

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



G.J.M. Cabrita

BioEngineering Research Group, Instituto Superior Técnico
Universidade Técnica de Lisboa

Editado por: Rui Gomes

Introdução

À primeira vista, tudo parecia normal. O rebanho pastava calmamente no prado, despreocupadamente guardado pelo seu pastor. No entanto, ocasionalmente algumas das ovelhas começaram a tornar-se mais irritadiças, mais rebeldes, mais difíceis de controlar. Gradualmente, com o passar dos dias algumas destas começavam a perder peso apesar de continuarem com apetite, e muitas começavam a roçar-se contra postes, paredes, árvores, como se lhes estivesse a crescer um prurido por todo o corpo, concentrado na cabeça e na cauda.

Os animais afectados por esta estranha “comichão” começaram então a tornar-se cada vez mais nervosos e agressivos, afastando-se do resto do rebanho. Iniciavam a apresentar “tremores” e “tiques” ou espasmos se fossem assustados, e perdiam bastante lã devido ao constante e incontrolável coçar e roçar, chegando ao ponto de apresentar feridas. Eventualmente, mordiscavam-



Figura 1: ovelha com sintomas de *scrapie* (imagem cedida pelo Dr. C. Kimberling, CVMBS, CSU, EUA).

se nos membros, tentando desesperadamente aliviar a sensação de prurido que as dominava.

Semanas depois, os animais atingidos tinham todos emagrecido (Fig. 1), e enquanto alguns animais pareciam ter chegado a um nível de exaustão, hesitando e vacilando muito ao caminhar, outros aparentavam ter enlouquecido, bamboleando-se ou saltitando ocasionalmente. Cada vez mais caíam num estado de apatia, como que a definharem.

Passados seis meses desde os primeiros sinais,

todos os animais tinham sucumbido à misteriosa doença, a inglesa *scrapie* (*to scrape*, raspar, arranhar), a *tremblante* (tremura) francesa, a *traberkrankheit* (doença do trote) alemã, a *rida* (tremor) islandesa, sendo estes os países principais onde a doença tem sido observada. Quando se examinaram ao microscópio amostras do seu tecido cerebral, estas apresentavam um aspecto de esponja (daí a designação científica de encefalopatia espongiforme), com agregados característicos de uma proteína peculiar, denominada prião.

História das encefalopatias espongiformes

A história das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE, *transmissible spongiform encephalopathies*) é já velha de pelo menos três séculos (revista em [1]). Data de 1732 a primeira referência em Inglaterra a uma doença que afectava as ovelhas, embora ainda não fosse referida como *scrapie* [2]. O comércio de lã era de tal modo importante na economia inglesa que inclusivamente ocorreu em 1755 uma discussão no parlamento acerca dos efeitos económicos desta doença fatal e contagiosa em ovinos, a salientar a necessidade de o governo ter de tomar medidas [3]. Também na Alemanha de 1759 surge uma referência a este mal das ovelhas [4], mencionando que a doença é contagiosa e incurável, sendo a melhor solução eliminar todos os animais que sofram dela, entregando-os para consumo aos servos do senhor das terras! Só para o final do séc. XVIII começa a ser mencionada em Inglaterra uma doença de nome ‘*the rubs*’ ou ‘*the rubbers*’ (*to rub*, esfregar), em alusão aos animais que se esfregavam até à morte, enquanto a primeira referência ao nome *scrapie* data já de 1853 [5], mais de um século depois da referência inicial à doença, designação esta a que se utiliza actualmente.

É já em 1865 que é feita a primeira recomendação (feita pelo químico alemão Justus Liebig) para a utilização de subprodutos do matadouro como suplemento na alimentação suína, sendo a sua implementação já efectiva no final daquele século também na alimentação bovina [5]. As consequências desta recomendação só muito mais tarde viriam a revelar os seus efeitos. Curiosamente, em 1883 é publicado em França um relato de uma vaca com sintomas de *tremblante* ocorrido em 1881 [6]. Não é mencionada nenhuma hipótese quanto às possíveis origens da doença, e mais uma vez é aconselhado o abate do animal e a venda da sua carne de qualidade inferior a baixo preço...

As observações de encefalopatias espongiformes em humanos ocorreram já no séc. XX (revisto em [7]), sendo descritos em 1920-1921 os primeiros seis casos de uma patologia que viria a ser conhecida por doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD, *Creutzfeldt-Jakob disease*) [8, 9], embora

actualmente se tenha verificado que apenas dois destes casos correspondiam verdadeiramente a CJD. Esta doença caracterizava-se por uma demência e deterioração do sistema motor progressivos e de rápido desenvolvimento, levando à morte. Um exame ao tecido cerebral revelava um aspecto esponjoso. De qualquer modo, esta doença rara não parecia contagiosa e não chamou muito a atenção. Pouco tempo depois, entre 1924 e 1936 são descritos casos de CJD em membros de uma mesma família que tomam a denominação de CJD familiar (fCJD) [10], e de síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), [11], devido à sua característica de serem transmissíveis hereditariamente. Entretanto, é de notar que também por esta altura Cuillè e Chelle demonstram que a *scrapie* das ovelhas é infecciosa e inoculável, concentrando-se o agente patogénico no sistema nervoso com um período de incubação longo, de 14 a 22 meses [12].

Em 1957 surge o primeiro relato da doença da “morte risonha”, uma estranha patologia também conhecida como *kuru*. Esta restringia-se a uma tribo indígena de cerca de 15.000 membros da Papua Nova-Guiné, que tinha como prática ritual o canibalismo dos seus mortos como modo de honrar os familiares desaparecidos. Os membros afectados pela doença sofriam de ataxia¹, tremores progressivos e ocasionalmente risos espasmódicos, que precediam a morte. Depois de examinado, o tecido cerebral apresentava o famoso aspecto esponjoso [13], tornando-se evidentes as semelhanças entre a *scrapie* e o *kuru*, de modo que dois anos mais tarde Hadlow associa as patologias [14], enquanto Klatzo nota a semelhança entre o *kuru* e a CJD [15], sugerindo uma origem comum para todas estas doenças.

Os desenvolvimentos lógicos seguiram-se pouco tempo depois: se a *scrapie* era transmissível, então seria possível que também a CJD e o *kuru* o fossem? Efectivamente, isto veio a demonstrar-se em 1966 para o *kuru* [16] e dois anos depois para a CJD [17]. Já na década de 70 veio a demonstrar-se que a CJD familiar também era transmissível [18], o mesmo sucedendo para o GSS em 1981 [19]. Ainda em 1974 surge mais uma demonstração da infecciosidade da CJD, com a primeira suspeita de transmissão iatrogénica², resultante de um transplante de córnea [20].

1986 é o ano em que se registam no Reino Unido os primeiros casos de encefalopatia espongiforme bovina (BSE, *bovine spongiform encephalopathy*) [21], a patologia vulgarmente conhecida como “doença das vacas loucas”. Mais uma vez os cérebros dos bovinos apresentam a característica morfologia devida à vesiculação neuronal, em conjunto com sintomas de nervosismo, elevada reactividade a estímulos externos e ataxia [21]. É também neste ano que se descreve pela

¹ Falta de coordenação motora.

² Alteração patológica provocada por procedimento médico.

primeira vez mais uma encefalopatia denominada insónia familiar fatal (FFI, *fatal familial insomnia*) [22], que também se veio a revelar uma doença hereditária [23].

Dez anos depois é assinalado, também no Reino Unido, o aparecimento de uma nova variante da CJD (vCJD), que se supõe ser devida a contágio por ingestão de carne proveniente de bovinos contaminados com BSE [24], hipótese que virá a ser confirmada nos anos seguintes [25-29].

Desta breve cronologia ressaltam algumas questões: qual o agente patogénico destas doenças? Como pode ser simultaneamente hereditário e contagioso? Como se transmite? Como se pode detectar? Como se previne o contágio? Existem alguns tratamentos?

Biologia Molecular

Já antes da demonstração experimental da transmissibilidade da *scrapie* [12] e das encefalopatias espongiformes humanas [16-19] se sabia que a característica histopatológica comum a todas estas doenças era uma vacuolização evidente do tecido cerebral, responsável pela aparência espongiforme. Além disso, em 1981 observou-se pela primeira vez que umas estruturas fibrilares estavam sempre presentes em tecidos cerebrais de animais afectados de *scrapie* [30], que assim se denominaram de fibrilas associadas à *scrapie* (SAF, *scrapie associated fibrils*). Mas qual a causa destas alterações?

As teorias do agente biológico

A primeira proposta de agente infeccioso veio do islandês Sigurdsson [31], que o definiu como “vírus lento” baseando-se nas observações de que o agente responsável pela *rida* das ovelhas era filtrável e apresentava um longo período de incubação. No entanto, embora esta denominação provisória pretendesse apenas descrever em termos genéricos a etiologia da doença, o seu uso repetido ao longo dos anos acabou por conferir-lhe um carácter literal que não era inicialmente pretendido. A favor da hipótese de um agente de origem biológica contribuíram as observações de que a doença é transmissível, que o agente é auto-replicável, que existem barreiras de espécie³ e que há variações nos sintomas da doença para estirpes diferentes dos agentes infecciosos.

³ Restrições à propagação da infecção entre duas espécies diferentes.

Foi ainda nos anos sessenta que se começaram a dar os primeiros passos no sentido de tentar definir a natureza do agente infeccioso. O que se sabia era que este agente era de dimensões particularmente reduzidas [32], e muitas vezes era referido como partícula de tipo viral (*virus-like particle*), ou mesmo como um vírus.

Entre as primeiras propostas para a identidade do agente conta-se a do viróide⁴ [33, 34], que tinha sido descoberto pouco tempo antes. No entanto, em breve esta teoria viria a ser abandonada devido ao facto de estudos de infectividade de extractos de ácidos nucleicos de cérebro de ratos infectados com *scrapie* [35], e de inactivação de viróides [36] mostrarem que o agente infeccioso não exibía propriedades de infectividade correspondentes às de um viróide. Uma variante da teoria anterior consiste na hipótese do virino⁵ [37], na qual o seu genoma interferiria com a agregação de proteínas do hospedeiro. Embora ainda não tenha sido completamente refutada, esta teoria nunca teve comprovação experimental.

Poder-se-ia considerar a teoria do nemavírus⁶ [38] como um refinamento da teoria do virino, mas no entanto surgiu independentemente [39]. Essencialmente baseada no facto de se observarem sempre SAFs em tecidos cerebrais infectados com TSEs, esta teoria defende que as SAFs (constituídas por priões) se encontram no interior dos nemavírus (Fig. 2), sendo rodeadas por DNA de cadeia simples, que por sua vez seria rodeado por uma camada externa de proteína viral [40]. Embora o defensor desta teoria pretenda ter conseguido isolar um ssDNA de 1,2 kb [39], consistindo numa repetição do palíndromo (TACGTA)_n, iniciado por TATATA [41], estes resultados nunca foram reproduzidos por nenhum outro grupo. Embora o promotor desta teoria afirme ter conseguido transmitir a doença a hamsters utilizando este DNA [42], outros estudos indicam que as TFP não parecem ser específicas das TSE [43].

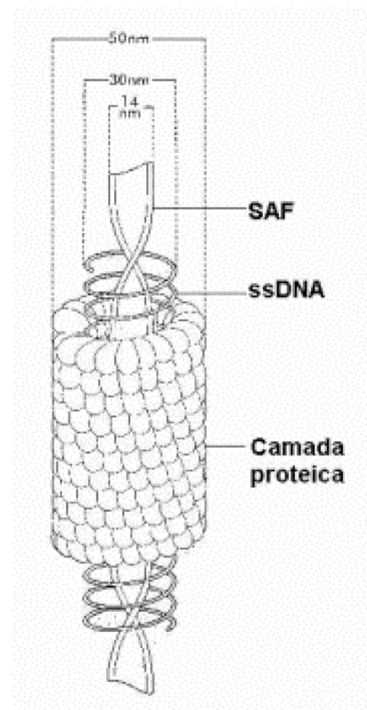


Figura 2: estrutura hipotética de um nemavírus (esquema cedido pelo Dr. H. Narang, Ken Bell Int., Reino Unido).

⁴ Um viróide é uma molécula de RNA circular sem cápsula protectora de proteína, cuja sequência não codifica proteínas.

⁵ Um virino seria uma molécula de ácidos nucleicos protegida por uma cápsula de proteínas codificadas pelo hospedeiro.

⁶ Os nemavírus (do grego *nema*, filamento, e do latim *virus*, veneno) seriam vírus filamentosos (NVP, *nemavirus particles*), também conhecidos por partículas tubulofilamentosas (TFP, *tubulofilamentous particles*).

Outra proposta pretende que o agente responsável seja um retrovírus [44, 45], baseada essencialmente em analogias entre mecanismos de transformação oncogénica entre o agente da *scrapie* e retrovírus [44] e na detecção de RNA potencialmente retroviral em cérebros infectados com CJD [46, 47]. No entanto, mais uma vez as provas para esta teoria são circunstanciais, além de que o agente se tem mostrado resistente a tratamentos de inactivação de retrovírus, e de as infecções retrovirais não produzirem lesões semelhantes às das TSEs.

A teoria do espiroplasma⁷ também surgiu devido à semelhança morfológica entre aquilo que se viria a denominar de SAFs e os espiroplasmas (Fig. 3) [49]. Mais uma vez, as inclusões observadas

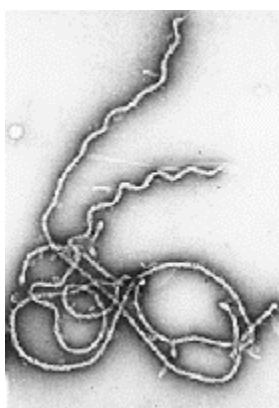


Figura 3: microscopia electrónica de um espiroplasma (www.mad-cow.org).

em células da córnea de coelhos injectados com espiroplasmas são semelhantes às provocadas pelas TSEs [50], além de produzirem vacuolizações semelhantes às destas [51]. Entre outros indícios a contribuírem para esta teoria contam-se a característica de os espiroplasmas apresentarem neurotropismo, serem comparativamente resistentes a agentes desinfectantes, e poderem transformar malignamente as células que infectam [52]. Mas o facto de ainda ninguém ter conseguido detectar a presença de DNA de espiroplasma em tecidos infectados por TSEs não permite que esta hipótese seja validada.

Digna de nota é também a hipótese de que as placas amilóides⁸ observadas nas TSEs sejam o resultado dos efeitos de um vírus ao invés do próprio agente, que já teria desaparecido na altura em que se começam a observar os sinais clínicos [53]. No entanto, nem sempre estas placas se acumulam ao longo de uma infecção...

Em suma, as várias tentativas de atribuição do agente causador das TSEs a um organismo biológico têm sempre como ponto forte poderem explicar mais facilmente a existência de estirpes da doença e o seu contágio através de agentes “convencionais”, mas falham quando se trata de isolar material genético ou de explicar a transmissibilidade por via hereditária. Mas existirá realmente material genético no agente das TSEs?

⁷ Os espiroplasmas são bactérias semelhantes aos micoplasmas, de tamanho muito reduzido (0,3-0,5µm) e sem parede celular, que infectam essencialmente plantas e insectos [48].

⁸ As placas amilóides designam genericamente a acumulação de proteína no exterior das células nervosas. No caso da doença de Alzheimer (onde são mais conhecidas, e onde foram descritas pela primeira vez), a proteína designa-se amiloide, não por ser quimicamente semelhante ao amido mas devido à sua semelhança morfológica. Nas doenças de priões a proteína acumulada é a PrP, como se verá adiante.

Inativação de DNA vs. Proteína

Um primeiro indício de que o agente das TSEs não parecia conter ácidos nucleicos surgiu em 1967 com estudos de inativação de microorganismos [54], nos quais se demonstrou que níveis de radiação UV que inativam a bactéria altamente resistente *Micrococcus radiodurans*, ou até bacteriófagos, não surtem qualquer efeito no agente das TSEs. Pouco tempo antes também já se tinha constatado a resistência deste agente ao formaldeído [55], uma conhecida substância desinfetante. Começam então a ser feitas as primeiras sugestões acerca da natureza puramente proteica do agente [54, 56, 57]. Esta teoria começa a ganhar forma quando se descobrem as SAFs [30], que parecem ser essencialmente constituídas por proteína [58, 59]. Entretanto, mais estudos de inativação do agente [36] parecem mostrar que este não é um víróide, pois resiste a tratamentos que inativam ácidos nucleicos; a sua sensibilidade a tratamentos que desnaturam proteínas virá a originar o termo prião (*prion, proteinaceous infectious particle*) [60], para a definição deste novo agente infeccioso. No entanto, paradoxalmente continuam a surgir estudos de inativação que defendem a natureza viral do agente [61], ao mesmo tempo que outros defendem a sua natureza proteica [62-64]. Um dos estudos mais recentes aponta para uma resistência do agente das TSEs a temperaturas da ordem dos 600°C [65]...

Organismo vs. Prião

Afinal, o agente é um organismo ou uma proteína? Em 1982, numa tentativa de purificar as SAFs, o grupo de Prusiner consegue isolar e caracterizar um possível agente infeccioso a partir de cérebros infectados com *scrapie* [66]. As análises revelam ser maioritariamente (ou mesmo unicamente) composto por uma proteína, a proteína priónica (PrP). Alguns anos mais tarde, descobre-se que esta proteína é codificada pelo hospedeiro e não por um agente externo [67, 68], e

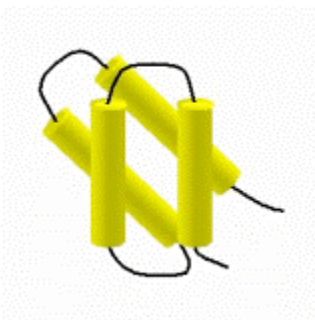


Figura 4: Esquema da PrP^C.

o gene correspondente é denominado de *Prnp* (vindo a reconhecer-se mais tarde [69] que este gene já tinha sido identificado em 1970 e denominado *Sinc*, dado estar relacionado com o período de incubação da *scrapie* [70]). Mais ainda: a mesma proteína, com exactamente a mesma sequência, encontra-se presente tanto em animais saudáveis como em doentes [71]...

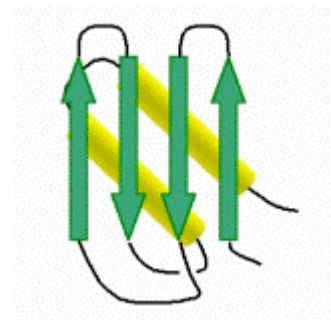


Figura 5: Esquema da PrP^{Sc}.

No entanto, enquanto a proteína “saudável” (denominada PrP^C, prião celular, ou PrP^{sen}, prião

sensível à proteólise, Fig. 4) é solúvel em água e de estrutura predominantemente em hélices α , a proteína “infecciosa” (denominada de PrP^{Sc}, prião da *scrapie*, ou PrP^{res}, prião resistente à proteólise, Fig. 5) é insolúvel, apresentando alguma percentagem de folhas β . É esta última PrP^{Sc} que se acumula nos cérebros das vítimas de TSEs, não tendo sido detectada a sua existência em cérebros saudáveis.

O que se sabe da PrP humana é que é uma glicoproteína com cerca de 250 aminoácidos que se encontra em níveis mais elevados nas membranas de células neuronais, mas apresentando-se também em níveis mais reduzidos em muitos outros tecidos. Está ancorada à superfície celular por meio de uma ponte de glico-fosfatidil inositol, e embora não se conheça ainda a sua função, pensa-se que esteja relacionada com a transmissão sináptica [72], além de parecer estar envolvida na fixação de cobre [73]. No entanto, a sua presença não é essencial, dado que ratos *knock-out* para o gene *Prnp* sobrevivem praticamente sem problemas [74]. Outros estudos mostram que estes ratos são imunes à infecção com *scrapie* [75, 76], o que revela que a PrP é necessária para o aparecimento das TSEs. Mais estudos com ratos transgénicos apoiam o conceito de prião, pois apesar de ratos normais serem dificilmente infectados com *scrapie* de hamsters, ratos nos quais se insere o gene para o prião do hamster tornam-se sensíveis àquela infecção [77].

Entretanto, também se sabe que as TSEs humanas, em alguns casos de CJD e em todos os casos de fCJD, GSS e FFI, estão associadas a mutações no gene *Prnp* (revisto em [78]). E ratos transgénicos com uma mutação análoga a uma mutação pontual que causa GSS em humanos também desenvolvem a doença sem necessidade de inoculação [79], tornando-se inclusivamente os seus tecidos cerebrais algo contagiosos.

Mas como é que a PrP^C se transforma na PrP^{Sc}?

(Continua no próximo número)