da doença (esporádica, infecciosa ou hereditária) e a isoforma da PrP^{SC}, que influencia de certa forma no grau de tropismo da proteína mal dobrada por uma determinada localidade anatômica do cérebro na qual os depósitos de PrP^{SC} se acumulam e induzem a formação de lesões espongioformes (PRIVAT et al., 2017), originando desta forma encefalopatias que apesar de suas características generalista, apresentam suas peculiaridades. (SOTO; SATANI, 2011).

Dentre as principais encefalopatias espongioformes, pode-se citar a o kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob, a síndrome de Gerstmann-Straussler e a insônia familiar fatal, que são descritas abaixo.

De acordo com McKintosh et al. (2001), o termo doença de Creutzfeldt-jakob usado por Spielmeyer no ano 1922, era utilizado para caracterizar doenças neurológicas humanas com progressiva mioclonia, ataxia e demência, que foram descritos anteriormente pelos médicos Creutzfeldt e Jakob, respectivamente nos anos de 1920 e 1921, sendo termo usado para descrever uma ampla variedade de condições que nem sempre coincide com os critérios modernos para diagnóstico de CJD após a natureza química e infecciosa do agente etiológico, ser elucidada.

Na Nova Guiné, Kuru é um termo que significa tremor da febre e frio, e designa uma encefalopatia esponjiforme transmissível descoberta pelo Dr. Carleton Gajdusek em sua expedição a Papua, onde suas investigações tinham como objetivo estabelecer a relação entre as características comuns entre a CJD e o screapie, tendo como foco a análise de variáveis ambientais e genéticas que apontaram como causa da propagação da doença na população, as práticas de rituais canibalísticos (LIBERSKI et al., 2012).

O quadro patológico da kuru é caracterizado por ataxia, tremor, perda da

coordenação motora, dismetria, hipotonia, labilidade emocional e progressão severa de demência até a morte, apresentando um período de incubação que varia entre três e um ano (MANDUJANO et al., 2006).

A insônia familiar fatal é uma doença priônica genética de padrão autossômico dominante, caracterizada pela manifestação de insônia proeminente, geralmente em associação com disautonomia, mioclonia e eventual demência, com as alterações patológicas predominantes no tálamo e uma mutação subjacente específica no PRNP e a síndrome de Gerstmann-Straussler outra encefalopatia espongiforme oriunda de mutação no mesmo gene, também com padrão de distribuição autossômico dominante, na qual a doença apresenta um horizonte clínico engloba um espectro clínico mais diversificado que varia de ataxia cerebelar progressiva ou paraparesia espástica (ambos geralmente em associação com demência), a deficiência cognitiva isolada que se assemelha à doença de Alzheimer (LU et al., 2017; COLLINS et al., 2001).

Tanto a insônia familiar fatal quanto a síndrome de Gerstmann-Straussler são casos de encefalopatias espongiformes de caráter hereditário, mas que podem ser transmissíveis em casos de cirurgias feitas com material contaminado pela isoforma infectante, transplante sanguíneo ou de órgãos, que demonstram uma unicidade deste agente no processo saúde-doença (RAMASAMY et al., 2003).

Epidemiologia

As doenças causadas por príons podem ser divididas em grupos de acordo com a etiologia da doença em infecciosa (5%), esporádica (80%) e hereditária (15%). Embora a origem e mecanismos de replicação não sejam totalmente elucidados, vários estudos sugerem que mutações em diferentes regiões do gene da PrP^C no cromossomo 20p, mais especificamente, no alelo 178 são reportadas em pacientes com insônia familiar fatal e Creutzfeldt-jakob (CJD), que podem ocorrer de forma esporádica e se tornarem hereditárias quando afetam células reprodutivas (DEAMOND; BOUZAMONDO, 2002).

A etiologia menos frequente entre humanos se dá por meio de transplante de órgãos, córnea, utilização de hormônios de procedência humana ou animal e transfusão de sangue. Entretanto, indivíduos contaminados podem viver normalmente por conta do período de incubação muito longo (anteriormente conhecidos como vírus lento antes da comprovação da composição proteica do agente infeccioso), tornando-se portadores assintomáticos, pois os príons formados possuem natureza altamente infecciosa e sustentam fortemente a proteína príon como único agente etiológico da doença. Essa é uma característica que torna as encefalopatias espongiformes transmissíveis únicas dentre as doenças infecciosas visto que podem ocorrer esporadicamente, por conta de mutação genética ou passagem infecciosa (PEDERSON, 2002).

A Barreira das Espécies

Sabe-se, há muitos anos, que linhagens de príons entre espécies diferentes demonstram barreiras entre as espécies, que podem ser observadas por um aumento do período de incubação e redução na porcentagem de animais sucumbindo à doença quando príons de uma espécie são inoculados em outra (primeira passagem). Havendo entretanto redução do período de incubação e aumento na quantidade de animais doentes após a primeira passagem, na qual os animais infectados apresentam tempo de incubação, sinais e sintomas similares à espécie inicial de origem dos príons (ASANTE et al., 2002).

Contudo, a infectividade e características patológicas de alguns príons podem ter suas características conservadas ou não quando inoculados em espécies intermediárias, como por exemplo, a encefalopatia espongiforme bovina pode ser prontamente transmitida para o homem e outros animais de forma similar à doença apresentada em bovinos, no entanto, a doença de creutzfeldt-jakob esporádica de humanos não é transmitida prontamente para ratos wild type durante primeira passagem, mas é altamente infecciosa para ratos transgênicos que expressam a PrP^C humana, apresentando os príons da CJD variante em ratos wild type e transgênicos menor tempo de incubação e maior poder infeccioso durante segunda passagem, demonstrando que entre doenças causadas por príons há inconsistência na barreira de transmissão entre

espécies (GRIFFITH, 1986; ASANTE et al., 2002).

Esses achados demonstram que a estrutura primária da PrP^C e da PrP^{SC} não são uma barreira determinante entre as espécies, reforçando a teoria de que a conformação da proteína é um fator importante para infectividade (McKINTOSH et al., 2003), porém Moore et al. (2005) apontam que as interações intermoleculares entre as sequências primárias das isoformas PrP^C e PrP^{SC}, o padrão de glicosilação entre as espécies e as diferenças nas estruturas tridimensionais das isoformas podem atuar como barreiras entre uma espécie e outra, apesar disso, o grau de conservação da PrP entre os vertebrados possivelmente favoreça a transmissão das isoformas PrP^{SC} entre diferentes espécies.

Métodos Diagnósticos

A natureza das encefalopatias espongiformes transmissíveis é única não só por conta da constituição química do agente infeccioso, mas também quanto a capacidade de se originar de diferentes formas (infecciosa, hereditária e esporádica) dentro de uma população de vertebrados, de atravessar a barreira das espécies e poder formar várias populações fonte de infecção ao ser humano e outros animais, o que torna o risco de uma reemergência de doenças priônicas constante e extremamente imprevisível (LAURINDO; FILHO, 2017). Fatos estes, que tornam as medidas de controle e detecção da PrP^{SC} uma ferramenta de relevância imprescindível para a saúde pública.

Há poucas décadas, nenhuma das doenças causadas por príons era detectável clinicamente em fase precoce e/ou após o surgimento dos sintomas, sendo as únicas ferramentas disponíveis limitadas às análises de alterações em regiões do sistema nervoso central por meio de ressonância magnética, tomografia computadorizada e necropsia, na qual o material cerebral era observado ao microscópio e o diagnóstico post-mortem confirmado por meio de técnicas de ELISA e perfil de resistência à proteinase K/Western Blot com suas variações criadas com o intuito de aumentar a sensibilidade e precisão (SOTO, 2004).

Entretanto, a natureza das doenças priônicas estimulou a comunidade científica a desenvolver minuciosas e intensas pesquisas a

respeito de vários aspectos da biologia do agente, que possibilitaram a obtenção de uma maior compreensão da patobiologia e dos aspectos clínicos destas doenças, na qual a partir de estudos genéticos das desordens neurodegenerativas hereditárias causadas por príons, mutações de ponto no códon 129 do gene PRPN, localizado no cromossomo 20, foram descobertas, com por exemplo, as mutações:

P105L (c.314C>T), G114V (c.341G>T)
 A117V (c.350C>T), G131V (c.392G>T)
 Y145X (c.435T>G), R148H (c.443G>A)
 Q160X (c.478C>T), V180I (c.538G>A)
 T183A (c.547A>G), H187R (c.560A>G)
 T188A (c.562A>G), T188K (c.563C>A)
 T188R (c.563C>G), E196K (c.586G>A)
 F198S (c.593T>C), D202N (c.604G>A)
 V203I (c.607G>A), R208H (c.623G>A)
 V210I (c.628G>A), E211Q (c.631G>C)
 Q212P (c.635A>G), Q217R (c.650A>G)
 M232R (c.695T>G), M232T (c.695T>C)
 P68P (c.204T>C), A117A (c.351A>G)
 G124G (c.372C>G), V161V (c.483G>A)
 H177H (c.531C>T), Q212Q (c.636G>A)
 R228R (c.684A>G), S230S (c.690G>A)

Podendo estas serem detectadas por metodologias moleculares para a análise de polimorfismo de nucleotídeo único com fins diagnósticos. Porém, tal ferramenta possui aplicabilidade limitada em função da epidemiologia das desordens neurodegenerativas hereditárias causadas por príons (MEAD, 2006)

Outras abordagens descritas na literatura para a detecção de príons com finalidades diagnósticas são: Indução por quaking em tempo real, na qual PrP recombinante expressa por *Escherichia coli* é utilizada como substrato para a conversão à PrP^{SC} (se presente em uma amostra) em meio submetido a extrema agitação para induzir a formação de fibrilas, que pode ser identificada e quantificada por métodos de fluorescência (McGUIRE et al., 2012), imunoprecipitação (ORRÚ et al., 2011) em diferentes amostras, incluindo líquido cefaloraquidiano e sangue.

Em nível de vigilância e prevenção das doenças priônicas a partir de água ou alimentos contaminado, Gilroyed et al. (2015) propuseram o desenvolvimento de um ensaio denominado amplificação de proteínas mal dobradas que é realizado em amostras orgânicas de resíduos de

animais decompostos, na qual a capacidade da PrP^{Sc} de converter a PrP^C na isoforma infecciosa é testada in vitro com alta precisão. Com este ensaio biológico, a presença de prions no ambiente pode ser detectada e o consumo de animais infectados, evitado.

Giese et al. (2000) em função da preocupação global que a doença da vaca-louca causou entre os anos de 1986-2000 e de seu grande poder infeccioso e propagação a nível de saúde pública, desenvolveram um método para detectar a isoforma PrP^{Sc} em líquido cefalorraquidiano por meio de um método chamado espectroscopia de correlação da fluorescência, que tem por fundamento a excitação de moléculas específicas através da energia imposta ao sistema contendo a amostra por meio de raios laser, que geram fluorescência e possibilitam a análise das flutuações de concentrações e o tamanho de partículas fluorescentes em solução, sendo observada a sua intensidade, flutuação (em função do movimento browniano das partículas) e tempo médio de difusão que são quantificados por um sistema ótico e possibilitam a caracterização de moléculas específicas como prions. Esta metodologia possibilita a quantificação de PrP^{Sc} em concentrações extremamente diluídas com grande precisão, tornando possível a análise das isoformas infecciosas, não necessariamente apenas em pessoas ou animais após o óbito, mas também em casos de suspeita de doença priônica ou de exposição ao agente infeccioso.

Considerações Finais

Os prions, constituem um importante capítulo dentro da história das doenças infecciosas e representam uma oportunidade insubstituível de estudo acerca dos fatores inter e intramoleculares que afetam o enovelamento e a função proteica, além de ser um ponto de partida capaz de gerar inúmeros insights sobre a função da proteína PrP^C na regulação da plasticidade neuronal e nos processos etiológicos das encefalopatias espongiformes transmissíveis, assim como outras doenças neurodegenerativas nas quais agregados proteicos tóxicos como no Alzheimer e na Coreia de Huntington.

No contexto globalizado em que as populações humanas se encontram imersas contemporaneamente, a compreensão atual sobre

a biologia dos prions e seu papel de protagonista na história natural das encefalopatias espongiformes, possibilitou a criação de medidas profiláticas que reduzem consideravelmente o risco de exposição a isoforma infecciosa, entretanto, o risco de uma reemergência similar ao da vaca louca nos anos de 1986-2000 é constante e imprevisível, podendo este, começar tanto em populações animais, quanto em populações humanas e o risco de contaminação cruzada entre espécies, assim como a formação de reservatórios da doença não devem ser descartados ou subestimados.

Referências bibliográficas

- ARAMAN, C.; THOMPSON, R. E.; WANG, S.; HACKL, S.; PAYNE, R. J.; BECKER, C. F. W. Semisynthetic prion protein (PrP) variants carrying glycan mimics at position 181 and 197 do not form fibrils. **Chemical Science**, v.8, n.9, p.6626-6632, 2017
- ASANTE, E.A.; LINEHAN, J. M.; DESBRUSLAIS, M.; JOINER, S.; GOWLAND, I.; WOOD, A. L.; WELCH, J.; HILL, A. F.; LLOYD, S. E.; WADSWORTH, J. D. F.; COLLINGE, J. BSE Prions Propagate as either Variant CJD-like or Sporadic CJD-like Prion Strains in Transgenic Mice Expressing Human Prion Protein, **The EMBO Journal**. v.21, n.23, p. 6358-6366, 2002.
- BASLER, K.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, v.46, n.3, p.4417-428, 1986.
- CAETANO, F. A.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N. M.; MACHADO, C. F.; ARANTES, C. P.; MAGALHÃES, A. C.; VIEIRA, M. P. B.; AMÉRICO, T. A.; MASSENSINI, A. R.; PRIOLA, S. A.; VORBERG, I.; GOMEZ, M. V.; LINDEN, R.; PRADO, V. F.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. M. Endocytosis of prion protein is required for ERK 1/2 signaling induced by Stress-inducible protein. **Journal of Neuroscience**. v.28, n.26, p.6691-6701, 2008.
- COLLINS, S.; McLEAN, C.A.; MASTERS, C.L. Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of

- these less common human transmissible spongiform encephalopathies. **Journal of Neuroscience**. V.8, n.5, p.387-397, 2001.
- COOPER, H.M. Organizing knowledge synthesis: A taxonomy of literature reviews. **Knowledge in Society**. v.1, n.1, p. 104-126, 1988.
- COSTA, A.L.P.; SILVA-JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica UNIFAP**. v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.
- DEAMOND, A.J.; BOUZAMONDO, E. Fundamentals of Prion Biology and Diseases, **Toxicology**. v.27, n.181-182, p. 9-16, 2002.
- DUMPITAK, C.; BEEKES, M.; WEINMANN, N.; METZGER, S.; WINKLHOFER, K. F.; TATZELT, J.; RIESNER, D. The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose. **Biological Chemistry**, v.386, n.1, p. 1149-1155, 2005.
- FALSIG, J.; NILSSON, P. R.; KNOWLES, T. P. J.; AGUZZI, A. Chemical and Biophysical Insights into the propagation of prion strains. **Human Frontier Science Program Journal**, v.2, n.6, p.332-341, 2008.
- FERNÁNDEZ-BORGES, N.; CASTILLA, J. Priones, Más de 200 años de História. **Virología**, v.14, n.3, p. 48-54.
- GIESE, A.; BIESCHKE, J.; EIGEN, M.; KRETZSCHMAR, H. A. Putting Prions in Focus: Application of Single Molecule Detection to the diagnosis of Prion Diseases. **Archives of Virology**, n.16, p.161-171, 2000.
- GILROYED, B. H.; BRAITHWAITEB, S. L.; LUKE M.; PRICE, L. M.; REUTER, T.; CZUB, S.; GRAHAM, C.; BALACHANDRAN, A.; McALLISTER, T. A.; BELOSEVIC, M.; NEUMANN, N. F. Application of Protein Misfolding Cyclic Amplification to Detection of Prions in Anaerobic Digestate. **Journal of Microbiological Methods**, v.118, p.1-6, 2015.
- GRIFFITH, S.J.; Nature of the Scrapie agent: Self Replication and Scrapie, **Nature**, n. 215, p. 1043-1044, 1967.
- INOUE, H.; KIRSCHNER, D.A. X-ray fibre diffraction of assemblies formed by prion-related peptides: polymorphism of the heterodimer interface between PrPC and PrPsc. **Fibre Diffraction Review**. n.11, p. 102-112, 2003.
- KHALILI-SHIRAZI, A.; SUMMERS, L.; LINEHAN, J.; MALLINSON, G.; ANSTEE, D.; HAWKE, S.; JACKSON, G. S.; COLLINGE, J. Prp Glycoforms are associated in strain-specific ration in naïve PrPsc. **Journal of General Virology**. v.86, p.2635-2644, 2005.
- LAURINDO, E.E.; FILHO, I.R.B. Encefalopatia Espongiforme Bovina Atípica: Uma Revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**. V.84, p.1-10, 2017.
- LIBERSKI, P.P.; SIKORSKA, B.; BROWN, P. Kuru: The First Prion Disease. **Advances. Experimental Medicine and Biology**, v.724, p.143-153, 2012.
- LU, T.; PAN, Y.; PENG, L.; QIN, F.; SUN, X.; LU, Z.; QIU, W. Fatal familial insomnia with abnormal signals on routine MRI: a case report and literature review. **BMC Neurology**, v.17, n.104, p.1-6, 2017.
- MAITI, N.R.; SUREWICZ, W.K. The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.4, p. 2427-2431, 2000.
- MÁLAGA-TRILLO, E.; SOLIS, G.P. Proteínas de prion: De la patogénesis a la funciones. **Mensaje Bioquímico**. v.30, p.167-182, 2006.
- MANDUJANO, A.; MONTES, S.; GUZMAN, A.; ESPINOSA, B.; REMBAO, D.; MARTÍNEZ-CAIRO, S.; ZENTENO, E.; GUEVARA, J. Fisiopatología de las enfermedades por priones. **Gaceta Médica de México**. v.142, n.5, p. 399-406, 2006.
- McGUIRE, L.I.; PEDEN, A.H.; ORRÚ, C.D.; WILHAM, J.M.; APPLEFORD, N.E.; MALLINSON, G.; ANDREWS, M.; HEAD, M.W.; CAUGHEY, B.; WILL, R.G.; KNIGHT, R.S.; GREEN, A.J. Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Annals of Neurology**. v.72, n.2, p.278-285, 2012.
- McKINTOSH, E.; TABRIZI, S.J.; COLLINGE, J., Prion Diseases, **Journal of NeuroVirology**, v.9, n.2, p. 183-193, 2003.

- MEAD, S. Prion Disease Genetics. *European Journal of Human Genetics*, v.14, p.273-281, 2006.
- MOORE, R.A.; VORBERG, I.; PRIOLA, S.A.; Species Barriers in prion diseases – brief review. *Infectious Diseases from nature: mechanisms of viral emergence and persistence*. v.19, p.187-202, 2005.
- NGUYEN, J.T.; INOUE, H.; BALDWIN, M.A.; FLETTERICK, R.J.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B.; KIRSCHNER, D. A. X-ray diffraction of Scrapie Prion Rods and PrP peptides. *Journal of Molecular Biology*. v.252, n.4, p. 412-422, 1995.
- NISHINA, K.A.; DELEAULT, N. R.; MAHAL, S. P.; BASKAKOV, I.; LUHRS, T.; RIEK, R.; SUPATTAPONE, S. The stoichiometry of host PrP^C glycoforms modulates the efficiency of PrP^{Sc} formation in vitro. *Biochemistry*. v. 45, n.47, p.14129-14139, 2006.
- ORRÚ, C. D.; WILHAMA, J. M.; RAYMONDA, L. D.; KUHN, F.; SCHROEDER, B.; RAEBER, A. L.; CAUGHEY, B. Prion Disease Blood Test Using Immunoprecipitation and Improved Quaking-Induced Conversion. *mBio*. v.2, n3, 2011.
- PAN, K. M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R. J.; COHEN, F. E. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.90, n.23, p.10962-10966, 1993.
- PEDERSON, N.S.; SMITH, E. Prion Diseases: Epidemiology in Man. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica*, v.110, n.1, p.14-22, 2002.
- PRIVAT, N.; LEVAVASSEUR, E.; YILDIRIM, S.; HANNAOUI, S.; BRANDEL, J.P.; LAPLANCHE, J.L.; BÉRINGUE, V.; SEILHEAN, D.; HAÏK, S. Region-specific protein misfolding cyclic amplification reproduces brain tropism of prion strains. *Journal of Biological Chemistry*, v.292, n.40, p.16688-16696, 2017.
- PRUSINER, S.B., Scrapie Prions. *Annual Reviews of Microbiology*. v.43, p.345-374, 1989.
- RAMASAMY, I.; LAW, M.; COLLINS, S.; BROOKE, F. Organ distribution of prion proteins in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The lancet: Infectious Diseases*. V.3, n.4, p.214-222, 2003.
- RIESNER, D. Biochemistry and Structure of PrP(C) and PrP(Sc). *British Medical Bulletin*, n.66, p.21-33, 2003
- RUDD, P.M.; WORMALD, M. R.; WING, D. R.; PRUSINER, S. B.; DWEK, R. A. Prion Glycoprotein: Structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry*. v.40, n.13, p.3759-3766, 2001.
- SIQUEIRA, C.M.M. Resistência aos Antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. *Revista de la Organización de Farmacéuticos Ibero-Americanos*, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.
- SOTO, C. Diagnosing Prion Diseases: Needs, Challenges and Hopes. *Nature Reviews Microbiology*. v.2, p. 809-819, 2004
- SOTO, C.; SATANI, N. The Intricate Mechanisms of Neurodegeneration in prion diseases. *Trends in Molecular Medicine*, n.17, v.1, p. 14-24, 2011.
- TOMPA, P.; TUSNÁDY, G. E.; FRIEDRICH, P.; SIMON, I. The role of dimerization in Prion replication. *Biophysical Journal*. v.82, p. 1711-1718, 2002
- WALTER, E.D.; STEVENS, D. J.; VISCONTE, M. P.; MILLHAUSER, G. L. The prion protein is combined zinc and copper binding protein: Zn²⁺ alters the distribution of Cu²⁺ coordination modes. *Journal of the American Chemical Society*. v.129, n.50, p.15440-15441, 2007.

Artigo recebido em 18 de fevereiro de 2018.
Avaliado em 12 de março de 2018.
Aceito em 05 de abril de 2018.
Publicado em 20 de junho de 2018.