

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR
(PrP_c) NA RETINA HUMANA**

ROBERTA MARTINS DA SILVA COSTA

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA MARTINS DA SILVA COSTA

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR
(PrPc) NA RETINA HUMANA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Medicina.

Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Ribeirão Preto

2007

RESUMO

Prion celular é uma proteína constituinte da membrana celular de várias espécies de mamíferos que está presente em diversos tecidos, predominantemente no tecido nervoso. Esta proteína pode se converter em uma isoforma a partir de modificações na sua estrutura secundária e terciária, tornando-se insolúvel em detergentes, resistente a proteases e com tendência a formar agregados (amilóides). A presença desta isoforma modificada ou prion scrapie (PrPsc) nos tecidos induz outras proteínas normais a adquirirem esta nova conformação desencadeando-se uma reação em cascata que leva ao desenvolvimento das encefalopatias espongiformes, uma doença invariavelmente fatal na qual ocorre gliose e vacuolização neuronal. A identificação da presença e localização do PrPc nos diversos tecidos é importante para auxiliar no esclarecimento de suas funções e da fisiopatologia das encefalopatias espongiformes. No presente trabalho foram verificados através dos métodos de imunohistoquímica e western blot, a presença e localização da proteína prion celular na retina humana e no nervo óptico. Trinta olhos de vinte e três doadores foram analisados por imunohistoquímica e um olho pelo método de Western blot utilizando-se três anticorpos diferentes (8G8, 3F4 e policlonal). Nove recuperações antigênicas foram testadas para se obter a melhor marcação possível nos tecidos estudados. Na imunohistoquímica houve marcação em todas as camadas da retina e no nervo óptico com os três anticorpos testados, mas esta foi mais intensa nas camadas nuclear interna e externa e na camada de células ganglionares. Evidenciou-se uma linha com marcação muito intensa em toda a extensão da camada plexiforme externa, adjacente à camada nuclear interna, onde ocorrem as sinapses entre os

fotorreceptores e os neurônios de primeira ordem. O método de Western Blot confirmou a presença da proteína na retina. Foi demonstrado que a proteína prion celular está presente na retina humana e no nervo óptico. Apesar de estar presente em todas as camadas dos tecidos analisados, o predomínio da proteína na região sináptica da retina, corrobora a hipótese de que a proteína desempenhe um papel importante nas sinapses.

Descritores: prion, PrP^c, PrP^{sc}, retina, encefalopatias espongiformes, imunohistoquímica, western blot.

ABSTRACT

Prion cellular protein (PrP^c) is a sialoglycoprotein anchored to the cell surface, highly expressed in the brain. The PrP^c scrapie isoform (PrP^{sc}), a protease-resistant and detergent insoluble protein, arrives from conformational changes of PrP^c induced by the presence of this misfolded protein. The accumulation of PrP^{sc} in the central nervous system can cause transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Although it is well known that the transmission of TSE is possible through ocular pathways, the literature is lacking in information about the expression of PrP^c in normal human eye tissues. The purpose of this study was to verify the presence and localization of PrP^c in normal human retina. In the present study thirty eyes from twenty-three cornea donors were analyzed by immunohistochemistry and one eye by Western blotting using three different antibodies anti- PrP^c (8G8, 3F4 and a non- commercial polyclonal mouse antibody). Seven pre-treatment to antigen retrieval were tested to find the best immunostaining. PrP^c was detected in all retinal layers and in the optic nerve, with intense labeling in the inner nuclear layer, outer nuclear layer and ganglion cell layer. There was a stronger staining in the synaptic region of the outer plexiform layer. Western blot analysis assessed the presence of PrP^c in the retina. The presence of cellular prion protein in human retina an optic nerve adds information about the transmission of TSE through ocular pathways. Although the protein is present in all retinal layers in diverse cell types, its accumulation in synaptic regions suggests that it may have a role in synaptic function.

Keywords: prion, PrP^c, PrP^{sc}, retina, transmissible spongiform encephalopathies, immunohistochemistry, western blot.

LISTA DE ABREVIATURAS

- APS - Ammonium persulphate (persulfato de amônio)
- BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
- BSE - Bovine spongiform encephalopathy (encefalopatia espongiforme bovina)
- CCG - camada de células ganglionares
- CF - camada de fotorreceptores
- CFN - camada de fibras nervosas
- CJD - Creutzfeldt-Jacob disease (doença de Creutzfeldt-Jacob)
- CNE - camada nuclear externa
- CNI - camada nuclear interna
- CPE - camada plexiforme externa
- CP I - camada plexiforme interna
- CWD - Chronic wasting disease (doença consuptiva crônica)
- EDTA - EthyleneDiamineTetrAcetic acid.(ácido etilenodiamino tetra-acético)
- EET - encefalopatias espongiformes transmissíveis
- EPR - epitélio pigmentar da retina
- Gly - glicina
- GSS - Gerstmann Sträussler-Scheinker Syndrome (syndrome de Gerstmann Sträussler-Scheinker)
- HCL - ácido clorídrico
- IFF- insônia familiar fatal
- kDa- kilodalton
- MgCl₂- cloreto de magnésio
- MHP - membrana hialóide posterior

MLE - membrana limitante externa

MLI - membrana limitante interna

MW - low range protein weight standard (padrão de peso de proteínas de baixo peso)

NaCl - cloreto de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

NBT - azul nitro-tetrazóico

PBS - Phosphate Buffered Saline (solução tampão de fosfato)

PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenilmetil sulfonil)

PRNP - gene que codifica a proteína prion celular

PrPc - Prion celular

PrPsc - Prion scrapie

SDS - [sodium dodecyl sulfate](#) (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE - [sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis](#)

SNC - sistema nervoso central

TME - Transmissible mink encephalopathy (encefalopatia transmissível de martas)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho esquemático da proteína prion celular.	14
Figura 2. Modelo da proteína Prion celular indicando as posições dos carboidratos, os domínios formados por α -hélices e a âncora de GPI.	16
Figura 3. Mutações patogênicas e variações polimórficas da proteína prion celular humana.	18
Figura 4. Ilustração das camadas da retina mostrando suas principais células.	43
Figura 5. Immunolocalização do PrP ^c na retina humana. Comparação das marcações utilizando três anticorpos diferentes.	55
Figura 6. Immunolocalização do PrP ^c na retina humana e no nervo óptico utilizando-se o anticorpo 8G8.	56
Figura 7. Western blot para PrP ^c na retina humana.	58

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1.1 PRION	1
1.1.1 Histórico	1
1.1.2 Estrutura e função	3
1.1.3 Encefalopatias espongiformes	9
1.1.3.1 Encefalopatias espongiformes em animais	11
1.1.3.2 Encefalopatias espongiformes no homem	15
1.2 A RETINA HUMANA	26
1.2.1 Anatomia	26
1.2.2 Histologia	27
1.2.2.1 Epitélio Pigmentado da Retina	27
1.2.2.2 Camada de Fotorreceptores	28
1.2.2.3 Membrana Limitante Externa	29
1.2.2.4 Camada Nuclear Externa	29
1.2.2.5 Camada Plexiforme Externa	29
1.2.2.6 Camada Nuclear Interna	30
1.2.2.7 Camada Plexiforme Interna	31
1.2.2.8 Camada de Células Ganglionares	31
1.2.2.9 Camada de Fibras Nervosas	31
1.2.2.10 Membrana Limitante Interna	32
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 FONTES DE TECIDOS	35
4.1.1 Olhos	35
4.1.2 Retinas	35
4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	35
4.2.1 Imunohistoquímica para PrPc	36
4.2.1.1 Desparafinização	36
4.2.1.2 Bloqueio da peroxidase endógena	36
4.2.1.3 Recuperação antigênica	36
4.2.1.4 Bloqueio de sítios de ligação inespecífica	37
4.2.1.5 Ligação com o anticorpo primário	37
4.2.1.6 Bloqueio da biotina endógena	38
4.2.1.7 Ligação com o anticorpo secundário	38
4.2.1.8 Revelação	38
4.3 WESTERN BLOT	38
4.3.1 Western blot para PrPc	39
4.3.1.1 Preparação do homogeneizado de retina	39
4.3.1.2 Eletroforese de amostras de retinas sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)	39
4.3.1.3 Eletrotransferência	40
4.3.1.4 Detecção da proteína PrPc na membrana de nitrocelulose	41
5. RESULTADOS	42
5.1 IMUNOLocalização da proteína prion celular na retina humana	42
5.2 WESTERN BLOT	45
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIAS	52
9. ANEXOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Prion

1.1.1 Histórico

As doenças priônicas ou encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) compreendem um grupo de condições neurodegenerativas invariavelmente fatais, que podem afetar várias espécies de mamíferos, incluindo o homem.¹ Podem se apresentar como desordens genéticas, infecciosas ou esporádicas e todas elas se desenvolvem a partir da presença da isoforma alterada da proteína prion celular (PrP_c), uma proteína que se encontra naturalmente ligada à membrana celular. Esta isoforma alterada, denominada PrP_{sc}, acumula-se no sistema nervoso dos organismos afetados levando à degeneração tecidual e perda funcional.¹ O termo PrP_{sc} originou-se a partir de *scrapie*, uma doença cujo nome científico é paraplexia enzoótica dos ovinos e que ocorria naturalmente em rebanhos de ovinos e caprinos na Europa há mais de 200 anos. Data de 1732 a primeira referência na Inglaterra a uma doença que afetava as ovelhas, embora naquela época ainda não fosse referida como *scrapie*. No final do século XVIII é mencionada uma doença de nome *the rubs* ou *the rubbers* (do inglês *to rub*, esfregar), em alusão aos animais que se esfregavam até à morte; enquanto a primeira referência ao nome *scrapie*, utilizado atualmente, data de 1853, mais de um século depois da referência inicial à doença. O termo *scrapie* é derivado do verbo *to scrape* que significa raspar, arranhar e foi introduzido devido ao constante e incontrolável roçar e coçar dos animais acometidos pela doença, chegando ao ponto de se desenvolverem feridas nos mesmos.²

Apesar da carência de dados epidemiológicos, sabe-se que esta doença é comum em alguns países da Europa, mas sua rota natural de transmissão não é conhecida. Sua transmissibilidade foi demonstrada experimentalmente em 1936 por Cuillé e Chelle através de inoculação de tecido nervoso proveniente de ovelhas infectadas com *scrapie* em animais sadios, sendo mais tarde comprovada quando 1800 ovelhas contraíram a doença ao receberem uma vacina contaminada.³ Em 1954 Bjorn Sigurdsson considerou que a doença fosse de etiologia viral e o termo *Slow virus* foi proposto. Cinco anos mais tarde, Willian Hadlow, estudando uma epidemia de doença neurodegenerativa em uma tribo isolada em regiões montanhosas da Nova Guiné, sugeriu que sua etiologia fosse similar à do *scrapie*. A doença encontrada nesta tribo era denominada *Kuru*, que significa tremer na linguagem nativa e era caracterizada principalmente por ataxia e tremores progressivos e ocasionalmente risos espasmódicos, que precediam a morte.⁴ Trabalhos subseqüentes mostraram que a transmissão da doença ocorria através de rituais de canibalismo, que eram freqüentes nesta tribo e cuja suspensão levou ao controle da epidemia.⁴ A transmissibilidade da *Kuru* foi demonstrada sete anos mais tarde por Gajdusek através da inoculação de homogeneizados de cérebro infectado em chipanzés.⁵ Assim como Hadlow fez a associação entre *scrapie* e *Kuru*, Igor Klatzo fez uma associação similar entre *Kuru* e Creutzfeldt-Jacob *disease* (CJD), uma doença de caráter familiar, ambos baseados nas similaridades das alterações neuropatológicas presentes nessas doenças, que se caracterizavam por degeneração espongiiforme e gliose astrocítica.¹ Em 1968 a transmissibilidade da CJD foi demonstrada por Gibbs e em 1981 uma outra doença neurodegenerativa denominada Gerstmann Sträussler-Scheinker *Syndrome* (GSS) também se mostrou transmissível,

compondo-se assim um grupo de demências transmissíveis e reforçando teoria de uma etiologia viral.⁵

A natureza do agente etiológico nas encefalopatias espongiformes foi alvo de estudos por vários anos e a proposta inicial de uma possível etiologia viral tornou-se pouco provável pela demonstração de que a infectividade do agente era reduzida por procedimentos capazes de hidrolisar ou modificar proteínas (digestão por proteases), mas era resistente a procedimentos que alteravam ácidos nucleicos (radiação ultravioleta e ionizante, tratamento com nucleases). Outra evidência contra uma etiologia viral era a ausência de resposta imunológica nos organismos infectados.¹ Entre 1966 e 1967, alguns pesquisadores sugeriram que o agente transmissível seria desprovido de ácido nucleico e seria composto apenas por proteína.⁶ Estudos posteriores resultaram no isolamento de uma sialoglicoproteína protease resistente que foi identificada como o principal constituinte da fração infecciosa dos tecidos neurais comprometidos e o termo prion (derivado de *proteinaceous infectious only*) foi proposto por Prusiner para designar esta partícula infecciosa protéica.⁷ A descoberta desta nova forma de agente patogênico rendeu ao pesquisador o prêmio Nobel de Medicina em 1997.¹

1.1.2 Estrutura e função

Prions são proteínas que, ao sofrerem modificações em sua conformação, tornam-se capazes de modificar novas proteínas semelhantes, induzindo essas novas proteínas a adquirirem a mesma conformação alterada.⁸ Já foram descritos vários tipos de prions em fungos e acredita-se que este tipo de fenômeno seja comum na natureza e nem sempre apresenta danos ao organismo em que ocorre.⁹ No que se refere às encefalopatias espongiformes, os prions agem como

partículas infecciosas. Estas partículas são únicas na prática médica porque, ao contrário de outros agentes infecciosos tais como bactérias, vírus e fungos, são constituídas apenas de uma cadeia protéica e não carregam nenhuma informação genética, uma vez que são desprovidas de ácido nucléico. Nos mamíferos, através deste mecanismo inteiramente novo, o PrPsc ao entrar em contato com tecidos que contenham o prion celular, uma proteína constituinte da membrana celular, modifica as estruturas secundária e terciária desta proteína transformando-a em uma nova proteína semelhante ao PrPsc. O mecanismo exato pelo qual ocorre esta conversão não está claro, mas a reação em cadeia que se desenvolve leva à produção de quantidades crescentes de PrPsc que irão depositar-se no tecido nervoso levando à sua destruição e conseqüentemente, a uma perda da função tecidual. Durante o processo de conversão de PrPc em PrPsc ocorrem alterações estruturais importantes na proteína normal, porém, não há modificações na sua seqüência de aminoácidos (estrutura primária).

O PrPc é uma proteína presente em várias espécies de mamíferos, incluindo o homem. Encontra-se ligada à membrana celular através de uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI), sendo composta inicialmente por uma seqüência de 254 aminoácidos que tem os 22 resíduos de sua porção N-terminal (peptídeo sinalizador) clivada logo após sua produção, sendo que os 24 resíduos finais da poção C-terminal são clivados quando esta se liga à âncora de GPI. A porção N-terminal possui um segmento entre os aminoácidos 51 e 91 na qual uma seqüência de oito aminoácidos, denominada *octarepeat* se repete cinco vezes (Figura 1).¹⁰

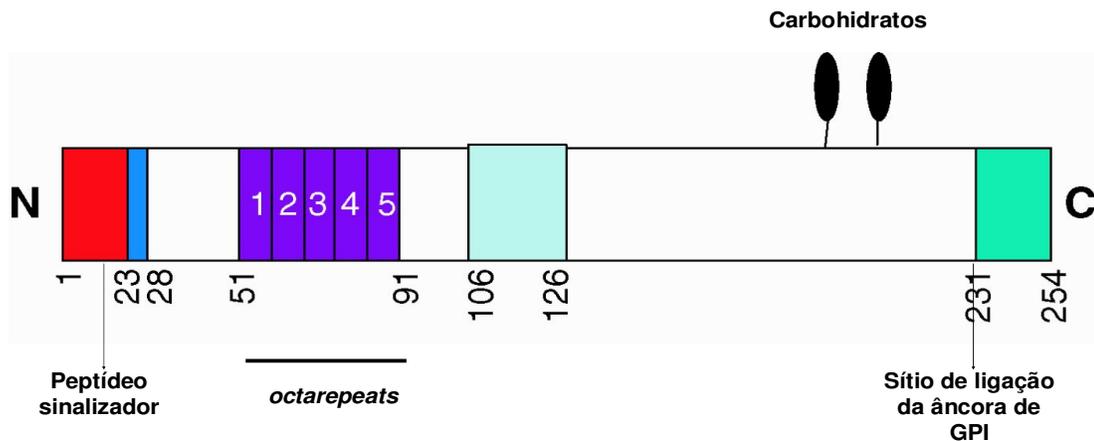


Figura 1 – Desenho esquemático da proteína prion celular (PrPc). Durante o trajeto da proteína através do retículo endoplasmático, a porção N-terminal (peptídeo sinalizador, em vermelho) é removida juntamente com a porção C-terminal (peptídeo sinalizador, em verde escuro), sendo esta última substituída por uma âncora de GPI. A região em azul escuro entre os aminoácidos 51 e 91, representa as seqüências de oito aminoácidos que se repetem cinco vezes (*octarepeats*) e as elipses em preto representam os dois carboidratos que se ligam à proteína. Adaptado de Taylor & Hooper, 2006.

Estudos de modelos moleculares mostram que na proteína madura (após ocorrerem as clivagens), a porção N-terminal, cuja estrutura não está bem determinada, é mais flexível e a porção C-terminal, que contém aproximadamente 100 aminoácidos, é constituída de três α -hélices e uma folha β -pregueada, estabilizadas por uma ponte dissulfeto que liga as hélices 2 e 3 (Figura 2). A estrutura molecular do PrPsc não está esclarecida, no entanto, sabe-se que apresenta uma porcentagem bem menor de α -hélices que o PrPc, com um maior número de folhas- β , que aparecem em pequena quantidade na proteína normal.¹¹ Esta nova conformação torna o PrPsc menos solúvel em detergentes e mais resistente à digestão por proteinases, adquirindo uma tendência a formar

aglomerados protéicos que se tornam birrefringentes quando corados com vermelho congo (amilóides).

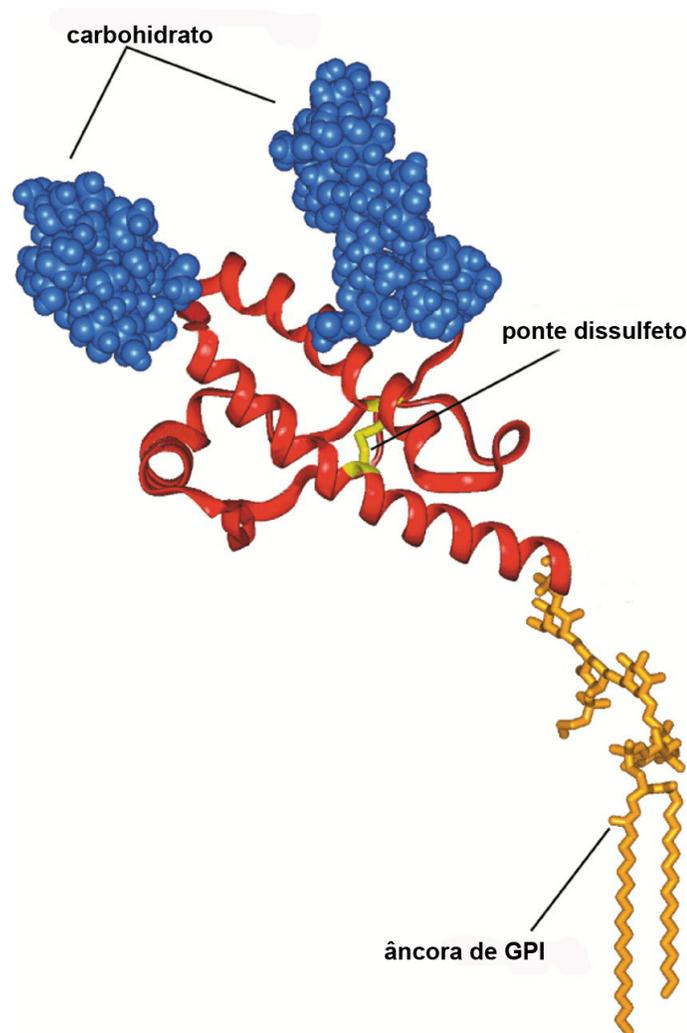


Figura 2 – Modelo da proteína Prion celular indicando as posições dos carboidratos (azul), os domínios formados por α -hélices (vermelho) e a âncora de GPI (amarelo). Adaptado de John Collinge, 2001.

O PrP^c é expresso em grande quantidade nas células constituintes do sistema nervoso, mas pode ser encontrado em níveis mais baixos em outros

tecidos ou órgãos incluindo pulmão, coração, rins, pâncreas, testículos, glóbulos brancos e plaquetas.¹² No SNC há uma grande disparidade entre os níveis de RNAm e a expressão da proteína encontrados nos tecidos, cujos resultados têm sido contraditórios entre os diversos autores.¹³ Na maioria dos estudos a proteína foi encontrada em quase todos os neurônios do SNC e nas células da glia, em maior quantidade no cerebelo, hipocampo e na substância cinzenta do córtex cerebral, tanto em animais (hamsters, babuínos e camundongos) como no homem.¹³⁻¹⁶ O gene que codifica o PrP^c (PRNP) está localizado no braço curto do cromossomo 20 com a fase aberta de leitura localizada em um único exon.¹ Várias mutações foram descritas no PRNP, sendo que aproximadamente 20 delas estão relacionadas ao desenvolvimento de encefalopatias espongiformes no homem (Figura 3).¹⁰ A troca de um resíduo de glutamato (E) por um de lisina (K) no códon 200 (E200K) e a troca de uma asparagina (N) por um aspartato (D) no códon 178 (D178N) são as duas mutações mais freqüentes no PRNP. O tipo de mutação presente no organismo está diretamente relacionado ao quadro clínico da doença, que pode ser muito variável. Na região octarepeats já foram descritas de uma a nove inserções de oito aminoácidos adicionais. Em geral, o número de inserções se relaciona de forma inversa com a idade de início dos sintomas e direta com a duração da doença.¹⁷ A seqüência de aminoácidos do prion celular é muito similar entre as diversas espécies de mamíferos, o que poderia explicar a capacidade de transmissão interespecie das encefalopatias espongiformes.¹⁰

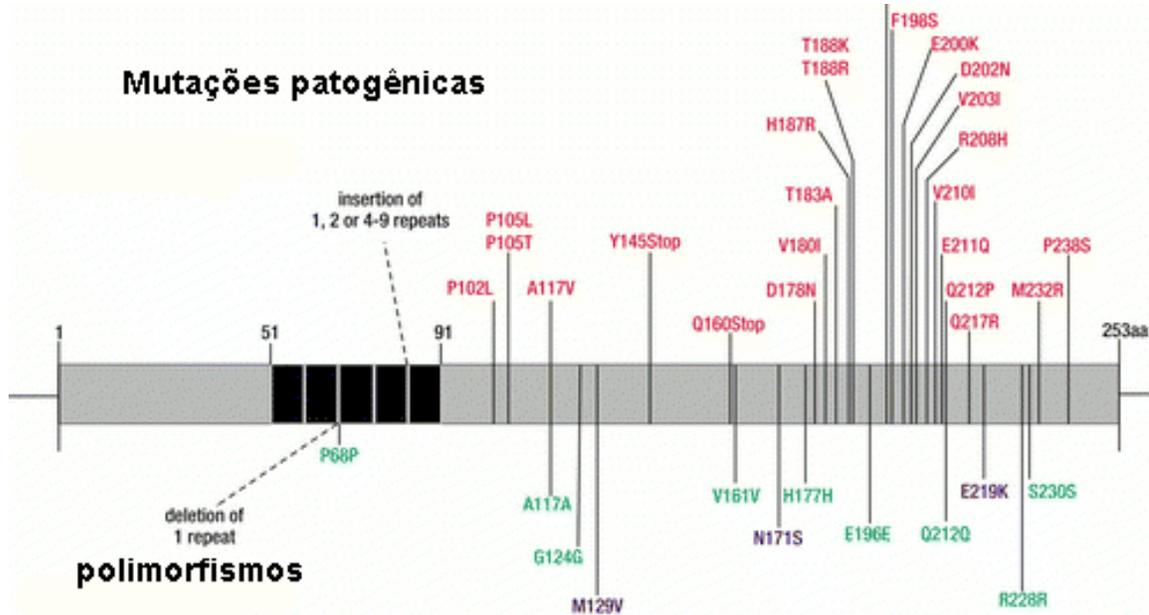


Figura 3 – Mutações patogênicas e variações polimórficas da proteína *prion* celular humana. Adaptado de Jonh Collinge, 2001.

Apesar de ser uma proteína presente em grande quantidade no sistema nervoso central (SNC), as funções do PrPc não estão totalmente esclarecidas. Estudos sugerem funções no transporte de metais, na adesão, sinalização e diferenciação celular e proteção ao estresse oxidativo.¹⁸ A região do PrPc onde se encontram as seqüências repetidas de oito aminoácidos, na sua porção N-terminal, apresenta afinidade por metais bivalentes como cobre, níquel, zinco e manganês, com uma afinidade preferencial pelo cobre, que parece estar diretamente ligado às funções desta proteína.¹⁰ Existe uma alta taxa de conservação entre as diversas espécies de mamíferos desta região com afinidade para ligação com o cobre, que de acordo com alguns estudos, apresenta capacidade de modular a expressão do PrPc *in vitro*.¹⁰

A presença de PrPc nos tecidos é essencial para que ocorra a propagação das encefalopatias espongiformes nos organismos.¹⁹ A deleção do PRNP em ratos torna-os resistentes à aquisição e ao desenvolvimento de doenças priônicas. As avaliações iniciais realizadas nestes ratos *knockout* para o gen do prion não mostraram alterações importantes no seu desenvolvimento²⁰, no entanto, estudos mais recentes evidenciaram a presença de distúrbios na motricidade²¹, respostas eletrofisiológicas cerebrais alteradas²², maior suscetibilidade ao desenvolvimento de epilepsia²³, modificações no ritmo circadiano e ataxia^{18,24} nos ratos desprovidos de PrPc.

Estudos comparando a quantidade de cobre presente nos tecidos cerebrais evidenciaram uma diminuição significativa da quantidade deste metal nos ratos *knockout* para PrPc em relação aos normais, reforçando a importância do mesmo para as funções desta proteína.

1.1.3 Encefalopatias espongiformes

As EET podem afetar várias espécies de mamíferos domésticos ou selvagens além da espécie humana. Apesar da proteína PrPsc ser encontrada em diversos órgãos em organismos infectados, as alterações patológicas características da doença são restritas ao SNC, evidenciando-se por perda neuronal intensa, gliose e vacuolização (degeneração espongiforme) e a formação de placas amilóides formadas pelo acúmulo da proteína. Apesar do avanço científico ocorrido nas últimas décadas em relação às EET, ainda não há testes laboratoriais específicos para este grupo de doenças.²⁵ O seu diagnóstico é realizado com base no quadro clínico dos pacientes, sendo que a sua confirmação só é possível através de biópsia cerebral ou do exame

anatomopatológico, que evidenciam as alterações típicas da doença e os depósitos de PrPsc no SNC. Durante a infecção, os títulos de PrPsc no tecido cerebral aumentam progressivamente durante um longo período de incubação clinicamente silencioso, não havendo nenhuma resposta imunológica detectável nos organismos infectados durante toda a evolução da doença.^{26,27} Estudos experimentais mostram EET subclínicas, nas quais os animais infectados morrem antes de desenvolverem sintomas, algumas vezes acometidos por outras doenças.²⁸ No homem, este período pode variar de 1,5 a 40 anos. A ausência de sinais clínicos durante o período de incubação dificulta a estimativa da incidência de pacientes portadores deste tipo de doença.²⁷ A transmissão direta das EET entre as diversas espécies de mamíferos raramente ocorre na natureza. Experimentalmente, em uma primeira inoculação de PrPsc de determinada espécie A em uma espécie B, nem todos os animais infectados irão desenvolver a doença e aqueles que a desenvolvem, apresentam um período de incubação muito mais longo e variável do que se esperaria de um animal infectado por PrPsc proveniente de outro da mesma espécie. Em uma segunda passagem, na qual uma inoculação de PrPsc provenientes desta espécie B previamente infectada com amostras da espécie A é inoculada em outros animais da espécie B, o número de animais que desenvolvem a doença é significativamente maior do que o observado na primeira inoculação e o período de incubação é bem reduzido. Esta dificuldade da doença em se propagar entre espécies diferentes é denominada barreira interespecie.⁵ Esta barreira, que aumenta o período de incubação da doença e reduz a quantidade de indivíduos acometidos pelas EET ocorre devido às variações na seqüência de aminoácidos do PrPc existentes entre as diferentes espécies. Quanto mais semelhança houver entre o PrPsc

infectante e o PrPc do hospedeiro, mais eficaz é a infecção. A injeção intracerebral de tecidos infectados com BSE é mil vezes mais eficiente em causar EET no gado do que em camundongos. Em alguns casos parece existir uma barreira completa na transmissão interespecie; como no caso do *scrapie*, cujas evidências epidemiológicas sugerem nunca ter acometido a espécie humana.³

1.1.3.1. Encefalopatias espongiformes em animais

As doenças priônicas ou EET podem ocorrer em diversas espécies de mamíferos. A encefalopatia espongiforme bovina (do inglês *Bovine spongiform encephalopathy* - BSE) é conhecida há menos de 20 anos, a doença do desgaste crônico (do inglês *Chronic wasting disease*-CWD) por mais de 30 anos, a encefalopatia transmissível de martas (do inglês *Transmissible mink encephalopathy*-TME) por mais de 50 anos e *Scrapie* já é conhecida há mais de 200 anos. As EET podem acometer animais selvagens ou domesticados e as espécies acometidas variam com a localização geográfica. Apesar das EET serem alvo de vários estudos, pouco se sabe sobre suas rotas de transmissão.

Scrapie

Foi a primeira doença priônica a ser identificada. É uma doença endêmica em algumas regiões da Europa e aflige ovelhas e cabras, causando-lhes mudanças de comportamento. Os animais acometidos esfregam-se contra objetos fixos e com a evolução da doença podem apresentar ataxia, perda de peso, ingestão excessiva de líquidos, tremores e convulsões. Os animais morrem num intervalo de três a seis meses. O tecido cerebral apresenta vacuolização e perda neuronal. Em relação à predisposição genética para a doença em ovelhas,

parecem ser de particular importância os códons 136, 154 e 171 do gen que codifica a proteína. Observou-se que a homozigose para arginina (R) no códon 171 (RR171), que tem polimorfismo para glutamina (Q), arginina (R), ou histidina (H), confere resistência à doença, enquanto a homozigose para a glutamina QQ171 confere susceptibilidade à mesma. No caso de ovelhas QQ171, a homozigose para alanina no códon 136 (AA136), que tem polimorfismo para alanina (A) ou valina (V), é menos susceptível do que a homozigose para a valina (VV136) ou a heterozigose (VA136). Assim, estão em curso programas de seleção genética de rebanhos que apresentem a homozigose RR171 como meio de erradicar a doença, ou pelo menos aumentar a resistência dos ovinos.² A rota de transmissão não está totalmente esclarecida, mas animais naturalmente acometidos apresentam infectividade inicialmente em amígdalas, linfonodos da retrofaringe e intestinos, sugerindo uma infecção através da alimentação.²⁹ Pode ocorrer transmissão vertical, mas a exposição de filhotes a rebanhos infectados parece ser o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da doença. A infecção atravessa a barreira interespecie, podendo acometer cabras que dividem o mesmo pasto, mas não há evidências de transmissão da doença a outras espécies ou ao homem. *Scrapie* já foi transmitida de forma experimental a primatas, roedores e outras espécies.²⁹

Encefalopatia Espongiforme Bovina

No ano de 1985, o gado leiteiro de algumas regiões do Reino Unido começou a se tornar agitado e agressivo, evoluindo com ataxia progressiva e morte. As alterações patológicas incluíam lesões espongiformes associadas a gliose e perda neuronal, assemelhando-se àquelas encontradas nos animais com

scrapie. Nos anos subseqüentes, o número de animais afetados pela doença aumentou vertiginosamente de 16 em 1986 para 7.000 em 1989 e 36.000 em 1992. Foram confirmados aproximadamente 170.000 casos de encefalopatia espongiforme bovina e aproximadamente um a três milhões de animais podem ter sido infectados com a doença. Muitos destes animais podem ter sido sacrificados para consumo antes de apresentarem sintomas de BSE. A origem do primeiro caso da doença é desconhecida. Uma das teorias é que a BSE se iniciou a partir do uso de carcaças de ovelhas contaminadas com *scrapie* na alimentação de bezerros e vacas. Após a doença ser transmitida ao gado, ela teria se tornado epidêmica através da reciclagem de restos de tecidos destas vacas e bezerros infectados para a alimentação do gado. No entanto, a inoculação experimental do agente causador do *scrapie* em bovinos desencadeou uma patologia com características diferentes das BSE, sugerindo que o aparecimento da epidemia deveria resultar do aproveitamento de carcaças de gado com encefalopatia espongiforme que teria ocorrido naturalmente de forma esporádica. A epidemia levou as autoridades a tomarem medidas de controle do gado com sacrifício em massa e proibição do uso de matéria prima animal como complementação alimentar em 1988. Após quatro a cinco anos, considerado o período de incubação médio da doença (variando de 2,5 a 8 anos), o número de casos começou a diminuir a uma taxa de 40% por ano, o que levou a um declínio significativo da epidemia a partir de 1992. A exportação de gado e ração infectados pelo Reino Unido resultou em epidemias menos significativas em outros países da Europa, nos quais medidas de controle foram instituídas mais tarde.^{17,30} A BSE foi transmitida experimentalmente a várias espécies de animais, incluindo roedores e primatas, inclusive por via oral. A infectividade no gado se

restringe ao cérebro, medula espinal, retina e íleo (em transmissão experimental). Não foi detectada infecção em tecido muscular, sangue ou leite. Não há evidências de transmissão vertical, pois não há relatos de desenvolvimento de BSE nos bezerros exportados pelo Reino Unido na época da epidemia da doença.³¹

Doença do desgaste crônico

Apesar de ser bem conhecida nos dias de hoje, até a poucos anos atrás CWD era considerada uma doença obscura que ocorria naturalmente em cervos e alces de algumas regiões montanhosas dos Estados Unidos. Foi observada pela primeira vez em 1967, quando biólogos perceberam uma síndrome que limitava o tempo de vida dos animais estudados em cativeiro. Ao contrário do *Scrapie* e da BSE, a CWD pode acometer animais selvagens, nos quais a história natural da doença não foi completamente estudada pela dificuldade de monitorização dos mesmos. As primeiras publicações ocorreram em 1980 com a descrição de 54 animais com CWD, que apresentavam alterações de comportamento (apatia, depressão) uma perda de peso crônica e ataxia, morrendo num intervalo de algumas semanas a oito meses do início dos sintomas.³² O exame do cérebro de animais com CWD revela degeneração espongiiforme importante, vacuolização e placas amilóides, semelhantes à patologia de outras formas de EET. Apesar de poder ser transmitido através de inoculação cerebral para várias outras espécies, não se conseguiu demonstrar suscetibilidade à exposição oral de tecido infectado com CWD. Estima-se que haja 22 milhões de alces e servos nos Estados Unidos e um grande número de caçadores que os consomem, no entanto, não há descrição de casos de transmissão de CWD para a espécie humana. Mesmo

assim, os centros de controle de doenças e os departamentos de saúde dos estados americanos monitoram todos os casos de CWD nas áreas endêmicas, com programas de erradicação da doença tanto em animais de cativeiro como nos de vida livre.^{2,32}

1.3.1.2 Encefalopatias espongiformes no homem

As Encefalopatias espongiformes são raras em humanos e sua prevalência aproximada de 1,5 por um milhão por ano vem se mantendo estável nas últimas décadas.¹⁷ Constituem um grupo especial de doença neurodegenerativa e apesar de sua similaridade em vários aspectos a outras doenças degenerativas como a doença de Alzheimer ou a esclerose lateral amiotrófica, elas são consideradas de forma separada, devido à sua natureza transmissível.⁵ Outra característica importante deste grupo de doenças é a grande variabilidade fenotípica possível de se desenvolver a partir de um mesmo agente etiológico.¹⁷ As encefalopatias decorrentes da modificação desta proteína podem apresentar quadros clínicos e alterações neuropatológicas extremamente diferentes entre si. Uma possível explicação para este fato são as diferentes conformações encontradas da mesma proteína (PrP^{sc}) nas diversas formas da doença. Outra característica importante das EET é o fato de que a doença pode apresentar uma etiologia hereditária (predisposição familiar ou mutação do pnp), esporádica ou infecciosa.¹ As observações de encefalopatias espongiformes em humanos ocorreram já no século XX², sendo descritos em 1920-1921 os primeiros seis casos de uma patologia que viria a ser conhecida por doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD, do inglês Creutzfeldt-Jakob *disease*). CJD é a forma mais comum de EET no homem e pode ocorrer na forma esporádica, familiar por mutação no PRNP e de origem infecciosa. Outros exemplos de doenças priônicas humanas são *Kuru*, doença de

Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e insônia familiar fatal (IFF). Desde a epidemia de encefalopatia espongiforme bovina ocorrida no Reino Unido nos anos 80, vários centros de vigilância foram criados em diversos países com a finalidade de monitorar as EET. Estes centros coletam dados clínicos, laboratoriais e amostras de tecidos dos pacientes, auxiliam no diagnóstico e classificação das doenças priônicas, determinam sua prevalência e compartilham dados e amostras com os centros de vigilância de outros países.^{30,33} A colaboração entre estes países proporcionou um grande avanço nas pesquisas direcionadas às doenças priônicas e algumas drogas já estão sendo testadas como potenciais tratamentos, entre elas a quinacrina, o pentosan polissulfato e a flurpitina. O uso de anticorpos monoclonais ainda está sendo avaliado em animais, mas apesar dos progressos alcançados em relação às EET, até o momento nenhum procedimento ou droga se mostrou eficaz no controle deste grupo de doenças.³⁴

Doença de Creutzfeldt-Jakob

Até 30 anos atrás, CJD era uma obscura forma de demência desconhecida pela maioria dos médicos. Hoje este nome é familiar à comunidade médica como a forma mais comum de encefalopatia espongiforme, que desafia os cientistas com seu estranho agente infeccioso e sua evolução inexorável para a morte. A doença pode apresentar-se na forma esporádica (sCJD), familiar (fCJD) ou infecciosa. A forma infecciosa por sua vez, pode ocorrer através consumo de alimentos contaminados, também chamada de forma variante (vCJD) ou por iatrogenia (iCJD). Um polimorfismo do códon 129 que ocorre naturalmente parece atuar como fator predisponente para o desenvolvimento de todas as formas de

CJD. Neste códon podem ser codificados os aminoácidos metionina (M) ou valina (V). Sabe-se que a distribuição genotípica neste códon na população caucasiana normal é de aproximadamente 49% de homozigoze (37% M/M e 12% V/V) e 51% de heterozigoze (M/V) e que a grande maioria dos pacientes com CJD apresentam o genótipo M/M ou V/V, sugerindo que a homozigoze neste códon determina um fator de risco para o desenvolvimento da patologia.³⁵⁻³⁷ Estudos realizados com a finalidade de evidenciar fatores predisponentes tais como sexo, ocupação, localização geográfica ou fatores ambientais, com exceção da predisposição nos caso familiares, foram inconclusivos.³⁸

Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica

A forma esporádica, que é a forma mais comum da doença (85% dos casos) ocorre em todo o mundo com uma incidência relativamente estável. Oitenta por cento dos casos de sCJD ocorrem em indivíduos com idade ente 50 e 70 anos. A tétrade clássica da sCJD compreende confusão e perda de memória (que evoluem rapidamente para uma demência severa), ataxia e mioclonia associados a uma alteração eletoencefalográfica característica da doença. Este quadro típico, porém, está presente em menos de 60% dos casos, podendo ocorrer quadros clínicos bem variados tanto em relação aos sintomas iniciais quanto à evolução da doença.¹⁷ Aproximadamente um terço dos pacientes inicialmente apresentam fadiga, desordens do sono ou diminuição do apetite. Outro terço inicia os sintomas com perda de memória, confusão e alterações comportamentais e finalmente os casos restantes apresentam sinais focais como ataxia, afasia, alterações visuais, hemiparesia ou amiotrofia. Este último grupo de pacientes é o que apresenta maior dificuldade no diagnóstico diferencial pelo fato

de apresentarem sinais clínicos muito similares a outras doenças neurológicas como esclerose lateral amiotrófica ou acidente vascular cerebral.²⁶ Com a evolução da doença, há uma limitação importante da movimentação dos pacientes que desenvolvem ataxia progressiva, que geralmente é descrita pelos familiares como um "andar de bêbado" ou por quedas sucessivas. Espasmos podem aparecer em qualquer fase da doença, mas são mais comuns nos estágios mais tardios. Síndrome de liberação frontal pode estar presente e uma mioclonia desencadeada por estímulos externos como bater palmas ou acender a luz ocorre com frequência. Uma minoria de casos (menos de 20%) pode apresentar sinais e sintomas atípicos, como alucinações, crises convulsivas, início abrupto, duração mais prolongada ou um eletroencefalograma (EEG) com padrão distinto do usual. Alguns destes casos com fenótipos atípicos foram classificados como síndromes, como por exemplo, a variante Heidenhain que foi descrita em 1929, na qual predominam sintomas visuais desde o início do quadro, evoluindo para uma demência rapidamente progressiva. Os principais sintomas nesta forma da doença são alucinações, distúrbios na percepção de cores e formas, escotomas homônimos e cegueira cortical. A evolução costuma ser rápida e 70% dos pacientes que desenvolvem esta síndrome vão a óbito antes de seis meses do início dos sintomas.⁵ O exame anatomopatológico mostra uma degeneração espongiiforme acometendo preferencialmente os lobos occipitais.^{39,40} A forma clínica de apresentação da sCJD está relacionada com polimorfismos no códon 129 do PRNP e com o tipo de PrPsc depositado no tecido nervoso dos pacientes.⁴¹ A duração média da doença é de 4 a 5 meses, sendo a morte dos pacientes geralmente decorrente de complicações respiratórias ou septicemia. Exames laboratoriais não evidenciam resposta inflamatória, alterações da função

renal, ou a presença de anticorpos contra o PrPsc. O exame do líquido evidencia uma pressão normal, com celularidade e níveis de imunoglobulinas normais. A única alteração que pode ser encontrada neste exame é uma discreta elevação nos níveis de proteína (raramente acima de 100mg/dl). O EEG pode ser normal nas fases iniciais da doença, mas com a sua evolução geralmente aparecem paroxismos periódicos ou pseudoperiódicos ou ondas trifásicas ou planas sobre um fundo lentificado. Um EEG negativo não exclui o diagnóstico de CJD, uma vez que em 30% dos casos este padrão típico pode não aparecer, principalmente nas fases iniciais e tardias da doença. A realização de EEG seriados aumenta a chance de se obter um exame característico. A tomografia computadorizada (CT) do cérebro inicialmente não evidencia nenhuma alteração, mas com a progressão da doença pode mostrar uma atrofia cerebral generalizada e a ressonância nuclear magnética (RNM) pode evidenciar, além da atrofia cerebral, que pode ser observada em 100% dos casos com mais de 4 meses de evolução, hiperintensidade de sinal nos gânglios da base em imagens ponderadas em T2 que ocorre em 79% dos casos.⁴² O mecanismo pelo qual a CJD se desenvolve nestes pacientes é desconhecido. Algumas hipóteses incluem transmissão horizontal do agente infeccioso entre homens ou animais, mutação somática do PRNP e conversão espontânea do PrPc em PrPsc, que não seria degradado por uma falha nos mecanismos de *clearance* celular.^{1,34} Um estudo retrospectivo no qual foram analisados 326 pacientes com diagnóstico de sCJD sugere uma associação desta forma da doença com a realização de cirurgias prévias.⁴³ Uma vez que a forma familiar tem traço dominante, a análise de DNA nestes pacientes só está indicada se houver história de demência rapidamente progressiva em parentes de primeiro grau.

Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar

A forma familiar da CJD, responsável por 10 a 15 % dos casos, é composta por pacientes que apresentam uma mutação hereditária do PRNP com traço autossômico dominante. O quadro clínico é muito variável, semelhante ao da forma esporádica da doença e tem relação com o tipo de mutação do PRNP. A idade de início dos sintomas também varia muito, podendo ocorrer em pacientes da quarta à nona década de vida, porém, na forma familiar os pacientes geralmente são acometidos mais precocemente (em média 12 anos mais cedo) e apresentam uma evolução mais arrastada (18 meses mais longa) que na forma esporádica. As alterações eletroencefalográficas características da forma esporádica geralmente estão ausentes e a análise do líquido não evidencia aumento de proteínas em aproximadamente metade dos casos.⁴⁴ As alterações neuropatológicas podem variar na topografia e em relação à presença de placas amilóides, mas as alterações essenciais das EET como vacuolização, gliose e perda neuronal estão geralmente presentes. Já foram descritas mais de 20 mutações no gen PRNP, que fica no braço curto do cromossomo 20, entre elas inserções, deleções e mutações pontuais, mas apenas três mutações estão claramente relacionadas ao desenvolvimento de fCJD. As duas mutações mais comuns presentes nos pacientes com fCJD são a E200K e a D178N. O desenvolvimento de fCJD apenas nos indivíduos que apresentam mutação no PRNP entre os membros de uma mesma família evidenciam uma relação causal entre a alteração genética e a doença.^{17,26} A grande variabilidade em relação à idade de início dos sintomas sugere uma penetrância incompleta, porém, estudos demonstram que a penetrância é quase completa ao redor da nona década de vida.^{45,46}

Doença de Creutzfeldt-Jakob iatrogênica

A transmissão das EET também pode ocorrer de forma iatrogênica através de vários procedimentos e substâncias infectadas. O período de incubação nesta forma de CJD é muito variável, podendo ser de poucos meses a vários anos.⁴⁷ Um exemplo importante deste tipo de transmissão foi o desenvolvimento de CJD em vários pacientes de diversos países que receberam hormônio do crescimento derivado de glândulas pituitárias humanas.^{48,49} Outros procedimentos usando tecidos provenientes de cadáver que comprovadamente apresentam risco de transmissão da doença são o transplante de córnea e o uso de enxerto de dura-máter em neurocirurgia.^{50,51} Apesar do envolvimento do sistema linforreticular na evolução das EET, o risco de transmissão de CJD através da transfusão de hemoderivados é muito controversa. Em uma revisão incluindo cinco estudos de caso-controle (com um total de 2479 pacientes entre 1982 e 2002) que tentavam identificar risco de desenvolver CJD através de transfusão sanguínea, os autores concluíram que não havia evidências que confirmassem esta possibilidade.⁵² No entanto, a análise de 48 indivíduos que receberam transfusão de hemoderivados de 15 pacientes com vCJD, evidenciou a presença de um caso de iCJD 6 anos após a transfusão. Análises estatísticas sugerem que uma eventual coincidência é improvável neste caso.⁵³ Um outro caso de transmissão de vCJD por transfusão sanguínea foi descrito em 2004, porém, o paciente foi a óbito na fase pré-clínica da doença.⁵⁴ A possibilidade de transmissão desta forma da doença através da transfusão de hemoderivados provenientes de pacientes assintomáticos levou à discussão das questões éticas em relação à instalação de testes de *screening* compulsório para todos os indivíduos doadores de órgãos ou candidatos a cirurgias ou outros procedimentos invasivos nos quais haja risco de transmissão da

doença.⁵⁵ Outra via de infecção por iatrogenia reside no uso de materiais não descartáveis durante procedimentos diagnósticos ou cirurgias, uma vez que o PrPsc é resistente aos processos normais de esterilização (óxido de etileno, formaldeído, calor seco, autoclave por 15 minutos, fervura). Há relato de contaminação em pacientes nos quais foram utilizados eletrodos profundos contaminados para localização de crises convulsivas.⁵⁶ Um dos métodos atualmente recomendados para a desinfecção de material potencialmente contaminado com PrPsc é a imersão em uma solução de NaOH 1M durante uma hora seguida de autoclavagem (121°C) por meia hora.⁵⁷

Doença de Creutzfeldt-Jakob variante

A partir de 1994 uma nova forma de EET foi descrita no Reino Unido como uma "nova variante" de CJD, porque apresentava características muito peculiares e distintas da forma esporádica.¹⁷ Além do fato de acometer indivíduos mais jovens do que aqueles com sCJD (idade média 27 anos), os sintomas nesta forma da doença também são distintos, geralmente iniciando por manifestações psiquiátricas e comportamentais, associadas a parestesias persistentes. Com a evolução da doença, desenvolve-se uma ataxia cerebelar, mas as alterações eletroencefalográficas e líquóricas típicas da forma esporádica estão ausentes. A duração da vCJD é mais arrastada, podendo durar de 9 a 38 meses (média de 16 meses). Esta forma de CJD não está associada a mutações no PRNP, porém, todos os casos confirmados de vCJD apresentam o aminoácido metionina em homozigose no códon 129 do gene que codifica a proteína priônica.⁵⁸ Várias pesquisas relacionadas a esta forma da doença apontam para uma origem comum entre a BSE e vCJD. Uma das hipóteses seria a transmissão direta da

doença priônica bovina para humanos através de ingestão de carne bovina contaminada com BSE. Além do fato de a grande maioria dos casos de vCJD diagnosticados ocorrerem em indivíduos provenientes do Reino Unido, onde a epidemia de BSE atingiu proporções significativas algumas décadas atrás, estudos comparando os padrões de glicosilação do PrPsc e o desenvolvimento da doença em camundongos inoculados experimentalmente mostraram similaridades entre vCJD e BSE que não são encontrados nas formas esporádica e iatrogênica da doença.²⁶ Em um estudo recente, a alimentação de 2 macacos com tecido nervoso proveniente de bovinos contaminados com BSE originou um tipo de EET com características clínicas e neuropatológicas muito semelhantes às da vCJD em 1 dos animais 60 meses após a ingestão.⁵⁹

Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome

GSS é uma doença hereditária de caráter autossômico dominante, com progressão lenta, tendo sido a primeira EET na qual uma mutação no PRNP foi descrita. Sua prevalência aproximada é de 1 a 10 indivíduos/100.000.000.⁶⁰ A apresentação clássica da doença é a de um paciente com história familiar de indivíduos que desenvolvem ataxia e disartria seguidos de sintomas piramidais e extrapiramidais de intensidade variável com evolução para demência nas fases avançadas da doença. Os sintomas se iniciam geralmente antes da quinta década de vida e a duração pode variar entre 2 e 10 anos. A principal característica da doença é a presença de depósitos de PrPsc em placas setoriais ou difusas por todo o córtex. Vacuolização não é um achado consistente²⁶ Estudos comparando as características clínicas de pacientes com GSS que apresentavam as mesmas características genóticas (mesmo tipo de mutação -Pro102Leu- e mesmos

polimorfismos no PRNP), evidenciaram diferenças significativas entre os fenótipos destes pacientes no que diz respeito à idade de início dos sintomas (38 a 70 anos) e duração da doença (4 a 8 anos), sugerindo a existência de outros fatores que interfiram no início e na progressão da doença.⁶¹ A mutação Pro102Leu é a mais frequentemente encontrada nos pacientes com GSS, mas outras já foram descritas nesta síndrome.⁵ Não há alterações eletroencefalográficas típicas e os pacientes geralmente morrem por pneumonia aspirativa devido a dificuldade para deglutir.

Insônia familiar fatal

Insônia familiar fatal foi descrita inicialmente em 1986 como uma doença autossômica dominante caracterizada por uma insônia progressiva intratável, disautonomia e sinais motores, sendo mais tarde reconhecida como uma EET. Assim como todas as EET de caráter familiar, é uma doença muito rara, com uma incidência menor que um caso por bilhão.⁵⁷ A mutação genética presente nos indivíduos que desenvolvem IFF é a troca do aminoácido ácido aspártico por asparagina no códon 178 do PRNP associada à presença de metionina no códon 129 do gene.⁶² A idade de início dos sintomas varia de 25 a 61 anos de idade (média de 48 anos), e o tempo decorrido do início dos sintomas até a morte do paciente é de um a dois anos (variando de 7 a 33 meses). A insônia é seguida de disautonomia (alterações pressóricas, de temperatura corporal, na frequência respiratória e cardíaca e nas secreções corporais), ataxia, e sintomas piramidais e extrapiramidais, poupando as funções cognitivas até estadios avançados da doença. Eventualmente podem ocorrer casos que não apresentam insônia durante o curso da doença.¹⁷

Kuru

Kuru é uma forma de EET que acomete os povos nativos de regiões montanhosas de Papua Nova Guiné. Os habitantes desta tribo, que foi encontrada em 1932, viviam como na idade da pedra. *Kuru* foi a primeira forma de doença priônica humana cuja transmissibilidade foi demonstrada experimentalmente. A doença era transmitida através de rituais de luto nos quais o canibalismo era praticado com a finalidade de homenagear os parentes mortos. Os primeiros casos de *Kuru* ocorreram em 1920, mas a sua disseminação atingiu proporções epidêmicas na década de 50, quando passaram a morrer 200 pessoas por ano acometidas pela doença. Entre 1957 e 1975 a doença *Kuru* matou 2500 indivíduos, na sua maioria mulheres e crianças, que eram os principais participantes dos rituais de luto e que ingeriam preferencialmente os cérebros e as vísceras dos "homenageados", enquanto os homens, que deixavam as iguarias para agradá-las, comiam a carne humana e não adoeciam. Os meninos eram afastados do convívio da mãe ao redor dos 6 a 8 anos, ficando a partir de então expostos ao mesmo risco dos homens, que representavam apenas 2% dos casos da doença. A epidemia iniciou-se provavelmente quando o ritual de luto foi realizado com um paciente acometido por sCJD (que ocorre de forma randomizada em todas as populações), levando à disseminação da doença. Esta epidemia levou as autoridades Australianas a proibirem os rituais de canibalismo, que foram completamente extintos em 1960. Uma base de vigilância epidemiológica foi estabelecida no local em 1957 e desde então é responsável por identificar e estudar todos os casos de *Kuru*. Entre 1996 e 2004 foram identificados 11 casos de *Kuru* e a partir do estudo destes casos, pôde-se estabelecer o período de incubação da doença, que pode variar de 5 a 50 anos.

Esta forma de EET, assim como todas as outras, também ocorre com mais frequência em indivíduos que apresentam homozigose no códon 129 do PRNP, sendo que este polimorfismo influencia tanto a susceptibilidade quanto o tempo de incubação da doença.⁴ A principal característica clínica do *Kuru* é a presença de ataxia cerebelar progressiva que não está associada a demência até fases avançadas da doença. A duração média dos sintomas é de 12 meses, podendo variar de 3 meses a 3 anos.⁵ Os achados neuropatológicos incluem alterações espongiiformes difusas, perda neuronal e depósitos amilóides densos encontrados principalmente no cerebelo.¹⁷

1.2 A retina humana

Todas as informações a respeito da anatomia e histologia da retina foram obtidas no livro Histology of the human eye.⁶³

1.2.1 Anatomia

A retina é um tecido fino, transparente e delicado que reveste o olho por dentro e está aderida em sua face mais externa à coróide através do epitélio pigmentado da retina (EPR) e em sua face mais interna à membrana hialóide posterior (MHP) através da membrana limitante interna (MLI). Estas duas membranas encontram-se firmemente aderidas na região da ora serrata, onde a retina neurosensorial termina (o EPR se estende ao corpo ciliar). Outro sítio de adesão entre a MHP e a MLI é ao redor do disco óptico. Neste local, todas as camadas da retina terminam, com exceção da camada de fibras nervosas (CFN), que vai formar o nervo óptico. De acordo com a classificação anatômica a retina pode ser dividida em duas porções. A retina central, que corresponde à região

cl clinicamente denominada pólo posterior, localiza-se entre as arcadas vasculares temporais e contém a mácula, a fóvea e a foveola. O restante da retina é denominado retina periférica. A mácula compreende uma área central de aproximadamente 5,5 mm de diâmetro com coloração amarelada à oftalmoscopia, na qual a camada de células ganglionares é composta por várias células. A fóvea constitui uma área de escavação central na mácula (1,5mm de diâmetro) e a foveola, com 0,35 mm de diâmetro, forma o centro da fóvea e da mácula. A foveola é constituída apenas por cones e células de Müller, compondo o local de maior limiar de sensibilidade visual em toda a retina.

A retina recebe suprimento sanguíneo por duas fontes distintas. A porção mais externa, que vai do EPR até a camada nuclear externa (CNE) é suprida pela pelos capilares da coróide e o restante das camadas é suprido pelos vasos centrais da retina. A mácula é avascular, sendo nutrida pela coróide.

1.2.2 Histologia

Histologicamente a retina é subdividida em dez camadas bem definidas: epitélio pigmentado da retina, camada de fotorreceptores (CF), membrana limitante externa (MLE), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna, camada plexiforme interna (CPI), camada de células ganglionares (CCG), camada de fibras nervosas e membrana limitante interna (Figura 4).

1.2.2.1 Epitélio Pigmentado da Retina

Consiste em uma camada única de células que se estende da margem do disco óptico até a ora serrata. É a camada mais externa da retina e encontra-se

em contato com a coróide através da membrana de Bruch. As células que constituem esta camada são hexagonais, com núcleo grande e vários grânulos de pigmentos localizados nos dois terços superiores. Em sua base, as células apresentam invaginações e sua membrana basal possui vários filamentos que se estendem à membrana de Bruch, permitindo uma maior adesão entre elas. As células do EPR também se encontram aderidas umas às outras através das *zonulae occludentes* e *zonulae adherentes* nos ápices de suas paredes laterais. Na região apical, elas possuem microvilosidades que envolvem os segmentos externos dos fotorreceptores, porém, sem que haja adesão firme entre estas células. A retina neurosensorial, que compreende as nove camadas mais internas, é fracamente aderida ao EPR. Este fato fica bem evidente na vigência de um descolamento de retina, no qual ocorre a separação entre o EPR e a camada de fotorreceptores. O EPR exerce importantes funções (estrutural e funcional), tais como transporte de fluidos do espaço subretiniano, fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, síntese e armazenamento de retinóides, controle da difusão de oxigênio e absorção e dispersão da energia luminosa, sendo indispensável para o metabolismo dos fotorreceptores.

1.2.2.2 Camada de Fotorreceptores

Esta camada é constituída pelos segmentos externo e interno dos cones e bastonetes (fotorreceptores) que são os responsáveis por transformar os estímulos luminosos em estímulos elétricos, possibilitando sua propagação ao SNC. O segmento interno compõe metade da camada de fotorreceptores e é responsável pela manutenção do metabolismo da camada de fotorreceptores. É formado por uma região adjacente à CNE (mióide) rico em retículo

endoplasmático e ribossomos e outra mais próxima ao segmento externo (elipsóide) que é rico em mitocôndrias. Nos cones da região foveal, estes segmentos alongam-se para formar a camada de Henle. O segmento externo é constituído de processos paralelos que são mais largos e curtos nos cones e mais longos e finos nos bastonetes. Na região foveal, os segmentos externos dos cones podem assemelhar-se aos dos bastonetes, assumindo uma forma mais compacta e alongada. Os segmentos interno e externo estão conectados por um *cilium* que se compõe de nove duplas de túbulos arranjadas em anel.

1.2.2.3 Membrana Limitante Externa

É formada pela união entre as membranas celulares dos cones e bastonetes e as terminações das células de Müller através de desmossomos.

1.2.2.4 Camada Nuclear Externa

É formada pelos núcleos dos fotorreceptores. Eles possuem uma forma redonda ou discretamente oval e são maiores nos cones que nos bastonetes. Na maior parte da retina, há uma camada de cones que se localiza próximo à MLE e quatro camadas de bastonetes. À medida que se aproxima da região foveal, o número de cones aumenta. Esta região é desprovida de bastonetes, sendo constituída por aproximadamente 10 camadas de núcleos de cones.

1.2.2.5 Camada Plexiforme Externa

Localiza-se entre as camadas nucleares e é formada pelos axônios dos fotorreceptores e os processos das células bipolares e horizontais. Os axônios dos cones e bastonetes atravessam dois terços externos da CPE formando uma

banda espessa e terminam na região mais interna desta camada onde suas terminações sinápticas se dispõem de forma linear formando uma fileira próxima à CNI. É nesta região que ocorrem as sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares e horizontais.

1.2.2.6 Camada Nuclear Interna

Esta camada é constituída pelos núcleos das células bipolares, horizontais, amácrimas e células de Müller. As células bipolares são neurônios de primeira ordem, responsáveis por conectar os fotorreceptores com as células ganglionares. As células amácrimas e horizontais são moduladoras das sinapses, sendo responsáveis por integrar as informações entre fotorreceptores (horizontais) e células ganglionares adjacentes (amácrimas). As células de Müller têm função de nutrição e suporte. A porção mais externa da CNI é constituída principalmente pelas células horizontais, que apresentam corpo celular amplo e possuem uma inclusão citoplasmática única (cristalóide de Kolmer) que pode ser visto à microscopia óptica. Adjacentes a estas células, estão os núcleos das células bipolares que podem apresentar diferentes formas e tamanhos, de acordo com a região da retina a que pertençam. Mais internamente, a CNI é constituída pelos núcleos das células de Müller. Estas células são maiores e possuem um núcleo angular, com cromatina densa. As células de Müller ocupam toda a extensão da retina, desde a MLI até a MLE, sendo responsável pelo fornecimento de glicose aos neurônios. As células amácrimas ficam localizadas na região mais interna desta camada. Elas possuem um núcleo indentado, maior que o das bipolares e longos processos citoplasmáticos que se estendem horizontalmente

em diversas direções, conectando várias células ganglionares. A CNI está ausente na região foveal.

1.2.2.7 Camada Plexiforme Interna

Esta camada tem espessura uniforme em diversas partes da retina com exceção da fóvea, onde ela está ausente. É formada pelos axônios das células bipolares e amácrimas e dendritos das células ganglionares e é aqui que ocorrem as sinapses entre as mesmas.

1.2.2.8 Camada de Células Ganglionares

Esta camada é composta pelos corpos celulares das células ganglionares (neurônios de segunda ordem). Sua espessura é variável, sendo mais delgada na periferia (uma camada de células) e mais espessa na região perifoveal (aproximadamente 10 camadas de células). As células possuem núcleo claro, de forma arredondada ou discretamente oval e podem apresentar corpos celulares de diferentes tamanhos e formas (multipolar, *midget*, polissináptica, difusa, difusamente estratificada e deslocada).

1.2.2.9 Camada de Fibras Nervosas

É composta principalmente pelos axônios das células ganglionares. Estes axônios são desprovidos de mielina e apresentam uma distribuição centrípeta, agrupando-se na região do disco óptico para formar o nervo óptico. A CFN é uma camada uniforme e apresenta um plexo vascular bem desenvolvido.

1.2.2.10 Membrana Limitante Interna

É formada pelas terminações dos processos das células de Müller, localizando-se adjacente à membrana hialóide.

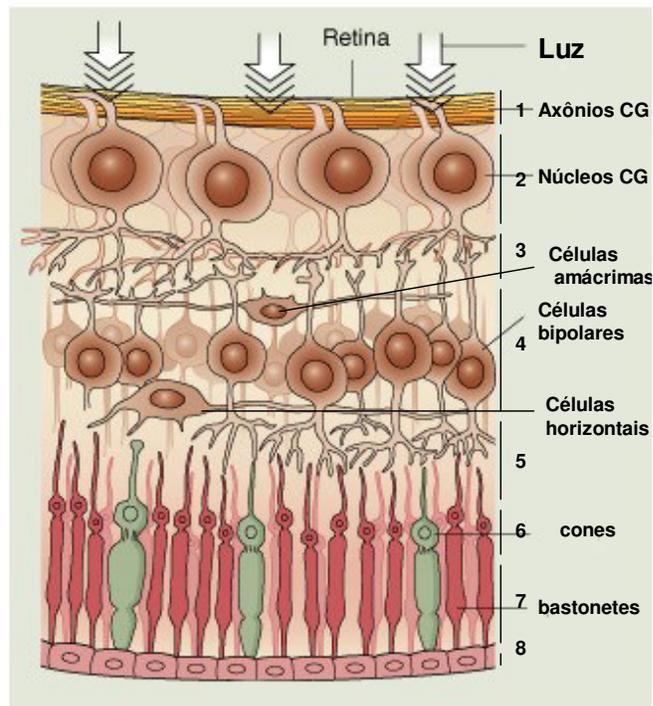


Figura 4 - Ilustração das camadas da retina mostrando suas principais células. 1, camada de fibras nervosas; 2, camada de células ganglionares; 3, camada plexiforme interna; 4, camada nuclear interna; 5, camada plexiforme externa; 6, camada nuclear externa; 7, camada de fotorreceptores; 8, epitélio pigmentado da retina (adaptado de John Wiley & sons, Inc 2000)

2. JUSTIFICATIVA

O prion celular é uma proteína constituinte das células de diversas espécies de animais, cuja estrutura é altamente conservada entre estas diferentes espécies e está presente em vários órgãos e tecidos, predominantemente no SNC. Sua presença nos organismos afetados é indispensável para o desenvolvimento das EET, no entanto, as funções desta proteína e o mecanismo pelo qual as doenças a ela relacionadas se desenvolvem não estão totalmente esclarecidos. Há vários estudos mostrando o acúmulo de PrPsc em olhos de animais infectados com EET, ocorrendo desenvolvimento variável de alterações na retina.⁶⁴⁻⁶⁶ Já foi demonstrado que os tecidos oculares são uma importante via de transmissão das doenças priônicas, tanto em estudos experimentais quanto no homem.⁴⁷ Experimentos realizados através da injeção intra-ocular de PrPsc em camundongos que expressam PrPc de forma seletiva em neurônios ou em células da glia, mostrou que ambos são capazes de desenvolver EET por esta via de inoculação, sem desenvolverem retinopatia.^{47,67} A demonstração da presença e localização do PrPc nos diversos tecidos é de fundamental importância para o esclarecimento de suas funções, assim como os mecanismos de desenvolvimento e as rotas de transmissão das EET da periferia para o SNC. Apesar da importância da via ocular como rota de transmissão da doença, há poucos estudos demonstrando a expressão do PrPc em tecidos oculares.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença e localização do prion celular na retina humana através da marcação imunohistoquímica e da detecção da proteína pelo método *Western blot* em homogeneizado de retina.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Fontes de tecidos

4.1.1 Olhos

Foram utilizados 30 olhos de 23 pacientes, todos provenientes do Banco de Olhos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HFMRP-USP). Esse material já se encontrava embebido em parafina na forma de blocos, tendo sido utilizado anteriormente em outro estudo.⁶⁸ Os tecidos parafinizados foram cortados com micrótomo, montados em lâminas para serem submetidos à imunohistoquímica. Todos os olhos já haviam sido analisados por um patologista para excluir qualquer alteração nos tecidos.

4.1.2 Retinas

As retinas utilizadas no método de *Western blot* também foram provenientes do Banco de Olhos do HFMRP-USP com permissão por escrito dos responsáveis pelo paciente doador. Logo após a enucleação e a avaliação da disponibilidade da córnea para transplante, as retinas de um doador foram separadas dos outros tecidos e imediatamente imersas em nitrogênio líquido, sendo então transportadas ao laboratório e mantidas a -70°C até serem processadas.

4.2 Imunohistoquímica

O termo imunohistoquímica surgiu a partir das palavras imunologia, histologia e química. É um método utilizado para se estudar as proteínas mantendo-se o contexto anatômico dos tecidos. Nele são empregados os

princípios da imunologia, tornando visíveis antígenos de interesse em tecidos ou preparações celulares, baseado na propriedade que os anticorpos têm de se ligarem a um antígeno específico. A marcação que permite observar o anticorpo pode ser fluorescente, enzimática ou radioativa.

4.2.1 Imunohistoquímica para PrPc

4.2.1.1 Desparafinização

As lâminas com tecido parafinizado permaneceram em estufa a 58°C *overnight*. Em seguida, à temperatura ambiente, as secções ficaram submersas respectivamente em xileno (5 min), xileno (5 min), álcool absoluto/xileno (5 min), álcool absoluto (1 min), álcool 95% (1 min), álcool 90% (1 min) álcool 80% (1 min) álcool 70% (1 min), álcool 50% (1 min) e água MilliQ (várias trocas).

4.2.1.2 Bloqueio da peroxidase endógena

A seguir, as lâminas foram incubadas com 4,5 vol% H₂O₂ em PBS duas vezes durante 7 minutos, à temperatura ambiente, sendo posteriormente enxaguadas com água destilada.

4.2.1.3 Recuperação antigênica

Foram testados vários protocolos de recuperação antigênica para a exposição dos epitopos da proteína desejada. As seguintes soluções foram testadas com as lâminas submersas por 40 min em *steam heater*: citrato de sódio 10mM pH6,0; cloridrato de guanidina 6M; tampão Tris-HCl 50mM pH9,5 e ácido clorídrico 2M/l. Todas as soluções foram testadas sozinhas e seguidas de imersão em ácido fórmico a 95% por 5 min em temperatura ambiente. Algumas lâminas

foram tratadas apenas com ácido fórmico a 95% por 5 min e outras não foram submetidas a nenhum pré-tratamento. A recuperação antigênica mais adequada para imunodeteccção do PrPc foi a incubação das lâminas com uma solução de ácido clorídrico 2mM/l por 40 minutos em *steam heater*, seguindo-se, após retornar à temperatura ambiente, a incubação com ácido fórmico a 95% durante 5 minutos.

4.2.1.4 Bloqueio de sítios de ligação inespecífica

Nesta fase os tecidos fixados nas lâminas foram circulados com lápis de diamante e os círculos preenchidos com cola. As lâminas foram então incubadas durante 30 minutos com tampão Tris-Gly (0,1M Gly pH7,4, ajustado com Tris base 0,1M) seguindo-se a incubação com tampão de bloqueio constituído por tampão B (tampão salina fosfato 20mM pH7,4 com NaCl 450mM e 0,3% Triton X-100) contendo 5% de soro de jumento e 2,5% de leite em pó por quatro horas à temperatura ambiente.

4.2.1.5 Ligação com o anticorpo primário

A incubação com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio foi realizada *overnight*. Os três anticorpos utilizados foram 8G8 *Prion protein monoclonal antibody* – Cayman (diluição 1:50), 3F4 *mouse anti-prion protein monoclonal antibody* – MAB1562, CHEMICOM (diluição 1:50) e um anticorpo policlonal anti-PrPc recombinante (diluição 1:25) desenvolvido em camundongos no Instituto Ludwig para a pesquisa do Câncer – SP, gentilmente cedido pela Dra. Vilma Martins. Em uma das lâminas (controle) o anticorpo primário foi substituído por tampão de bloqueio.

4.2.1.6 Bloqueio da biotina endógena

Após serem lavadas três vezes durante cinco minutos com tampão B, as lâminas foram incubadas sucessivamente com as soluções de avidina e biotina (DAKO) durante 15 minutos, sendo lavadas com tampão B entre e após as incubações.

4.2.1.7 Ligação com o anticorpo secundário

O passo seguinte foi a incubação das lâminas com o anticorpo secundário biotilado (E0354-Dako) na diluição 1:100 durante uma hora, seguida de enxágüe sucessivamente com tampão B e PBS. Ao término do enxágüe, os reagentes A (10µl) e B (10µl) do kit ABC (Elite-Vector) que já estavam sendo incubados em PBS (500 µl) há 30 minutos foram adicionados às lâminas e incubados durante uma hora.

4.2.1.8 Revelação

Nesta fase, após serem lavadas com tampão B e tampão 50mM Tris-HCl pH 7,6, as lâminas foram submersas neste último tampão (24ml) adicionado de diaminobenzidina (DAB 10mg) e H₂O₂ (7,5µl -30 v%). A reação foi interrompida com água.

4.3 Western blot

Western blot é um método utilizado para detectar proteínas em um homogeneizado de células. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas pelo peso. As proteínas são então transferidas do gel

para uma membrana de nitrocelulose e a presença da proteína de interesse é demonstrada utilizando-se um anticorpo marcado específico para a mesma.

4.3.1 Western blot para PrPc

4.3.1.1 Preparação do homogeneizado de retina

A retina foi homogeneizada a 10% em tampão de homogeneização (tampão Tris HCl 25 mM pH 7,5, PMSF 0,3mM, aprotinina 0,3 benzamidina 1mM, EDTA 10mM, β mercaptoetanol 2mM). A homogeneização foi realizada com pistilo de teflon a 1000rpm em banho de gelo (10 incursões). Após a homogeneização, a amostra foi separada em alíquotas, adicionadas a tampão de amostra (Tris HCl 0,375M pH 6,8, 10% sacarose, 10% SDS, 3,6M β mercaptoetanol, bromoferol) na proporção 4:1, fervidas por 3 minutos e estocadas a -20° . A dosagem de proteínas das alíquotas foi realizada pelo método microLowry.⁶⁹

4.3.1.2 Eletroforese de amostras de retinas sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)

O procedimento de eletroforese foi realizado de acordo com Laemmli & Favre.⁷⁰ As amostras de homogeneizado foram aplicadas em mini-géis de poliacrilamida a 15%. A seqüência de amostras aplicadas em cada poço do gel de empilhamento foi: padrão de peso de proteínas de baixo peso (10 μ l), proteína prion celular recombinante (0,25 μ g) e uma amostra de retina (60 μ g de proteína). Foram preparadas sete membranas, sendo que em três delas, as amostras da retina e da proteína foram incubadas com proteinase K (50 μ g/ μ l) durante uma hora antes de serem aplicadas no poço. Além disto, nestas três membranas, houve a aplicação da proteína recombinante sem proteinase K em um poço adicional. O padrão de peso molecular (SDS-PAGE *Molecular Weight Standards*,

low range-Bio rad) continha as seguintes proteínas: fosforilase b (97,4 kDa), albumina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor da tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). A corrente elétrica utilizada no início da corrida eletroforética foi de 10 mA por gel até as amostras atingirem o gel de separação, sendo então aumentada para 15 mA por gel até o final da corrida (azul de bromofenol atingindo a extremidade catódica do gel).

Composição dos géis: o gel de separação foi preparado com Tris HCl 2M pH8,8 (18,75 ml), TEMED (90ul), APS (750ul), SDS(750ul), Acrilamida (37,5ml) e H₂O (17,25ml). O gel de empilhamento foi preparado com Tris HCl pH6,8 (4,4ml), TEMED (87ul), APS (440ul), SDS(707ul), Acrilamida/bisacrilamida (9,4ml), H₂O (54,7ml).

4.3.1.3 Eletrotransferência

A eletrotransferência de proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o método de Towbin.⁷¹ O princípio deste método consiste na transferência eletroforética de proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (ECL *hybond nitrocellulose membrane*). Após a eletroforese, foi montado um “sanduíche” com a seguinte seqüência: suporte plástico / esponja / papel de filtro / gel / membrana de nitrocelulose / papel de filtro / esponja / suporte plástico. Este procedimento foi realizado com o material imerso em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,3, com SDS 0,1% (p/v), glicina 100 mM e etanol 18%(v/v), que foi utilizado também durante a eletrotransferência em cuba própria, com voltagem constante de 35 volts/gel por um período de quatro horas. O gel foi posicionado mais próximo à extremidade anódica e a membrana de nitrocelulose mais próxima à extremidade catódica cuba.

4.3.1.4 Detecção da proteína PrPc na membrana de nitrocelulose

Ao final da eletrotransferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau 5% (p/v), diluído em ácido tricloracético 3% (p/v) por 10 minutos e lavadas com água Milli-Q para observação das bandas de proteínas. As bandas do padrão de peso molecular foram marcadas a lápis. Após este procedimento, elas foram lavadas com tampão B e em seguida imersas em tampão de bloqueio durante 2 horas e 10 minutos. Foi então trocada a solução pelos anticorpos primários (os mesmos utilizados na imunohistoquímica) diluídos no tampão de bloqueio na concentração de 1:500, permanecendo por 4 horas. Neste passo uma das membranas foi incubada apenas com tampão de bloqueio (controle). Na seqüência as membranas foram lavadas com o tampão B, sendo então incubadas com o anticorpo secundário (o mesmo utilizado na imunohistoquímica) na diluição de 1:1000. Posteriormente as membranas foram lavadas com tampão B, depois com PBS e incubadas por uma hora com o *kit ABC Standard AK5000* para fosfatase alcalina com os reagentes A e B pré-incubados em PBS durante 30 minutos. A revelação foi realizada com azul nitro-tetrazóico (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) – Promega, diluídos em tampão Tris-HCl 0,1M pH9,5 , NaCl 0,1M, MgCl₂ 0,005M. A reação foi interrompida com água Milli-Q após 30 minutos.

5. RESULTADOS

5.1 Imunolocalização da proteína prion celular na retina humana

A imunohistoquímica evidenciou a presença de PrPc na retina humana com os três anticorpos testados (figura 5B, 5C e 5D). Os anticorpos 8G8 (figura 5D) e 3F4 (figura 5C) mostraram uma marcação mais intensa que o anticorpo policlonal (figura 5B). Houve marcação em todas as camadas da retina, mas esta foi mais intensa nas camadas nucleares interna e externa e na camada de células ganglionares. A eliminação da marcação na lâmina controle, na qual não houve incubação com o anticorpo primário comprovou a especificidade da reação (Figura 5A).

Na CNE os bastonetes foram corados de maneira uniforme, o que não se verificou com os cones, cujos núcleos ficaram mais evidentes que os citoplasmas, formando uma linha próxima à camada de fotorreceptores na retina central (Figura 6B, seta e 6C mesmo campo com maior aumento). Na camada de fotorreceptores, os segmentos internos dos cones e bastonetes apresentaram uma marcação moderada, mas os segmentos externos não coraram (Figura 6D). A marcação da CPE foi uniforme, com exceção da sua porção interna, adjacente à CNI, onde se observa uma linha de coloração mais intensa em toda a extensão da camada. Neste local ocorrem as sinapses entre os fotorreceptores e os neurônios de primeira ordem (Figura 6B, cabeça de seta). Na CNI e CCG grande parte das células apresentou marcação, com predomínio da coloração do citoplasma em comparação com os núcleos celulares tanto na retina periférica quanto na central (Figura 6E). O nervo óptico apresentou uma marcação granular

e uniforme (Figura 6G), semelhante à marcação dos axônios das células ganglionares na CFN (Figura 6F).

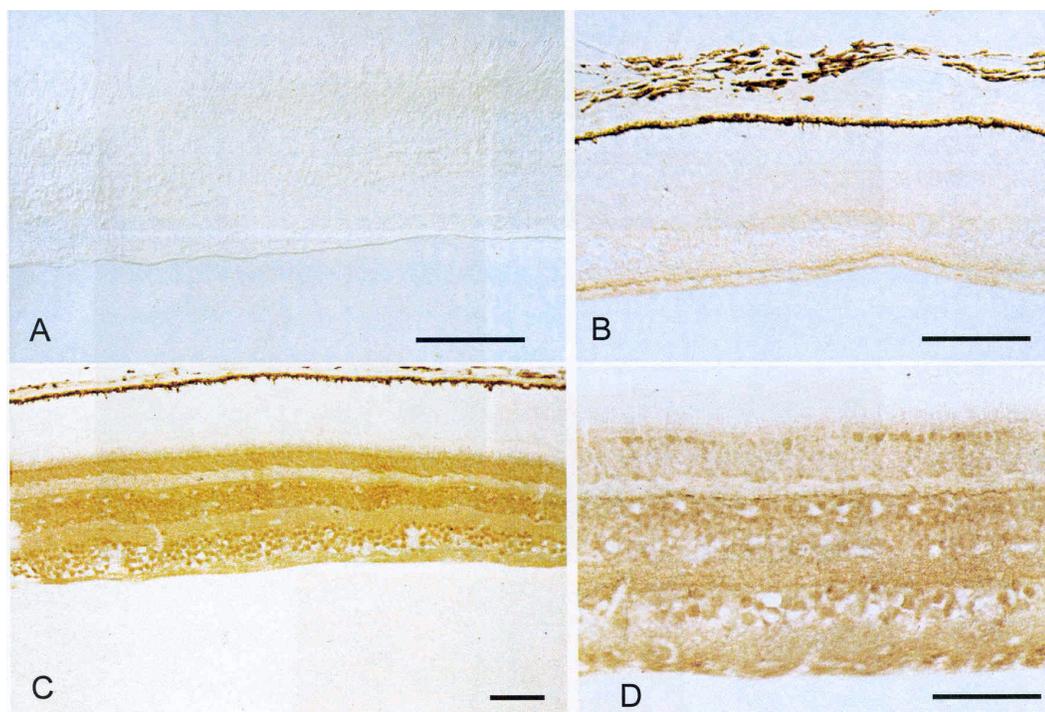


Figura 5. Imunolocalização do PrP^c na retina humana. Comparação das marcações utilizando três anticorpos diferentes. **A**-controle (no qual não ocorreu incubação com o anticorpo primário), **B**-policlonal, **C**-3F4 e **D**-8G8, Barra de calibração, 50 μ m.

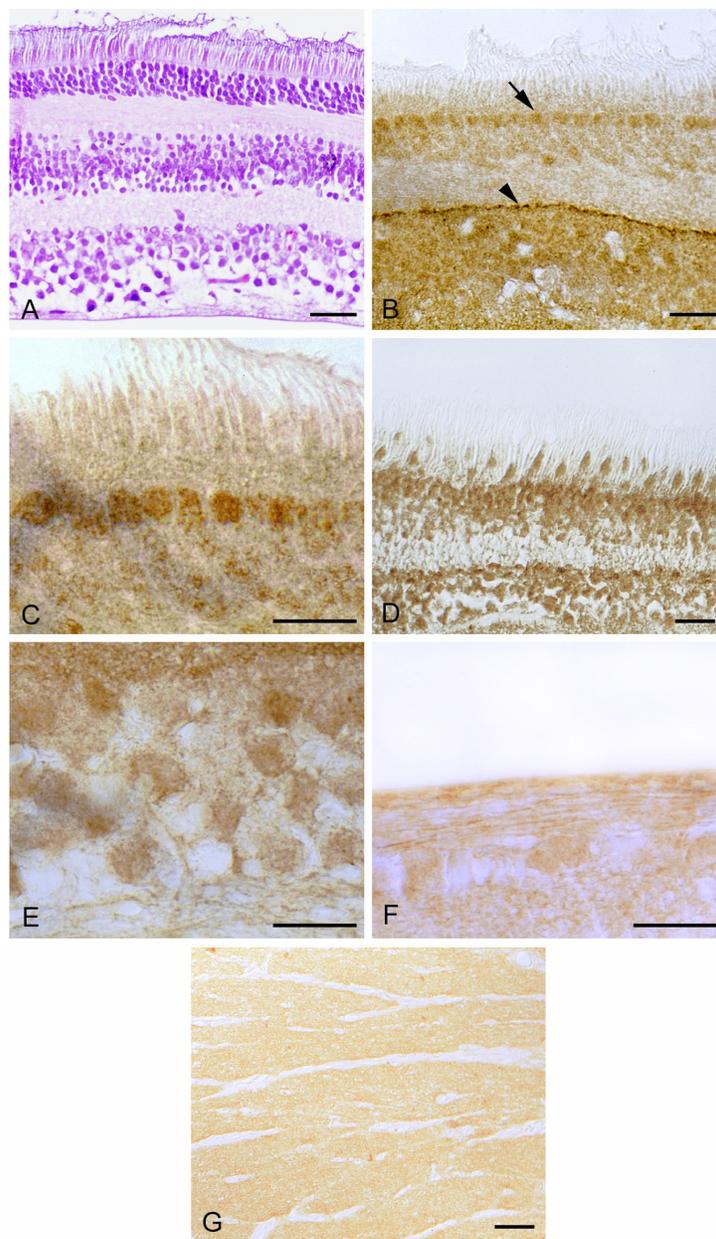


Figura 6. Imunolocalização do PrP^c na retina humana e no nervo óptico utilizando-se o anticorpo 8G8. **A**, corte da retina central corado com hematoxilina-eosina mostrando as camadas da retina; **B**, marcação dos núcleos dos cones localizados na porção mais externa da CNE (seta) e uma linha com coloração mais intensa na região de sinapses da CPE (cabeça de seta); **C**, maior aumento da mesma região mostrada em B (núcleos dos cones); **D**, corte da camada de fotorreceptores mostrando a marcação dos seguimentos internos dos cones e bastonetes. Não houve marcação nos seguimentos externos dos fotorreceptores; **E**, marcação predominantemente citoplasmática das células ganglionares na região central da retina; **F**, camada de fibras nervosas mostrando uma marcação uniforme moderada; **G**, nervo óptico. Barras de calibração: A, B, 50 μ m; C, D, E and F, 25 μ m; H = 100 μ m.

5.2 Western Blot

Os resultados do Western blot confirmaram a presença de PrPc na retina humana. A marcação da membrana obtida com a eletroforese da amostra de retina utilizando-se os anticorpos 8G8 e policlonal, mostrou uma proteína com mobilidade semelhante àquela obtida pelo PrPc recombinante (figura 7 A e B). A proteinase K digere completamente o PrPc e apenas parcialmente o PrPsc, portanto a ausência de marcação no local da membrana onde foi depositado o homogeneizado de retina previamente incubado com esta proteinase confirma a natureza não patológica da proteína presente no tecido (figura 7 C). Não houve marcação quando foi utilizado o anticorpo 3F4, mesmo após a recuperação antigênica. Na membrana processada sem o anticorpo primário (controle) não houve marcação (figura 7 D).

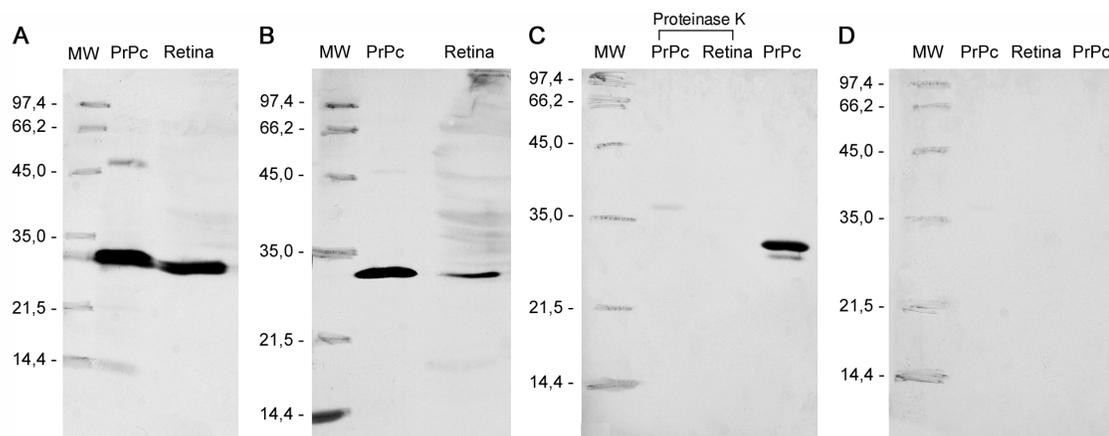


Figura 7. Western blot para PrP^c na retina humana. Membranas **A** e **B** mostrando a presença da proteína prion celular (PrPc) em uma amostra de retina. A proteína marcada na amostra apresentou uma mobilidade eletroforética similar àquela obtida pelo PrPc recombinante. As marcações foram obtidas com a utilização dos anticorpos policlonal (**A**) e 8G8 (**B**). A membrana **C** mostra a ausência de sinal nas amostras incubadas com proteinase K. Houve detecção da proteína apenas na última fileira, na qual o PrPc recombinante não foi incubado com a proteinase. Na membrana **D** o anticorpo primário não foi utilizado (controle). **MW**-padrão de peso, **PrPc**-Proteína prion celular recombinante

6. DISCUSSÃO

A localização da proteína prion celular nos tecidos é de grande importância para a compreensão das suas funções e da fisiopatologia das EET. No presente estudo, a partir da análise de olhos humanos por imunohistoquímica e Western blot, demonstramos que o PrP^c está presente em diferentes células em todas as camadas da retina e no nervo óptico. Para evitar a inclusão de pacientes com qualquer tipo de retinopatia, uma lâmina de cada olho foi avaliada por um patologista.

Sabe-se que a expressão do PrP^c é indispensável para o desenvolvimento das encefalopatias causadas pelo prion, tanto nos tecidos periféricos como no SNC. Este fato fica bem demonstrado em um experimento no qual animais *Knockout* para o gen do prion foram transplantados com retalhos de tecido nervoso proveniente de cérebros que expressavam esta proteína. A inoculação intra-cerebral de extratos de tecido infectado com PrP^{Sc} nestes animais acarretou o desenvolvimento de degeneração espongiiforme no tecido transplantado sem comprometer o tecido adjacente. No entanto, a inoculação periférica de PrP^{Sc} nestes animais não foi capaz de desencadear a degeneração do tecido cerebral transplantado.¹⁹ A rota através da qual o PrP^{Sc} atinge o cérebro também é importante, pois tem influência no período de incubação da doença. Sabe-se que a inoculação intra-ocular de PrP^{Sc} irá desencadear sintomas de EET em hamsters mais tardiamente do que a inoculação intra-cerebral ou intra-abdominal.⁷² Vários Modelos animais foram utilizados para demonstrar a transmissão das encefalopatias espongiiformes através das vias oculares. A doença de Creutzfeldt-Jakob foi transmitida experimentalmente para cobaias

através da inoculação intra-ocular de córneas infectadas.⁷³ A transmissão de *Scrapie* também foi demonstrada através da inoculação intra-ocular e da instilação conjuntival de tecido nervoso contaminado.⁷⁴ No homem, esta rota de transmissão tem ocorrido acidentalmente através de transplante de córnea de doadores doentes.^{47,51}

O desenvolvimento de retinopatia foi descrito em várias espécies de animais portadores de EET. Em estudos experimentais, hamsters infectados com *scrapie* e ratos com CJD evidenciaram alterações semelhantes na retina caracterizadas principalmente por uma atrofia da camada de fotorreceptores e da camada nuclear externa.^{63,75} Diferentemente dos modelos animais, em pacientes portadores de sCJD e vCJ evidenciou-se a presença do PrP^{sc} nas camadas plexiforme interna e externa. Não foi encontrado PrP^{sc} em nenhuma das camadas nucleares ou na camada de células ganglionares e não houve evidência de retinopatia nestes pacientes.^{66,76} Há poucos trabalhos abordando a presença e a localização do PrP^{sc} nos tecidos oculares normais. A expressão do PrP^{sc} foi demonstrada em retina de hamsters e de camundongos geneticamente modificados que expressavam PrP^{sc} de hamsters,. Nestes animais, houve marcação preferencialmente da camada de fotorreceptores. Os camundongos normais não apresentaram nenhuma marcação.⁷⁷ Em retinas de ratos recém nascidos, foi demonstrada a presença de PrP^{sc} em todas as camadas.⁷⁸ No homem a presença do RNA mensageiro (mRNA) responsável pela codificação do PrP^{sc} foi demonstrada através de hibridização *in situ* na retina e no nervo óptico de um olho normal, mas a expressão da proteína no tecido não foi analisada.⁶⁶ Neste trabalho, assim como no presente estudo, ocorreu uma marcação específica em todas as camadas nucleares, porém não há descrição de marcação nas camadas

plexiformes e os resultados das marcações na MLI e na CFN não foram conclusivos devido à presença de artefatos. Um resultado interessante no trabalho com hibridização *in situ* foi a descrição de uma linha de marcação mais intensa no limite externo da camada nuclear externa. Esta linha mais marcada provavelmente corresponde aos corpos celulares dos cones, confirmando os resultados encontrados no presente estudo, no qual os núcleos destas células, que se encontram enfileirados adjacentes à camada de fotorreceptores, apresentaram uma marcação intensa. Esta marcação não se verificou nos bastonetes (Figura 6B, seta). Alguns autores descrevem uma grande discordância entre os níveis de RNAm que codifica o PrPc e a expressão da proteína no cérebro, sugerindo que a regulação da sua expressão ocorra por mecanismos pós-translação, como tráfego e degradação protéicos.¹³ Neste experimento, houve marcação das diversas células em todas as camadas da retina e no nervo óptico. Esta distribuição universal da proteína também é descrita em estudos de imunolocalização do PrPc no SNC. Foi demonstrado que em córtex frontal e occipital humano o prion celular encontra-se presente tanto na substância branca quanto na cinzenta (preferencialmente nesta), bem como na região de transição entre ambas.⁷⁹ Em cerebelo de ratos, a proteína está presente em toda a superfície celular, tanto de células da glia quanto nos neurônios.¹⁴ Outro estudo sobre a expressão do PrPc mRNA através de hibridização *in situ* evidenciou sua presença em neurônios do hipocampo, córtex, tálamo, cerebelo e medula.¹⁵ Um resultado importante no nosso estudo foi o acúmulo de PrPc que se verificou na CPE, onde há uma concentração de sinapses organizadas de forma linear (Figura 6B, cabeça de seta). Estudos recentes têm evidenciado o papel do prion nas sinapses. Já foi mostrado que a presença de PrPc recombinante com uma

conformação semelhante à do PrPc nativo estimula o desenvolvimento de sinapses em neurônios do hipocampo de embriões de ratos *in vitro*.⁸⁰ Alguns autores entendem que existem hoje evidências suficientes de que PrPc é uma proteína sináptica que confere resistência ao estresse oxidativo e à toxicidade pelo cobre e que provavelmente ocorram duas formas de PrPc nos neurônios: uma sináptica e outra não sináptica.⁸¹ Foi demonstrado que alterações na fisiologia seguidas de destruição das sinapses são o passo inicial e decisivo na neuropatogênese das EET.⁸² Neste estudo houve uma diminuição da quantidade de sinaptofisina (uma glicoproteína constituinte das membranas das vesículas sinápticas) nas terminações nervosas no hipocampo antes que fosse demonstrada qualquer alteração neuronal. Esta diminuição ocorreu concomitantemente ao acúmulo de PrPsc nestas células na fase pré-clínica da doença. Outros estudos, ao contrário, contradizem a noção de que o PrPc é encontrado preferencialmente nas sinapses, evidenciando que a proteína está distribuída por todas as porções dos neurônios, sem qualquer localização sináptica especial.¹⁴ É importante considerar que demonstrar a presença de uma proteína com a labilidade conformacional do PrPc é um desafio, uma vez que os protocolos utilizados para fixar e processar os tecidos influenciam de forma decisiva os resultados encontrados. Mesmo em estudos no qual foram utilizados cortes de tecidos congelados (que, portanto, não haviam sido submetidos à fixação com paraformaldeído e parafinização), os resultados obtidos com quatro anticorpos diferentes foi muito variável, demonstrando a variabilidade de marcação desta proteína.⁷⁹ Alguns anticorpos não são capazes de reconhecer antígenos sem que haja um pré-tratamento dos tecidos com agentes desnaturantes ou mudanças de temperatura.⁸³ Estes tratamentos, denominados

recuperação antigênica, têm a finalidade de promover a exposição dos epitopos a serem reconhecidos pelos anticorpos. No caso do PrPc, diversos protocolos foram testados por diferentes autores com a finalidade de encontrar a recuperação antigênica mais eficaz para esta proteína.⁸⁴ No presente estudo, com a finalidade de encontrar a melhor marcação para o prion na retina, foram testados nove diferentes protocolos de recuperação antigênica e o que mostrou o melhor resultado foi o aquecimento dos tecidos em *steam heater* submersos em uma solução de ácido clorídrico 2mM/l durante quarenta minutos seguidos por cinco minutos de imersão em ácido fórmico a 95%. No método de Western blot as membranas também foram submetidas a um processo de recuperação antigênica com altas temperaturas e agentes desnaturantes. Mesmo assim, o anticorpo 3F4 não foi capaz de identificar a presença da proteína nas amostras testadas, provavelmente por uma exposição inadequada do epitopo reconhecido por este anticorpo. A expressão do PrPc na retina humana aqui demonstrada adiciona informações ao estudo das vias oculares como rota de transmissão das encefalopatias espongiformes no homem.

7.CONCLUSÃO

A proteína prion celular está presente em todas as camadas da retina e no nervo óptico. Apesar de apresentar uma distribuição difusa por todo o tecido, verificou-se um predomínio desta proteína nas camadas nucleares e na região de sinapses da camada plexiforme externa. Esta distribuição universal da proteína também é descrita em estudos de imunolocalização do PrPc no SNC e coincide com os resultados de hibridização *in situ* na retina humana. A verificação da presença do prion celular na retina humana reforça a importância da via ocular na transmissão das EET.

8. REFERÊNCIAS

1. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(23):13363-13383.
2. Cabrita G. ovelhas, vacas loucas, priões e o resto. 10-9-2006.
<http://www.ordembilogos.pt/Biologias.html#abril05>
3. Macalister GO, Buckley RJ. The risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease via contact lenses and ophthalmic devices. Cont Lens Anterior Eye 2002; 25(3):104-136.
4. Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ et al. Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. Lancet 2006; 367(9528):2068-2074.
5. Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. Annu Rev Neurosci 2001; 24:519-550.
6. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature 1967; 214(90):764-766.
7. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. Science 1982; 218(4579):1309-1311.

8. Ross ED, Minton A, Wickner RB. Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat Cell Biol* 2005; 7(11):1039-1044.
9. Harris DA, True HL. New insights into prion structure and toxicity. *Neuron* 2006; 50(3):353-357.]
10. Choi CJ, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy AG. Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. *Neurotoxicology* 2006; 27(5):777-787.
11. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23):10962-10966.
12. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY et al. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 1992; 42(1):149-156.
13. Ford MJ, Burton LJ, Li H, Graham CH, Frobert Y, Grassi J et al. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* 2002; 111(3):533-551.

14. Laine J, Marc ME, Sy MS, Axelrad H. Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *Eur J Neurosci* 2001; 14(1):47-56.
15. McLennan NF, Rennison KA, Bell JE, Ironside JW. In situ hybridization analysis of PrP mRNA in human CNS tissues. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27(5):373-383.
16. Moya KL, Sales N, Hassig R, Creminon C, Grassi J, Di Giamberardino L. Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc Res Tech* 2000; 50(1):58-65.
17. Mastrianni JA, Roos RP. The prion diseases. *Semin Neurol* 2000; 20(3):337-352.
18. Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I et al. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 2002; 512(1-3):25-28.
19. Blattler T, Brandner S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtlander T, Weissmann C et al. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 1997; 389(6646):69-73.
20. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356(6370):577-582.

21. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 1996; 380(6574):528-531.
22. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994; 370(6487):295-297.
23. Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 1999; 40(12):1679-1682.
24. Roesler R, Walz R, Quevedo J, de Paris F, Zanata SM, Graner E et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 71(2):349-353.
25. Saa P, Castilla J, Soto C. Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 2006; 313(5783):92-94.
26. Johnson RT, Gibbs CJ, Jr. Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1998; 339(27):1994-2004.

27. Mabbott NA, MacPherson GG. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(3):201-211.
28. Hill AF, Collinge J. Subclinical prion infection. *Trends Microbiol* 2003; 11(12):578-584.
29. Johnson RT. Prion diseases. *Lancet Neurol* 2005; 4(10):635-642.
30. The National Prion Disease Pathology Surveillance Center (NPDPSC). The National Prion Disease Pathology Surveillance Center (NPDPSC). 14-10-2006.
31. Ref Type: Internet Communication
32. Collee JG, Bradley R. BSE: a decade on--Part I. *Lancet* 1997; 349(9052):636-641.
33. Williams ES. Chronic wasting disease. *Vet Pathol* 2005; 42(5):530-549.
34. The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit. The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit. 14-10-2006.
35. Ref Type: Internet Communication

36. Korth C, Peters PJ. Emerging pharmacotherapies for Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2006; 63(4):497-501.
37. Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro CJ, Hegyi I et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999; 353(9165):1673-1674.
38. Laplanche JL, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Chatelain J, Beaudry P, Alperovitch A et al. Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Neurology* 1994; 44(12):2347-2351.
39. Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T et al. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet* 1996; 98(3):259-264.
40. Wientjens DP, Davanipour Z, Hofman A, Kondo K, Matthews WB, Will RG et al. Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies. *Neurology* 1996; 46(5):1287-1291.
41. Kropp S, Schulz-Schaeffer WJ, Finkenstaedt M, Riedemann C, Windl O, Steinhoff BJ et al. The Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1999; 56(1):55-61.

42. Vargas ME, Kupersmith MJ, Savino PJ, Petito F, Frohman LP, Warren FA. Homonymous field defect as the first manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Ophthalmol* 1995; 119(4):497-504.
43. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46(2):224-233.
44. Finkenstaedt M, Szudra A, Zerr I, Poser S, Hise JH, Stoebner JM et al. MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease. *Radiology* 1996; 199(3):793-798.
45. Ward HJ, Everington D, Croes EA, Alperovitch A, Delasnerie-Laupretre N, Zerr I et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and surgery: a case-control study using community controls. *Neurology* 2002; 59(4):543-548.
46. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J et al. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998; 43(1):32-40.
47. Chapman J, Ben Israel J, Goldhammer Y, Korczyn AD. The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation. *Neurology* 1994; 44(9):1683-1686.

48. Spudich S, Mastrianni JA, Wrensch M, Gabizon R, Meiner Z, Kahana I et al. Complete penetrance of Creutzfeldt-Jakob disease in Libyan Jews carrying the E200K mutation in the prion protein gene. *Mol Med* 1995; 1(6):607-613.
49. Hammersmith KM, Cohen EJ, Rapuano CJ, Laibson PR. Creutzfeldt-Jakob disease following corneal transplantation. *Cornea* 2004; 23(4):406-408.
50. Billette d, V, Gelot A, Deslys JP, Dormont D, Duyckaerts C, Jardin L et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease in three growth hormone recipients: a neuropathological study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20(2):111-117.
51. Brown P, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Asher DM. Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. *N Engl J Med* 1985; 313(12):728-731.
52. Heath CA, Barker RA, Esmonde TF, Harvey P, Roberts R, Trend P et al. Dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease: experience from surveillance in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(7):880-882.
53. Heckmann JG, Lang CJ, Petrush F, Druschky A, Erb C, Brown P et al. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63(3):388-390.

54. Wilson K, Code C, Ricketts MN. Risk of acquiring Creutzfeldt-Jakob disease from blood transfusions: systematic review of case-control studies. *BMJ* 2000; 321(7252):17-19.
55. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363(9407):417-421.
56. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004; 364(9433):527-529.
57. Duncan RE, Delatycki MB, Collins SJ, Boyd A, Masters CL, Savulescu J. Ethical considerations in presymptomatic testing for variant CJD. *J Med Ethics* 2005; 31(11):625-630.
58. Blattler T. Implications of prion diseases for neurosurgery. *Neurosurg Rev* 2002; 25(4):195-203.
59. Rutala WA, Weber DJ. Creutzfeldt-Jakob disease: recommendations for disinfection and sterilization. *Clin Infect Dis* 2001; 32(9):1348-1356.
60. Collinge J, Beck J, Campbell T, Estibeiro K, Will RG. Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1996; 348(9019):56.

61. Lasmezas CI, Comoy E, Hawkins S, Herzog C, Mouthon F, Konold T et al. Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* 2005; 365(9461):781-783.
62. Liberski PP, Budka H. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. I. Human diseases. *Folia Neuropathol* 2004; 42 Suppl B:120-140.
63. Arata H, Takashima H, Hirano R, Tomimitsu H, Machigashira K, Izumi K et al. Early clinical signs and imaging findings in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome (Pro102Leu). *Neurology* 2006; 66(11):1672-1678.
64. Almer G, Hainfellner JA, Brucke T, Jellinger K, Kleinert R, Bayer G et al. Fatal familial insomnia: a new Austrian family. *Brain* 1999; 122 (Pt 1):5-16.
65. Hogan MJ AJWJ. *Histology of the Human Eye*. 1-2-1971. W B Saunders Company.
66. Foster J, Farquhar C, Fraser J, Somerville R. Immunolocalization of the prion protein in scrapie affected rodent retinas. *Neurosci Lett* 1999; 260(1):1-4.
67. Greenlee JJ, Hamir AN, West Greenlee MH. Abnormal prion accumulation associated with retinal pathology in experimentally inoculated scrapie-affected sheep. *Vet Pathol* 2006; 43(5):733-739.

68. Head MW, Northcott V, Rennison K, Ritchie D, McCardle L, Bunn TJ et al. Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(1):342-346.
69. Kercher L, Favara C, Chan CC, Race R, Chesebro B. Differences in scrapie-induced pathology of the retina and brain in transgenic mice that express hamster prion protein in neurons, astrocytes, or multiple cell types. *Am J Pathol* 2004; 165(6):2055-2067.
70. Jorge R. Imunolocalização da Isoforma Neuronal da Sintase do Óxido Nítrico (nNOS), do Inibidor Proteico da nNOS e da Miosina-V na Retina Humana Normal. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para a obtenção do título de doutor em medicina. 1999.
71. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83(2):346-356.
72. Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 1973; 80(4):575-599.
73. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9):4350-4354.

74. Kimberlin RH, Walker CA. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol* 1986; 67 (Pt 2):255-263.
75. Manuelidis EE, Angelo JN, Gorgacz EJ, Kim JH, Manuelidis L. Experimental creutzfeldt-jakob disease transmitted via the eye with infected cornea. *N Engl J Med* 1977; 296(23):1334-1336.
76. Scott JR, Foster JD, Fraser H. Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease. *Vet Microbiol* 1993; 34(4):305-309.
77. Hogan RN, Baringer JR, Prusiner SB. Progressive retinal degeneration in scrapie-infected hamsters: a light and electron microscopic analysis. *Lab Invest* 1981; 44(1):34-42.
78. Head MW, Peden AH, Yull HM, Ritchie DL, Bonshek RE, Tullo AB et al. Abnormal prion protein in the retina of the most commonly occurring subtype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(9):1131-1133.
79. Chishti MA, Strome R, Carlson GA, Westaway D. Syrian hamster prion protein (PrP(C)) is expressed in photoreceptor cells of the adult retina. *Neurosci Lett* 1997; 234(1):11-14.

80. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 2002; 21(13):3317-3326.
81. Rezaie P, Pontikis CC, Hudson L, Cairns NJ, Lantos PL. Expression of cellular prion protein in the frontal and occipital lobe in Alzheimer's disease, diffuse Lewy body disease, and in normal brain: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(8):929-940.
82. Kanaani J, Prusiner SB, Diacovo J, Baekkeskov S, Legname G. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem* 2005; 95(5):1373-1386.
83. Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 2001; 24(2):85-90.
84. Cunningham C, Deacon R, Wells H, Boche D, Waters S, Diniz CP et al. Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *Eur J Neurosci* 2003; 17(10):2147-2155.
85. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(8):931-937.

86. Van Everbroeck B, Pals P, Martin JJ, Cras P. Antigen retrieval in prion protein immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1999; 47(11):1465-1470.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)