

PRION CELULAR E INFECCIOSO

A importância de um receptor de prion

Vilma Regina Martins

Farmacêutica e doutora em Ciências
pelo Departamento de Bioquímica
Instituto de Química da USP
Pesquisadora científica da Fundação
Antônio Prudente, SP

Doenças neurodegenerativas

Desde o início do século já se conhecia uma doença que acometia cabras e ovelhas, causando-lhes uma perda de coordenação motora, irritabilidade e um intenso prurido - o que acabou por denominá-la de "scrapie". Posteriormente, observou-se que outros animais, como o alce, a marta e o cervo, podiam ser acometidos com patologias semelhantes.

Doenças neurodegenerativas que afetavam o homem e tinham características similares ao "scrapie" também foram descritas. O kuru, que atingia nativos de Papua-Nova Guiné, foi relatado por Vicent Zigas e Carleton Gajdusek em 1957. A estranha doença causava perda de coordenação motora seguida de demência e morte. Acreditava-se que os nativos adquiriram a doença devido ao hábito de canibalismo, caracterizando uma doença infecciosa, sendo o agente etiológico provavelmente transferido do cérebro (órgão preferencialmente ingerido) de indivíduos doentes para indivíduos saudáveis. A doença foi exterminada pela interrupção da prática canibal.

A doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), bastante rara (um afetado em um milhão de indivíduos), tem distribuição mundial, sendo também caracterizada por demência seguida de perda de coordenação motora e atingindo indivíduos geralmente com mais de 60 anos. Sua etiologia é desconhecida nas formas esporádicas da doença (85-90% dos casos). Entretanto, há alguns relatos da aquisição de CJD por procedimentos médicos como: aplicação de eletrodos cerebrais, transplantes de retina, prótese de dura-máter e uso de

hormônio de crescimento purificado a partir de pituitária de cadáveres, todos contaminados com o agente infeccioso de indivíduos portadores da doença.

Um aspecto surpreendente é o padrão hereditário encontrado em cerca de 15% dos casos de CJD, mostrando um novo e interessante aspecto destas patologias. Pela primeira vez era descrita uma disfunção que possuía um padrão simultaneamente infeccioso e hereditário. Posteriormente, outros grupos de patologias foram associados a esta descrição. A doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), que à semelhança da CJD leva ao aparecimento de alterações de coordenação motora e à Insônia Familiar Fatal, onde a demência é seguida de alterações no sono. O componente hereditário destas últimas é muito maior que o infeccioso, sendo responsável por mais de 90% dos casos.

Em 1986, a emergência de uma epidemia que acometeu o gado bovino da Grã-Bretanha foi relatada por Gerald Wells e John Wilesmith. Seu aparecimento foi associado ao uso de vísceras de ovelhas contaminadas com o "scrapie" no preparo da ração usada para alimentar estes animais. A doença, denominada encefalopatia espongiforme bovina (nome dado devido à grande quantidade de buracos presentes no cérebro destes animais) ou "doença da vaca louca", atingiu seu ápice em 1994 com 138.359 casos naquele país.

Desde então há uma contínua discussão sobre a possibilidade da transmissão da encefalopatia espongiforme bovina para o homem através da ingestão de carne proveniente de animais afetados. Esta sugestão foi dada

após o aparecimento recente de alguns casos de CJD, que foram denominados de "new variant" e que tinham como principal característica o acometimento de indivíduos muito jovens que ingeriam carne bovina regularmente.

O agente infeccioso

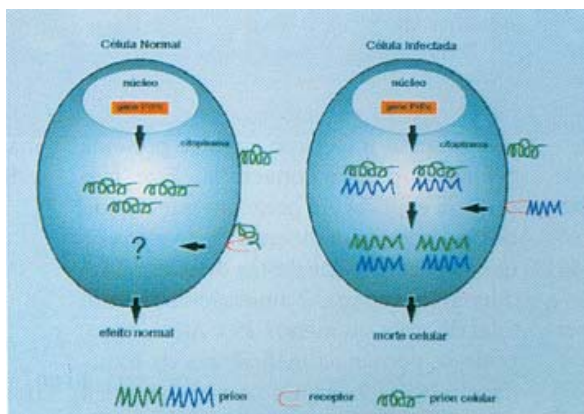
Mas, afinal, quem é o agente causador destas doenças neurodegenerativas? Tikvah e colaboradores, do Hammersmith Hospital de Londres, realizaram os primeiros estudos na tentativa de detectar a natureza do agente infeccioso. Eles sugeriram que este devia ser destituído de ácidos nucleicos (material responsável pela herança genética), já que o uso de agentes como a luz ultravioleta ou a radiação ionizante, que normalmente degradam estas moléculas, não tinha nenhum efeito sobre sua atividade infecciosa. Estes achados caracterizariam uma nova entidade de agente infeccioso, já que ele não poderia ser um vírus, uma bactéria ou qualquer outro parasita, pois todos estes organismos possuem material genético.

A descoberta da proteína prion celular

Em 1974, Stanley Prusiner e colaboradores iniciaram um árduo trabalho na tentativa de isolar e identificar este novo agente infeccioso. Usando cérebro de animais infectados por "scrapie", eles chegaram à mesma conclusão que Tikvah, ou seja, o uso de agentes que provocavam danos em material genético não reduziam a infectividade. Entretanto, processos que desnaturavam (inativavam) ou degradavam proteínas reduziam drasticamente a capacidade infecciosa. Convencido de que se tratava de uma nova classe de agentes infecciosos, Prusiner nomeou-os de "prions" (pronuncia-se em inglês como se lê em português), de "proteinaceous infectious particles".

Esta descoberta gerou muita controvérsia, já que era impossível imaginar como um agente infeccioso era capaz de se reproduzir na ausência de material genético. A possível quebra de um dogma da biologia molecular gerou grande divergência entre a comunidade científica na época.

Em 1984, Prusiner e Leroy Hood identificaram uma seqüência de 15 aminoácidos de uma das extremidades



Representação da expressão da proteína prion celular e sua interação com o receptor numa célula normal (esquerda), a função biológica desta interação é ainda desconhecida. No lado direito da figura está representado o mecanismo da infecção celular por prion a partir do receptor específico, este evento leva à morte celular.

da proteína prion. A construção de sondas de DNA que poderiam codificar estes aminoácidos permitiu que o grupo de Charles Weissman, na Universidade de Zurich, e Bruce Cheseboro, do NIH Rocky Mountain Laboratories, mostrassem independentemente que células de hamster e camundongo não-infectados possuem um gene que codifica a proteína prion, sendo esta então denominada prion celular. Trabalhos subseqüentes mostraram a presença deste gene em todos os mamíferos avaliados e também em aves. Interessantemente, este gene é bastante conservado ao longo da evolução, sugerindo que a proteína por ele codificada deve ter uma função biológica importante.

Já que o gene que codifica a proteína infecciosa está localizado em um dos cromossomos de todos os animais estudados, por que eles não desenvolvem a doença? A resposta inicial para esta pergunta veio da observação de Ronald Barry e Stanley Prusiner de que a proteína infecciosa era bastante resistente a enzimas celulares denominadas proteases. Entretanto, se o cérebro de animais não-infectados fosse submetido a este tratamento, a proteína prion celular desaparecia completamente. Estes dados sugeriam que o agente infeccioso era uma variante da proteína prion celular.

Vários estudos foram realizados na tentativa de detectar as diferenças entre as proteínas prion celular e infecciosa. A análise da seqüência de aminoácidos das duas proteínas mostrou uma identidade quase total, particularmente em quatro regiões da molécula que inclusive eram conservadas

entre diferentes espécies animais. O estudo da forma destas proteínas foi realizado independentemente por Keh-Ming Pan, trabalhando no laboratório de Stanley Prusiner, e por Fred Cohen. As quatro regiões muito conservadas da proteína prion celular têm a forma de uma alfa hélice (um tipo de espiral), enquanto que as mesmas regiões na molécula infecciosa têm a forma beta pregueada (como pregas num papel).

O mecanismo de infecção

A existência de diferentes formas para as duas proteínas levou à proposta de que o mecanismo de infecção era produtivo porque a proteína infecciosa era capaz de mudar a forma da proteína celular irreversivelmente. A infecção se propagava, portanto, à custa da contínua síntese de proteína celular. Esta proposta ficou mais estruturada quando Charles Weissman e colaboradores produziram um animal onde o gene que codifica a proteína prion celular havia sido deletado, e este, conseqüentemente, não sintetizava esta proteína (animal "knockout"). Estes animais eram totalmente resistentes à infecção, o que provava a total necessidade da proteína celular para que a infecção fosse produtiva. Além disso, Peter Lansbury e Byron Caughey mostraram que a proteína prion celular pode ser convertida na forma infecciosa em tubo de ensaio.

Estes achados explicam o processo infeccioso envolvido nas doenças provocadas por prions como o "scrapie", a "doença da vaca louca", o kuru e o CJD. Mas como a doença ocorre de forma hereditária? Vários grupos de pesquisadores estudaram pacientes com a forma herdada de CJD, GSS e Insônia Familiar Fatal, e mostraram que o gene que codifica a proteína prion celular apresentava mutações nestes indivíduos. Interessantemente, o aparecimento de doença envolvia sempre mutações que alteravam a seqüência de aminoácidos nas quatro regiões da molécula que formam a estrutura em hélice. Estes achados levaram os pesquisadores a concluir que estas alterações tornavam a molécula mais instável, podendo, num determinado momento, mudar irreversivelmente sua forma para a beta-pregueada. Isto dispararia um mecanismo lento de conversão de proteínas recém-sintetizadas, por isto a doença só apareceria tardiamente

(depois dos 60 anos).

Muitas perguntas ainda precisam ser respondidas. Uma delas relaciona-se a diferentes cepas (tipos) de prion. Sabe-se que o as moléculas infecciosas podem diferir quanto ao tempo de produção de doença, área do cérebro mais comprometida e diferentes sinais clínicos produzidos. Uma das propostas é que os prions pudessem adquirir múltiplas conformações e que cada uma delas pode estar relacionada com um fenótipo da doença.

Outra questão ainda não resolvida é o mecanismo pelo qual a proteína que tem a estrutura convertida de hélice para folha pregueada produz morte neuronal. Alguns relatos mostram que esta proteína é pouco solúvel e acaba formando aglomerados conhecidos como placas amilóides. Entretanto, já foram relatados casos de doenças produzidas por prion onde não se encontravam placas. A resposta para esta questão vem sendo procurada arduamente.

A barreira entre espécies no mecanismo de infecção

Um ponto bastante discutido nas doenças priônicas é a barreira da infecção entre espécies. No começo dos anos 60, Pattison descreveu a dificuldade de transmitir o agente "scrapie" de ovelhas para animais de laboratório (roedores). Mais tarde, M. Scott e Stanley Prusiner produziram camundongos transgênicos, isto é, com o gene de prion celular de hãms ter introduzido em suas células-ovo, de tal forma que o animal proveniente desta manipulação podia produzir a proteína prion celular de hãms ter, além da sua própria (camundongo). Os pesquisadores observavam que estes animais eram infectados com prion de hãms ter enquanto que o camundongo normal não o era, mostrando que a eficiência de transformação do prion celular pelo prion é muito mais produtiva se ambos forem da mesma espécie. Entretanto, possíveis casos de contaminação entre espécies diferentes, como o a aquisição da "doença da vaca louca" pelo gado bovino após a ingestão de ração contaminada com o "scrapie" ou ainda a possível contaminação do homem pelo gado, envolveriam uma quebra nesta barreira.

Uma das hipóteses para explicar a quebra da barreira entre espécies é a homologia na seqüência de aminoácidos da proteína infecciosa com

a proteína celular que será convertida. Este fato poderia explicar em parte por que o gado bovino adquiriu a doença de ovelhas, já que o prion celular destas duas espécies diferem em apenas 7 aminoácidos de um total de mais ou menos 250. Além disso, pode-se pensar na ineficiência da transmissão do gado para o homem, já que a proteína destas espécies diferem em pelo menos 30 aminoácidos. A partir de resultados obtidos por G. Telling, usando camundongos transgênicos para o gene que codifica a proteína humana, foi mostrado que a conservação de aminoácidos em regiões particulares da molécula de prion celular é o fator mais importante para a quebra da barreira entre espécies.

A existência de um receptor celular responsável pela internalização do prion celular e do infeccioso

Uma das perguntas que ainda existiam e que foi recentemente respondida pelo nosso grupo é o mecanismo usado pelo prion para entrar na célula. A membrana celular é uma barreira para fatores externos, e tudo que entra na célula normalmente o faz seguindo algumas regras. As moléculas que entram na célula (ligantes) funcionam como uma chave que deve encontrar uma fechadura específica (receptor) para que "a porta seja aberta".

Sabia-se que a conversão da proteína celular na forma infecciosa ocorre dentro da célula, em compartimentos chamados lisossomos. Portanto, supunha-se que a molécula infecciosa deveria reconhecer um receptor na superfície da célula que permitisse sua entrada. Nosso grupo publicou em dezembro do ano passado (Nature Medicine) um artigo mostrando a existência da proteína receptora de prion em cérebro de mamíferos. O bloqueio desta proteína inibia o efeito tóxico de um fragmento de prion em cultura de células neuronais. Portanto, este receptor deve funcionar como mediador dos efeitos do agente infeccioso. O conhecimento da identidade desta proteína pode ser muito útil na tentativa de identificar drogas que impeçam a infecção.

Há dados da literatura que mostram que o prion celular, normalmente localizado na superfície externa da célula, é internalizado. Havia propostas sugerindo a necessidade de uma proteína que o conectasse com a face

interna da célula. No nosso trabalho determinamos que a proteína receptora de prion caracterizada também liga prion celular. Portanto, este receptor deve mediar funções normais da célula em que o prion celular está envolvido.

A função fisiológica ainda desconhecida do prion celular

Uma abordagem bastante utilizada nos últimos anos para estudar a função de uma proteína é deletar seu gene codificador em células-ovo (animais "knockout"). A partir daí, avalia-se o que acontece com o fenótipo do animal resultante desta manipulação. Como já foi discutido anteriormente, animais "knockout" para prion celular não são passíveis de infecção por prion. Mas para que serve normalmente a proteína prion celular que está presente em grandes quantidades e com grande similaridade no cérebro de todos os mamíferos e aves?

Um trabalho inicial feito pelo grupo de C. Weissman com animais "knockout" para o gene codificador de prion celular mostrou que eles não apresentam nenhuma alteração fenotípica importante. Entretanto, alguns resultados bastante relevantes foram observados com estes animais durante o envelhecimento. Collinge e colaboradores mostraram que estes animais têm alteração num sinal eletrofisiológico denominado LTP "Long Term Potentiation". Esta medida está muito correlacionada, em animais, com a memória a longo prazo. Além disso, Sakaguchi e colaboradores mostraram que estes animais apresentam alterações de coordenação motora, dada provavelmente por uma diminuição de um tipo de neurônio encontrado no cerebelo, denominado célula de Purkinje.

Do ponto de vista da função normal de prion celular, nossa proposta é que o receptor por nós caracterizado desempenhe um papel vital na mediação de um sinal celular que modulará respostas biológicas específicas. Portanto, é possível ainda especular que doenças conhecidas como relacionadas ao prion podem ser causadas na verdade por alterações na proteína receptora.

Desta forma, muitos estudos ainda serão necessários para que se conheça mais a respeito do mecanismo de infecção por prion, função de prion celular e participação do receptor nos dois processos.