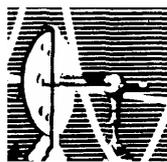


RAFAEL MARIANTE MEYER

“REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
PRÍON EM NEUTRÓFILOS”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 8

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RAFAEL MARIANTE MEYER

“REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
PRÍON EM NEUTRÓFILOS”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Rafael Linden

Co-orientador: Alberto Félix Antônio da Nóbrega



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 8

Mariante, Rafael Meyer

Regulação da expressão da proteína príon em neutrófilos / Rafael Mariante Meyer. -- Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

xiv, 134 f. : il. ; 29,7 cm.

Orientadores: Rafael Linden e Alberto Félix Antônio da Nóbrega

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Referências bibliográficas: f. 105-134

1. Proteína príon 2. Neutrófilos 3. Lipopolissacarídeo 4. Inflamação 5. Estresse 6. Citocinas 7. Glicocorticóides - Tese. I. Linden, Rafael. II. Nóbrega, Alberto Félix Antônio da. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). IV. Título.

RAFAEL MARIANTE MEYER

“REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRÍON EM NEUTRÓFILOS”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2008.

DR. RAFAEL LINDEN, IBCCF, UFRJ
(ORIENTADOR)

DR. ALBERTO FÉLIX ANTÔNIO DA NÓBREGA, IMPPG, UFRJ
(CO-ORIENTADOR)

DR. GEORGE ALEXANDRE DOS REIS, IBCCF, UFRJ

DR. MARCELO TORRES BOZZA, IMPPG, UFRJ

DR. PEDRO PAULO XAVIER ELSAS, IMPPG, UFRJ

DR. BRUNO LOURENÇO DIAZ, IBCCF, UFRJ
(REVISOR)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurogênese do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Dr. Rafael Linden e co-orientação do Dr. Alberto Félix Antônio da Nóbrega, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

A minha amada esposa, Fernanda, que depositou toda confiança em mim e acreditou na minha capacidade, até quando eu mesmo deixei de fazê-lo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Rafael, pela imensa sabedoria compartilhada, pela liberdade que me conferiu para que eu conduzisse essa tese na direção em que eu acreditei ser a melhor, pela generosidade, e pela total confiança depositada em mim;

Ao meu co-orientador, Alberto, por compartilhar comigo sua mente brilhante nas madrugadas que passamos juntos no FACS, pelos ensinamentos metodológicos, pela total disposição em ajudar e solucionar problemas, e pelo seu eterno bom humor;

A Fernanda, minha querida esposa, pela eterna paciência, dedicação, companheirismo e amizade, por todas as noites que passou em claro esperando minha chegada do laboratório, quase sempre com um banquete pronto para suprir os longos períodos que passei sem me alimentar enquanto me entretinha com experimentos, por apoiar todas as minhas decisões, mesmo que isso significasse mudar radicalmente seus planos pessoais e profissionais, e por todo amor que uma mulher é capaz de oferecer;

A minha querida mãe, Aline, pelo incentivo que me deu quando decidi me tornar biólogo, pelo apoio financeiro, e por ter me atribuído o caráter que tenho hoje;

A Ana, minha dileta sogra, por sua dedicação, por sua disposição em ajudar sempre, e pelo apoio financeiro;

Ao meu tio Armando, por todo apoio que sempre me concedeu, moral e financeiro, ao longo da minha caminhada científica, e por me servir de exemplo de dedicação, perseverança e força de vontade;

Ao meu filho de quatro patas, Jorge Antônio, pelo amor incondicional que nenhum ser humano seria capaz de oferecer;

A Dra. Vilma Martins, pela colaboração na produção do soro anti-PrP^C, principal ferramenta dessa tese;

Ao Sérgio Seabra, “Serginho”, por me ensinar algumas das metodologias com manipulação de camundongos empregadas nessa tese;

A Hilda, por sua orientação, por suas dicas valiosas, e pela ajuda essencial na elaboração inicial desse trabalho;

A Juliana, por todas as nossas afinidades, que fizeram com que nos tornássemos mais do que colegas de laboratório;

As meninas, Roberta e Tamara, pela energia vital que irradia de cada uma delas, tornando mais agradável o ambiente de trabalho, e pela total disponibilidade em ajudar;

A Isadora, por seu carisma, e pela ajuda fundamental na realização dos experimentos finais desse projeto;

Ao Bruno, por sua sincera e admirável paixão pela ciência;

A todos os colegas e ex-colegas do laboratório de neurogênese que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho: Alfred, Brian, Camila, Carol, Isabel, Luciana, Lucianne, Maithê, Marco, Mari, Mona, Rachel, Sebastián, Tati e Vinícius;

Ao Nilson, Gildo, Tiburcio, Talita e Terezinha, pela paciência, pela disposição em ajudar sempre, e pelo apoio técnico sem o qual o laboratório não funcionaria;

A todos que me ajudaram na produção dos resultados presentes nessa tese, fosse através de doação de reagentes, ensinamento de alguma metodologia ou compartilhamento de idéias: Maria Bellio, Alessandra Granato, Luciana Romão, Victor Resende e Ana Gabriela;

Aos meus guias espirituais.

“Tudo tem seu tempo e até
certas manifestações mais vigorosas e
originais entram em voga ou saem de moda. Mas
a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.” Baltasar Gracián

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPc	Monofosfato de adenosina (AMP) cíclico
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Trifosfato de adenosina
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
CG	Catepsina G
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
CMV	Corpos multivesiculares
ConA	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenase
CpG DNA	DNA contendo citocinas e guaninas não metiladas
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CTAP	Peptídeo ativador de tecido conjuntivo
CTR	Controle
CWD	Doença Crônica Degenerativa
DC	Célula dendrítica
DEX	Sulfato de dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dpl	Doppel
EC	Estresse por confinamento
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
EUE	Encefalopatia Exótica de Ungulados
FACS	Separação celular ativada por fluorescência
FDC	Célula dendrítica folicular
FFI	Insônia Familiar Fatal
FLT	Tirosina cinase semelhante a FMS
fMLPR	Formilmetionilleucilfenilalanina
FPR	Receptor de formil peptídeo
FPRL	Receptor semelhante ao receptor de formil peptídeo
FSE	Encefalopatia Espongiforme Felina
GC	Glicocorticóide
G-CSF	Fator estimulante de granulócitos
GFP	Proteína fluorescente verde
GH	Hormônio de crescimento
GM-CSF	Fator estimulante de granulócitos e macrófagos
GP	Grânulos protéicos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GR	Receptor de glicocorticóide
GRE	Elemento de resposta a glicocorticóides
GSS	Síndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HMG	Proteína do grupo de alta mobilidade
Hop/STI-1	Co-chaperona induzida por estresse, adaptadora de Hsp70/Hsp90
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HSC	Célula tronco hematopoiética
Hsp	Proteína de choque térmico

ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KO/PrP ^{-/-}	Animal deficiente em PrP ^C ou célula obtida de animal deficiente em PrP ^C
LAD	Deficiência de adesão leucocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
LTβR	Receptor solúvel de linfotoxina beta
MACS	Separação celular magnética
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MC	Meio condicionado
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos
MD	Diferenciação mielóide
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NE	Elastase neutrofílica
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NLR	Receptor semelhante a NOD
NOC-18	Composto de liberação de óxido nítrico
NOD	Proteína de domínio de oligomerização de nucleotídeos
ORF	Região aberta para leitura
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PAR	Receptor ativado por protease
PBS	Tampão fosfato salino
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PI-PLC	Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PMA	Forbol miristato acetato
PMN	Polimorfonuclear
PR3	Proteinase 3
PrP ¹⁰⁶⁻¹²⁶	Peptídeo neurotóxico que simula a toxicidade da PrP ^{Sc}
PrP ^C	Proteína príon
PrP ^{Sc}	Forma patogênica da proteína príon
PrR	Peptídeo de ligação ao domínio de interação com a STI-1
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RANTES	Proteína regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais
RE	Retículo endoplasmático
RIG	Gene indutível de ácido retinóico
RLR	Receptor semelhante a RIG-I
RNA _m	Ácido ribonucléico (RNA) mensageiro
ROS	Espécie reativa de oxigênio
R-SMAD	SMAD regulada por receptor
SBE	Elemento de ligação a SMAD
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sódio)

SFB	Soro fetal bovino
SMAD	Proteína homóloga às proteínas MAD de <i>Drosophila</i> e SMA de <i>C. elegans</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNI	Soro não-imune
SOD	Cu/Zn superóxido dismutase
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TCR	Receptor de células T
TGF	Fator de crescimento transformante
TGF- β RII	Receptor de TGF- β tipo II
TLR	Receptor semelhante ao gene <i>Toll</i> de <i>Drosophila</i>
TME	Encefalopatia transmissível de Marta
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 de TNF- α
TNFR1 ^{-/-}	Animal deficiente em TNFR1
TREM	Receptor de ativação expresso em células mielóides
TSE	Encefalopatia espongiiforme transmissível
UTR	Região não traduzida
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT/PrP ^{+/+}	Animal selvagem ou célula obtida de animal selvagem
ZAP-70	Proteína cinase associada à cadeia zeta

RESUMO

MARIANTE, Rafael Meyer. Regulação da expressão da proteína príon em neutrófilos. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A proteína príon (PrP^C) é uma sialoglicoproteína encontrada predominantemente em células do sistema nervoso e, em menor quantidade, em outros tecidos, principalmente no sistema linfocitário. Ela é expressa constitutivamente na superfície celular ligada à membrana plasmática por uma âncora de glicosil fosfatidilinositol (GPI). As funções fisiológicas da PrP^C ainda não estão totalmente esclarecidas, apesar de ter sido demonstrada sua participação nos processos de proteção contra estresse oxidativo, apoptose, atividade sináptica, diferenciação celular, dentre outros. No sistema imune, dados sugerem que a PrP^C participa das funções normais de diversos componentes celulares e da modulação de vários aspectos da inflamação induzida por ligantes de receptores tipo Toll (TLR) ou Fas; e parece haver uma associação entre a sinalização via TLRs e a patogênese das doenças por príon. O controle da expressão da PrP^C é de fundamental importância, tanto sob condições fisiológicas, onde a proteína participa da regulação de várias funções celulares, quanto sob condições patológicas, onde a disponibilidade da mesma é imprescindível para a propagação das doenças por príon. Uma vez que as células imunes afetam o desenvolvimento das doenças por príon e, reciprocamente, a PrP^C afeta a função imune, os níveis de expressão dessa proteína funcionariam, em ambos os casos, como um fator limitante. Tendo em vista que os neutrófilos constituem um dos principais componentes celulares da inflamação, a compreensão dos mecanismos de regulação da PrP^C nessas células poderia ter grande relevância para as funções celulares normais, além de fornecer informações importantes para o entendimento das doenças por príon. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo determinar o papel de mediadores inflamatórios na regulação da expressão da PrP^C em neutrófilos, utilizando-se para isso um modelo murino de inflamação aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Observamos que o tratamento com LPS induz aumento na expressão da PrP^C em neutrófilos por uma via dependente de fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e glicocorticóide (GC). Em um modelo experimental de estresse induzido, onde os níveis de GCs são naturalmente elevados, a quantidade de PrP^C também se encontra aumentada em neutrófilos. O tratamento prévio dos camundongos com um antagonista de receptores de GCs inibe parcialmente o efeito do estresse. Em resumo, o estresse causado por endotoxemia ou confinamento induz aumento na expressão da PrP^C em neutrófilos por mecanismos dependentes de TGF- β e/ou GCs. Esses dados mostram, pela primeira vez, a participação direta de componentes antiinflamatórios na regulação da PrP^C em neutrófilos.

ABSTRACT

MARIANTE, Rafael Meyer. Regulação da expressão da proteína príon em neutrófilos. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The prion protein (PrP^C) is a sialoglycoprotein found mainly in cells of the nervous system and, to a lesser extent, in other tissues, mainly in the lymphoreticular system. It is constitutively expressed on the cell surface, and bound to the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI). The physiological functions of PrP^C are not totally known, although it has been shown to participate in mechanisms of protection against oxidative stress, apoptosis, synaptic activity, cell differentiation, among others. Within the immune system, data suggest that PrP^C has a role in normal functions of several cellular components and in the modulation of many aspects of inflammation induced by toll-like receptor (TLR) or Fas ligands; and there seems to be an association between TLRs signaling and the pathogenesis of prion diseases. The control of PrP^C expression is of key importance under physiological conditions, where the protein participates in the regulation of various cellular functions, as well as under pathological conditions, where its availability is essential for the propagation of prion diseases. Since immune cells affect the progression of prion diseases and, in turn, the PrP^C impacts immune function, the protein expression levels would be, in both cases, a limiting factor. Having in mind that neutrophils constitute one of the main cellular components of inflammation, understanding the mechanisms of PrP^C regulation in these cells could be of great relevance for the normal cellular functions, besides bringing important informations for the understanding of prion diseases. Therefore, the aim of this work was to determine the role of inflammatory mediators in the regulation of PrP^C expression in neutrophils, by using a murine model of acute inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). We found that LPS treatment induces an increase in the expression of PrP^C in neutrophils, through a transforming growth factor-beta (TGF- β) and glucocorticoid (GC) dependent pathway. In an experimental model of induced stress, where the levels of GCs are naturally raised, the amount of PrP^C is also found increased in neutrophils. Previous treatment of mice with a glucocorticoid receptor antagonist partially inhibited the stress effect. In short, the stress provoked by endotoxemia or restraint induces increased expression of PrP^C in neutrophils through TGF- β and/or GCs dependent mechanisms. These data show, for the first time, the direct involvement of antiinflammatory components in the regulation of PrP^C in neutrophils.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PRÍONS.....	15
1.2 DOENÇAS POR PRÍONS	16
1.3 ESTRUTURA E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>PRNP</i>	19
1.4 TRÁFEGO INTRACELULAR DA PROTEÍNA PRÍON	23
1.5 FUNÇÕES DA PROTEÍNA PRÍON	27
1.5.1 <i>Estresse oxidativo, apoptose, neuroproteção</i>	28
1.5.2 <i>Interação com cobre</i>	31
1.5.3 <i>Atividade sináptica</i>	31
1.5.4 <i>Proliferação, diferenciação e migração celular</i>	32
1.5.5 <i>Outras funções</i>	34
1.6 O SISTEMA IMUNE NAS DOENÇAS POR PRÍON	35
1.7 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NAS DOENÇAS POR PRÍON	39
1.8 A PROTEÍNA PRÍON NO SISTEMA IMUNE.....	43
1.9 A PROTEÍNA PRÍON EM NEUTRÓFILOS E NA INFLAMAÇÃO	48
1.10 RACIONAL.....	55
2 OBJETIVOS	56
2.1 GERAL.....	56
2.2 ESPECÍFICOS.....	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 REAGENTES	57
3.2 ANIMAIS	58
3.3 PRODUÇÃO DO SORO ANTI-PrP ^C	59
3.4 TRATAMENTO COM LPS E DEX E ISOLAMENTO DE CÉLULAS DA M.O.	60
3.5 PURIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS POR COLUNAS MAGNÉTICAS	60
3.6 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	61
3.7 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO BAÇO.....	62
3.8 CONDICIONAMENTO DE MEIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	62
3.9 ESTRESSE POR CONFINAMENTO	62
3.10 COLETA DE SORO SANGÜÍNEO.....	63
3.11 TRATAMENTO CELULAR <i>IN VITRO</i>	63
3.12 CULTURA DE CÉLULAS DISSOCIADAS DO CÓRTEX CEREBRAL.....	64
3.13 CITOMETRIA DE FLUXO	65
3.14 WESTERN BLOT.....	66
3.15 IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS A ELEMENTOS DE RESPOSTA A GC OU TGF- β NO <i>PRNP</i> MURINO.....	67
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67

4	RESULTADOS	68
4.1	LPS INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP ^C EM NEUTRÓFILOS	68
4.2	TNF- α INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP ^C EM NEUTRÓFILOS	70
4.3	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP ^C INDUZIDA POR LPS É INDEPENDENTE DE TNF- α	75
4.4	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP ^C INDUZIDA POR LPS É INDEPENDENTE DE FAS/FASL	77
4.5	TGF- β INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP ^C EM NEUTRÓFILOS	79
4.6	DEX INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP ^C EM NEUTRÓFILOS	79
4.7	REGULAÇÃO DA PrP ^C INDUZIDA POR TNF- α , TGF- β E DEX É EXCLUSIVA DE NEUTRÓFILOS	85
4.8	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP ^C INDUZIDA POR LPS É MEDIADA POR TGF- β E GC	85
4.9	ESTRESSE REGULA A EXPRESSÃO DE PrP ^C DE MANEIRA DEPENDENTE DE GC	87
4.10	IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS A ELEMENTO DE RESPOSTA A GC E ELEMENTO DE LIGAÇÃO A SMAD NO <i>PRNP</i>	89
5	DISCUSSÃO	92
6	CONCLUSÕES	103
7	REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRÍONS

Príons são patógenos infecciosos causadores de uma série de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais, denominadas *encefalopatias espongiformes transmissíveis* (TSEs). As TSEs representam uma nova classe de enfermidades, conhecidas como *doenças de conformação de proteínas*. Elas podem ser geneticamente adquiridas, infecciosas ou esporádicas, e todas envolvem modificações da proteína príon (PrP^C), encontrada normalmente no organismo. Dentre as várias doenças causadas por príons destacam-se as TSEs bovina (BSE, ou “mal da vaca louca”), caprina e ovina (*scrapie*) e as formas humanas: doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD); síndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker (GSS); insônia familiar fatal (FFI); e Kuru (revisado por PRUSINER, 1999).

Por definição, príons são *partículas infecciosas proteináceas* desprovidas de material genético e constituídas exclusivamente de uma isoforma (anômala) da proteína príon, denominada príon patogênico, ou PrP^{Sc} (PRUSINER, 1999). Apesar de não estar claro o mecanismo de conversão da PrP^C em PrP^{Sc}, sabe-se que o processo envolve a conversão pós-traducional de estruturas constituídas de *α -hélices* (abundantes na forma normal) em estruturas ricas em *folhas- β* (encontradas em grande quantidade na forma patogênica) (PAN *et al.*, 1993). Acredita-se que, uma vez modificada, a proteína anômala sirva de molde para que as proteínas normais se tornem igualmente anormais, levando à propagação da PrP^{Sc}. Esse processo seria facilitado por alguma outra proteína (possivelmente uma chaperona) ou por um complexo de proteínas ainda pouco conhecido (PRUSINER, 1999; HACHIYA *et al.*, 2007). A mudança conformacional observada é acompanhada de alterações físico-químicas da

proteína prion, incluindo a resistência parcial da PrP^{Sc} ao tratamento com proteases e sua tendência em formar grandes agregados (PRUSINER, 1999).

1.2 DOENÇAS POR PRÍONS

As doenças por príons são caracterizadas por vários sintomas neurológicos e particularidades histopatológicas comuns, como degeneração espongiiforme do sistema nervoso central (SNC), acúmulo da PrP^{Sc} no tecido, astrogliose, perda neuronal e, em alguns casos, formação de placas amilóides (REZAIE & LANTOS, 2001). Acredita-se que a intensa vacuolização do tecido, que deu origem ao termo ‘espongiiforme’, seja proveniente não apenas da perda neuronal, mas também da degradação da matriz extracelular ou até mesmo de artefatos provenientes do processamento desses tecidos, uma vez que tais características não são observadas em tecidos não fixados (REZAIE & LANTOS, 2001). As TSEs apresentam algumas características peculiares, como longos períodos de incubação (de alguns meses até vários anos) e ausência de uma resposta inflamatória típica pelo organismo, além de distintas formas de manifestação (adquiridas, infecciosas ou esporádicas) (PRUSINER, 1998). As diferentes formas de TSEs, humanas e animais, bem como os seus mecanismos de transmissão, encontram-se listados na tabela 1.

A expressão da PrP^C é absolutamente necessária para a propagação da forma anômala e o desenvolvimento das TSEs. Estudos feitos em camundongos PrP^{-/-} resultaram em resistência desses animais às doenças, e os mesmos não apresentaram qualquer sinal clínico quando inoculados com homogenato de cérebro de animais infectados com PrP^{Sc}, ao contrário do observado em animais selvagens (PrP^{+/+}) (BÜELER *et al.*, 1993).

Tabela 1. Encefalopatias espongiformes transmissíveis animais e humanas (adaptado de MABBOTT & MACPHERSON, 2006).

<i>Encefalopatia</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Via de transmissão</i>
Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD)	Humanos	Ingestão de carne bovina contaminada com BSE; transfusão de sangue
Doença de Creutzfeldt-Jakob Esporádica (sCJD)	Humanos	Desconhecida. Mutação somática ou conversão espontânea da PrP ^C em PrP ^{Sc} ?
Doença de Creutzfeldt-Jakob Iatrogênica (iCJD)	Humanos	Exposição acidental a tecidos ou subprodutos contaminados
Doença de Creutzfeldt-Jakob Familiar (fCJD)	Humanos	Mutações no gene da proteína príon (<i>Prnp</i>)
Síndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Humanos	Mutações no gene <i>Prnp</i>
Insônia Familiar Fatal (FFI)	Humanos	Mutações no gene <i>Prnp</i>
Kuru	Humanos	Prática de canibalismo ritual
<i>Scrapie</i>	Carneiros e Cabras	Adquirida (ingestão); transmissão horizontal; suspeita de transmissão vertical
Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE)	Bovinos	Ingestão de carne ou ração contaminada com BSE
Doença Crônica Degenerativa (CWD)	Veados, Cervos e Alces	Adquirida (ingestão); transmissão horizontal; suspeita de transmissão vertical
Encefalopatia Espongiforme Felina (FSE)	Gatos	Ingestão de carne contaminada com BSE
Encefalopatia Transmissível de Marta (TME)	Marta	Adquirida (ingestão) de fonte desconhecida
Encefalopatia Exótica de Ungulados (EUE)	Antílopes	Ingestão de carne contaminada com BSE

Em geral, o desenvolvimento das TSEs é caracterizado por uma rápida e progressiva demência e disfunção motora acompanhada de degeneração espongiiforme do material cerebral e astrogliose. O processo patológico central parece ser a deposição cerebral de um agregado de PrP^{Sc} (revisado por WECHSELBERGER *et al.*, 2002). A base molecular da disfunção neurológica das doenças por príons ainda não é conhecida, apesar de haver evidências de que a degeneração espongiiforme e a morte dos neurônios estejam relacionadas a alterações de propriedades da membrana ou mudanças nas funções dos canais iônicos devido ao acúmulo de agregados de PrP^{Sc} (BROWN *et al.*, 1994; MEDA *et al.*, 1995).

O desenvolvimento das TSEs após infecção periférica (ingestão de carne contaminada, transfusão de sangue, transplante de tecidos infectados, contaminação cirúrgica) envolve a propagação da PrP^{Sc} em órgãos linfóides em uma fase precoce, e a disseminação para o SNC pelos nervos periféricos em uma fase tardia (NICOTERA, 2001). Apesar da PrP^{Sc} se acumular primariamente no tecido neural, há relatos de sua presença em diversos tecidos periféricos (AGUZZI, 2000; BROWN *et al.*, 2000). Contudo, os sinais clínicos conhecidos estão confinados ao SNC e apenas algumas respostas imunes de baixa intensidade parecem acompanhar a progressão da doença (BERG, 1994; PERRY *et al.*, 2002).

Duas hipóteses não excludentes podem explicar o desenvolvimento das doenças por príons: (1) a de perda de função da proteína príon normal e (2) a de ganho de função da proteína príon patogênica. Até pouco tempo atrás se acreditava que a doença era promovida exclusivamente por um ganho de função da PrP^{Sc}, uma vez que camundongos nulos para a forma normal da proteína se desenvolviam de maneira aparentemente normal (BÜELER *et al.*, 1992). Além disso, o acúmulo de PrP^{Sc} no SNC parecia ser o responsável pela perda neuronal e pela astrocitose do tecido nervoso (HARRIS, 1999). Entretanto, outros estudos não corroboram a superposição entre acúmulo de PrP^{Sc} e sinais histopatológicos de neurodegeneração (DORANDEU *et al.*, 1998; CHRETIEN *et al.*, 1999; GRAY *et al.*, 1999).

De fato, são crescentes as evidências de que a PrP^C participa de diversos processos fisiológicos, incluindo proteção contra estresse oxidativo, apoptose, sinalização celular, excitabilidade de membrana e transmissão sináptica, neuritogênese, transporte e metabolismo de cobre. Não se sabe ao certo, porém, como todas essas funções são realizadas por uma mesma proteína (revisado por PRADO *et al.*, 2004). Atualmente acredita-se que a proteína príon constitua uma plataforma dinâmica na superfície celular, responsável pela organização de módulos de sinalização nos quais interações moleculares seletivas e sinalizações transmembrana são traduzidas em múltiplas conseqüências fisiológicas e comportamentais (LINDEN *et al.*, 2008).

1.3 ESTRUTURA E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *PRNP*

Os promotores do gene *Prnp*, que codifica para PrP^C, foram caracterizados em camundongos, hamsters, ratos, bovinos e humanos; e a principal região de controle transcricional está localizada antes do sítio de iniciação, apesar de outras regiões regulatórias terem sido relatadas (BAYBUTT & MANSON, 1997; INOUE *et al.*, 1997). Não foram identificadas seqüências *TATA-box* associadas ao *Prnp*, porém algumas regiões ricas em GC (sítios potenciais para ligação de fatores de transcrição SP1), além de um elemento CCAAT, estão presentes na maioria dos casos. Regiões específicas para AP1 e AP2 também foram identificadas (SAEKI *et al.*, 1996a, 1996b; BAYBUTT & MANSON, 1997; MAHAL *et al.*, 2001).

O *Prnp* possui três éxons em camundongos, ratos, bovinos e carneiros, e dois éxons em hamsters, humanos e marsupiais, sendo que apenas um éxon codifica para a proteína príon (PUCKETT *et al.*, 1991; WESTAWAY *et al.*, 1994; SAEKI *et al.*, 1996a; HORIUCHI *et al.*,

1998; PREMZL *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2006). Um peptídeo sinal está presente na molécula, e é clivado durante a biossíntese da PrP^C (N-terminal). Um outro peptídeo permite a ligação a uma âncora de glicosil fosfatidilinositol (GPI) (C-terminal). Dois sítios de glicosilação também foram mapeados na região C-terminal (revisado por PRUSINER, 1998), além de uma região na porção N-terminal contendo quatro ou cinco repetições de octapeptídeos, na qual se encontra um dos domínios de ligação para íons cobre (Fig 1) (HORNSHAW *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1997a).

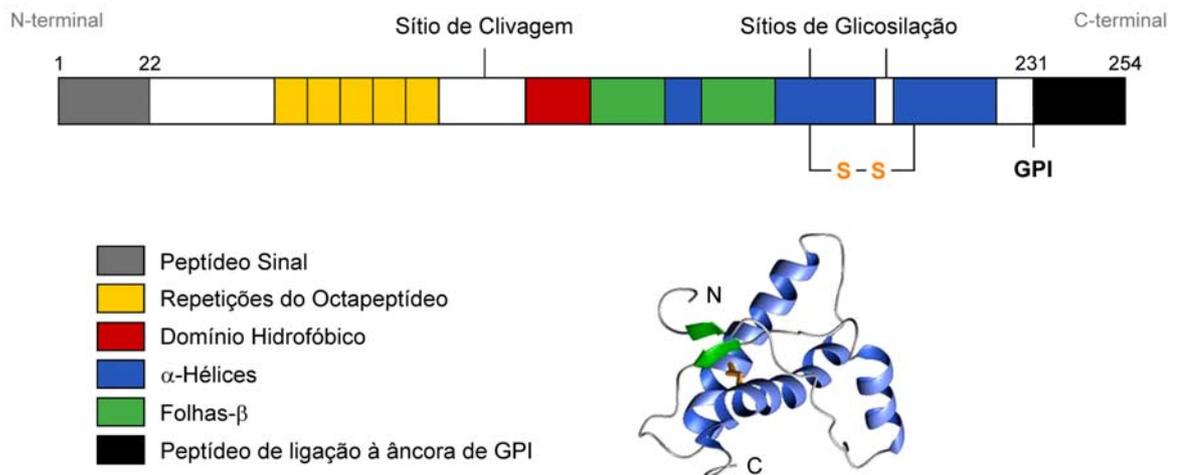


Figura 1. Diagrama estrutural da proteína príon. Destaque para o peptídeo sinal na região N-terminal, o peptídeo de ligação à âncora de GPI na porção C-terminal, a região de repetição de octapeptídeos, a ponte dissulfeto (S-S), os sítios de glicosilação, e o sítio de clivagem da proteína (adaptado de GILL *et al.*, 2000; AGUZZI & HEIKENWALDER, 2006).

O papel do cobre na regulação do *Prnp* é controverso. Kubosaki e colaboradores verificaram que, em linfócitos T, a expressão da PrP^C não é afetada pelo cobre (KUBOSAKI

et al., 2003). Por outro lado, há várias evidências de que o cobre participe regulando o *Prnp* em outros modelos celulares. O tratamento de neurônios granulares cerebelares com cobre induz diminuição na expressão da PrP^C (NISHIMURA *et al.*, 2004). Toni e colaboradores mostraram que íons cobre, em concentrações fisiológicas, induzem diminuição nos níveis da PrP^C e RNAm para PrP^C em neurônios hipotalâmicos (TONI *et al.*, 2005). Contudo, neurônios primários corticais e hipocâmpais de ratos tratados com cobre apresentam aumento nos níveis de PrP^C e RNAm para proteína príon. Além disso, o tratamento de células PC12 com íons cobre e cádmio, mas não com zinco e manganês, induz aumento na atividade do promotor da PrP^C (VARELA-NALLAR *et al.*, 2006).

O *Prnp* é, ainda hoje, freqüentemente classificado como um gene constitutivo, devido à ausência de *TATA-box* e à presença de vários sítios de ligação para SP1 (PUCKETT *et al.*, 1991; SAEKI *et al.*, 1996a, 1996b; BAYBUTT & MANSON, 1997), além do fato de seu RNAm ser constitutivamente expresso em tecidos de animais adultos (OESCH *et al.*, 1985). Porém a expressão da PrP^C é altamente regulada durante o desenvolvimento, tendo seus níveis aumentados no período pós-natal, durante a fase de maturação do cérebro de ratos, camundongos e hamsters, e se mantendo inalterados ao longo da vida adulta (LIEBERBURG, 1987; MCKINLEY *et al.*, 1987; PRUSINER, 1989; LAZARINI *et al.*, 1991; MANSON *et al.*, 1992; MIELE *et al.*, 2003). Além disso, camundongos transgênicos superexpressando PrP^C apresentam degeneração em músculo esquelético, nervos periféricos e no SNC (WESTAWAY *et al.*, 1994), sugerindo ser de extrema importância a regulação da expressão dessa proteína.

Cabral e colaboradores mostraram que a regulação do *Prnp* é altamente dependente da conformação da cromatina. O tratamento de células PC12 e C6 (linhagem derivada de um glioma de rato) com tricostatina A, um inibidor de histona deacetilase, induz aumento na atividade do promotor da PrP^C, bem como nos níveis de RNAm e da proteína príon, sugerindo

que a estrutura da cromatina necessite ser desfeita para permitir o acesso de fatores de transcrição endógenos a sítios de ligação específicos no DNA (CABRAL *et al.*, 2002).

O primeiro fator identificado como regulador da expressão da PrP^C foi o fator de crescimento neural, NGF (MOBLEY *et al.*, 1988; WION *et al.*, 1988). Injeções de NGF no cérebro de hamsters neonatos (MOBLEY *et al.*, 1988), bem como o tratamento *in vitro* de linhagem celulares com a mesma proteína (WION *et al.*, 1988; LAZARINI *et al.*, 1994), induziram aumento na expressão do RNAm do *Prnp*. Recentemente, verificou-se a dependência de vias de sinalização de MAPK ou PI3K/AKT no processo (ZAWLIK *et al.*, 2006). Lasmézas e colaboradores apontaram para um mecanismo de regulação da expressão do *Prnp* altamente controlado por hormônios. Células PC12 (linhagem derivada de um feocromocitoma de rato) tratadas com hormônio de crescimento (GH) humano ou com IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina, que atua como mediador do GH) apresentaram aumento substancial na expressão do RNAm do *Prnp* (LASMÉZAS *et al.*, 1993). Resultado semelhante foi obtido com células beta produtoras de insulina (INS-1) tratadas com GH ou dexametasona (ATOUF *et al.*, 1994). Apesar dessas evidências, o papel fisiológico da regulação hormonal do *Prnp*, bem como os mecanismos pelos quais ela é controlada, ainda permanece desconhecido.

Algumas citocinas já foram descritas regulando a expressão do *Prnp* em diferentes modelos celulares. O tratamento de células de neuroblastoma com interleucina 1 β (IL-1 β) e fator- α de necrose tumoral (TNF- α) induz aumento nos níveis de RNAm para PrP^C (SATOH *et al.*, 1998). Já o tratamento dessas mesmas células (SATOH *et al.*, 1998) ou de monócitos sanguíneos humanos (DÜRIG *et al.*, 2000) com interferon- γ (IFN- γ) induz, respectivamente, diminuição ou aumento da expressão de PrP^C. Queratinócitos humanos cultivados *in vitro* na presença de IFN- γ ou fator de crescimento transformante- α (TGF- α), mas não de IL-1 β ou TNF- α , apresentaram elevados níveis de PrP^C (PAMMER *et al.*, 1998). Sauer e colaboradores

verificaram que, em células tumorais, o TNF- α aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez induzem aumento na expressão da PrP^C por essas células (SAUER *et al.*, 2003). Esses dados apontam para a participação de diversas citocinas na regulação da PrP^C, apesar de não haver um padrão de resposta característico para os diferentes tipos celulares estudados.

Outras evidências sugerem que o estresse modula a expressão do *Prnp*. Células de neuroblastoma submetidas a choque térmico apresentam elevados níveis de PrP^C e RNAm para PrP^C, bem como de proteínas de choque térmico Hsp70 (SHYU *et al.*, 2000, 2002). Nesse caso, a regulação do *Prnp* é feita através de elementos de choque térmico presentes no promotor do *Prnp* (SHYU *et al.*, 2002). Processos inflamatórios na pele e no epitélio gastrointestinal também regulam a expressão da PrP^C. Queratinócitos humanos obtidos de indivíduos com doenças de pele, incluindo psoríase e dermatite de contato, apresentaram níveis de PrP^C bem superiores aos encontrados em células de indivíduos normais (PAMMER *et al.*, 1998). Pacientes com gastrite provocada por *Helicobacter pylori* demonstraram aumento nos níveis de PrP^C da mucosa intestinal (PAMMER *et al.*, 2000).

1.4 TRÁFEGO INTRACELULAR DA PROTEÍNA PRÍON

Os mecanismos que regem a conversão da PrP^C em PrP^{Sc} nas doenças por príon ainda não estão totalmente esclarecidos. São crescentes, porém, as evidências de que o processo envolve o tráfego intracelular da proteína príon (CAUGHEY & RAYMOND, 1991; CAUGHEY *et al.*, 1991; BORCHELT *et al.*, 1992) e a entrada da mesma em organelas ácidas, como endossomos e lisossomos (MCKINLEY *et al.*, 1991; ARNOLD *et al.*, 1995). Algumas mutações na PrP^C relacionadas às doenças por príon podem alterar o tráfego da

proteína (IVANOVA *et al.*, 2001; NEGRO *et al.*, 2001). O pH ácido parece ser uma condição crítica para as mudanças conformacionais da PrP^C (HORNEMANN & GLOCKSHUBER, 1998). Desta forma, qualquer alteração nos mecanismos de internalização poderia levar a um desvio da proteína para diferentes compartimentos celulares e, conseqüentemente, facilitar a conversão da PrP^C em PrP^{Sc} (PRADO *et al.*, 2004). Sendo assim, torna-se claro o interesse na identificação dos mecanismos envolvidos no tráfego da proteína príon.

A internalização da PrP^C da membrana plasmática ocorre constitutivamente em células em cultura, e grande parte da proteína retorna à membrana sem sofrer degradação (SHYNG *et al.*, 1993). Assim como outras proteínas ancoradas por GPI, a PrP^C encontra-se, em sua maior parte, localizada em *rafts* de membrana, o que sugere a participação de mecanismos caveolares no seu processo de internalização. De fato, vários trabalhos mostraram que a PrP^C de células em cultura está presente em domínios de membrana semelhantes a cavéolas (VEY *et al.*, 1996; NASLAVSKY *et al.*, 1999). Contudo, os primeiros experimentos, feitos com PrP^C de galinha, indicaram que a internalização da proteína envolve endocitose mediada por clatrina (SHYNG *et al.*, 1994). A presença de PrP^C de mamífero em *coated-pits* também foi identificada (LAINÉ *et al.*, 2001). Parece que a PrP^C coexiste em *rafts* e outros componentes da membrana, e acredita-se que a proteína saia dos *rafts* para ser internalizada via *coated-pits* (SUNYACH *et al.*, 2003).

Um dos mecanismos mais importantes no tráfego da PrP^C é a sua internalização mediada por cobre (PAULY & HARRIS, 1998; PERERA & HOOPER, 2001). Utilizando moléculas de PrP^C ligadas a proteína verde fluorescente (GFP), Magalhães e colaboradores acompanharam o tráfego da PrP^C em células neurais vivas e verificaram que, em resposta ao cobre, a proteína é internalizada da membrana e se acumula no complexo de Golgi e em organelas endocíticas clássicas (MAGALHÃES *et al.*, 2002). Por outro lado, a superexpressão de um mutante dominante negativo de dinamina, proteína responsável pelo controle da fissão

das membranas endocíticas (DAMKE *et al.*, 1994; DAMKE *et al.*, 2001), alterou a distribuição da PrP^C, levando a um acúmulo da proteína em intermediários endocíticos não fissionados (MAGALHÃES *et al.*, 2002). Surpreendentemente, uma proteína mínima ancorada a GPI e ligada a GFP (GFP-GPI) não se acumula nesses intermediários endocíticos ocupados pela GFP-PrP^C. Esses resultados sugerem que a PrP^C é internalizada constitutivamente pelas células por uma via dependente de dinamina, e que essa via não é igual à de outras proteínas ancoradas por GPI (MAGALHÃES *et al.*, 2002).

Analisando o tráfego da PrP^C em eritroblastos humanos, Griffiths e colaboradores constataram que nessas células a proteína príon também se comporta de maneira diferente de outras proteínas ancoradas por GPI (GRIFFITHS *et al.*, 2007). Ao contrário do que ocorre com a CD59, proteína também ancorada por GPI, a PrP^C é rapidamente internalizada da superfície celular pela via endossomal, através de um mecanismo dependente de clatrina. Por outro lado, há uma co-localização da PrP^C com as tetraspaninas CD63 e CD81 em endossomos e na membrana plasmática, respectivamente; e apesar de não ter sido observada uma interação direta entre as proteínas, a PrP^C também parece estar presente em microdomínios enriquecidos em tetraspaninas (GRIFFITHS *et al.*, 2007).

A internalização da PrP^C mediada pelo cobre é dependente do domínio de octapeptídeos presente na porção N-terminal da proteína (LEE *et al.*, 2001). Além disso, a porção N-terminal da PrP^C de galinhas é importante não apenas para a endocitose, mas também para o transporte da PrP^C para a membrana plasmática (SHYNG *et al.*, 1995; NUNZIANTE *et al.*, 2003), o que sugere que essa região tenha um papel relevante no endereçamento da proteína durante o seu tráfego intracelular (PRADO *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que a sinalização induzida pela interação entre PrP^C e STI-1 (proteína induzida por estresse) é dependente da atividade endocítica (AMERICO *et al.*, 2007; CAETANO *et al.*, 2008). A interação das duas proteínas na superfície celular induz

a endocitose da PrP^C, de maneira dependente de dinamina; e a sinalização por PKA e ERK1/2, promovida pela STI-1, não ocorre em células PrP^{-/-}. Por outro lado, um mutante de PrP^C desprovido de atividade endocítica foi incapaz de ativar ERK1/2, sugerindo um papel crucial da endocitose no processo de sinalização por essa via (CAETANO *et al.*, 2008).

De maneira geral, a endocitose mediada por clatrina parece ser a principal via de internalização da PrP^C, apesar de rotas intracelulares alternativas também serem utilizadas pela proteína (Fig 2).

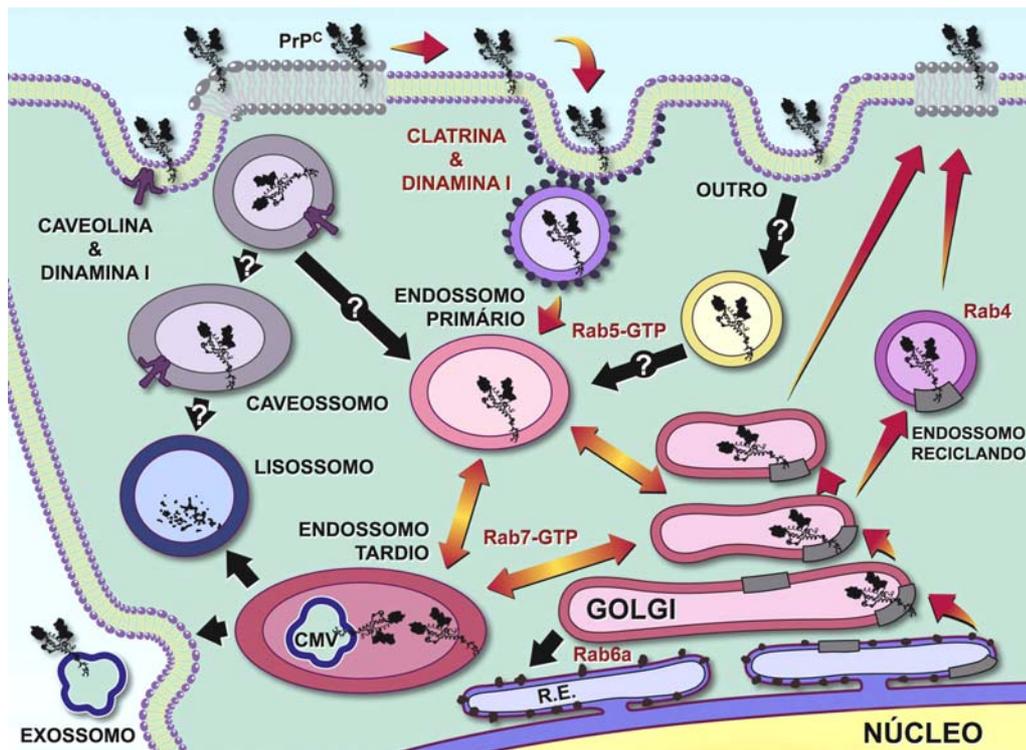


Figura 2. Tráfego subcelular da PrP^C. A membrana plasmática está representada pela bicamada lipídica, e os *rafts* por uma bicamada cinza, mais espessa. Os principais sistemas vesiculares envolvidos na síntese da PrP^C e na liberação de exossomos contendo a proteína estão indicados com letras pretas. Moléculas envolvidas na via dependente de clatrina estão indicadas em letras vermelhas. Nota-se que a PrP^C está inicialmente associada a *rafts* na via secretória, e que ela deixa os *rafts* para ser internalizada via clatrina. CMV, corpos multivesiculares; RE, retículo endoplasmático (adaptado de LINDEN *et al.*, 2008).

1.5 FUNÇÕES DA PROTEÍNA PRÍON

A proteína príon é uma sialoglicoproteína encontrada em células do SNC e, em menor quantidade, de vários outros tecidos, incluindo baço, timo, coração, rim, estômago e intestino, dentre outros (MCBRIDE *et al.*, 1992; HORIUCHI *et al.*, 1995; FOURNIER *et al.*, 1998; PAMMER *et al.*, 2000). A identificação da PrP^C foi feita devido ao seu envolvimento nas TSEs, e não às suas funções celulares. Uma vez que essas doenças apresentam características incomuns, os esforços foram direcionados principalmente para a compreensão dos mecanismos de infecção, enquanto que o papel fisiológico da PrP^C foi ignorado (MARTINS *et al.*, 2002; WECHSELBERGER *et al.*, 2002). Boa parte das informações geradas acerca das atividades da PrP^C foi obtida com a utilização de animais transgênicos, nulos ou superexpressando a proteína. Além disso, o peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶, cuja região equivalente na proteína normal está envolvida na conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, apresenta neurotoxicidade *in vitro* dependente de PrP^C, e também constitui uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos funcionais dessa proteína (REZAIE & LANTOS, 2001).

As primeiras cepas de camundongos nulos para PrP^C produzidas, denominadas Zurich I (ZrchI) e Edinburgh (Edbg), não demonstraram qualquer sinal de alteração anatômica significativa. Também não foram detectados déficits de aprendizado ou mudanças comportamentais nesses animais, e eles foram capazes de se desenvolver normalmente, o que sugere que a PrP^C não seja necessária para o desenvolvimento, ou que sua função esteja sendo suprida por algum mecanismo compensatório (BÜELER *et al.*, 1992; MANSON *et al.*, 1994). Por outro lado, outras cepas de camundongos nulos para PrP^C, produzidas posteriormente utilizando-se diferentes construções, apresentaram ataxia severa e degeneração em células de Purkinje em idades avançadas, apesar dos animais se desenvolverem normalmente (SAKAGUCHI *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 1999; ROSSI *et al.*, 2001). Contudo, verificou-se

que esses fenótipos são causados não pela ausência da PrP^C, mas pela superexpressão de uma proteína semelhante à proteína príon, denominada Doppel (Dpl), que, nesses animais, passa a ter sua expressão controlada pelo promotor do *Prnp* (MOORE *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2001).

Vários processos celulares no sistema nervoso parecem ser influenciados pela proteína príon, incluindo sobrevivência neuronal; crescimento neurítico; formação, crescimento e manutenção de sinapse; e manutenção de fibras mielinizadas. Uma das funções celulares mais relevantes da PrP^C, observada em diferentes modelos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é a sua capacidade de promover proteção de células neurais e não neurais contra diversos estímulos de morte celular, incluindo privação de soro e tratamento com vários agentes pró-apoptóticos (para revisão, ver ROUCOU & LEBLANC, 2005).

1.5.1 Estresse oxidativo, apoptose e neuroproteção

Uma das principais funções atribuídas à proteína príon é proteção contra estresse oxidativo (para revisão, ver MILHAVET & LEHMANN, 2002). Experimentos com células PC12 mostraram que as células resistentes a estresse oxidativo apresentavam níveis elevados de PrP^C (BROWN *et al.*, 1997b). Culturas de neurônios primários PrP^{-/-} são mais susceptíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio do que as células selvagens (WHITE *et al.*, 1999). Além disso, verificou-se que neurônios PrP^{-/-} são mais susceptíveis ao tratamento com agentes indutores de estresse oxidativo, e que o fenômeno parece envolver uma redução na atividade da Cu/Zn superóxido dismutase (SOD) (BROWN *et al.*, 1997c, 2002).

O papel da PrP^C na regulação da atividade de SOD é controverso. A oxidação protéica e lipídica, bem como a atividade de SOD e catalase, é alterada não apenas no cérebro, mas também no músculo esquelético, no coração, e no fígado de camundongos PrP^{-/-} (KLAMT *et*

al., 2001), sugerindo que a PrP^C deve exercer um importante papel como antioxidante em outros órgãos, e não apenas no SNC. Se esse for o caso, a proteína prion pode estar envolvida não somente em doenças neurológicas, mas também em outras patologias humanas que envolvem a geração de ROS, como infarto do miocárdio, disfunção hepática e sepse (MARTINS *et al.*, 2002). Esses resultados, porém, não foram confirmados por outros pesquisadores (WAGGONER *et al.*, 2000; HUTTER *et al.*, 2003). Várias alterações mitocondriais já foram observadas em camundongos PrP^{-/-} (MIELE *et al.*, 2002) e em animais infectados com *scrapie* (CHOI *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999). Uma vez que essas organelas desempenham papel fundamental no estresse oxidativo, as alterações na atividade de SOD mencionadas anteriormente podem estar relacionadas a essas modificações mitocondriais, e não diretamente a PrP^C (AGUZZI *et al.*, 2008).

Outros estudos mostraram que células de camundongos PrP^{-/-} se tornaram vulneráveis não apenas ao estresse oxidativo, mas também a apoptose. Linhagens de células neurais de camundongos PrP^{-/-} são mais sensíveis à morte celular induzida por privação de soro do que as de camundongos PrP^{+/+} (KUWAHARA *et al.*, 1999), ao passo que a superexpressão da PrP^C protege neurônios contra a morte celular induzida por superexpressão de Bax (BOUNHAR *et al.*, 2001). Além disso, verificou-se que os níveis de expressão de Bax e caspase-3, bem como a liberação de citocromo *c*, são aumentados em linhagens celulares PrP^{-/-}, sugerindo que a PrP^C deva exercer um papel central como antioxidante através das vias mitocondriais apoptóticas dependentes de caspase (HUR *et al.*, 2002).

O peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶, utilizado como modelo de indução de neurotoxicidade, provoca o aparecimento de várias características de apoptose, incluindo alterações morfológicas, fragmentação do DNA (BURKLE *et al.*, 1999) e ativação de caspase-3 (SAEZ-VALERO *et al.*, 2000). O efeito neurotóxico desse peptídeo em culturas de neurônios é dependente da expressão de PrP^C e da presença de células da microglia que, uma vez ativadas pelo peptídeo,

liberam substâncias neurotóxicas, como ROS (BROWN *et al.*, 1996), e essa resposta é mediada por uma via de transdução de sinais dependente de tirosina-cinases (COMBS *et al.*, 1999).

Zanata e colaboradores descreveram um ligante de superfície celular que interage com a PrP^C. Os pesquisadores identificaram a proteína como sendo STI-1, uma co-chaperona de 66 kDa conhecida também como extendina, devido à sua participação na extensão de pseudópodes (ZANATA *et al.*, 2002). A STI-1 é homóloga a Hop, proteína altamente conservada em eucariotos que atua como uma proteína adaptadora, se ligando às principais chaperonas citosólicas (Hsp70/Hsp90) e coordenando interações entre essas chaperonas durante a formação de complexos de receptores, como, por exemplo, os receptores para glicocorticóides e progesterona (revisado por CHEN & SMITH, 1998; KING *et al.*, 2001). A interação PrP^C-STI-1 induz a transdução de sinais neuroprotetores pela PrP^C; sinais estes que resgatam as células nervosas da apoptose induzida por inibição de síntese protéica (ZANATA *et al.*, 2002).

O papel neuroprotetor da PrP^C foi confirmado utilizando-se um peptídeo (PrR) que se liga ao mesmo domínio de interação que a STI-1. Chiarini e colaboradores verificaram que o peptídeo leva à ativação de duas vias de sinalização: AMPc/PKA e ERK (CHIARINI *et al.*, 2002). A neuroproteção promovida pelo peptídeo é mediada pela ativação de AMPc dependente de PKA, e é dependente de PrP^C endógena na superfície das células. Após interagir com o peptídeo, a PrP^C leva à transdução de sinais que previnem a morte de células da retina de roedores, atuando, desta forma, como um receptor trófico cuja estimulação leva ao estado neuroprotetor pela via AMPc/PKA. A compreensão dos mecanismos de neuroproteção mediados pela PrP^C é de importância crucial para a avaliação dos componentes de perda de função na patogênese das doenças por príon (CHIARINI *et al.*, 2002).

1.5.2 Interação com cobre

O cobre é um elemento celular essencial, mas que pode se tornar extremamente tóxico quando em excesso devido à atividade pró-oxidante de seus íons. Há várias evidências que indicam um papel funcional da PrP^C através de sua interação com cobre; contudo, o mecanismo exato pelo qual a PrP^C e esse elemento estão funcionalmente relacionados não é conhecido (WECHSELBERGER *et al.*, 2002). Vários trabalhos mostraram que a PrP^C pode se ligar ao cobre através de domínios de ligação a cobre presentes nos octapeptídeos da porção N-terminal da proteína (HORNSHAW *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1997a; VILES *et al.*, 1999) ou, com muito mais afinidade, em um sítio de ligação localizado na porção C-terminal da PrP^C (CEREGHETTI *et al.*, 2001; HASNAIN *et al.*, 2001; JACKSON *et al.*, 2001; JOBLING *et al.*, 2001). Essa associação pode ter um impacto direto na regulação da concentração pré-sináptica de cobre, na estabilidade conformacional da PrP^C, e na resposta celular ao estresse oxidativo através da regulação do balanço redox (RIZZARDINI *et al.*, 1997; SÀLES *et al.*, 1998; VILES *et al.*, 1999; MILHAVET & LEHMANN, 2002).

1.5.3 Atividade sináptica

Diversos trabalhos apontam para um papel fisiológico da PrP^C na atividade sináptica. Estudos de imunomarcação em microscopia eletrônica mostraram a localização da PrP^C nas sinapses (FOURNIER *et al.*, 1995; TATEISHI *et al.*, 1996; SALÈS *et al.*, 1998; MOYA *et al.*, 2000). Pesquisadores verificaram que a ausência da PrP^C, ou a sua conversão em PrP^{Sc}, deve levar a alterações na formação das sinapses, bem como no metabolismo de neurotransmissores, o que deve contribuir para a perda neuronal no SNC (COLLINGE *et al.*, 1994; SALÈS *et al.*, 1998). Dentre as mudanças patológicas que acompanham as doenças por

príon encontram-se desorganização ou perda sináptica e deposição da PrP^{Sc} em terminais sinápticos (revisado por AGUZZI *et al.*, 2008). Além disso, há uma redução cerebral da neurotransmissão e de proteínas sinápticas associadas a exossomos em pacientes portadores de TSE (FERRER *et al.*, 1999, 2000).

Estudos eletrofisiológicos feitos em neurônios hipocâmpais derivados de camundongos PrP^{-/-} mostraram deficiência na transmissão sináptica glutamatérgica excitatória e na potenciação de longo prazo (COLLINGE *et al.*, 1994) nessas células. Por outro lado, observou-se uma redução de correntes de K⁺ ativadas por Ca²⁺ (HERMS *et al.*, 2001) e uma maior sensibilidade a convulsões (WALZ *et al.*, 1999) nos animais PrP^{-/-}, quando comparados com camundongos selvagens. Outros pesquisadores, porém, não encontraram diferenças entre animais PrP^{-/-} e selvagens quanto à excitabilidade neuronal e transmissão sináptica (LLEDO *et al.*, 1996), ou ainda observaram aumento, e não redução, da transmissão sináptica glutamatérgica em animais PrP^{-/-} (MAGLIO *et al.*, 2004, 2006).

Outras alterações observadas nos animais PrP^{-/-} que devem estar relacionadas a disfunções sinápticas incluem alteração do ciclo circadiano e do aprendizado espacial dependente do hipocampo (TOBLER *et al.*, 1996; CRIADO *et al.*, 2005).

1.5.4 Proliferação, diferenciação e migração celular

A proliferação astrocitária é uma das características mais marcantes das doenças por príon, e acredita-se que ela seja uma resposta ao dano neuronal ou à presença da forma patogênica, PrP^{Sc}. Uma vez que a astrogliose coincide com os locais de acúmulo de PrP^{Sc} e ocorre antes da neurodegeneração (revisado por HAFIZ & BROWN, 2000), a segunda hipótese parece ser a mais plausível, embora o acúmulo de PrP^{Sc} não seja universal nas TSEs.

O peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ também induz proliferação astrocitária, desde que as células expressem PrP^C e estejam na presença de microglia. Esse efeito envolve a via de transdução de sinal MAPK e ERK e parece ser dependente de superóxido e/ou seus produtos, uma vez que a adição de xantina oxidase e NOC-18 (que geram superóxido e óxido nítrico, respectivamente) leva à astrogliose na presença de IL-1 β e IL-6, que são produzidas pela microglia em resposta ao peptídeo (HAFIZ & BROWN, 2000). Além dos astrócitos, o peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ também já foi visto induzindo proliferação de células da microglia (REZAIE & LANTOS, 2001).

O papel da PrP^C na diferenciação celular foi inicialmente proposto com base na interação dessa proteína com a laminina. A PrP^C é um receptor de laminina de alta afinidade e a interação dessas proteínas afeta a neuritogênese induzida por NGF. O tratamento com NGF leva a um aumento dos níveis de proteína e RNAm para PrP^C e um aumento da neuritogênese sobre laminina. Essa neuritogênese é parcialmente inibida pela adição de anticorpos contra PrP^C. Além disso, neurônios hipocâmpais de camundongos PrP^{-/-} apresentam neuritogênese menor do que neurônios derivados de animais PrP^{+/+} (GRANER *et al.*, 2000). Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que a PrP^C também interage com vitronectina, e que essa interação induz crescimento axonal em gânglios da raiz dorsal de camundongos. Contudo, em animais PrP^{-/-} a ausência dessa interação parece ser suprida por um mecanismo compensatório dependente de integrina (HAJJ *et al.*, 2007).

Vários trabalhos mostraram uma associação entre o crescimento neurítico e a ativação de vias de transdução de sinal dependentes de PrP^C, incluindo p59Fyn cinase, AMPc/PKA, PKC e MAPK (CHEN *et al.*, 2003; KANAANI *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; SANTUCCIONE *et al.*, 2005). Estudos recentes verificaram que a PrP^C regula positivamente a proliferação de precursores neurais durante o desenvolvimento e a neurogênese de mamíferos adultos (STEELE *et al.*, 2006).

Le e colaboradores verificaram que o peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ induz a migração de monócitos *in vitro*, e que essa migração é mediada pelo receptor semelhante ao receptor de formil peptídeo (FPRL-1) acoplado à proteína G. Esse receptor já foi descrito em vários tipos celulares, *in vitro* e *in vivo*, e é capaz de interagir com diversos ligantes, podendo inclusive atuar no acúmulo intracelular de PrP^{Sc} (LE *et al.*, 2001). Esse fenômeno de migração teria relevância não apenas para a compreensão das funções da PrP^C sob condições fisiológicas, mas também durante a patogênese, uma vez que as áreas do SNC afetadas pelas TSEs geralmente apresentam infiltrados de fagócitos mononucleares (BROWN & KRETZSCHMAR, 1997; PERRY *et al.*, 1998). O PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ também é capaz de promover a migração de leucócitos, e ainda a produção de O₂⁻ por monócitos e neutrófilos (DIOMEDE *et al.*, 1996).

1.5.5 Outras funções

Várias proteínas ligantes da PrP^C foram identificadas (para revisão, ver MARC *et al.*, 2007; AGUZZI *et al.*, 2008; LINDEN *et al.*, 2008); contudo, o papel fisiológico da maioria dessas interações ainda permanece um mistério. As informações obtidas até o momento indicam que a PrP^C faz parte de um complexo de proteínas localizado na membrana plasmática e que, devido a essa localização, ela deve, sob condições fisiológicas, conectar e transmitir sinais da matriz extracelular para o meio intracelular (WECHSELBERGER *et al.*, 2002; LINDEN *et al.*, 2008). A compreensão dos papéis fisiológicos da proteína, bem como a investigação dos mecanismos de transdução de sinal, irá não apenas contribuir para a elucidação dos processos responsáveis pela conversão da PrP^C em PrP^{Sc} nas doenças por príon, mas terá também um papel crucial no estudo de outras doenças neurodegenerativas, colaborando assim com o desenvolvimento de regimes de tratamento e novas estratégias terapêuticas (WECHSELBERGER *et al.*, 2002).

1.6 O SISTEMA IMUNE NAS DOENÇAS POR PRÍON

A relação entre príons e o sistema imune é complexa. Há mais de duas décadas se constatou a ausência de respostas imunes humoral e celular específicas contra a PrP^{Sc} nas doenças por príon (PORTER *et al.*, 1973; KINGSBURY *et al.*, 1981). Por outro lado, parece que a proteína príon apresenta propriedades imunogênicas normais, uma vez que camundongos nulos para PrP^C são capazes de montar uma resposta imune humoral contra a proteína (PRUSINER *et al.*, 1993; WILLIAMSON *et al.*, 1996). A maioria dos trabalhos mostra que as funções imunes normais não são afetadas pela infecção por PrP^{Sc}, sugerindo que a não responsividade à forma patogênica não está relacionada a uma imunodeficiência induzida, mas a tolerância imunológica a PrP^{Sc} (AUCOUTURIER *et al.*, 2000). Essa tolerância é causada, possivelmente, pela rápida agregação da PrP^{Sc} e a formação de depósitos insolúveis, que por sua vez dificultariam o reconhecimento da proteína anormal pelos componentes do sistema imune.

Apesar das doenças por príon serem condições neurológicas, eventos críticos na sua patogênese acontecem em regiões fora do sistema nervoso, especificamente nos órgãos linfóides periféricos (HORWICH & WEISSMAN, 1997). Particularmente, o baço e os linfonodos constituem o primeiro sitio de propagação da PrP^{Sc} após administração por rotas periféricas. Por outro lado, esses órgãos são significativamente afetados após inoculação intracerebral da forma patogênica, o que levanta a possibilidade dessas regiões também serem importantes nos estágios avançados da doença (KIMBERLIN & WALKER, 1979).

O sistema nervoso e o sistema imune organizam uma série de respostas coordenadas e essenciais contra danos ao organismo. Diversas conexões anatômicas e fisiológicas já foram descritas entre os dois sistemas, incluindo as fibras nervosas simpáticas que fazem contato com as principais regiões do sistema imune no fígado, baço, medula óssea, timo, linfonodos,

pele e intestino (STEINMAN, 2004). Há uma série de evidências de que a disseminação da PrP^{Sc} ocorre através dessa inervação periférica. O processo pelo qual os príons migram do local da inoculação (periferia) para o SNC é chamado *neuroinvasão*, e envolve basicamente duas etapas: a *linfoinvasão*, onde o príon se acumula nos órgãos linfóides, e a neuroinvasão propriamente dita, onde, através das extremidades da inervação simpática dos órgãos linfóides, há a disseminação da forma patogênica para o SNC (AGUZZI, 2001).

Utilizando um modelo experimental de camundongos infectados com CJD, Kitamoto e colaboradores verificaram que as células dendríticas foliculares (FDCs) constituem o sítio de acúmulo da proteína patogênica nos tecidos linfóides (KITAMOTO *et al.*, 1991). Os autores observaram ainda que em animais deficientes em células T e B (SCID) o desenvolvimento da doença só ocorre após inoculação intracraniana, mas não intraperitoneal. Como o desenvolvimento das FDCs também é afetado nos animais SCID, os pesquisadores sugeriram que a não manifestação da doença nesses camundongos está relacionada ao desenvolvimento anormal das FDCs, sendo estas células, então, indispensáveis para a disseminação da PrP^{Sc} da periferia para o SNC (KITAMOTO *et al.*, 1991).

Em outro trabalho, Klein e colaboradores analisaram o papel das FDCs, e dos linfócitos B e T na propagação de PrP^{Sc} no sistema linforeticular utilizando uma série de camundongos imunodeficientes inoculados com príon intraperitonealmente. Os pesquisadores constataram que os animais deficientes em células T (CD4^{0/0}, CD8^{0/0}, $\beta_2\text{-}\mu$ ^{0/0} e perforina^{0/0}) não demonstraram qualquer efeito aparente na propagação da forma patogênica, enquanto que todas as mutações que afetam a diferenciação e as respostas dos linfócitos B (μ MT, rag-1^{0/0}, rag-2^{0/0} e agr^{0/0}) impediram o desenvolvimento da doença, sugerindo um papel importante das células B na propagação de príon dos órgãos linfóides para o sistema nervoso (KLEIN *et al.*, 1997). Contrariando os dados obtidos anteriormente com FDCs (KITAMOTO *et al.*, 1991), Klein e colaboradores verificaram que animais nulos para o receptor-1 de TNF (TNFR1),

desprovidos de FDCs mas com linfócitos T e B funcionais, desenvolveram a doença após injeção intraperitoneal, descartando um papel primordial das FDCs na patogênese das doenças por príon (KLEIN *et al.*, 1997).

No ano seguinte, o mesmo grupo publicou um trabalho mostrando que a expressão de PrP^C em linfócitos B não é necessária para que ocorra a neuroinvasão. Utilizando camundongos SCID e rag-1^{0/0} irradiados e reconstituídos com células de fígado fetal de animais PrP^{+/+} ou PrP^{-/-}, e de animais desprovidos de células T ou B, os autores verificaram que a neuroinvasão ocorre igualmente em todos os casos, com exceção da reconstituição feita a partir de células de animais desprovidos de linfócitos B. Nesse caso não há neuroinvasão, sugerindo que esta seja dependente de células cuja maturação dependa das células B ou de seus produtos (o que retornaria a atenção às FDCs), ou ainda que os linfócitos B transportem príon para o sistema nervoso por um mecanismo independente de PrP^C (KLEIN *et al.*, 1998). Mais recentemente, um outro trabalho do grupo mostrou que a depleção de células B dos centros germinativos também não influencia na patogênese das TSEs, indicando que outros componentes devem participar do mecanismo de transporte da PrP^{Sc} do sistema linforeticular para o sistema nervoso (HEIKENWALDER *et al.*, 2008).

Várias outras evidências da participação de FDCs na propagação de PrP^{Sc} foram constatadas. Brown e colaboradores observaram que essas células são necessárias para a propagação da cepa priônica ME7. Os pesquisadores verificaram que as próprias FDCs produzem PrP^C, e que a propagação de PrP^{Sc} no baço dos camundongos ocorre nas FDCs PrP^{+/+}, mas não em outros tipos celulares derivados da medula óssea, como linfócitos ou células mielóides (BROWN *et al.*, 1999), sugerindo que as FDCs são suficientes para a propagação da forma patogênica. Corroborando esses resultados, Montrasio e colaboradores verificaram que camundongos submetidos ao tratamento com o receptor solúvel de linfotóxina β (LTβR), que resulta no desaparecimento de FDCs maduras, não apresentaram

acúmulo de príon no baço, e a neuroinvasão nesses animais foi retardada após inoculação intraperitoneal de PrP^{Sc} (MONTRASIO *et al.*, 2000), o que sugere, mais uma vez, que as FDCs constituem o principal sítio de propagação da forma patogênica em órgãos linfóides.

Outros componentes celulares, porém, também parecem estar envolvidos na propagação de príon e na invasão do SNC. Ao contrário da cepa ME7, a cepa priônica RML (*Rocky Mountain Laboratory*) é capaz de se replicar no baço de camundongos nulos para PrP^C transplantados com medula óssea expressando a proteína (BLÄTTLER *et al.*, 1997). No baço dos animais selvagens infectados com RML, a infectividade é associada tanto aos linfócitos livres quanto ao estroma, mas apenas os linfócitos expressam PrP^C (RAEBER *et al.*, 1999), o que levanta a possibilidade de diferentes cepas priônicas infectarem diferentes tipos celulares nos tecidos linfóides (BRUCE *et al.*, 2000).

A disseminação de príon por células de origem hematopoiética não pode ser descartada, uma vez que a PrP^{Sc} também pode ser transmitida por transfusão de sangue, tanto em animais (HOUSTON *et al.*, 2008) quanto em humanos (ZOU *et al.*, 2008). Além disso, a PrP^{Sc} já foi vista se ligando a componentes sanguíneos, como plasminogênio, em várias espécies (FISCHER *et al.*, 2000; MAISSEN *et al.*, 2001).

Aucouturier e colaboradores sugerem que células dendríticas típicas (DCs) podem disseminar príon da periferia para o SNC na ausência de qualquer outro elemento linfóide adicional, não descartando, entretanto, o papel das FDCs na propagação e no acúmulo de PrP^{Sc} nos órgãos linfóides. Através de injeções intravenosas de frações celulares do baço de camundongos infectados em animais rag-1^{0/0}, os pesquisadores verificaram que as frações de DCs infectadas induzem o desenvolvimento da doença sem que haja acúmulo de PrP^{Sc} no baço (AUCOUTURIER *et al.*, 2001). Por outro lado, Cordier-Dirikoc e Chabry mostraram que a depleção temporária de DCs retarda a propagação da PrP^{Sc} no baço após injeção intraperitoneal, mas não oral, e conseqüentemente a neuroinvasão e o tempo de incubação da

doença são atrasados. Essas observações sugerem que as DCs agem como vetor, seqüestrando e transportando a PrP^{Sc} da periferia, mas não do intestino, para o baço (CORDIER-DIRIKOC & CHABRY, 2008).

Mecanismos acelulares também parecem participar do transporte da PrP^{Sc} às extremidades nervosas. Raposo e colaboradores sugerem que os exossomos liberados por diferentes tipos celulares podem atuar transportando príon de células infectadas para células saudáveis, próximas ou distantes, contribuindo assim para a propagação da PrP^{Sc} e para a chegada da mesma no sistema nervoso (FÉVRIER & RAPOSO, 2004; FÉVRIER *et al.*, 2005; PORTO-CARREIRO *et al.*, 2005).

1.7 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NAS DOENÇAS POR PRÍON

Os aspectos celulares e moleculares da neuropatologia das TSEs sugerem que componentes inflamatórios, tais como citocinas e proteínas do complemento, exercem importante papel na patogênese dessas doenças (revisado por HUR *et al.*, 2002). Foi demonstrado que microglia e astrócitos ativados liberam citocinas e proteínas de choque térmico no cérebro de portadores de TSEs, e que esses podem ser fatores importantes no processo de neurodegeneração (CAMPBELL *et al.*, 1994). Kim e colaboradores verificaram um aumento na expressão de genes de citocinas com funções majoritariamente pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , no cérebro de camundongos infectados, além de um aumento na atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B) nesses animais (KIM *et al.*, 1999).

Outras proteínas parecem ter sua expressão aumentada nas TSEs, como a quimiocina RANTES (CCL5) e seus receptores (LEE *et al.*, 2001), que participam dos mecanismos de ativação e migração de leucócitos, e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (KIM *et al.*, 2000), crucial

no controle da geração de mediadores pró-inflamatórios. A COX-2 co-localiza com a PrP^{Sc} e com NF-κB em animais doentes, o que levou à especulação de que o acúmulo de PrP^{Sc} induz ativação de NF-κB através de um aumento na produção de ROS, e que as alterações de expressão gênica induzidas pelo NF-κB contribuem tanto para a neurodegeneração quanto para as respostas inflamatórias relacionadas a doença (HUR *et al.*, 2002).

Recentemente verificou-se a participação de diversos componentes do complemento na patogênese das TSEs. Sabe-se que antígenos são capturados e retidos na superfície das FDCs através de interações entre proteínas do complemento e seus receptores celulares (NIELSEN *et al.*, 2000). Utilizando diferentes modelos de doenças por príon, Klein, Mabbott, Zabel e colaboradores verificaram que o sistema complemento está envolvido na captura do agente patogênico, na sua propagação no sistema linforeticular e na neuroinvasão propriamente dita (KLEIN *et al.*, 2001; MABBOTT *et al.*, 2001; ZABEL *et al.*, 2007). A depleção de um dos fatores do complemento (C1q, Bf/C2, C3 e C4) ou de seu receptor (CR1/2) retardou de maneira significativa o aparecimento dos sintomas da doença em camundongos injetados intraperitonealmente com doses limitadas das cepas priônicas RML (KLEIN *et al.*, 2001; ZABEL *et al.*, 2007) e ME7 (MABBOTT *et al.*, 2001), além de ter reduzido o acúmulo inicial de PrP^{Sc} no baço em ambos os casos. Esses dados indicam que a ativação de componentes específicos do complemento está envolvida na captura inicial de príons nos órgãos linforeticulares imediatamente após a infecção (KLEIN *et al.*, 2001). Klein e colaboradores verificaram, ainda, que a depleção do complemento teve pouco ou nenhum efeito na progressão da doença em animais infectados com altas doses de RML (KLEIN *et al.*, 2001), ao passo que Mabbott e colaboradores constataram que apesar dos sintomas da TSE estarem retardados nos animais deficientes em complemento, esses animais eventualmente sucumbem à doença (MABBOTT *et al.*, 2001). Essas observações estão de acordo com a hipótese (KIMBERLIN & WALKER, 1982) de que existem múltiplas, não exclusivas, vias de

neuroinvasão, e os efeitos da interferência nessas vias diferem com base na combinação cepa/hospedeiro, na rota de entrada e na multiplicidade da infecção (revisado por CARDONE & POCCHIARI, 2001).

A figura 3 mostra um modelo resumido das possíveis vias de neuroinvasão e dos componentes celulares e acelulares envolvidos na propagação da PrP^{Sc} nas doenças por prion após ingestão ou infecção periférica.

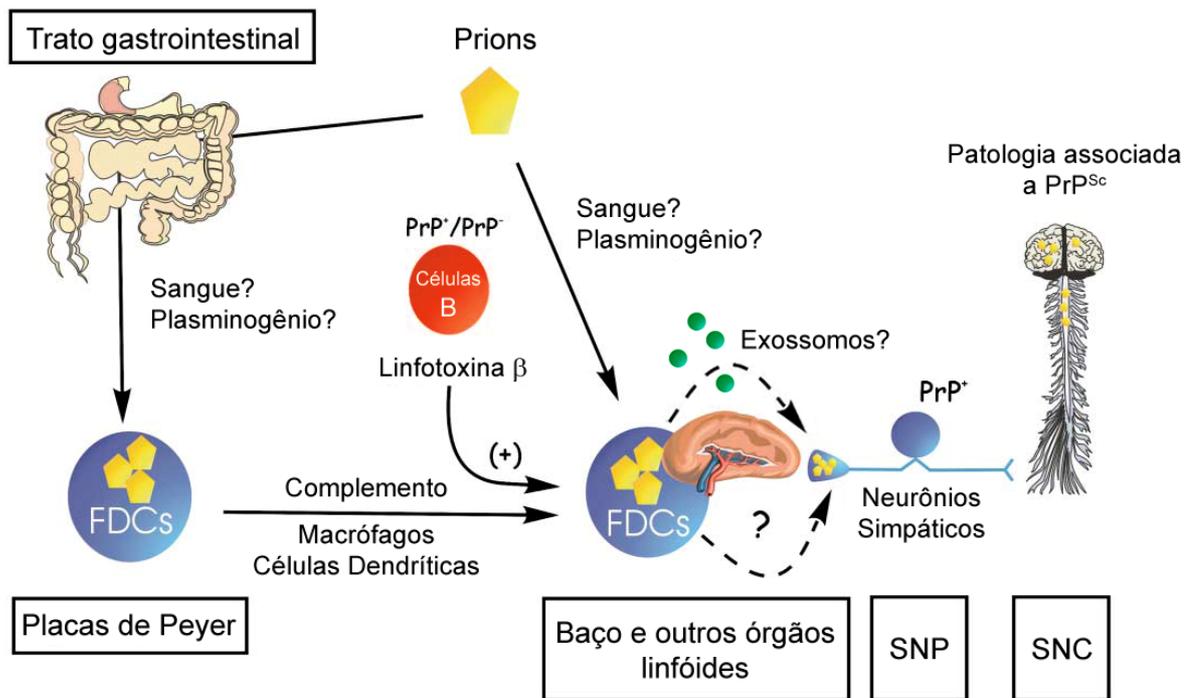


Figura 3. Rotas de neuroinvasão. Partículas infecciosas, adquiridas por via oral, atravessam o epitélio intestinal (provavelmente pela corrente sanguínea e seus constituintes, como o plasminogênio) e atingem as placas de Peyer. Então, o agente infeccioso infecta as FDCs, presentes nas placas de Peyer e em órgãos linfóides periféricos. A linfotóxina β, produzida por células B, induz maturação das FDCs e é essencial para propagação dos príons. Em estágios tardios da doença, a PrP^{Sc} é detectada no sistema nervoso periférico e, mais tarde, no SNC, onde forma agregados e leva à neurodegeneração. Componentes adicionais, celulares e acelulares, também participam do processo (adaptado de NICOTERA, 2001).

Perry e colaboradores verificaram que, ao contrário do perfil observado *in vitro* e em outros modelos de TSEs, nenhuma das citocinas IL-1 β , IL-6 ou TNF- α tem sua expressão significativamente aumentada após administração da cepa ME7 (PERRY *et al.*, 2002). Nesse modelo, porém, dois importantes mediadores inflamatórios apresentaram-se elevados: o TGF- β 1 e a prostaglandina E₂ (PGE₂). O TGF- β é secretado por vários tipos celulares, incluindo linfócitos T, linfócitos B e macrófagos (APPEL *et al.*, 2004), e desempenha importantes papéis nos mecanismos de proliferação e diferenciação celular, apoptose, produção de matriz extracelular, e respostas imunes (SMOAK & CIDLOWSKI, 2004). As conseqüências dos níveis aumentados de TGF- β 1 ainda não foram esclarecidas, mas acredita-se que o TGF- β 1 tenha implicações na amiloidogênese (WYSS-CORAY *et al.*, 1997, 2000; CUNNINGHAM *et al.*, 2002), exercendo um papel direto na patogênese das TSEs e outras doenças neurodegenerativas. Por outro lado, o TGF- β parece atuar na inibição de mediadores pró-inflamatórios nas TSEs, minimizando, assim, os danos cerebrais que acompanham as doenças por príon (BOCHE *et al.*, 2006). Além de ser um mediador pró-inflamatório clássico e alvo de várias drogas antiinflamatórias, parece que a PGE₂ possui diversos papéis antiinflamatórios, podendo atuar como um regulador negativo da ativação de macrófagos e microglia (FADOK *et al.*, 1998; ZHANG & RIVEST, 2001), o que seria de importância crucial para o controle das TSEs.

O perfil de citocinas demonstrado no trabalho de Perry e colaboradores, que inclui elevados níveis de TGF- β e PGE₂, é o mesmo daquele observado em macrófagos durante a fagocitose de células apoptóticas (FADOK *et al.*, 1998). Uma vez que a morte celular apoptótica não leva a uma resposta inflamatória típica, a morte celular de neurônios de cérebros infectados por príon estaria de acordo com o perfil de citocinas observado no cérebro de camundongos com TSE. Há ainda evidências que sugerem que a infecção periférica e a

inflamação sistêmica provocada pela PrP^{Sc} devem dirigir a expressão de citocinas no SNC e, talvez, exacerbar a doença (PERRY *et al.*, 2002).

A microglia constitui o principal fagócito do SNC (LING & WONG, 1993; CUADROS & NAVASCUÉS, 1998). Essas células invadem o SNC durante o desenvolvimento e participam da remoção de neurônios apoptóticos (HUME *et al.*, 1983; CUADROS & NAVASCUÉS, 1998). No SNC de animais adultos a microglia é quiescente, e pode ser ativada por isquemia, respostas inflamatórias ou pela invasão de patógenos (LING & WONG, 1993; PERRY *et al.*, 1994). Acredita-se que as células da microglia estejam envolvidas na fagocitose de PrP^{Sc}, e que sejam ativadas para produzir neurotoxinas e mediadores inflamatórios nas doenças por príon (BROWN & KRETZSCHMAR, 1997; GIESE *et al.*, 1998; BROWN, 2001; REZAIE & LANTOS, 2001). A ativação da microglia precede a perda neuronal e ocorre ao longo de vias anatômicas neurais definidas e em regiões de vacuolização, de formação de placas e de acúmulo de PrP^{Sc} (revisado por REZAIE & LANTOS, 2001). O peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ estimula a proliferação das células da microglia, bem como a produção de IL-1 β e IL-6, além de ROS e outras neurotoxinas potenciais, que podem contribuir para o dano tecidual (REZAIE & LANTOS, 2001).

1.8 A PROTEÍNA PRÍON NO SISTEMA IMUNE

Vários trabalhos destacaram o papel do sistema imune nas doenças por príon, incluindo a participação direta ou indireta de linfócitos, macrófagos, DCs e FDCs. Por outro lado, são crescentes as evidências de participação da PrP^C nas funções normais desses e de outros componentes celulares do sistema imune.

Os primeiros dados relacionados às funções imunomodulatórias desempenhadas pela PrP^C foram obtidos há quase duas décadas através de estudos de ativação linfocitária. Cashman e colaboradores verificaram que a ativação de linfócitos humanos, ou de linhagens de células linfóides, induz aumento na expressão de PrP^C na superfície celular, e que anticorpos anti-PrP^C impedem a proliferação celular induzida por concanavalina A (ConA) (CASHMAN *et al.*, 1990). Esses dados foram posteriormente corroborados e ampliados por outros pesquisadores. Utilizando camundongos PrP^{-/-}, Mabbott e colaboradores observaram que a proliferação de células T induzida por ConA é reduzida em até 80% nesses animais, quando comparada a de camundongos selvagens, e que a expressão de PrP^C nos linfócitos obtidos de animais selvagens também é aumentada pela estimulação com ConA (MABBOTT *et al.*, 1997). A reintrodução da PrP^C em esplenócitos derivados de animais PrP^{-/-} aumentou a capacidade de proliferação dessas células, quando estimuladas com ConA ou forbol miristato acetato (PMA)/ionomicina. Além disso, os níveis de IFN- γ se mostraram elevados após a transfecção das células com o plasmídeo expressando PrP^C (BAINBRIDGE & WALKER, 2005).

Já o papel da PrP^C na ativação de linfócitos B é controverso. Até pouco tempo se acreditava que a PrP^C não participava do mecanismo, uma vez que o tratamento de culturas primárias de células B murinas com lipopolissacarídeo (LPS) não afetou a expressão da proteína príon (KUBOSAKI *et al.*, 2003). Recentemente, porém, Cordier-Dirikoc e colaboradores verificaram que o tratamento de uma linhagem de células B A20, derivadas de linfoma murino, com LPS elevou significativamente a expressão de PrP^C na superfície celular (CORDIER-DIRIKOC *et al.*, 2008). Em conjunto, esses dados apontam para um papel importante da proteína príon em tecidos extra-neurais, e sugerem que a PrP^C tenha um impacto crucial na proliferação e na ativação de células T (MABBOTT *et al.*, 1997; BAINBRIDGE & WALKER, 2005) e, talvez, de células B.

O tratamento das células PrP^{-/-} transfectadas com PrP^C com ConA (que necessita do complexo de receptor de células T, TCR), mas não com PMA/ionomicina (que independe do complexo TCR), induziu aumento na expressão de IL-2 e IL-4 (BAINBRIDGE & WALKER, 2005). Trabalhos antigos já haviam demonstrado que a remoção de proteínas ancoradas por GPI impede a ativação de linfócitos T por ConA, mas não a ativação direta via TCR (PRESKY *et al.*, 1990; THOMAS *et al.*, 1991). Corroborando esses dados, Mattei e colaboradores recentemente verificaram que a PrP^C encontra-se em microdomínios de membrana associada às proteínas cinases Fyn e ZAP-70 (proteína cinase associada a cadeia zeta), que participam das vias de sinalização linfocitárias associadas a estimulação do TCR (MATTEI *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que a PrP^C é um dos componentes do complexo TCR envolvidos na ativação de células T.

O papel funcional da PrP^C parece não estar restrito apenas aos mecanismos de ativação e proliferação das células T. Ballerini e colaboradores estudaram o papel funcional da proteína príon nas interações entre células T e DCs. Utilizando modelos de resposta linfocítica alogênica e resposta proliferativa dependente de peptídeo ligado ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), os pesquisadores observaram que há um acúmulo de PrP^C em sítios de contato entre células T e DCs, e que a ausência de PrP^C nas DCs resulta em uma diminuição significativa da capacidade proliferativa dos linfócitos (BALLERINI *et al.*, 2006). A mobilização da proteína por anticorpos anti-PrP^C também impediu a proliferação das células T em ambos os tipos de resposta envolvendo DCs PrP^{+/+} e células T PrP^{+/+} ou PrP^{-/-}. O mesmo foi observado *in vivo* em uma resposta dependente de peptídeo-MHC. Por outro lado, a ausência de PrP^C nas células T não afetou sua capacidade de proliferar em respostas a DCs (BALLERINI *et al.*, 2006). Em princípio, esse dado parece estar em desacordo com os resultados de ativação demonstrados anteriormente, onde a presença de PrP^C nos linfócitos parece ser crucial para ativação celular dependente de TCR. Contudo, o tratamento com anti-

PrP^C foi capaz de bloquear a resposta alogênica entre DCs PrP^{-/-} e linfócitos T PrP^{+/+}, sugerindo fortemente que essa proteína exerce funções sinalizadoras nessas células. Ao contrário da depleção gênica, a mobilização da PrP^C por anticorpos poderia levar a uma cascata de eventos bioquímicos que resultaria na inibição da proliferação celular (BALLERINI *et al.*, 2006). Em conjunto, esses dados fornecem fortes evidências de participação da proteína príon na interação de células apresentadoras de antígeno (APCs) e células T e, conseqüentemente, na formação da sinapse imunológica. Reforçando esses dados, Burthem e colaboradores observaram que a PrP^C é co-expressa com moléculas de MHC classe II em DCs derivadas de monócitos sanguíneos (BURTHEM *et al.*, 2001).

Experimentos de análise de expressão gênica por microarranjo de DNA sugerem que a PrP^C pode ser naturalmente superexpressa em algumas populações de células T regulatórias (Treg) (HUEHN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; SUGIMOTO *et al.*, 2006). Corroborando essas observações, um estudo recente mostrou que tanto a expressão de RNAm para a proteína quanto os níveis de PrP^C na superfície celular estão elevados em Treg (CD4⁺CD25⁺) derivadas de camundongos, quando comparadas a células T convencionais (CD4⁺CD25⁻) (ISAACS *et al.*, 2008). Contudo, o número de células e as funções normais das Treg não se mostraram alteradas em animais PrP^{-/-}.

O papel fisiológico da proteína príon em macrófagos também foi analisado por diferentes grupos. Watarai e colaboradores estudaram a participação da PrP^C nos mecanismos de infecção de macrófagos por *Brucella abortus*, e observaram que a infecção é dependente da interação da PrP^C com Hsp60 secretada pela bactéria (WATARAI *et al.*, 2003). Contudo, esses resultados não puderam ser reproduzidos por outros pesquisadores. Utilizando anticorpos neutralizantes anti-PrP^C, Fontes e colaboradores não constataram nenhuma alteração no processo de invasão de macrófagos por *Brucella*. Por outro lado, não foi observada qualquer diferença na infecção de macrófagos ou camundongos selvagens ou PrP^{-/-},

nem ligação específica entre a bactéria e PrP^C recombinante (FONTES *et al.*, 2005), o que torna duvidoso o papel da PrP^C na interação de macrófagos com microorganismos.

De Almeida e colaboradores examinaram o papel da PrP^C em respostas fagocíticas. Utilizando vários modelos experimentais *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, os pesquisadores verificaram que macrófagos derivados de camundongos PrP^{-/-}, assim como macrófagos derivados de animais selvagens tratados com fosfoinositol-fosfolipase C (PI-PLC), apresentam uma atividade fagocítica significativamente maior do que as células obtidas de camundongos selvagens, o que sugere um papel funcional da PrP^C na modulação negativa da fagocitose (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Esse aumento da atividade fagocítica dos animais PrP^{-/-} é semelhante ao comportamento inflamatório atípico apresentado pela microglia, descrito anteriormente. Seria interessante pensar na possibilidade de, no curso da doença, a microglia adquirir um fenótipo semelhante ao de macrófagos PrP^{-/-}. A conversão da PrP^C em PrP^{Sc} e a conseqüente depleção de PrP^C da microglia levariam as células a um estado ativo, com elevada atividade fagocítica (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Uma vez que no SNC a inflamação é limitada (PERRY *et al.*, 1995), e a ativação da microglia precisa ser abreviada por causa da produção de mediadores citotóxicos e inflamatórios por essas células, a capacidade de regulação negativa da fagocitose, e possivelmente de outras atividades da microglia, seria uma vantagem em um tecido rico em PrP^C, como o SNC (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Krebs e colaboradores verificaram que a PrP^C induz cascatas de sinalização em macrófagos. Os autores administraram proteínas de fusão de PrP^C a uma linhagem de macrófagos (P388D-1) e observaram que há adesão dessas proteínas na superfície celular acompanhada de fosforilação de tirosinas cinases da família Src, bem como de ERK1/2 e AKT, como resultado da ativação de vias de sinalização. Uma vez que a ativação dessas vias leva a diversas respostas biológicas em macrófagos, como fagocitose, migração e produção de

citocinas, a PrP^C desempenharia aí um importante papel na transdução de sinal por essas células (KREBS *et al.*, 2006). Contudo, vale lembrar que a P388D-1 constitui uma linhagem celular triplóide, derivada de linfoma murino, com alto grau de instabilidade genômica e aberrações citogenéticas abundantes (COLEMAN *et al.*, 1999), o que faz com que os dados obtidos nesse trabalho sejam de pouca relevância fisiológica para estudos com macrófagos/monócitos (LINDEN *et al.*, 2008).

Recentemente, Zhang e colaboradores propuseram um papel funcional da proteína príon para as células tronco hematopoiéticas (HSCs). Através de reconstituições seriadas de medula óssea em camundongos fatalmente irradiados, os autores verificaram que as HSCs obtidas de camundongos PrP^{-/-} são incapazes de sustentar sua auto-renovação (ZHANG *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual ocorre essa diminuição da capacidade de auto-renovação das HSCs para reconstituir a medula óssea, se por inibição da proliferação celular ou da resistência à morte, ainda não é conhecido.

1.9 A PROTEÍNA PRÍON EM NEUTRÓFILOS E NA INFLAMAÇÃO

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, atingem a corrente sangüínea e ficam circulando por algumas horas até serem seletivamente recrutados para os tecidos que sofreram algum dano por infecção, trauma, ou uma reação autoimune (ZARBOCK & LEY, 2008). Eles constituem a primeira linha de defesa contra infecção, e sua capacidade de fagocitar e matar microorganismos invasores tem implicação vital para a defesa imunológica do hospedeiro (PHAM, 2008). Em resposta a infecção, os neutrófilos engolfam os patógenos em uma organela, denominada fagossomo, na qual os microorganismos são destruídos por uma combinação de radicais livres, proteases e peptídeos antimicrobianos, além de fatores próprios

do microambiente formado na organela, como pH ácido e indisponibilidade de nutrientes (REEVES *et al.*, 2002; STUART & EZEKOWITZ, 2005). Alterações no número de células e nas funções dos neutrófilos acarretam em elevados riscos de infecção, como acontece com pacientes portadores de neutropenia crônica severa (NEWBURGER, 2006). Por outro lado, defeitos nos mecanismos de recrutamento dos neutrófilos, como observado na deficiência de adesão leucocitária (LAD), são associados a infecções bacterianas recorrentes, que podem até levar à morte (ANDERSON & SPRINGER, 1987).

Uma vez recrutados para o sítio de inflamação, os neutrófilos rolam pelo endotélio capilar, coletam sinais inflamatórios e transmigram para o tecido infectado. Durante a interação com o endotélio, os neutrófilos recebem sinais de uma série de moléculas, incluindo moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, que podem ativar diferentes vias de sinalização e, subseqüentemente, induzir ou inibir os mecanismos de ativação celular, espalhamento, transmigração através do endotélio, *burst* respiratório, e degranulação (ZARBOCK & LEY, 2008). Após exercer suas funções, os neutrófilos precisam sofrer apoptose, e a sua remoção é essencial para a resolução da inflamação (EYLES *et al.*, 2006), já que o acúmulo prolongado dessas células no sítio inflamatório pode danificar o tecido, o que tem sido relacionado à inflamação crônica que, por sua vez, contribui para o desenvolvimento da autoimunidade (NATHAN, 2006).

Ao contrário do que se acreditava alguns anos atrás, os neutrófilos não são apenas células destrutivas que têm como principal função matar e digerir patógenos invasores. Estudos recentes indicam que os neutrófilos desempenham papel fundamental na orquestração da resposta inflamatória, na resolução da inflamação, e na cicatrização de tecidos danificados (NATHAN, 2006; BORREGAARD *et al.*, 2007), e eles o fazem através da expressão de citocinas, quimiocinas e uma série de outros mediadores inflamatórios ao longo do processo de maturação celular ou durante a inflamação (Fig 4).

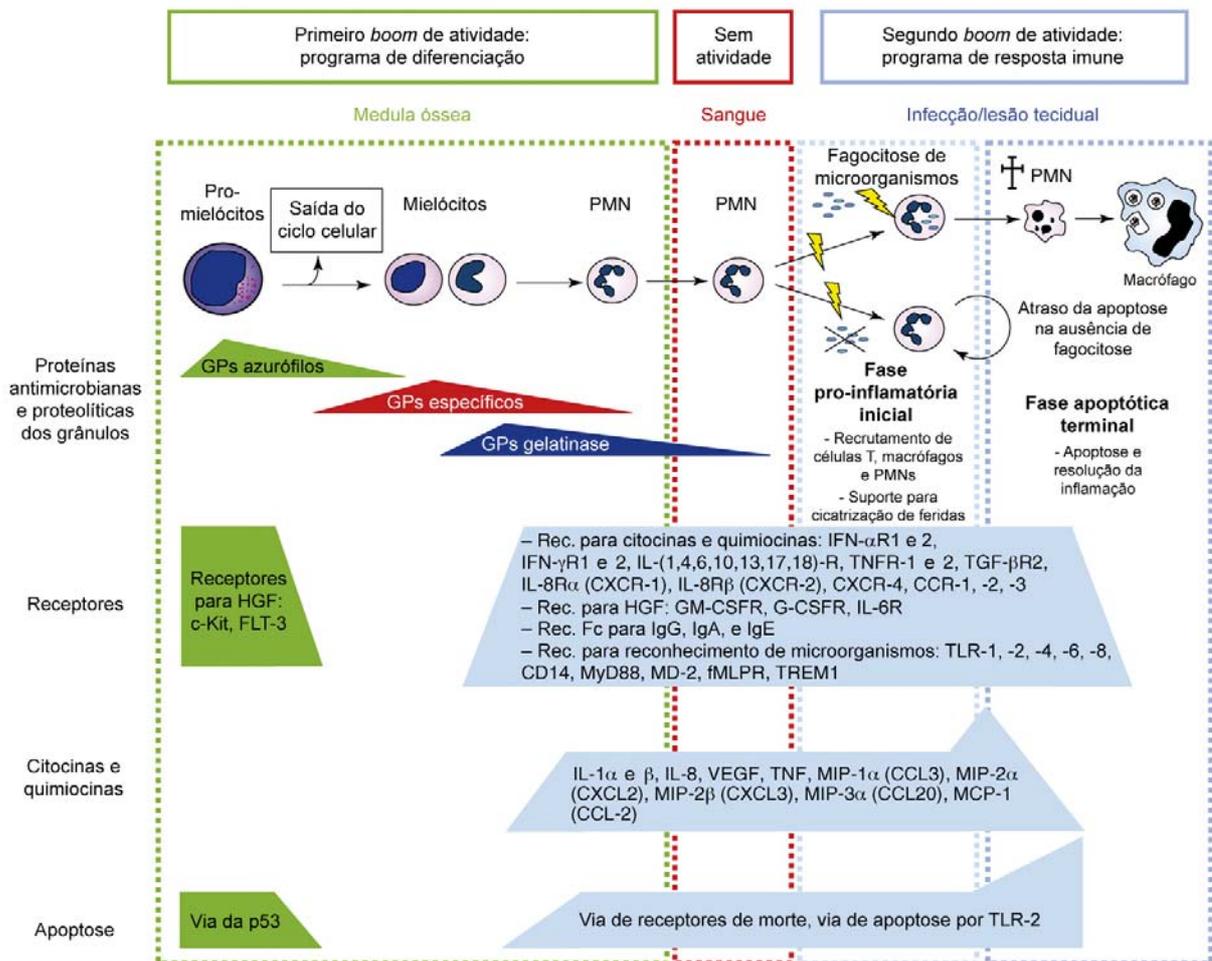


Figura 4. Perfil de expressão gênica dos neutrófilos durante a mielopoiese e na inflamação. A figura mostra os perfis sequenciais de expressão de RNAm para proteínas neutrofílicas. Verde: expressão em mieloblastos e promielócitos; vermelho: expressão em mielócitos e metamielócitos; azul-escuro: expressão em metamielócitos tardios e neutrófilos imaturos; azul-claro: expressão em neutrófilos segmentados. GPs, grânulos protéicos; PMN, polimorfonucleares; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; FLT, tirosina cinase semelhante a FMS; GM-CSF, fator estimulante de granulócitos e macrófagos; G-CSF, fator estimulante de granulócitos; MD, diferenciação mielóide; fMLPR, formilmetionilileucilfenilalanina; TREM, receptor de ativação expresso em células mielóides; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; MIP, proteína inflamatória de macrófago; MCP, proteína quimioatraente de monócitos (adaptado de BORREGAARD *et al.*, 2007).

Dentre os mediadores mais importantes, destacam-se as serino-proteases catepsina G (CG), elastase neutrofílica (NE), e proteinase 3 (PR3), presentes nos grânulos azurófilos (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). Em conjunto, essas proteínas são responsáveis

pela atividade bactericida e fungicida dos neutrófilos, além de estarem envolvidas em uma série de doenças inflamatórias não infecciosas, como artrite, doenças pulmonares crônicas e danos teciduais resultantes de isquemia/reperfusão (revisado por PHAM, 2008). Essas proteases atuam não apenas na degradação da matriz extracelular, mas também na modulação da resposta inflamatória através da modificação proteolítica de quimiocinas e citocinas, ativação de formas latentes de citocinas e fatores de crescimento, e clivagem de receptores de superfície; além de induzirem apoptose independente de caspases e iniciarem a resposta imune adaptativa através da ativação linfocitária (Fig 5) (para revisão, ver PHAM, 2008).

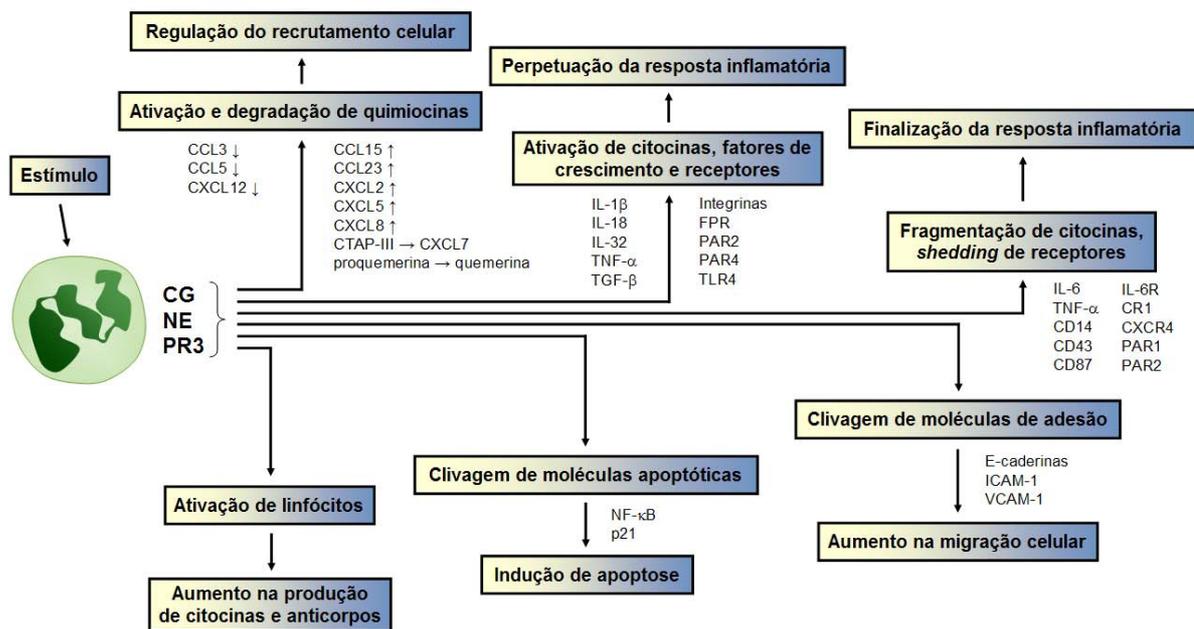


Figura 5. Efeitos de serino-proteases neutrofílicas em alvos biológicos. A figura ilustra alguns mecanismos potenciais pelos quais as serino-proteases dos neutrófilos devem estar envolvidas na regulação do processo inflamatório e na resposta imune. CTAP, peptídeo ativador de tecido conjuntivo; FPR, receptor de formil peptídeo; PAR, receptor ativado por protease; ICAM, molécula de adesão intercelular; VCAM, molécula de adesão celular vascular (adaptado de PHAM, 2008).

Pouco se sabe a respeito do papel fisiológico da proteína príon em respostas inflamatórias, e menos ainda com relação a sua função em neutrófilos. De Almeida e colaboradores verificaram que camundongos PrP^{+/+} injetados intraperitonealmente com zimosan exibem um intenso influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, para a cavidade peritoneal, enquanto que em camundongos PrP^{-/-} o influxo de leucócitos é significativamente menor, além de monócitos serem recrutados em maior proporção do que neutrófilos (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Em um estudo preliminar utilizando um modelo de silicose pulmonar dependente de Fas, De Almeida e colaboradores observaram que camundongos PrP^{-/-} que receberam sílica via intratraqueal apresentaram menor quantidade de leucócitos infiltrados no líquido broncoalveolar, perderam menos peso, e formaram menos fibrose pulmonar, quando comparados aos animais PrP^{+/+}. Esses dados sugerem que a PrP^C participa da modulação de vários aspectos da inflamação induzida por ligantes de receptores tipo Toll (TLR) ou Fas, ou ainda pelo sistema complemento, que também pode ser ativado por LPS ou zimosan na inflamação (ZHANG *et al.*, 2007). Contudo, os mecanismos envolvidos nos múltiplos efeitos da depleção de PrP^C ainda não foram esclarecidos (LINDEN *et al.*, 2008).

A sinalização através de TLRs constitui um mecanismo central na resposta imune inata do hospedeiro. Até o momento foram identificados treze TLRs (TLR1 a TLR13) em humanos e camundongos; e formas equivalentes a muitos desses TLRs foram encontradas em outras espécies de mamíferos (CHUANG & ULEVITCH, 2000; DU *et al.*, 2000; TABETA *et al.*, 2004). Os TLRs funcionam como sentinelas que reconhecem e induzem respostas a constituintes microbianos, como zimosan (agonista de TLR2), LPS (TLR4), DNA contendo citosinas e guaninas (CpG DNA) não metiladas (TLR9), dentre outros (para revisão, ver TAKEDA & AKIRA, 2005). Tais respostas são imediatas, e promovem a mobilização de fagócitos aos sítios infectados (KAPETANOVIC & CAVAILLON, 2007).

Recentemente, verificou-se que o CpG DNA retarda a patogênese de TSEs quando administrado em camundongos infectados, sugerindo que a ativação da imunidade inata interfere na infecção por príon (SETHI *et al.*, 2002; SPINNER *et al.*, 2007). Contudo, a proteína MyD88, um intermediário de sinalização obrigatório para vários membros da família dos TLRs, incluindo o TLR9, parece não interferir no desenvolvimento das TSEs, uma vez que camundongos MyD88^{-/-} não apresentam diferenças no tempo de incubação, na cinética da infecção ou nos perfis neuropatológicos quando comparados aos animais selvagens (PRINZ *et al.*, 2003). Por outro lado, Spinner e colaboradores recentemente demonstraram que animais C3H/HeJ, que possuem uma mutação no domínio intracelular de sinalização do TLR4 e, conseqüentemente, não sinalizam por essa via (POLTORAK *et al.*, 1998; HOSHINO *et al.*, 1999), apresentam acelerada patogênese após infecção intracerebral ou intraperitoneal com diferentes doses das cepas priônicas 139A ou ME7, quando comparados com animais controles (HeOuJ) (SPINNER *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que a ativação da imunidade inata atua na inibição da patogênese das TSEs, e que a estimulação do TLR4 deve ter um papel crucial na supressão da infecção por príon (SPINNER *et al.*, 2008). Uma vez que alguns TLRs, como o TLR4, podem utilizar ambas as vias de sinalização, dependente e independente de MyD88 (TAKEDA & AKIRA, 2005; WEST *et al.*, 2006), os resultados de Spinner e colaboradores com camundongos desprovidos de um TLR definitivamente apontam para uma importante associação entre a sinalização via TLRs e a patogênese das TSEs.

Cunningham e colaboradores recentemente observaram que a inflamação sistêmica induzida por LPS é capaz de exacerbar a neurodegeneração e acelerar a progressão da doença induzida pela cepa priônica ME7 em camundongos (CUNNINGHAM *et al.*, 2008). A endotoxemia provoca uma estimulação de células da microglia, fazendo com que elas produzam um perfil de citocinas mais pró-inflamatório durante o desenvolvimento da doença, o que não acontece com os animais normais submetidos ao mesmo tratamento

(CUNNINGHAM *et al.*, 2008). Esses dados mostram, mais uma vez, uma relação entre as vias de sinalização mediadas por TLRs e seus ligantes e o desenvolvimento das TSEs. Porém, sob condições fisiológicas, a relação dos TLRs com a PrP^C ainda permanece desconhecida.

A expressão da PrP^C não é homogênea entre as espécies, os subtipos celulares e os diferentes estágios de maturação das células imunes. Como regra geral, ela é modulada negativamente com a maturação de granulócitos, e positivamente com a maturação de APCs. Entre as células linfóides, a maturação pode ser acompanhada de diminuição ou aumento dos níveis de PrP^C, dependendo da espécie estudada (para revisão, ver ISAACS *et al.*, 2006). Contudo, há informações discrepantes na literatura, principalmente com relação a expressão da PrP^C em granulócitos. Cashman e colaboradores foram os primeiros a estudar a expressão de PrP^C em células do sistema imune. Os pesquisadores detectaram a proteína em linfócitos, mas não em granulócitos e eritrócitos sanguíneos humanos (CASHMAN *et al.*, 1990). Mais tarde, o mesmo grupo verificou que precursores da medula óssea apresentam altos níveis de PrP^C na superfície, e que esses níveis diminuem progressivamente a medida em que as células se diferenciam em granulócitos (DODELET & CASHMAN, 1998). Outros trabalhos, porém, não corroboram esses dados. Diomedede e colaboradores mostraram que a PrP^C está presente não apenas em linfócitos, mas também em monócitos e granulócitos sanguíneos humanos (DIOMEDEDE *et al.*, 1996). Por outro lado, a proteína foi ainda identificada em granulócitos em processo de maturação na medula óssea de camundongos (LIU *et al.*, 2001), mas não em granulócitos sanguíneos de carneiros (HERRMANN *et al.*, 2001; HALLIDAY *et al.*, 2005), ou em pequena quantidade em outros mamíferos (HOLADA *et al.*, 2007).

1.10 RACIONAL

Como vimos, o controle da expressão da proteína príon é de fundamental importância, tanto sob condições fisiológicas, onde a PrP^C participa da regulação de várias funções celulares, quanto sob condições patológicas, onde a disponibilidade da mesma é imprescindível para a propagação da PrP^{Sc}. Uma vez que as células imunes afetam diretamente o desenvolvimento das TSEs e, reciprocamente, a PrP^C afeta a função imune, os níveis de expressão da proteína príon funcionariam, em ambos os casos, como um fator limitante. Tendo em vista que os neutrófilos constituem um dos principais componentes celulares da inflamação, a compreensão dos mecanismos de regulação da PrP^C nessas células poderia ter grande relevância para as funções normais dos neutrófilos, além de fornecer informações importantes para o entendimento das doenças por príon.

Resultados preliminares de citofluorimetria (DE ALMEIDA, NÓBREGA & LINDEN, dados não publicados) foram instrumentais na elaboração da nossa hipótese de trabalho. Por ocasião da execução de um controle de rotina em uma população de macrófagos marcados com anticorpos contra PrP^C e contra F4/80, uma molécula indicadora de diferenciação e ativação de macrófagos (GORDON, 1999), verificou-se que células obtidas de lavado peritoneal de camundongos *naive* que apresentaram marcação de baixa intensidade para F4/80 pareciam expressar menos PrP^C do que células com intensa marcação para F4/80. Esse achado poderia resultar de regulação da expressão da PrP^C em função do estado de diferenciação ou ativação de macrófagos. Sendo assim, o projeto foi iniciado com ensaios *in vitro* e *in vivo* de ativação celular, incluindo endotoxemia provocada por LPS que resultou em um aumento na expressão de PrP^C não em macrófagos, mas em uma população que, mais tarde, foi identificada como sendo constituída predominantemente por neutrófilos (Gr-1⁺). Esse resultado gerou o objetivo fundamental dessa tese.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Determinar o papel de mediadores inflamatórios na regulação da expressão da proteína príon em neutrófilos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos do LPS na regulação da expressão de PrP^C por neutrófilos em um modelo de inflamação aguda;
- Verificar, *in vitro*, o papel de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias na regulação da expressão da PrP^C em neutrófilos;
- Verificar, *in vitro* e *in vivo*, o papel de glicocorticóides (GCs) naturais e sintéticos, bem como sua interação com citocinas, na expressão de PrP^C por neutrófilos;
- Analisar os mecanismos de regulação da expressão de PrP^C em um modelo experimental de estresse induzido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

O meio de cultura RPMI foi obtido da Gibco (EUA). Lipopolissacarídeo de *Salmonella enterica* (#L6511), mifepristona (RU486) e HMG-1 recombinante humano foram comprados da Sigma Chemical Co. (EUA). Anticorpos monoclonais anti-Ly-6G/Gr-1 (RB6-8C5), anti-TNF- α neutralizante (MP6-XT22), anti-IL-1 β neutralizante (B122), anti-CD3 (145-2C11) e anti-CD16/32 bloqueador de receptores Fc (93) de camundongo, assim como TNF- α , IL-6 e IL-1 β recombinantes murinos, foram adquiridos da eBioscience (EUA). O anticorpo monoclonal anti-CD178 ligante de Fas murino (Jo2) foi comprado da BD Pharmingen (EUA). IL-4, IL-10 e IL-13 recombinantes humanos foram comprados da PeproTech (EUA). O TGF- β recombinante humano e o anticorpo monoclonal anti-F4/80 murino (BM8) foram obtidos da Invitrogen (EUA). O anticorpo policlonal anti-TGF- β neutralizante (produzido em coelhos imunizados com diferentes isoformas de TGF- β) e o GM-CSF recombinante murino foram comprados da R&D Systems (EUA). A PGE₂ foi obtida da Cayman Chemical (EUA). A dexametasona (sulfato de dexametasona, Decadron) foi obtida do Aché Laboratórios Farmacêuticos (Brasil). O MIF recombinante humano foi gentilmente cedido pela Dra. Christine Metz (The Feinstein Institute for Medical Research, Nova York, EUA). O anticorpo monoclonal anti-príon SAF32 foi adquirido da SPI-BIO (França). O anticorpo policlonal anti-PrP^C foi produzido contra PrP^C recombinante murina, conforme detalhado no item 3.3. Anticorpos secundários para análises por citofluorimetria e *western blot* foram obtidos da Jackson ImmunoResearch Laboratories (EUA) e da Santa Cruz Biotechnology (EUA), respectivamente. Todos os outros reagentes utilizados foram de pureza analítica (PA).

3.2 ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 foram obtidos da Universidade Federal Fluminense, do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/Unicamp), e da Fundação Estadual de Produção em Pesquisa e Saúde (FEPPS) de Porto Alegre.

Animais deficientes no receptor p55 para o fator de necrose tumoral (TNFR1^{-/-}; PFEFFER *et al.*, 1993) foram gentilmente cedidos pela Dra. Leda Quércia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Camundongos BALB/c selvagens e mutantes com doença linfoproliferativa generalizada (BALB/c.gld) (TAKAHASHI *et al.*, 1994) foram obtidos do Instituto Oswaldo Cruz.

Animais nulos para PrP^C (Zurich I) foram produzidos pelo Dr. Charles Weissmann e colaboradores (BÜELER *et al.*, 1992; FISCHER *et al.*, 1996) em uma cepa originada de um cruzamento misto entre C57BL/6 e 129/Sv, e gentilmente cedidos pelo Dr. Hans Kretzschmar (Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munique, Alemanha).

Camundongos Suíços foram gentilmente cedidos pela Dra. Luciana Romão (Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Todos os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas contendo comida e água *ad libitum* e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h. Os experimentos foram feitos com camundongos de mesmo sexo, com idade entre 8 e 12 semanas, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Experimentação Animal do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.3 PRODUÇÃO DO SORO ANTI-PrP^C

O soro anti-PrP^C utilizado nesse trabalho foi obtido de camundongos nulos para PrP^C (Zrch1) imunizados com proteína príon recombinante. Os animais sofreram uma série de três imunizações, com intervalos de 21 dias entre cada imunização. Treze dias após a terceira imunização os camundongos foram sangrados (sangramento plexo-orbital) para obtenção do soro. Depois desse período, os animais permanecem descansando por mais 21 dias, quando foram, então, novamente imunizados. Depois da imunização, após 13 dias foi feito novo sangramento, e assim sucessivamente. O soro do sangue foi, então, coletado e analisado, e caracterizado por *western blot* (Fig 6). O soro de animais não imunizados foi utilizado como controle negativo dos experimentos. O soro anti-PrP^C utilizado neste projeto foi preparado em colaboração com a Dra. Vilma Martins, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (São Paulo). Um anticorpo monoclonal anti-PrP^C, SAF32, também foi utilizado nesse trabalho para confirmação de alguns experimentos de citometria de fluxo e para a maioria dos experimentos de *western blot*.

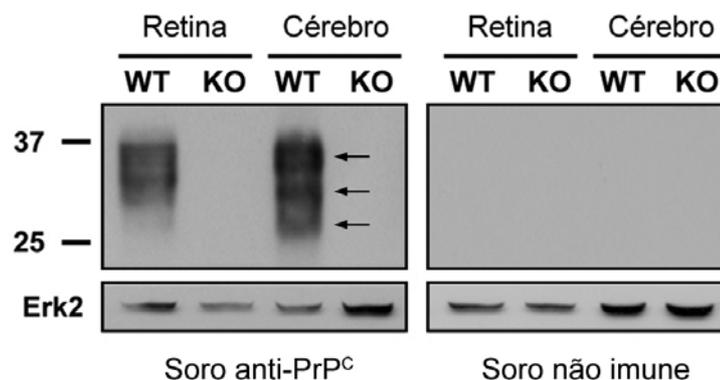


Figura 6. Caracterização do soro anti-PrP^C. Extratos totais de retinas e cérebros de camundongos selvagens (WT) ou nulos para a proteína príon (KO) foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados na presença do soro anti-PrP^C ou do soro obtido de animais não imunizados. Os diferentes pesos moleculares das bandas apontadas pelas setas correspondem a diferentes formas de glicosilação da proteína príon.

3.4 TRATAMENTO COM LPS E DEX E ISOLAMENTO DE CÉLULAS DA M.O.

Para indução de inflamação, os camundongos receberam uma injeção (seringa de 1 ml, agulha de 26 G ½”) intraperitoneal de LPS, em diferentes concentrações, diluído em 0,1 ml de tampão fosfato salino (PBS). O tratamento com sulfato de dexametasona (DEX) também foi realizado através de injeções da droga em diferentes concentrações na cavidade peritoneal. Após o tratamento, os animais sofreram eutanásia por eterização e seus fêmures foram removidos e liberados de tecidos aderidos. As extremidades das epífises femurais foram cortadas e as células da medula óssea (m.o.) foram retiradas com jatos de RPMI gelado, com o auxílio de uma seringa. Depois de lavadas uma vez com meio de cultura gelado, as células foram submetidas a um tratamento com tampão ACK, para lise de hemáceas (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,2). Por fim, as células foram lavadas mais duas vezes, ressuspensas em meio RPMI, quantificadas em hemocítômetro e mantidas a 4°C até a realização dos experimentos.

3.5 PURIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS POR COLUNAS MAGNÉTICAS

Após o isolamento, as células da medula óssea foram purificadas pelo método de separação celular magnética (MACS). Resumidamente, as células foram incubadas com anticorpo anti-Gr-1 biotilado (1 µg/10⁶ células) por 30 min a 4°C. Depois de lavadas duas vezes com RPMI, as amostras foram incubadas por mais 30 min com microesferas magnéticas conjugadas a um anticorpo anti-biotina, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Alemanha), e lavadas com PBS/EDTA 2 mM contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%. A seleção positiva das células Gr-1⁺ foi feita passando-se as amostras em colunas

magnéticas MS afixadas a um suporte magnético (Miltenyi Biotec, Alemanha). Depois de passar as amostras, as colunas foram lavadas com PBS/EDTA para remover as células livres (Gr-1⁻). Posteriormente, as colunas foram retiradas do suporte magnético e lavadas com meio RPMI a fim de coletar as células que ficaram retidas nas mesmas (Gr-1⁺). As amostras foram mantidas a 4°C até a realização dos experimentos.

3.6 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para coleta de macrófagos e granulócitos da cavidade peritoneal, os animais tiveram uma peritonite induzida através de injeção (seringa de 3 ml, agulha de 26 G ½”) intraperitoneal de 2 ml de tioglicolato de sódio a 3% em PBS. Depois de 4 ou 72 h, os camundongos sofreram eutanásia por eterização e foram fixados em decúbito dorsal para a coleta do exsudato, o que foi feito através de lavagem da cavidade abdominal com 5 ml de meio RPMI gelado, com auxílio de uma seringa de 5 ml (agulha de 22 G ½”). Macrófagos residentes, obtidos de animais não estimulados com tioglicolato, também foram coletados através de lavagem peritoneal. Os exsudatos obtidos 4 h após a injeção de tioglicolato contêm em sua maioria neutrófilos. Já os macrófagos são predominantes em animais não estimulados, ou estimulados com tioglicolato por 72 h (LAGASSE & WEISSMAN, 1996).

Após a coleta, as células foram lavadas com RPMI e colocadas para aderir em placas de Petri, a 37°C por 2 h. Os neutrófilos (não aderentes) foram recuperados do sobrenadante dos exsudatos de 4 h. Os macrófagos (aderentes) foram recuperados dos exsudatos de 72 h, ou daqueles não estimulados, através de raspagem cuidadosa das placas de Petri, após lavagem com RPMI e eliminação das células não aderentes. Depois de recuperadas, as células foram quantificadas em hemocitômetro e mantidas a 4°C até a realização dos experimentos.

3.7 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO BAÇO

Para coleta de linfócitos, o baço dos camundongos foi cuidadosamente removido da cavidade abdominal e transferido para uma placa de Petri contendo RPMI gelado. As células foram dissociadas do baço por maceração com o auxílio do êmbolo de uma seringa, e posteriormente transferidas para um tubo cônico contendo RPMI. Depois de lavados com meio de cultura, os linfócitos foram submetidos à lise de hemáceas em tampão ACK, lavados novamente, quantificados em hemocitômetro e mantidos a 4°C até a realização dos experimentos.

3.8 CONDICIONAMENTO DE MEIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Macrófagos peritoneais obtidos após estimulação com tioglicolato (1×10^6 /ml) foram cultivados a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, em placas de 24 poços com LPS em diferentes concentrações, por 24 ou 48 h. Após o período de tratamento, o sobrenadante dessas culturas foi coletado e armazenado a -20°C para utilização em experimentos posteriores. A concentração e o tempo de incubação do LPS estão indicados nas legendas das figuras.

3.9 ESTRESSE POR CONFINAMENTO

Camundongos foram colocados sob confinamento em tubos cônicos de 50 ml bem ventilados, dentro dos quais permaneceram por 15 h (18h00 - 09h00). Durante o período de confinamento os animais não tiveram acesso à comida e água. Os animais controle também

foram privados de comida e água pelo mesmo período de tempo. Após o estresse, os camundongos sofreram eutanásia por eterização e tiveram seu sangue e medula óssea coletados para análises posteriores. Alguns grupos experimentais foram tratados com RU486 (500 µg/animal, diluído em metilcelulose 0,5%) antes de serem submetidos ao estresse. O RU486 foi administrado via gavagem oral (500 µl).

3.10 COLETA DE SORO SANGÜÍNEO

Após administração de LPS ou após o estresse por confinamento anteriormente descrito, os animais tiveram amostras de soro coletadas para realização de experimentos *in vitro*. As amostras foram coletadas por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1 ml (agulha de 26 G ½”), transferidas para tubos eppendorf e mantidas a 37°C por 10 min para coagulação. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 20 min a 4°C, e o sobrenadante (soro) foi coletado e armazenado a -20°C.

3.11 TRATAMENTO CELULAR *IN VITRO*

Células da medula óssea, do baço ou do peritônio (1×10^6 /ml) foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio RMPI contendo SFB a 10%, e cultivadas a 37°C (CO₂ 5%) na presença ou não de uma das seguintes citocinas recombinantes: IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, MIF, HMG-1, IL-4, IL-10, IL-13 ou TGF- β 1. Alternativamente, as células foram tratadas com LPS, DEX, PGE₂, anticorpo anti-Fas, com o sobrenadante de culturas de macrófagos, ou com o soro coletado do sangue de animais previamente tratados com LPS ou estressados, como descrito anteriormente. Experimentos de inibição foram feitos incubando-

se as células com anticorpos neutralizantes contra TNF- α , IL-1 β ou TGF- β , ou com o antagonista do receptor de glicocorticóides, RU486. A incubação dos inibidores foi realizada 30 min antes dos demais tratamentos. A concentração das drogas e o tempo de incubação estão indicados nas legendas das figuras.

3.12 CULTURA DE CÉLULAS DISSOCIADAS DO CÓRTEX CEREBRAL

Culturas mistas foram preparadas a partir do córtex de camundongos Suíços em idade embrionária. Para tanto, embriões com 14 dias (E14) foram retirados de fêmeas grávidas previamente mortas por eterização e imediatamente transferidos para uma placa de Petri contendo meio DMEM/F12. O cérebro dos embriões foi removido, e o córtex cuidadosamente dissecado e cortado em pedaços (explantes) de cerca de 1mm². Os explantes foram, então, tratados com tripsina a 0,1% por 10 min a 37°C. A tripsina foi, então, inativada adicionando-se SFB, e os explantes foram mecanicamente dissociados com auxílio de pipetas Pasteur. Após a dissociação, as células foram lavadas e plaqueadas (1x10⁶/ml) em placas de 6 poços contendo DMEM/F12 com SFB 10%. As culturas foram mantidas por 8 dias em estufa a 37°C (CO₂ 5%), tendo metade do volume do seu meio trocado no quarto dia. No oitavo dia o meio foi novamente trocado e as células foram tratadas com DEX por mais 24 h. Após esse período, as células foram soltas da placa através de jatos de meio de cultura, com auxílio de uma micropipeta, lavadas e processadas para citometria de fluxo. As concentrações de DEX estão indicadas nas legendas das figuras.

3.13 CITOMETRIA DE FLUXO

As análises citofluorimétricas foram realizadas em um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Amostras de células (1×10^6) foram lavadas com tampão (BSA 1% e azida sódica 0,01% em PBS) e incubadas com uma solução saturante do anticorpo anti-CD16/32 ($1 \mu\text{g}/10^6$ células) diluído em soro normal de rato a 10%, a fim de bloquear os receptores de Fc livres. Os anticorpos marcadores conjugados com fluorocromos, bem como o soro anti-PrP^C, foram adicionados em concentrações pré-determinadas por 30 min a 4°C. A revelação do anti-PrP^C foi feita com um anticorpo secundário anti-camundongo (Fab')₂ conjugado a ficoeritrina. Para excluir das análises as células não viáveis, foi adicionado iodado de propídeo ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 15 min antes da aquisição. Foram registrados pelo menos 10.000 eventos com o auxílio do programa CellQuest (BD Biosciences, EUA). Para análises posteriores, o programa Summit MoFlo (Cytomation, EUA) foi utilizado. As análises de expressão de PrP^C foram realizadas nas populações celulares positivas para Gr-1, uma proteína abundante na superfície de neutrófilos (LAGASSE & WEISSMAN, 1996), com exceção das análises de macrófagos e linfócitos T, que foram feitas nas populações positivas para os antígenos celulares específicos F4/80 e CD3, respectivamente. Os gráficos de expressão de PrP^C foram feitos com base na intensidade de fluorescência, que foi determinada dividindo-se a mediana da intensidade das células marcadas com o soro anti-PrP^C pela mediana das células tratadas com soro de animais não imunizados (SNI). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

3.14 WESTERN BLOT

Análises de *western blot* foram realizadas com amostras coletadas de diferentes tecidos (medula óssea, cérebro, baço e timo). As amostras foram coletadas e mantidas em PBS gelado até a preparação dos extratos protéicos. Os extratos foram preparados homogeneizando-se as amostras em tampão de extração (Tris HCL 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Nonidete P40 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, EDTA 1 mM) contendo um coquetel de inibidores de proteases (PMSF 1 mM e aprotinina, leupeptina e pepstatina a 4 µg/ml cada). Após 15 min, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min (4°C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. A concentração de proteína de cada extrato foi estimada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951).

As proteínas foram resolvidas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com tampão de bloqueio contendo leite desnatado a 5% em TBS-T (Tris-HCl 40 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, Tween 20 0,1%) por 1 h a temperatura ambiente; marcadas com anticorpos primários contra PrP (soro anti-PrP^C ou SAF32) por 8 h a 4°C; lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário apropriado conjugado a peroxidase por mais 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas para remover os anticorpos não ligados e os níveis de proteína foram detectados com o kit de quimioluminescência ECL Plus (Amersham Biosciences, RU) de acordo com as instruções do fabricante. O controle de carregamento foi feito com anticorpos contra ERK2, revelados com anticorpos secundários adequados e com o kit ECL Plus, conforme descrito anteriormente. A análise densitométrica das bandas foi realizada com auxílio do programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH, EUA).

3.15 IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS A ELEMENTOS DE RESPOSTA A GC OU TGF- β NO *PRNP* MURINO

A busca de possíveis candidatos a elementos de resposta a GCs ou TGF- β no gene da proteína príon de camundongos foi feita inserindo-se a seqüência completa do *Prnp* murino, obtida no banco de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (U29186, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), em bancos de dados de sítios de ligação de receptores de hormônios nucleares (NHR Scan - http://www.cisreg.ca/cgi-bin/NHR-scan/nhr_scan.cgi) e sítios de ligação de fatores de transcrição (GeneACT - <http://promoter.colorado.edu/geneact>).

3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e analisados pelos testes ANOVA, com pós-teste Dunnett (Fig 6B, 8A, 9A, 10B, 10C, 11C, 11D, 12C, 13B, 14B, 15B, 16B, 16C) ou Bonferroni (Fig 9B, 11A, 13C, 14C, 16D, 18A, 18B, 19B, 19C), ou *t-Student* não pareado (Fig 11B, 12A, 12B), utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA). Valores de *P* inferiores a 0,01 foram considerados significativos. O asterisco (*) significa diferença estatística entre os grupos assinalados e os seus respectivos controles (sem tratamento). O significado da cerquilha (#), o número de animais utilizados em cada experimento (*n*), e o número de experimentos realizados, estão indicados nas legendas das figuras.

4 RESULTADOS

4.1 LPS INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP^C EM NEUTRÓFILOS

A fim de analisar o papel da PrP^C na inflamação, tomamos como modelo a endotoxemia induzida por LPS. Para tanto, camundongos C57/BL6 receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de LPS em diferentes concentrações. Após 24 h, os animais foram submetidos à eutanásia e as células da medula óssea isoladas para análise por citofluorimetria. Como resultado, verificamos que o tratamento com LPS induziu um aumento no conteúdo de PrP^C na superfície de células GR-1⁺ (em sua maioria neutrófilos) de maneira dose-dependente (Fig 7). Nos animais controle, não tratados com LPS, observamos um conteúdo basal de PrP^C em cerca de 25% da população de neutrófilos, ao passo que após o tratamento com LPS esse percentual sobe gradativamente, ultrapassando 80% nas doses mais altas (Fig 7A). Não apenas o percentual de células marcadas, mas também a quantidade de PrP^C na superfície celular, representada pela intensidade de fluorescência, foram significativamente aumentadas após administração do LPS (Fig 7B). Para os experimentos seguintes, o LPS foi utilizado na dose mínima que resultou em aumento significativo da PrP^C (50 µg/animal).

Para verificar se o LPS estava agindo aumentando de fato o conteúdo de PrP^C, ou se o efeito consistia apenas de um aumento no tráfego e na exposição da proteína na superfície celular, realizamos experimentos de *western blot* com extratos obtidos de células Gr-1⁺ purificadas da medula óssea, antes e após o tratamento dos animais com LPS. Como controle de marcação, utilizamos extratos totais de córtex cerebral. O tratamento com LPS levou a um aumento de quase três vezes no conteúdo de PrP^C em neutrófilos, mas não no tecido nervoso (Fig 7C).

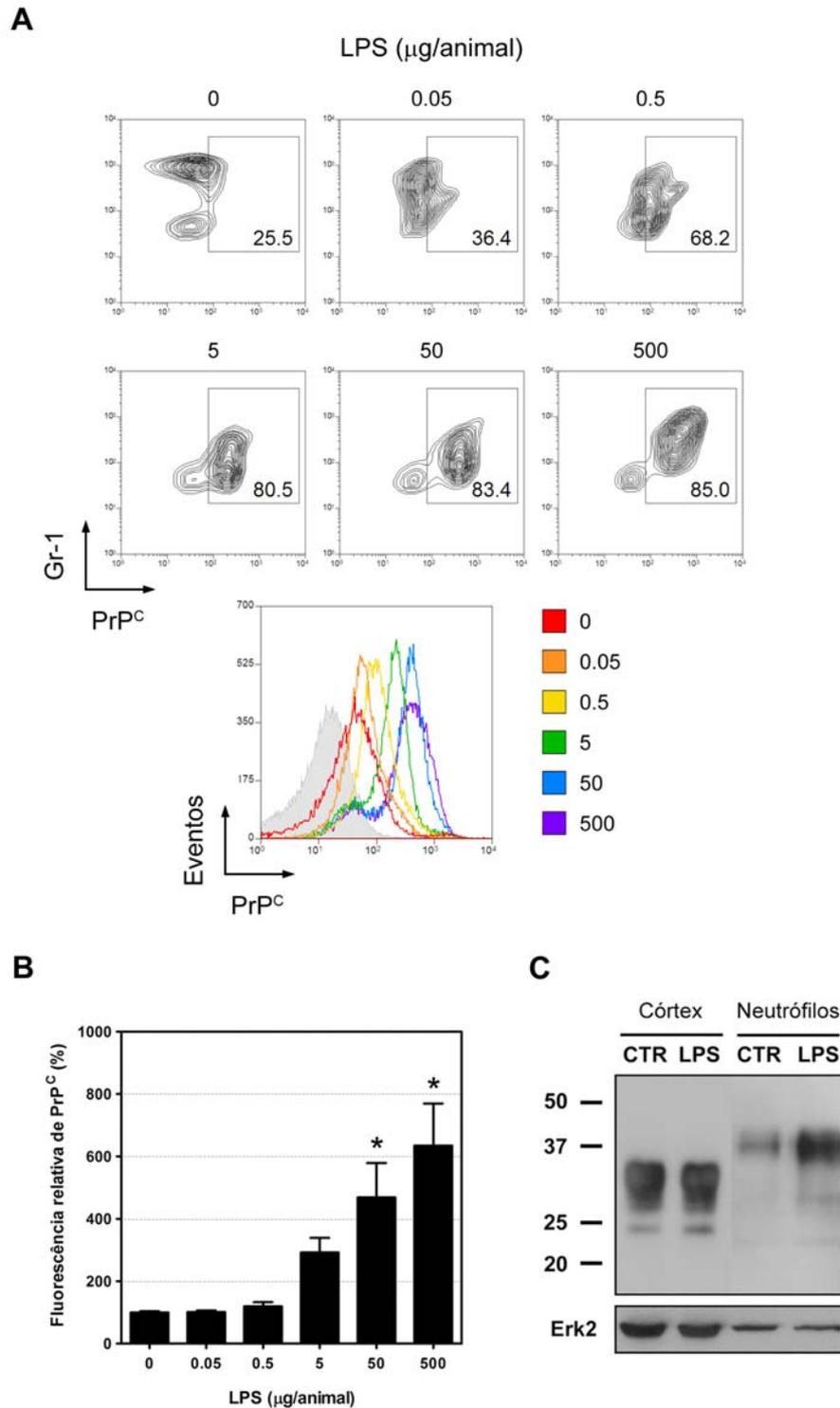


Figura 7. Efeito do LPS in vivo na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A e B) Camundongos C57/BL6 receberam injeções i.p. com LPS em diferentes concentrações, e 24 h depois as células da medula óssea foram coletadas e analisadas por citofluorimetria quanto ao percentual de células PrP^C positivas (A) e quanto à intensidade de fluorescência relativa de PrP^C (B). Dados representativos de dois experimentos independentes ($n = 3$). (C) O resultado foi confirmado por *western blot* com neutrófilos (células Gr-1⁺) purificados de animais tratados com LPS por 24 h (50 μg).

Com base nesse resultado, foram propostas duas hipóteses para tentar explicar de que forma o LPS regula a expressão da PrP^C em neutrófilos: (1) de maneira direta, independente de outros componentes celulares e/ou moleculares, sinalizando via receptores TLRs presentes nos próprios neutrófilos e, desta forma, induzindo aumento na expressão da PrP^C ou (2) de maneira indireta, induzindo a liberação de fatores como, por exemplo, citocinas, por algum outro componente celular. Esses fatores, por sua vez, atuariam nos neutrófilos regulando a expressão da proteína. Para elucidar essa questão, procedemos ao tratamento *in vitro* das células da medula (24 h) com LPS em diferentes concentrações ou com o soro obtido de animais previamente tratados com LPS por diferentes intervalos de tempo (Fig 8). Análises por citofluorimetria mostraram que o tratamento *in vitro* com LPS sozinho não levou a um aumento significativo da PrP^C em neutrófilos, ao passo que o tratamento das células com o soro dos animais pré-tratados com LPS (a partir daqui referido apenas como soro LPS) induziu um aumento do conteúdo de PrP^C em até oito vezes, quando comparado com células não tratadas ou tratadas com o soro obtido de animais não estimulados com LPS (soro CTR) (Fig 8A). Resultados semelhantes foram observados por *western blot* (Fig 8B), sugerindo um efeito indireto do LPS na regulação da proteína príon em neutrófilos. Uma vez que o soro obtido de animais tratados com LPS por 12 h (soro LPS 12 h) induziu um aumento máximo na expressão da PrP^C, esse soro foi escolhido para utilização nos experimentos posteriores.

4.2 TNF- α INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP^C EM NEUTRÓFILOS

Uma vez que o LPS atua na regulação da PrP^C em neutrófilos de maneira indireta, outros fatores devem estar sendo liberados por diferentes componentes celulares do sistema imune e modulando a expressão da PrP^C. Uma das principais células-alvo do LPS são os

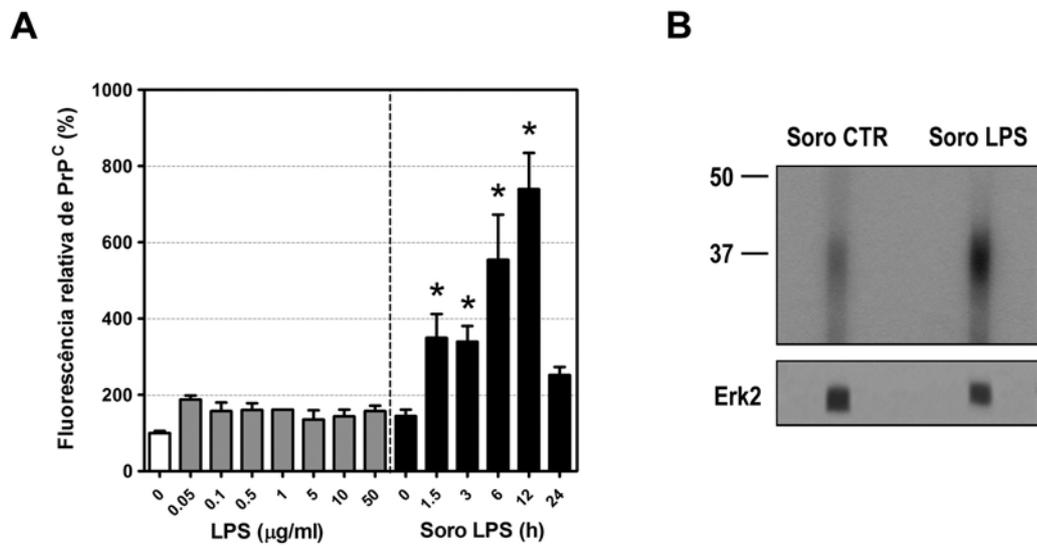


Figura 8. Efeito do LPS e do soro LPS na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A) Células totais da medula óssea foram tratadas por 24 h com LPS em diferentes concentrações, ou com soro (10%) obtido de animais previamente estimulados com LPS por diferentes intervalos de tempo, e em seguida analisadas por citofluorimetria. Dados representativos de um (LPS) ou dois (Soro LPS) experimentos independentes ($n = 2$). (B) O resultado foi confirmado por *western blot* tratando-se células de medula óssea total com soro LPS 12 h.

macrófagos. O LPS se liga a receptores TLR4 presentes na superfície dos macrófagos e induzem a transcrição e a secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias (VASSELON & DETMERS, 2002). Sendo assim, analisamos a possível participação de moléculas produzidas por macrófagos estimulados com LPS na regulação da proteína príon.

Células de medula óssea foram tratadas *in vitro* com meios condicionados (MCs) por macrófagos peritoneais tratados com LPS (Fig 9). O tratamento das células com os MCs levou a um aumento significativo na expressão de PrP^C por neutrófilos (Fig 9A), sugerindo a participação de citocinas liberadas por macrófagos, no mecanismo de regulação da proteína. Duas citocinas abundantes em MCs por macrófagos tratados com LPS são a IL-1 β e o TNF- α (AGELAKI *et al.*, 2002). A fim de verificar a participação dessas citocinas na regulação da PrP^C, células de medula óssea foram tratadas por 30 min com anticorpos neutralizantes para IL-1 β ou TNF- α , e então incubadas com os MCs por 24 h (Fig 9B). O tratamento prévio das células com anti-TNF- α , mas não com anti-IL-1 β , levou a uma inibição parcial do efeito do MC, sugerindo que o TNF- α participa da regulação da PrP^C em neutrófilos. Uma vez que a inibição provocada pelo anti-TNF- α foi apenas parcial, não descartamos a participação de outras citocinas, como a IL-6, no processo. Por outro lado, é possível que a concentração de anticorpo neutralizante utilizada tenha sido insuficiente para inibir completamente o efeito do MC. Sendo assim, resolvemos analisar o papel individual de várias citocinas recombinantes na indução da expressão de PrP^C em neutrófilos.

Células isoladas de medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com uma das seguintes citocinas recombinantes, com funções predominantemente pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, MIF e HMG-1 (Fig 10). O tratamento com TNF- α , mas não com as demais citocinas testadas, induziu aumento no número de células positivas para PrP^C (Fig 10A) e na quantidade de PrP^C na superfície das células (Fig 10B), fazendo-o de maneira dose-dependente (Fig 10C).

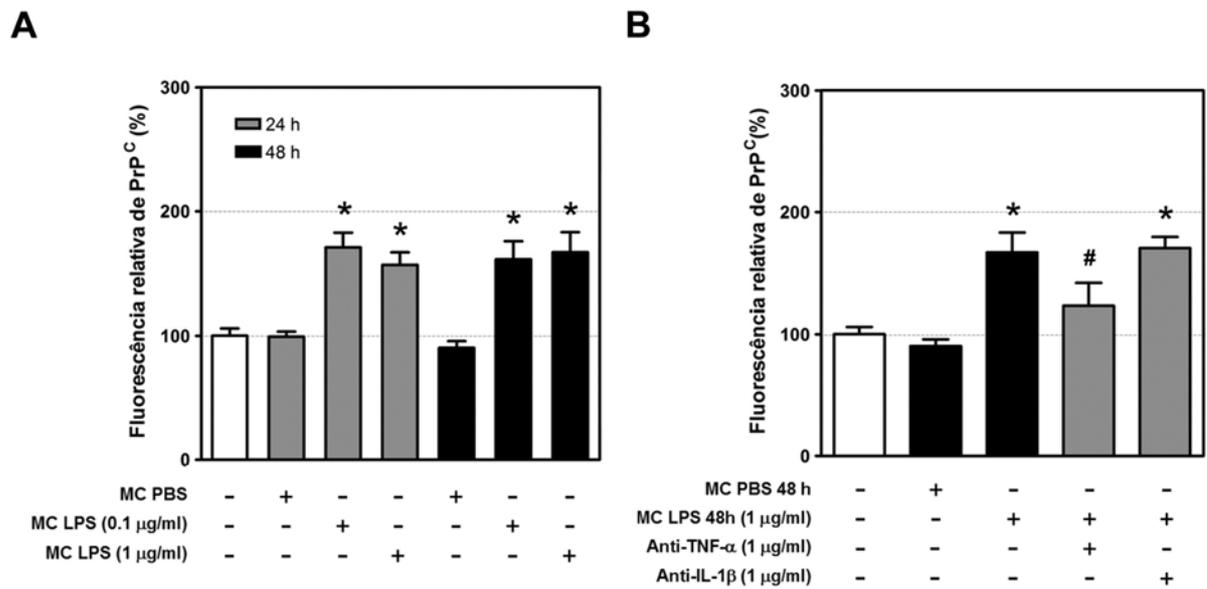


Figura 9. Efeito do meio condicionado de macrófagos na expressão de PrP^C em neutrófilos. (A) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com MC de macrófagos estimulados com LPS a 0.1 ou 1 μg/ml, por 24 ou 48 h, e em seguida analisadas por citofluorimetria. (B) Efeito de anticorpos neutralizantes contra TNF-α ou IL-1β na expressão de PrP^C em neutrófilos induzida por MC de macrófagos. # Significa diferença estatística entre o grupo tratado com anti-TNF-α + MC LPS e o grupo tratado apenas com MC LPS. Dados representativos de um (B) ou dois (A) experimentos independentes ($n = 3$).

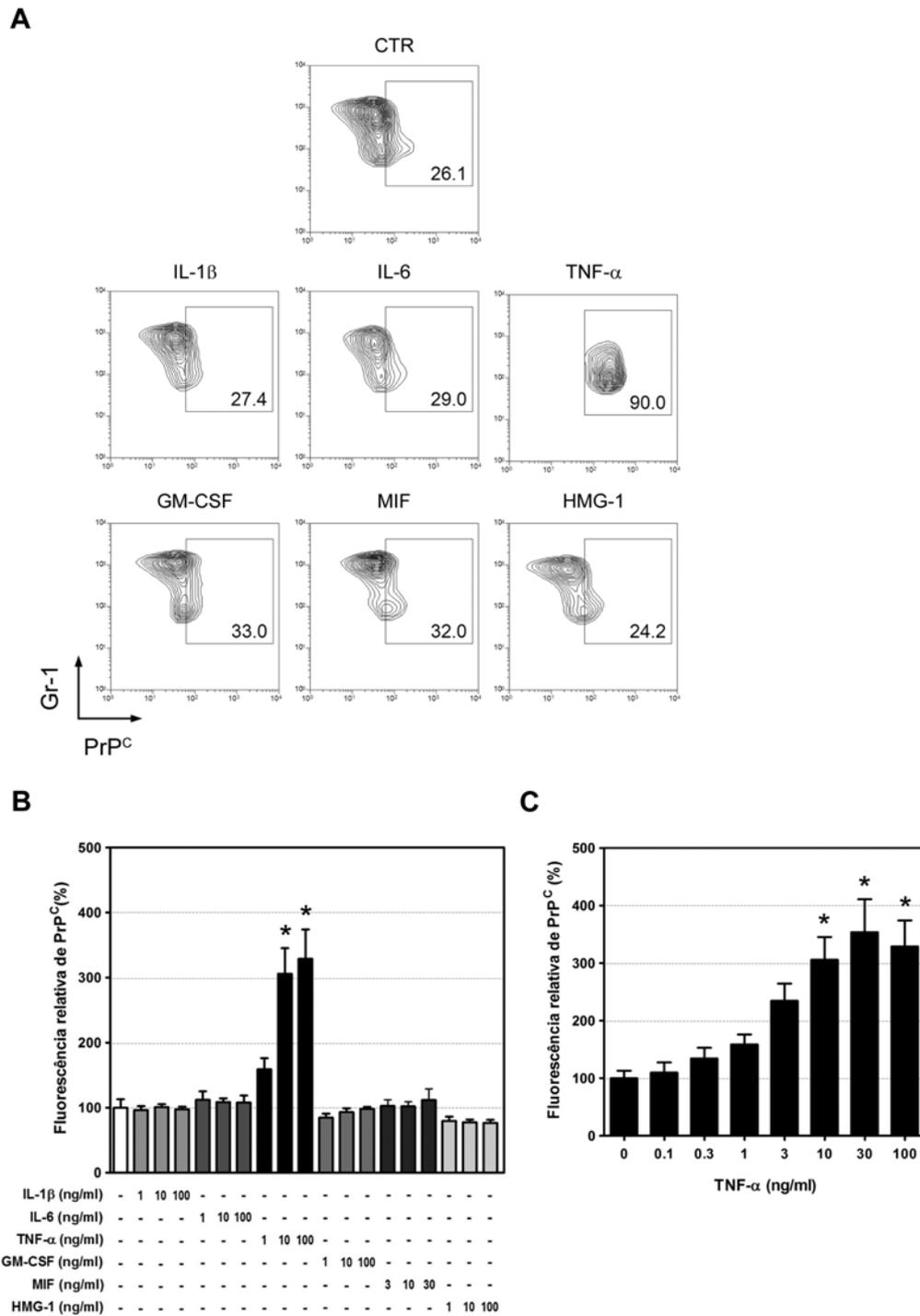


Figura 10. Efeito de citocinas pró-inflamatórias na modulação da expressão de PrP^C em neutrófilos. (A e B) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com uma das citocinas indicadas, em diferentes concentrações, e em seguida analisadas por citofluorimetria quanto ao percentual de células PrP^C positivas (A) e quanto à intensidade de fluorescência relativa de PrP^C (B). (C) Curva dose-efeito do TNF- α na regulação da PrP^C em neutrófilos (tratamento *in vitro* por 24 h com TNF- α em diferentes concentrações). Os citofluorogramas apresentados em (A) são representativos da dose intermediária (10 ng/ml) das citocinas. Dados representativos de dois (A e B, $n = 3$) ou três (C, $n = 2$) experimentos independentes.

4.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP^C INDUZIDA POR LPS É INDEPENDENTE DE TNF- α

Os resultados demonstrados anteriormente apontam para o TNF- α como um potencial candidato a participar diretamente da regulação da PrP^C no modelo *in vivo* de inflamação induzida por LPS. Para testar essa hipótese, células de medula óssea foram tratadas *in vitro* por 30 min com o anticorpo neutralizante para TNF- α e posteriormente cultivadas na presença do soro LPS 12 h em diferentes concentrações (Fig 11A). Para nossa surpresa, o anti-TNF- α não inibiu o efeito do soro LPS. Nesse experimento, o anti-TNF- α foi utilizado a 10 μ g/ml, concentração dez vezes maior do que aquela utilizada para inibir o efeito dos MCs. Para confirmar esses resultados e eliminar por completo a participação do TNF- α na regulação da PrP^C induzida pelo LPS, recorreremos a análise de camundongos nulos para o receptor TNFR-p55 (TNFR1^{-/-}), principal receptor utilizado nas vias de sinalização pró-inflamatórias induzidas pelo TNF- α (KÄGI *et al.*, 1999).

Camundongos TNFR1^{-/-} receberam uma injeção i.p. de LPS (50 μ g/animal). Depois de 24 h as células da medula óssea foram coletadas e analisadas por citofluorimetria (Fig 11B). De maneira semelhante ao que acontece com camundongos selvagens (Fig 7), o LPS induz aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos de animais TNFR1^{-/-}. Além disso, o soro LPS produzido em animais selvagens, mas não o TNF- α recombinante, também induz aumento de PrP^C nos neutrófilos dos animais TNFR1^{-/-} (Fig 11C), demonstrando que não é o TNF- α o fator presente no soro LPS responsável pela indução de PrP^C. Finalmente, o soro dos animais TNFR1^{-/-} previamente tratados com LPS também induz aumento no conteúdo de PrP^C em neutrófilos de animais selvagens (Fig 11D) indicando que, além da via de sinalização do TNF não ser necessária para a regulação da PrP^C, a produção do fator que está induzindo essa regulação também não o é.

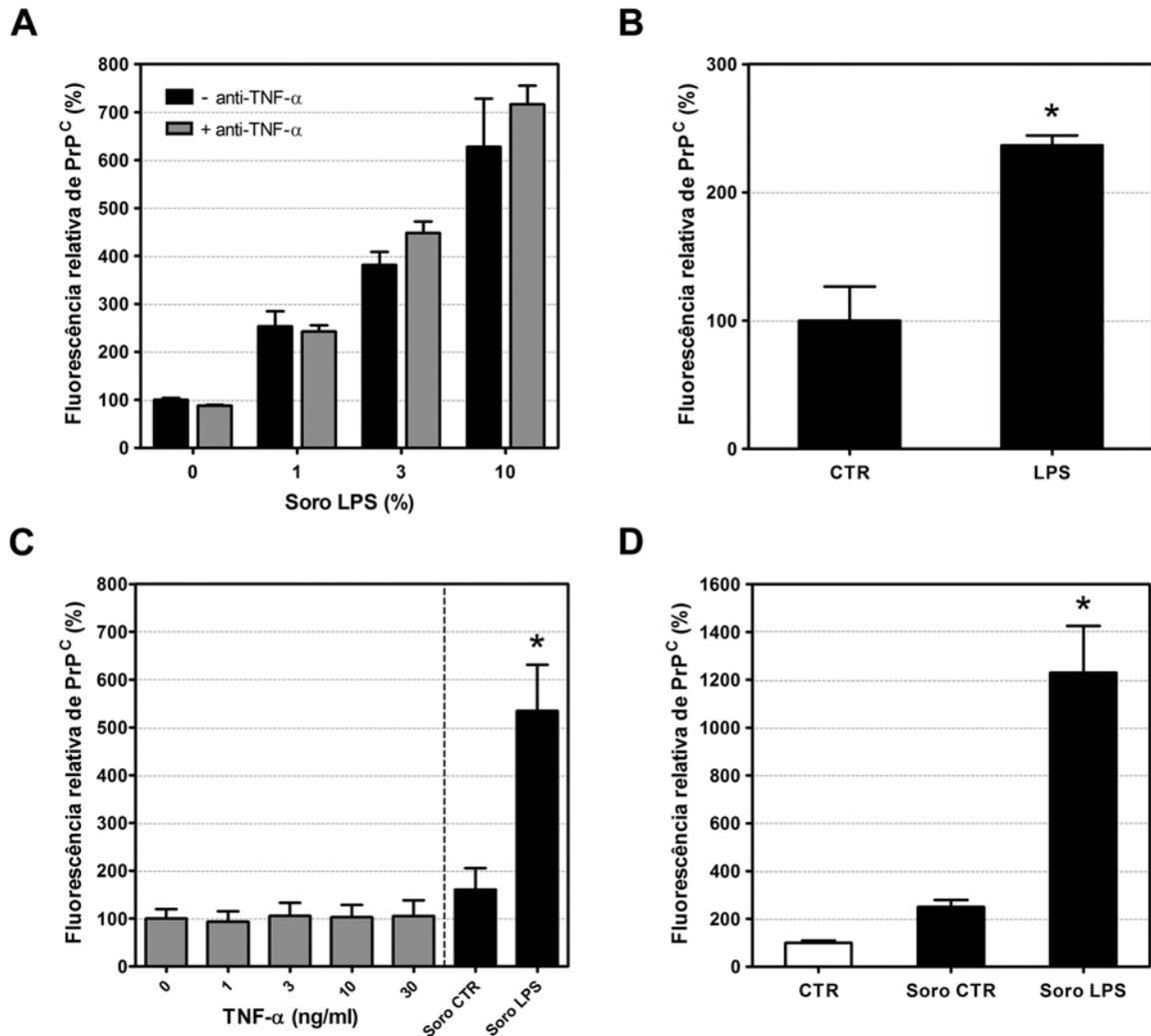


Figura 11. Papel do TNF- α na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com soro LPS 12 h em diferentes concentrações, na presença ou não do anticorpo anti-TNF- α (10 μ g/ml), e em seguida analisadas por citofluorimetria. (B) Camundongos TNFR1^{-/-} receberam injeções i.p. com LPS (50 μ g/animal) e 24 h depois tiveram suas células da medula óssea coletadas e analisadas. (C) Células da medula óssea obtidas de animais TNFR1^{-/-} foram tratadas *in vitro* por 24 h com TNF- α recombinante ou com soro obtido de animais C57/BL6, e analisadas. (D) Células da medula óssea de animais C57/BL6 foram cultivadas por 24 h na presença de soro obtido de animais TNFR1^{-/-}, e analisadas por citofluorimetria. Dados representativos de um (A, $n = 2$; B e C, $n = 3$) ou dois (D, $n = 3$) experimentos independentes.

4.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP^C INDUZIDA POR LPS É INDEPENDENTE DE FAS/FASL

Os mecanismos de sinalização do TNF- α no processo inflamatório são compartilhados por uma via de sinalização induzida pela interação do receptor Fas/Apo1 (CD95) com seu ligante FasL. O Fas é um receptor da mesma família de receptores do TNF, e está funcionalmente relacionado ao TNFR1 (WALLACH *et al.*, 1999). Fukui e colaboradores demonstraram que o LPS induz aumento na expressão de Fas em macrófagos, tornando-os mais suscetíveis ao FasL e fazendo com que eles produzam mais IL-1 β , indicando que esse aumento parece estar relacionado a eventos pró-inflamatórios (FUKUI *et al.*, 2003). Sendo assim, decidimos avaliar um possível papel da via de sinalização Fas/FasL na regulação da PrP^C induzida pelo LPS.

Inicialmente analisamos o papel do Fas na regulação da proteína príon independentemente do LPS. Para tanto, células isoladas de medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com um anticorpo contra Fas que age mimetizando os efeitos do FasL e induzindo apoptose (Fig 12A). O tratamento com anti-Fas não teve qualquer efeito na expressão basal de PrP^C por neutrófilos. Posteriormente analisamos o efeito *in vivo* do LPS na regulação da PrP^C em neutrófilos de animais com doença linfoproliferativa generalizada (BALB/c.gld), deficientes em FasL. O tratamento desses animais com LPS levou a um aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos de maneira semelhante ao observado em animais BALB/c selvagens (Fig 12B). Além disso, o soro dos animais BALB/c.gld previamente tratados com LPS também induziu aumento na PrP^C de neutrófilos de animais C57/BL6 selvagens (Fig 12C) indicando que, da mesma maneira que a via do TNF, a via do Fas/FasL parece não ser necessária para a modulação da PrP^C, e que a produção do fator que induz essa modulação também independe dessa via.

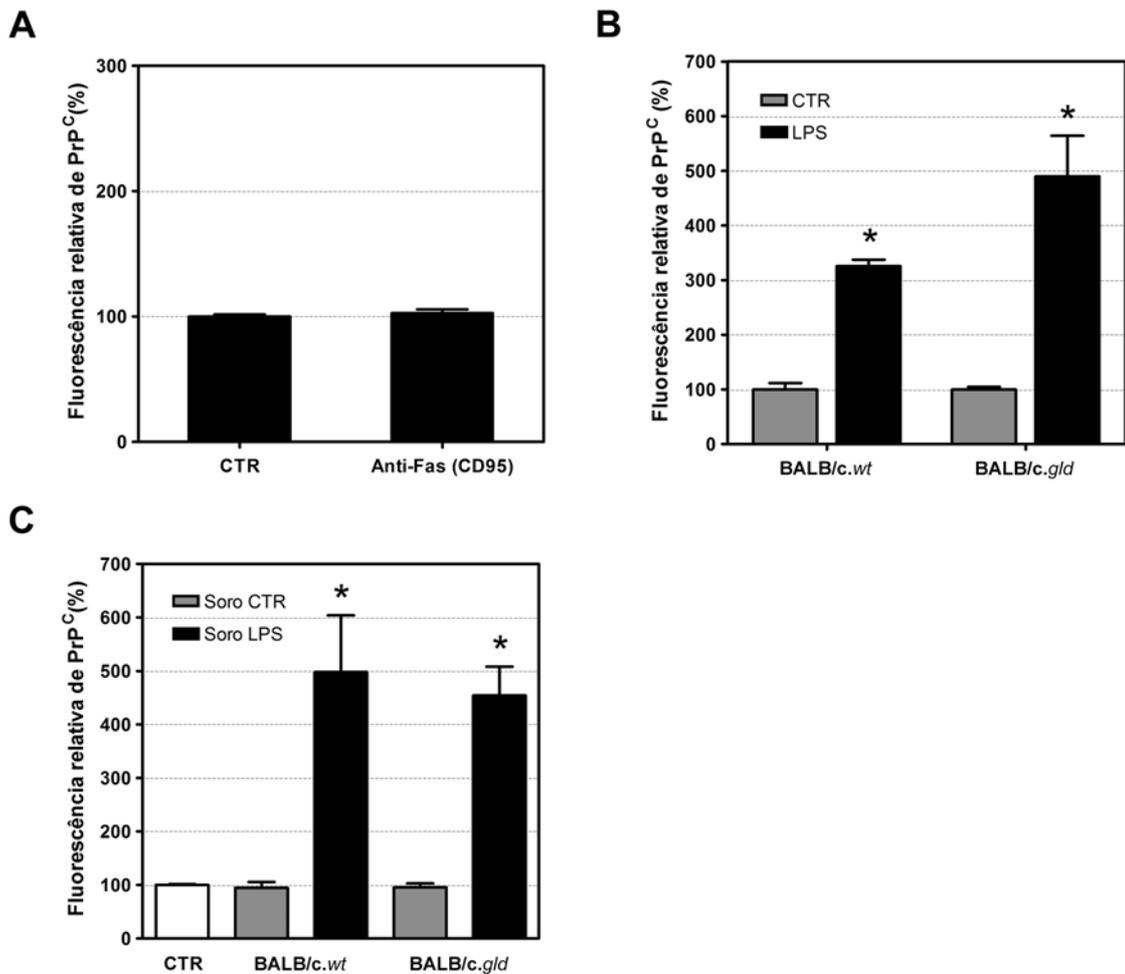


Figura 12. Papel da via de sinalização do Fas/FasL na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com anticorpo anti-Fas (10µg/ml), e em seguida analisadas por citofluorimetria. (B) Camundongos BALB/c.wt e BALB/c.gld receberam injeções i.p. com LPS (50µg/animal) e 24 h depois tiveram suas células coletadas da medula óssea e analisadas por citofluorimetria. (C) Células de medula óssea de animais C57/BL6 foram cultivadas por 24 h na presença do soro obtido de camundongos BALB/c.wt ou BALB/c.gld previamente tratados com LPS (50µg/animal, 24 h). Dados representativos de um (B, n = 3) ou dois (A, n = 2; C, n = 3) experimentos independentes.

4.5 TGF- β INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP^C EM NEUTRÓFILOS

O mecanismo de inflamação é caracterizado não apenas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas por uma interação complexa de mediadores pró- e antiinflamatórios (MARIE *et al.*, 1996). Como demonstrado anteriormente, a regulação da PrP^C que acontece na inflamação induzida pelo LPS independe da participação das principais citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, resolvemos testar o possível papel de mediadores antiinflamatórios na modulação da proteína príon.

Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com algumas das principais citocinas com papéis principalmente antiinflamatórios: IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (Fig 13). O tratamento com TGF- β , mas não com as demais citocinas, levou a um aumento significativo e dose-dependente no percentual de células positivas para PrP^C (Fig 13A) e na quantidade da proteína na superfície de neutrófilos (Fig 13B). Esse efeito foi completamente inibido pela incubação prévia das células com anticorpo neutralizante anti-TGF- β (Fig 13C).

4.6 DEX INDUZ AUMENTO NA EXPRESSÃO DE PrP^C EM NEUTRÓFILOS

A inflamação causada por LPS induz não apenas a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias, mas também a produção de outros mediadores igualmente importantes para a resolução da inflamação. Dentre esses, alguns hormônios desempenham papel crucial. O tratamento com LPS leva a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e a conseqüente liberação de GCs, que por sua vez irão atuar inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a síntese de citocinas antiinflamatórias (revisado por BEISHUIZEN & THIJIS, 2003). Por outro lado, a prostaglandina E₂ (PGE₂) é sintetizada em

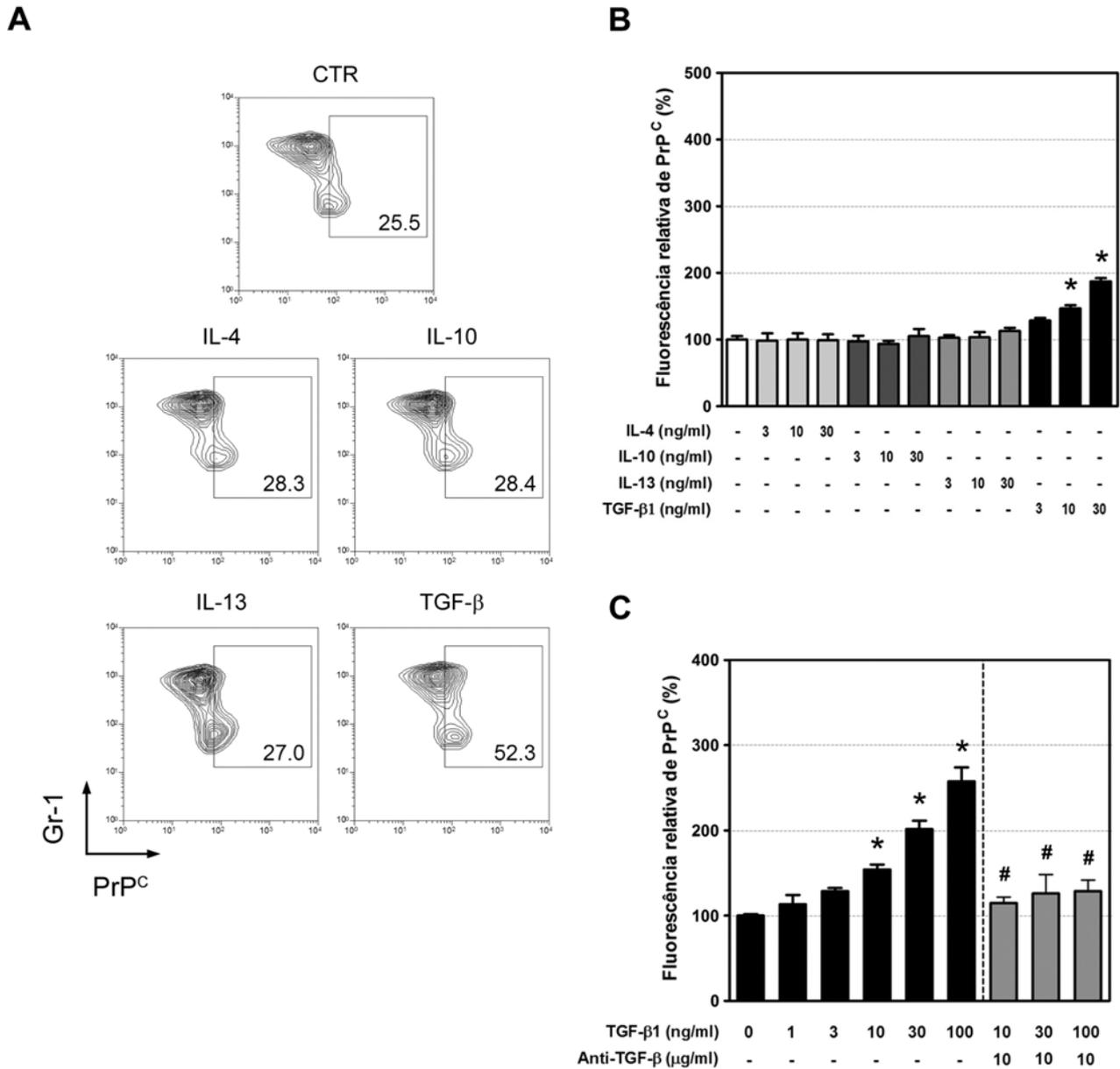


Figura 13. Efeito de citocinas antiinflamatórias na modulação de PrP^C em neutrófilos. (A e B) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com uma das citocinas indicadas, em diferentes concentrações, e em seguida analisadas por citofluorimetria quanto a quantidade de células positivas para PrP^C (A) e quanto a expressão da proteína por essas células (B). (C) Curva dose-efeito do TGF-β na regulação da PrP^C em neutrófilos (tratamento *in vitro* por 24 h com TGF-β em diferentes concentrações). Os citofluorogramas apresentados em (A) são representativos da dose intermediária (10 ng/ml) das citocinas. # Representa diferença estatística entre os grupos tratados com TGF-β1, com ou sem o anticorpo neutralizante anti-TGF-β. Dados representativos de dois experimentos independentes ($n = 3$).

grandes quantidades nos sítios de inflamação, onde age como um potente vasodilatador e, em sinergismo com outros mediadores, como a histamina, leva ao aumento da permeabilidade vascular e a formação de edemas (DAVIES *et al.*, 1984). Além disso, a PGE₂ é o mediador central da febre que acompanha o processo inflamatório induzido por LPS (DINARELLO *et al.*, 1999). Assim sendo, decidimos analisar a participação hormonal na modulação da expressão de PrP^C em neutrófilos.

Culturas de células de medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com DEX ou PGE₂ em diferentes concentrações (Fig 14). A tratamento com DEX levou a um aumento significativo no percentual de células positivas para PrP^C (Fig 14A) e na quantidade de PrP^C na superfície dos neutrófilos (Fig 14B). O efeito da DEX foi completamente inibido com o tratamento prévio das células com RU486 (Fig 14C), um antagonista do receptor para glicocorticóides. Para verificar a dependência de outros componentes celulares no processo, neutrófilos foram purificados da medula óssea (NP) e tratados *in vitro* com DEX ou com soro LPS 12 h (Fig 15A). Como podemos observar, o tratamento de NP com DEX ou com o soro LPS continua induzindo aumento na expressão de PrP^C, apesar de ser necessária uma dose dez vezes maior, no caso da DEX, para se obter o mesmo efeito observado com células totais de medula óssea (MT). O tratamento de células dissociadas de córtex cerebral com DEX não teve qualquer efeito na expressão basal de PrP^C por essas células (Fig 15B).

A fim de analisarmos o efeito da DEX *in vivo*, camundongos C57/BL6 receberam injeções i.p. com diferentes concentrações da droga (Fig 16). O tratamento dos animais com DEX levou a um aumento dose- (Fig 16A, 16B) e tempo-dependente (Fig 16C) no conteúdo da PrP^C em neutrófilos. O resultado foi confirmado por *western blot*, demonstrando que não apenas a medula óssea, mas também o timo, apresentou uma maior expressão de PrP^C após o tratamento, o que não aconteceu com o baço e o cérebro (Fig 16D).

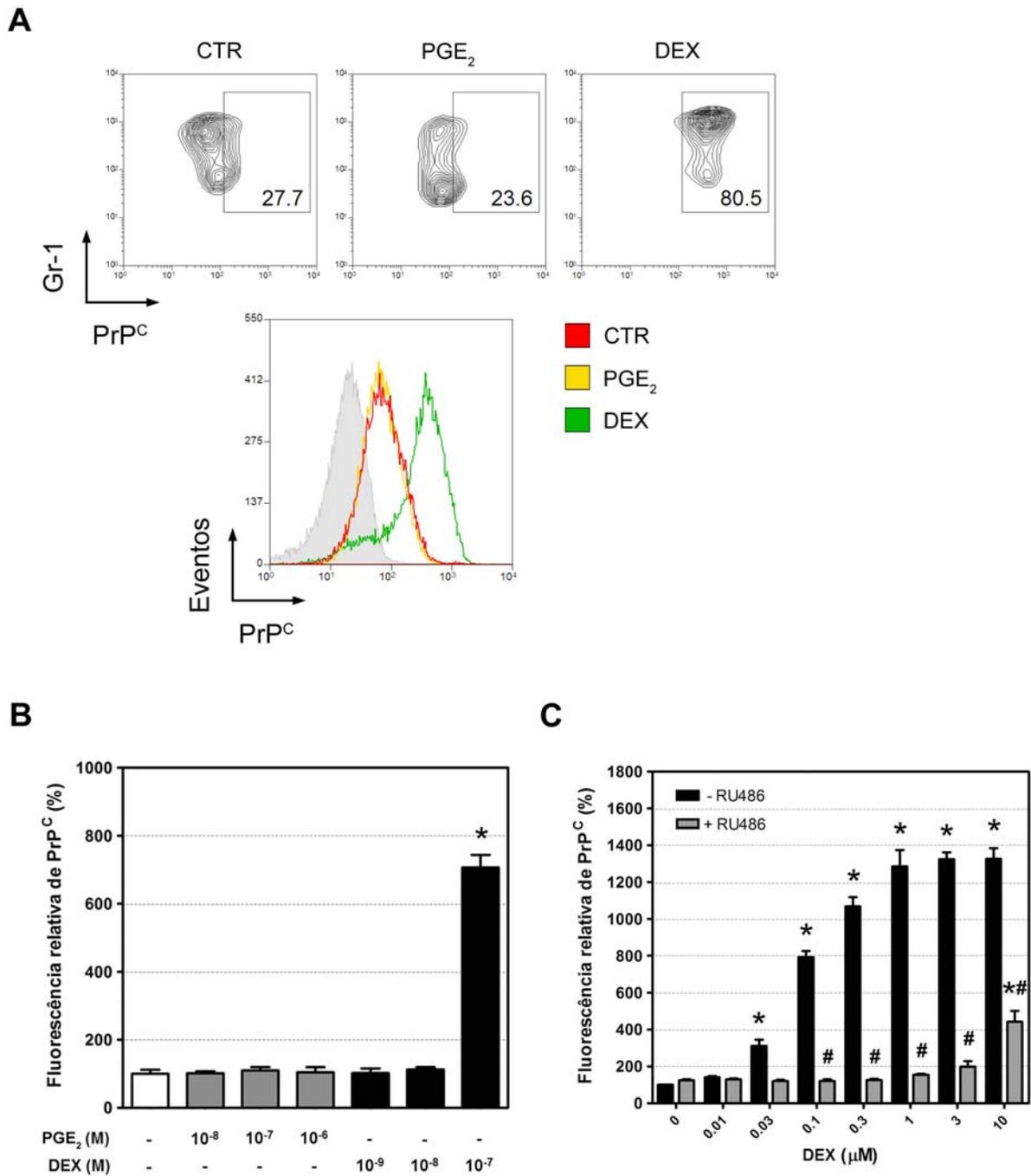


Figura 14. Efeito de PGE₂ e DEX na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A e B) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com PGE₂ ou DEX em diferentes concentrações, e em seguida analisadas por citofluorimetria. (C) Curva dose-efeito da DEX (tratamento *in vitro* por 24 h com DEX em diferentes concentrações) na regulação da expressão de PrP^C em neutrófilos pré-tratados por 30 min com RU486 (2 μM). Os citofluorogramas apresentados em (A) são representativos da dose de 10⁻⁷ M de PGE₂ e DEX. # Significa diferença estatística entre os grupos tratados com DEX, na presença ou não do RU486. Dados representativos de um (A e B, n = 3) ou dois (C, n = 2) experimentos independentes.

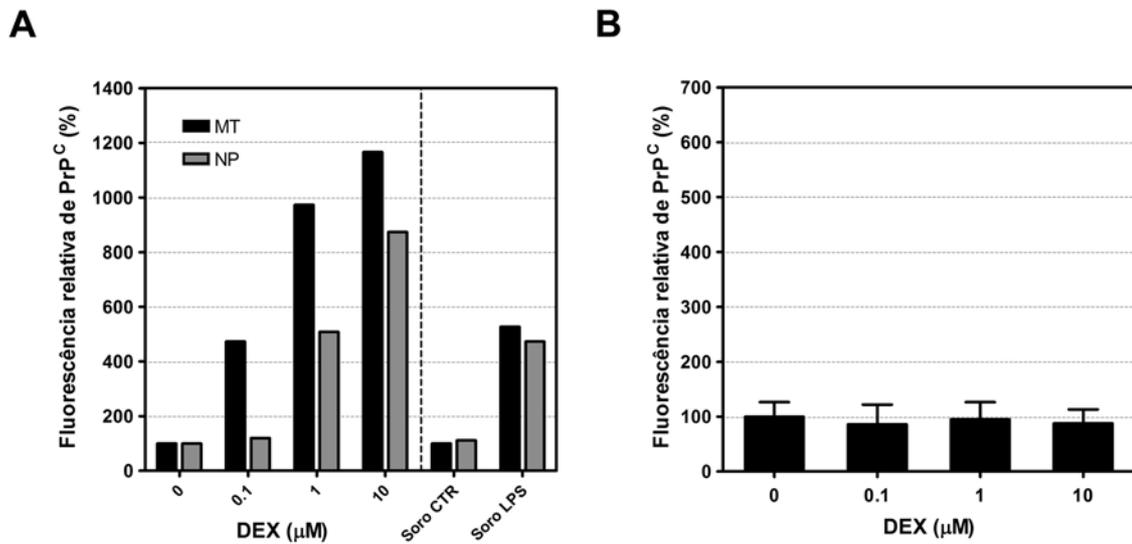


Figura 15. Efeito da DEX na regulação da PrP^C em neutrófilos purificados da medula e em células corticais. (A) Células totais de medula óssea (MT) ou neutrófilos purificados (NP) foram tratados *in vitro* por 24 h com DEX em diferentes concentrações ou com soro CTR ou LPS (10%), e em seguida analisadas por citofluorimetria. (B) Culturas de células dissociadas do córtex de camundongos E14 foram tratadas *in vitro* com DEX em diferentes concentrações e posteriormente analisadas por citofluorimetria. Dados representativos de dois experimentos independentes (B, $n = 1$).

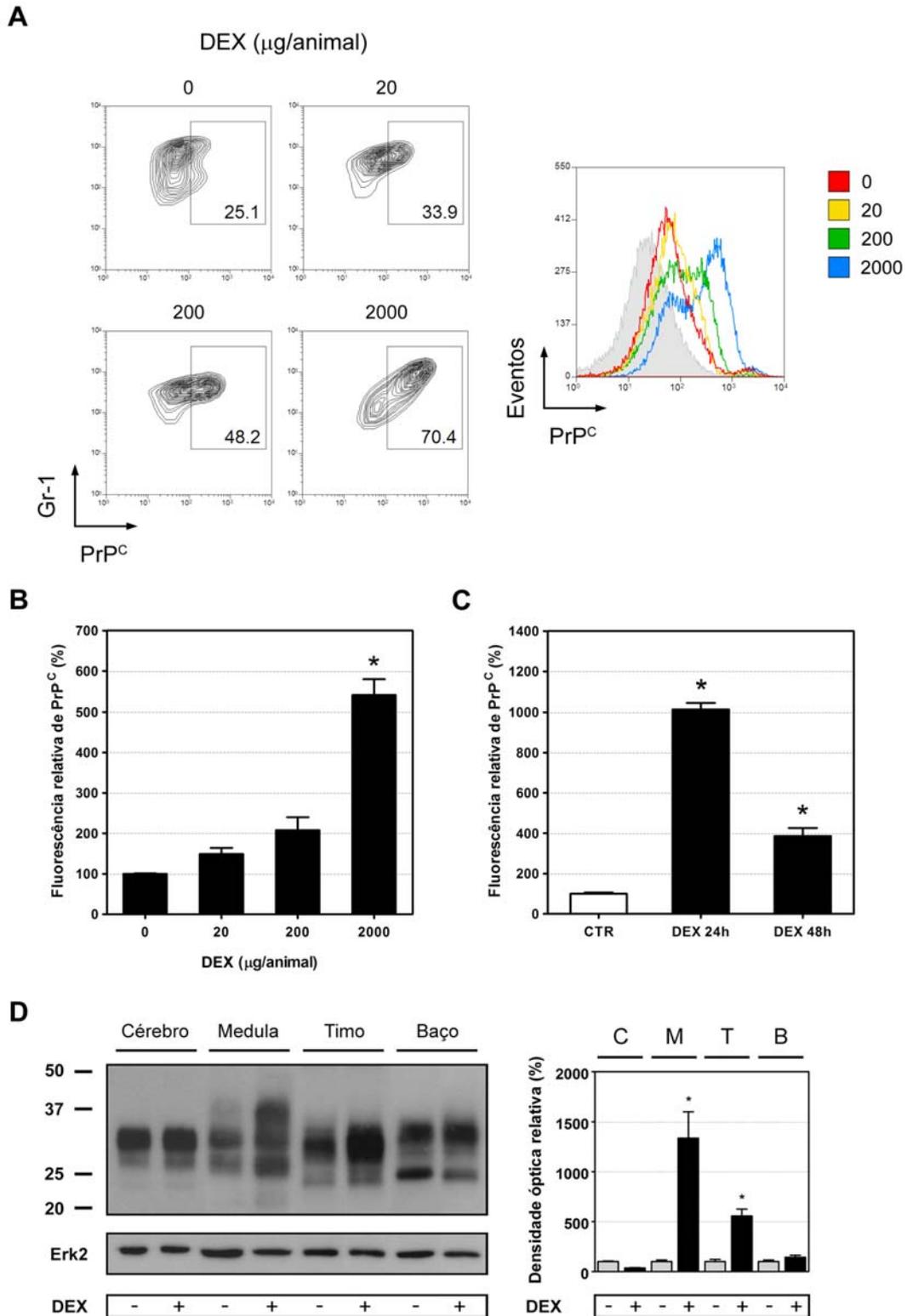


Figura 16. Efeito da DEX in vivo na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A, B e C) Camundongos C57/BL6 receberam injeções i.p. com DEX em diferentes concentrações, e 24 h (A e B) ou 48 h (C, DEX 2 mg) depois tiveram suas células coletadas da medula óssea e analisadas. (D) *Western blot* de diferentes tecidos obtidos de animais previamente tratados com DEX por 24 h (2 mg). C, cérebro; M, medula óssea; T, timo; B, baço. Dados representativos de um experimento (A, B e C, $n = 3$; D, $n = 4$).

4.7 REGULAÇÃO DA PrP^C INDUZIDA POR TNF- α , TGF- β E DEX É EXCLUSIVA DE NEUTRÓFILOS

Os dados apresentados até o momento sugerem uma modulação da proteína príon em neutrófilos por componentes distintos do sistema imune e, possivelmente, do sistema endócrino. A fim de analisar a especificidade celular dos efeitos do TNF- α , do TGF- β e da DEX, macrófagos, neutrófilos e linfócitos de diferentes tecidos foram submetidos ao tratamento *in vitro* (24h) com uma das drogas. Neutrófilos *naive* obtidos da medula óssea e neutrófilos inflamatórios, obtidos de lavado peritoneal após estimulação com tioglicolato, responderam de maneira semelhante ao tratamento com DEX ou TGF- β , e em ambos os casos é possível notar um aumento na expressão da PrP^C nas células Gr-1⁺ (Fig 17). Por outro lado, o tratamento de macrófagos peritoneais residentes (dados não mostrados) ou inflamatórios (Fig 17) com qualquer uma das drogas não teve nenhum efeito na expressão basal de PrP^C pelas células F4/80⁺. O mesmo aconteceu com os linfócitos T (CD3⁺) obtidos do baço após o tratamento com TNF- α ou TGF- β (Fig 17). É importante ressaltar que, no baço, a DEX induziu morte celular massiva dos linfócitos, e, portanto, a análise dessas células após o tratamento com DEX não pôde ser realizada.

4.8 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP^C INDUZIDA POR LPS É MEDIADA POR TGF- β E GC

Para verificar a participação do TGF- β e de glicocorticóides na regulação da PrP^C no modelo de inflamação induzida por LPS, células de medula óssea foram tratadas por 30 min com anticorpo neutralizante anti-TGF- β ou com o antagonista RU486, e em seguida cultivadas na presença do soro LPS 12 h (Fig 18A). O tratamento prévio com anti-TGF- β

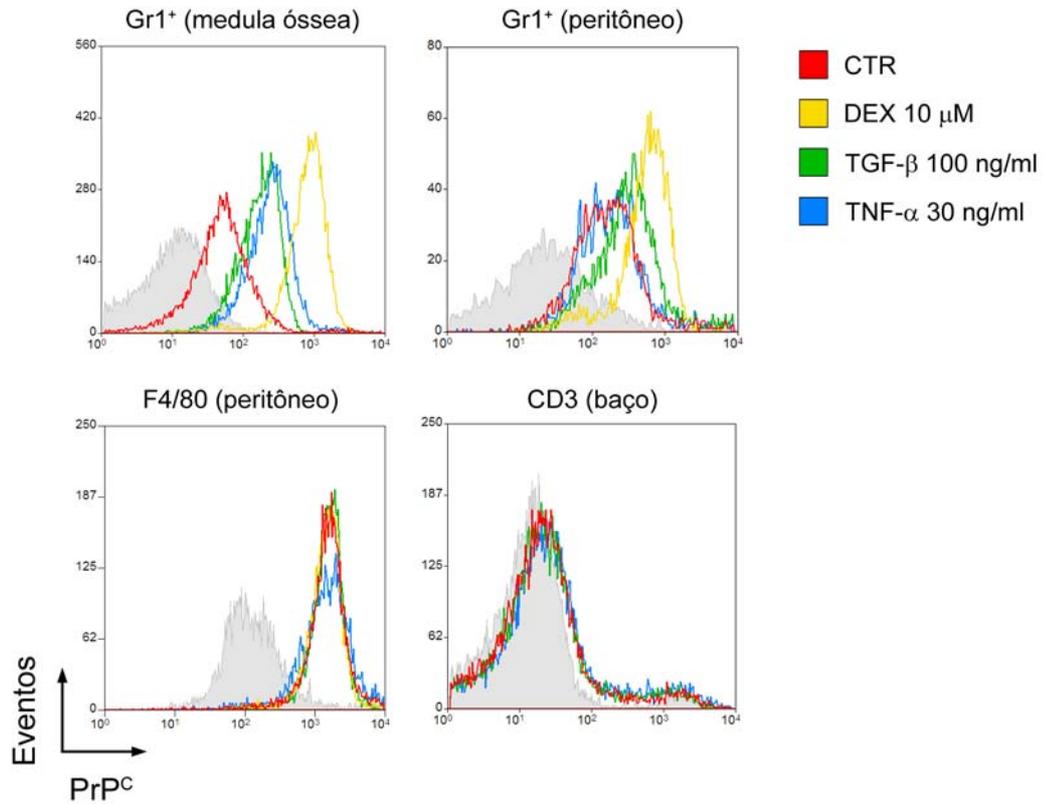


Figura 17. Efeito de DEX, TGF- β e TNF- α na regulação da PrP^C em neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Neutrófilos *naive* obtidos da medula óssea, neutrófilos e macrófagos inflamatórios provenientes de lavado peritoneal após estimulação com tioglicolato, e linfócitos obtidos do baço foram submetidos ao tratamento *in vitro* por 24 h com DEX (10 μ M), TGF- β (100 ng/ml) ou TNF- α (30 ng/ml) e posteriormente analisados por citofluorimetria. Dados representativos de um experimento ($n = 2$).

inibiu cerca de 60% do efeito do soro LPS na indução de PrP^C. De forma semelhante, o tratamento das células com RU486 inibiu em torno de 65% do efeito do soro. Quando colocados em conjunto, o anti-TGF- β e o RU486 bloqueiam praticamente todo o efeito induzido pelo soro, sugerindo que ambos, TGF- β e glicocorticóides, atuam induzindo aumento na expressão da PrP^C durante a inflamação. Além disso, é possível notar um efeito sinérgico das drogas quando administradas em conjunto, *in vitro* (Fig 18B).

4.9 ESTRESSE REGULA A EXPRESSÃO DE PrP^C DE MANEIRA DEPENDENTE DE GC

A fim de analisar o papel de glicocorticóides em um contexto fisiológico, utilizamos o modelo de estresse por confinamento, que sabidamente induz elevação na produção de corticosterona em camundongos (NAIR & BONNEAU, 2006). Para tanto, animais C57/BL6 foram colocados em tubos cônicos de 50 ml devidamente ventilados, dentro dos quais permaneceram por 15 h. Uma vez que os camundongos não tinham acesso à comida e água no período de confinamento, os animais controle também foram sujeitos a tais privações pelo mesmo período de tempo. Em um dos grupos experimentais, duas horas antes de passarem pelo período de estresse os camundongos receberam um tratamento via oral (gavagem) com RU486 (500 μ g, diluído em 0,5% de metilcelulose). Os demais grupos foram tratados apenas com o veículo. Após o período de confinamento, os animais foram submetidos à eutanásia e suas medulas ósseas coletadas para análise (Fig 19). Os neutrófilos de camundongos estressados apresentaram uma expressão de PrP^C cerca de duas vezes maior que os animais do grupo controle (Fig 19A, 19B). O tratamento prévio com RU486 inibiu cerca de 60% do efeito do estresse. Além disso, o soro dos animais estressados também induziu, *in vitro*, aumento significativo na expressão de PrP^C em neutrófilos de camundongos não tratados

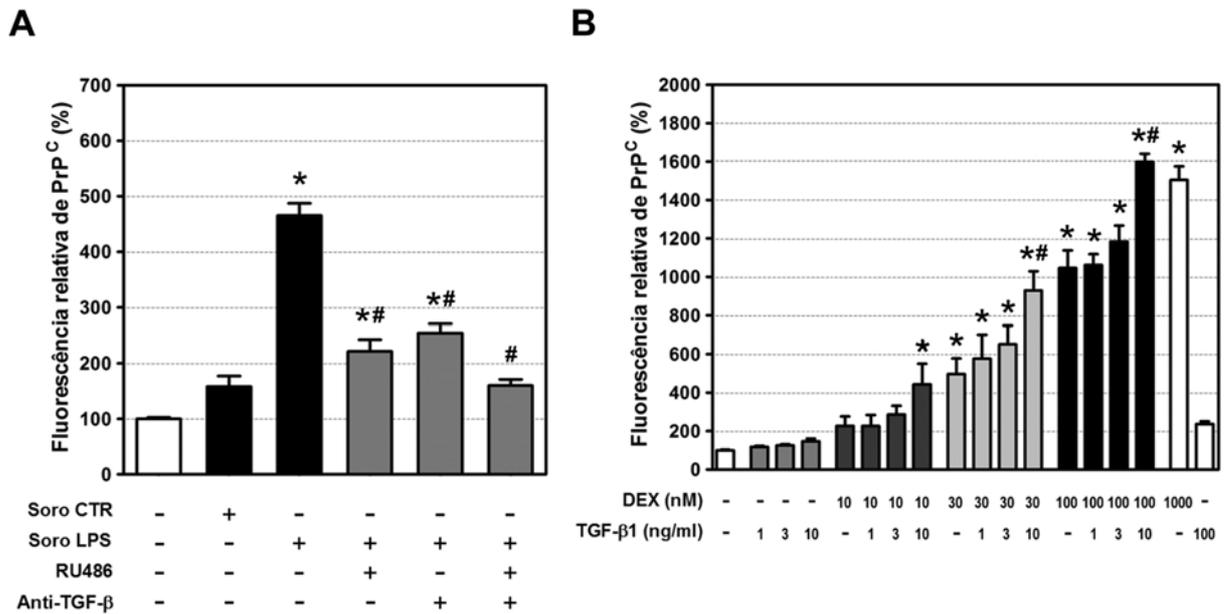


Figura 18. Efeito de TGF- β e glicocorticóides na regulação da PrP^C em neutrófilos. (A) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 30 min com RU486 (2 μ M) e/ou anti-TGF- β (10 μ g/ml), e por mais 24 h com soro LPS 12 h (10%), e em seguida analisadas por citofluorimetria. (B) O efeito sinérgico do TGF- β e da DEX foi observado tratando-se as células da medula óssea *in vitro* com diferentes combinações das duas drogas. # Significa diferença estatística entre o grupo tratado com Soro LPS e os grupos tratados com Soro LPS + RU486, anti-TGF- β ou ambos (A); ou entre os grupos tratados com DEX em diferentes concentrações e os grupos tratados com DEX + TGF- β 10 ng/ml (B). Dados representativos de dois experimentos independentes (A, $n = 3$; B, $n = 2$).

(Fig 19C). Um aumento menor foi observado após o tratamento das células com o soro dos animais estressados que receberam tratamento prévio com RU486.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS A ELEMENTO DE RESPOSTA A GC E ELEMENTO DE LIGAÇÃO A SMAD NO *PRNP*

Com base nos resultados anteriormente demonstrados, resolvemos buscar possíveis candidatos a elementos de resposta a glicocorticóides ou TGF- β no gene da proteína príon de camundongos. Para tanto, a seqüência completa do *Prnp* murino foi inserida em bancos de dados de sítios de ligação de receptores de hormônios nucleares e sítios de ligação de fatores de transcrição. Nossa busca resultou na identificação de um candidato a elemento de resposta a glicocorticóide (GRE) com 80% (12/15) de identidade com a seqüência consenso (NORDEEN *et al.*, 1990), e um candidato a elemento de ligação a SMAD (SBE) com 87,5% (7/8) de identidade com o consenso (ZAWEL *et al.*, 1998), localizados entre o segundo e o terceiro éxons do *Prnp* (Fig 20).

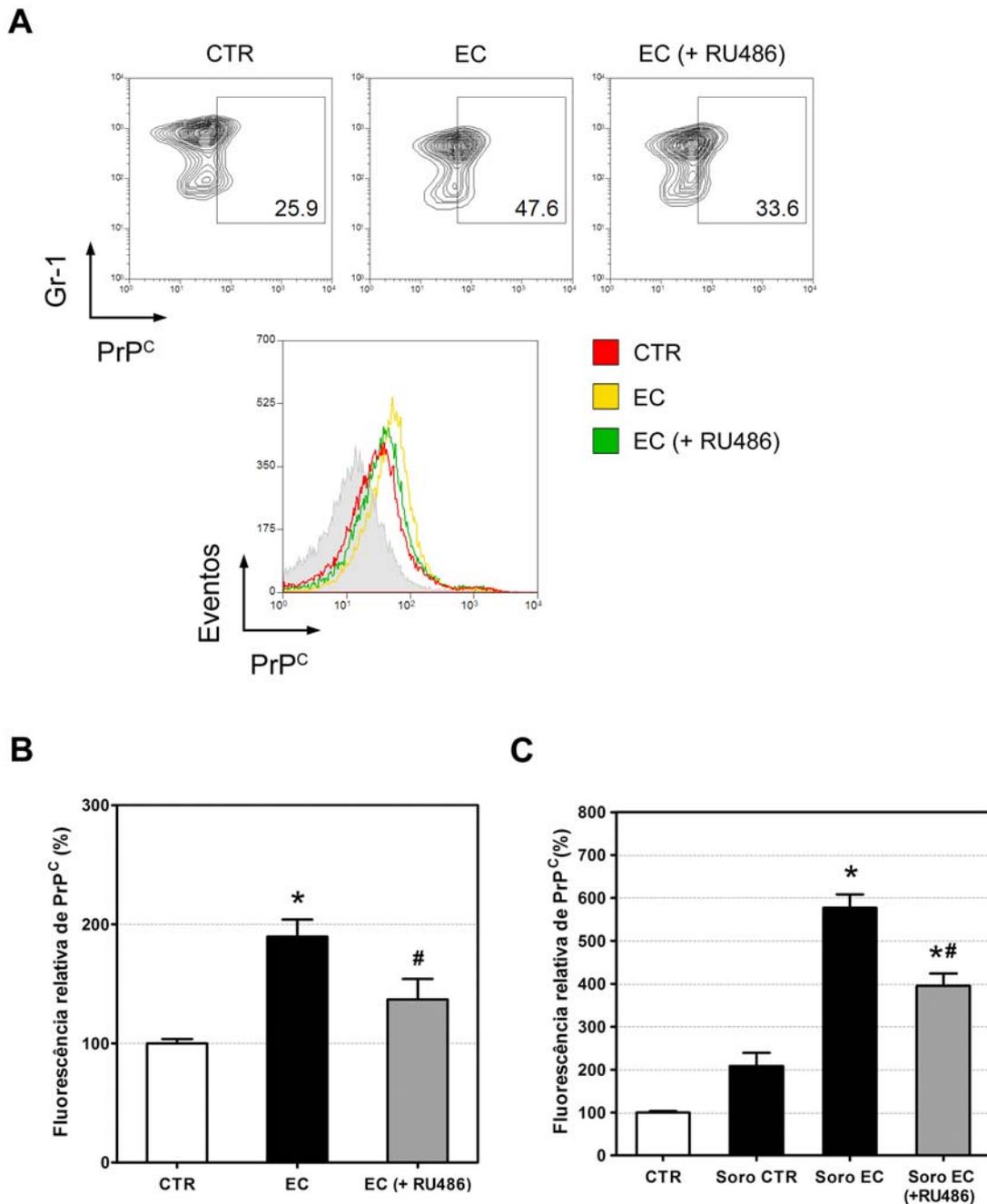


Figura 19. Efeito do estresse na modulação da expressão de PrP^C em neutrófilos. (A e B) Camundongos C57/BL6 foram tratados com RU486 (500 µg) e 2 h depois submetidos a estresse por confinamento (EC) em tubos cônicos por 15 h. Após esse período, as células da medula óssea foram coletadas e analisadas por citofluorimetria. (C) Células da medula óssea foram tratadas *in vitro* por 24 h com o soro de animais submetidos ao EC, e posteriormente analisadas quando à expressão de PrP^C em neutrófilos. # Representa diferença estatística entre os grupos submetidos à EC, pré-tratado ou não com RU486 (B); ou entre o grupo tratado com Soro EC e o seu equivalente pré-tratado com RU486 (C). Dados representativos de dois experimentos independentes ($n = 2$).

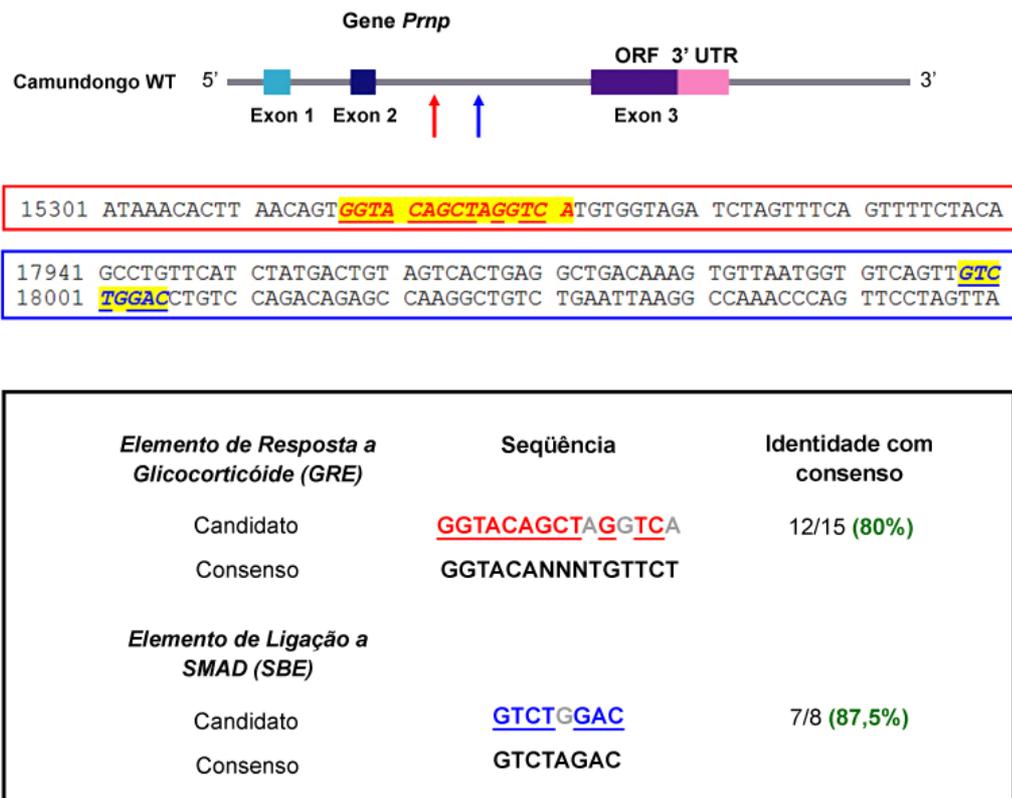


Figura 20. Identificação de candidatos a elemento de resposta a glicocorticóides e elemento de ligação a SMAD no Prnp. A seqüência do gene Prnp murino foi inserida em bancos de dados de sítios de ligação de receptores de hormônios nucleares e sítios de ligação de fatores de transcrição, a fim de obtermos possíveis candidatos a GRE ou SBE no gene da PrP^C. Dessa forma, identificamos um candidato a GRE com 80% de identidade com a seqüência consenso, e um candidato a SBE com 87,5% de identidade com o consenso, ambos no segundo íntron do Prnp. ORF, região aberta para leitura; UTR, região não traduzida.

5 DISCUSSÃO

A regulação da expressão da proteína príon é de fundamental importância tanto sob condições fisiológicas, onde a PrP^C interage com inúmeros ligantes e participa de vários processos importantes para a manutenção das células e do organismo (para revisão ver MARC *et al.*, 2007); quanto sob condições patológicas, onde a disponibilidade da mesma é imprescindível para a replicação e propagação da forma patogênica e o desenvolvimento das TSEs (BRANDNER *et al.*, 1996). Por outro lado, são crescentes as funções imunomodulatórias atribuídas a PrP^C.

Além de ter sua expressão modulada ao longo dos processos de diferenciação e/ou maturação de células de origem linfóide e mielóide (para revisão ver ISAACS *et al.*, 2006), a PrP^C desempenha um papel importante nos mecanismos de ativação linfocitária, participando do complexo de sinalização TCR (MATTEI *et al.*, 2004) e da formação da sinapse imunológica, em conjunto com células dendríticas (BALLERINI *et al.*, 2006). Além disso, ela atua nos mecanismos de fagocitose, modulando negativamente o processo (DE ALMEIDA *et al.*, 2005), e na auto-renovação de células tronco hematopoiéticas (ZHANG *et al.*, 2006). Por outro lado, no desenvolvimento das TSEs, os macrófagos e as células dendríticas parecem participar da propagação da PrP^{Sc} das placas de Peyer para os órgãos linfóides (linfoinvasão), enquanto as células dendríticas foliculares e os linfócitos B são necessários, direta e indiretamente, para o mecanismo de neuroinvasão - transporte da PrP^{Sc} dos órgãos linfóides para o SNC (AGUZZI, 2001; RAYMOND *et al.*, 2007). Sendo assim, a compreensão dos mecanismos de controle e regulação da proteína príon no sistema imune teriam implicações importantes no entendimento das funções da PrP^C sob condições normais e durante o processo neurodegenerativo das doenças por príon. Alguns trabalhos foram realizados na tentativa de

elucidar os mecanismos pelos quais a PrP^C é regulada, porém os resultados obtidos até o momento são, em sua maioria, inconclusivos e/ou contraditórios.

Evidências apontam para a participação da PrP^C em mecanismos inflamatórios induzidos por ligantes de TLRs e Fas. Camundongos PrP^{-/-} injetados com zimosan (DE ALMEIDA *et al.*, 2005) apresentaram deficiência no recrutamento de leucócitos, quando comparados com animais selvagens. Resultados semelhantes foram observados após injeção intraperitoneal de LPS (MARIANTE, NÓBREGA & LINDEN, dados não publicados), e o mesmo foi constatado analisando-se o fluido broncoalveolar dos animais PrP^{-/-} submetidos ao tratamento com sílica (LINDEN *et al.*, 2008). Com base nesses dados, resolvemos analisar os mecanismos de regulação da PrP^C em um modelo de inflamação induzida por endotoxemia.

Nós demonstramos que o tratamento *in vivo* com LPS induz aumento na expressão da PrP^C em células Gr-1⁺ (majoritariamente neutrófilos), de maneira dose-dependente. Contudo, células isoladas da medula óssea e tratadas *in vitro* com a endotoxina não apresentaram alteração significativa no conteúdo de PrP^C, o que aponta para um papel indireto do LPS na regulação da proteína. Dentre as várias citocinas que têm produção aumentada na endotoxemia, TNF- α , IL-1 β e INF- γ já foram descritas regulando a expressão da PrP^C em diferentes modelos. Satoh e colaboradores observaram um aumento nos níveis de RNAm para PrP^C em células de neuroblastoma tratadas *in vitro* com IL-1 β e TNF- α , e uma diminuição após o tratamento com INF- γ (SATOH *et al.*, 1998). Por outro lado, o tratamento de monócitos sangüíneos humanos com INF- γ induziu aumento na expressão da PrP^C por essas células (DÜRIG *et al.*, 2000). Sendo assim, resolvemos olhar para o efeito de citocinas com funções predominantemente pró-inflamatórias na regulação da proteína príon em neutrófilos.

Meios condicionados por macrófagos estimulados com LPS induziram aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos, efeito que foi parcialmente inibido pelo anticorpo neutralizante contra TNF- α . O tratamento *in vitro* com TNF- α , mas não com outras citocinas

pró-inflamatórias, também induziu aumento na PrP^C. Sauer e colaboradores demonstraram que o TNF- α induz aumento na expressão da PrP^C em esferóides de células tumorais Gli-36 de maneira indireta, aumentando a produção de ROS por essas células (SAUER *et al.*, 2003). No nosso modelo, porém, os efeitos do TNF- α podem não ser dependentes de ROS, uma vez que o tratamento das células com IL-1 β , que assim como o TNF- α também induz produção de ROS (O'DONNELL *et al.*, 2000; VEREKER *et al.*, 2001; YOO *et al.*, 2002), não afetou a expressão basal de PrP^C.

Apesar do TNF- α induzir aumento na expressão de PrP^C *in vitro*, não é ele o responsável pela regulação da PrP^C *in vivo* no modelo de endotoxemia, uma vez que o tratamento das células com um anticorpo neutralizante anti-TNF- α não inibiu o efeito do soro obtido de animais previamente tratados com LPS; e camundongos TNFR1^{-/-} responderam ao tratamento *in vivo* com LPS de maneira semelhante aos animais selvagens. Não descartamos, porém, uma participação precoce do TNF- α na iniciação da resposta induzida pelo LPS, ou ainda na estimulação das células, tornando-as mais responsivas a outras moléculas que participam da regulação da PrP^C. Desta forma, é possível que o soro obtido de animais tratados com LPS por tempos mais curtos, como 1,5 ou 3 h, contenha TNF- α em quantidades suficientes para induzirem aumento na expressão da PrP^C em neutrófilos (o que não acontece com o soro obtido tardiamente, como 12 ou 24 h). Se isso for verdade, o bloqueio dos soros de 1,5 ou 3 h com anti-TNF- α neutralizante poderia, aí sim, inibir o aumento da expressão da PrP^C observado após o tratamento das células com esses soros.

Além dos mecanismos de sinalização do TNF- α serem compartilhados pela via Fas/FasL (WALLACH *et al.*, 1999), a PrP^C parece exercer um papel crucial nos mecanismos inflamatórios dependentes de Fas (LINDEN *et al.*, 2008). Contudo, utilizando animais deficientes em FasL vimos que, ao menos no modelo de endotoxemia induzida por LPS, a via de sinalização Fas/FasL não participa da regulação da PrP^C. É importante notar, porém, que os

animais deficientes em FasL demonstraram uma resposta um pouco maior ao LPS (maior aumento na expressão de PrP^C) do que os animais selvagens. Uma vez que os animais BALB/c.gld apresentam níveis bem mais elevados de TNF- α , quando comparados aos animais selvagens (BORGES et al., 2001), é possível, mais uma vez, que essa citocina esteja participando, ao menos nos estágios iniciais, da indução do efeito provocado pelo LPS.

O tratamento com LPS induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias em uma fase inicial, seguida da liberação de mediadores antiinflamatórios, que por sua vez participam da resolução da inflamação. Uma vez que, no nosso modelo, a regulação da PrP^C independe da participação de citocinas pró-inflamatórias, decidimos examinar o efeito de mediadores com funções principalmente antiinflamatórias no processo. O tratamento *in vitro* de células da medula óssea com TGF- β induziu aumento significativo na expressão de PrP^C em neutrófilos. Outras citocinas antiinflamatórias foram testadas, porém nenhuma delas alterou os níveis basais da proteína príon.

Analisando os mecanismos de resposta inflamatória em um modelo de doença por príon, Perry e colaboradores verificaram que, ao contrário do que se observa *in vitro*, os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α não são significativamente afetados no modelo *in vivo*. Ao contrário, há uma elevação evidente dos níveis de TGF- β (CUNNINGHAM *et al.*, 2002). A análise funcional do papel do TGF- β durante o curso temporal da doença mostrou que sua expressão aumenta concomitantemente com a ativação de microglia. Além disso, a inibição do TGF- β nesse modelo induz aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), acompanhada de inflamação local massiva, o que sugere um papel funcional do TGF- β na supressão de mediadores pró-inflamatórios nas doenças por príon, o que evitaria o agravamento dos danos cerebrais (BOCHE *et al.*, 2006).

No nosso modelo, porém, a administração de TGF- β elevou os níveis de PrP^C, o que seria desfavorável no modelo de doença, uma vez que a velocidade de propagação da PrP^{Sc} é

diretamente proporcional a quantidade de PrP^C (PRUSINER *et al.*, 1990; BÜELER *et al.*, 1993). Por outro lado, evidências crescentes apontam para uma função anti-apoptótica ou neuroprotetora da proteína príon (para revisão ver LINDEN *et al.*, 2008). Nesse caso, o aumento na expressão da PrP^C induzido pelo TGF- β poderia ter como conseqüência proteger os neurônios da morte celular que acontece no desenvolvimento da doença.

As citocinas produzidas por linfócitos ou macrófagos na inflamação atuam não apenas na ativação de outros componentes do sistema inflamatório, mas também na produção de glicocorticóides pelo organismo. O tratamento com LPS induz a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo. Subseqüentemente o CRH induz aumento na produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise. O ACTH, por sua vez, estimula as células do córtex adrenal a sintetizarem e secretarem GCs, que exercerão seu papel antiinflamatório em vários tipos celulares criando, assim, um feedback negativo da inflamação (SMOAK & CIDLOWSKI, 2004). Por essa razão, resolvemos analisar o papel de GCs na regulação da PrP^C.

Observamos que, *in vitro* e *in vivo*, a DEX participa positivamente da regulação da PrP^C em neutrófilos. Atouf e colaboradores verificaram que o tratamento com DEX induz aumento na expressão do RNAm do *Prnp* em células beta produtoras de insulina (ATOUF *et al.*, 1994). Por outro lado, células PC12 ou C6 transfectadas com um repórter para luciferase sob controle do promotor da PrP^C, não apresentaram alteração na atividade do promotor quando tratadas com DEX (CABRAL *et al.*, 2002), sugerindo que diferentes tipos celulares respondem de maneira diferente ao tratamento com GCs. Não descartamos, porém, a possibilidade de, no nosso modelo, a DEX atuar na redução do *turnover* da PrP^C, sem afetar a expressão do gene *Prnp*.

Quando isolados da medula óssea e cultivados *in vitro* na presença de DEX, os neutrófilos responderam aumentando a expressão de PrP^C. Contudo, foi necessária uma dose

dez vezes maior da droga para que os níveis de PrP^C se aproximassem daqueles obtidos nas culturas de células totais de medula óssea. Sabe-se que o tratamento *in vitro* de linfócitos T com DEX induz aumento na produção e secreção de TGF- β por essas células (AYANLARBATUMAN *et al.*, 1991; CORREALE *et al.*, 1998). Sendo assim, o cultivo de células totais de medula óssea com o GC pode induzir as células T ali presentes a liberarem TGF- β que, como demonstramos anteriormente, também regula positivamente a PrP^C. Dessa forma, os efeitos da DEX seriam amplificados pelo TGF- β .

É importante notar que o tratamento *in vivo* com DEX induziu aumento no conteúdo de PrP^C não apenas na medula óssea, mas também no timo dos animais injetados. Sabe-se que os GCs desempenham um papel importante na regulação da morte celular de linfócitos T, o que por sua vez constitui um evento crucial no desenvolvimento das respostas imunes e na seleção intratímica negativa do repertório de células T, que leva a uma deleção clonal de linfócitos T autoreativos (BLACKMAN *et al.*, 1990; CIFONE *et al.*, 1999). O tratamento com GCs, incluindo DEX, induz morte celular massiva em populações imaturas duplo-positivas (CD4⁺CD8⁺) de timócitos, mas não em populações duplo-negativas (CD4⁻CD8⁻) ou simples-positivas (CD4⁺CD8⁻ ou CD8⁺CD4⁻) (AHMED & SRIRANGANATHAN, 1994; KONG *et al.*, 2002). Uma vez que os níveis de PrP^C variam de acordo com o grau de maturação dos linfócitos (KUBOSAKI *et al.*, 2001), é possível que a DEX esteja enriquecendo uma população de células que apresentem um maior conteúdo basal de PrP^C, e não induzindo aumento na expressão da proteína nessas células, como se poderia imaginar. De fato, as populações afetadas pela DEX são as que apresentam os menores níveis de PrP^C na superfície celular (KUBOSAKI *et al.*, 2001). Por outro lado, uma vez que os macrófagos produzem grandes quantidades de TGF- β durante a fagocitose de células apoptóticas (FADOK *et al.*, 1998), o aumento nos níveis de PrP^C observados na medula e no timo após o tratamento com

DEX pode ser causado, ao menos em parte, pelo TGF- β produzido pelos macrófagos presentes nesses locais, que estariam participando da remoção de linfócitos mortos pela DEX.

O papel do TGF- β e dos GCs no modelo de endotoxemia foi confirmado em experimentos de inibição, utilizando-se o antagonista de receptores de GCs e o anticorpo neutralizante contra TGF- β . O tratamento prévio das células com uma combinação de RU486 e anti-TGF- β inibiu quase completamente o efeito do soro LPS, indicando que ambos TGF- β e GC participam da regulação da PrP^C, não apenas *in vitro*, mas também *in vivo*. Mais do que isso, os dois mediadores atuam de maneira sinérgica aumentando ainda mais a expressão da proteína príon.

A via de sinalização central do TGF- β envolve a participação de receptores de superfície e SMADs. A sinalização começa com a ligação do TGF- β a um dímero de receptor do tipo II (TGF- β RII), que por sua vez recruta um dímero de receptor do tipo I, formando um heterocomplexo tetramérico com o ligante. A formação desse complexo leva a fosforilação de SMADs reguladas por receptores (R-SMADs), que por sua vez formam um complexo com a SMAD4. Esses complexos se acumulam no núcleo onde, em conjunto com fatores de transcrição e proteínas responsáveis pelo remodelamento da cromatina, participam da regulação da transcrição gênica (SCHMIERER & HILL, 2007).

Os GCs exercem seus efeitos antiinflamatórios através de sua interação com receptores para GCs (GR), levando a indução ou repressão da transcrição gênica. Uma vez ativados pela interação com seus ligantes, os GRs se homodimerizam e se ligam a GREs presentes no DNA, o que gera uma mudança conformacional no GR e promove o recrutamento de várias moléculas coativadoras para a região. Os principais efeitos antiinflamatórios dos GCs são, porém, resultado de interações proteína-proteína entre os GRs e outros fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1. Esse mecanismo leva a repressão da produção de várias citocinas importantes nos processos inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Contudo, os GRs

também podem interagir diretamente com fatores de transcrição da família das STATs ou SMADs, resultando em indução ou repressão da transcrição gênica (revisado por SMOAK & CIDLOWSKI, 2004).

Diversos trabalhos apontam para uma relação direta entre a regulação de GCs e TGF- β . O tratamento de linfócitos T com DEX induz aumento tanto na produção de TGF- β quanto nos níveis de RNAm para a proteína (AYANLARBATUMAN *et al.*, 1991). Kanatani e colaboradores verificaram que GCs e TGF- β atuam de forma sinérgica inibindo o crescimento de células monocitóides leucêmicas, e que essa inibição é mediada por aumento na atividade transcricional do GRE pelo TGF- β (KANATANI *et al.*, 1996). Por outro lado, macrófagos humanos tratados com DEX respondem ao TGF- β iniciando um programa de expressão gênica constituído de mais de uma centena de genes, incluindo reguladores de sinalização/transcrição e imunomoduladores, dentre outros. Nesse caso, o GC induz aumento na expressão de TGF- β RII, tornando as células mais permissivas ao TGF- β (GRATCHEV *et al.*, 2008). Sendo assim, é possível que os GCs e o TGF- β atuem de forma coordenada na regulação da expressão da PrP^C. Novos estudos se fazem necessários a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais essa regulação ocorre.

De forma compatível com nossos resultados, identificamos um candidato a GRE com 80% de identidade com a seqüência consenso, e um candidato a SBE com 87,5% de identidade com o consenso, ambos localizados no segundo intron do *Prnp*. Experimentos funcionais serão necessários para elucidar se essas seqüências realmente atuam como elementos reguladores do *Prnp*.

O papel de GCs endógenos na regulação da PrP^C foi analisado em um modelo experimental de estresse por confinamento. Animais estressados por 15h apresentaram um aumento significativo na expressão da proteína príon, quando comparados com animais não estressados. O tratamento prévio dos animais com RU486 inibiu cerca de 60% do efeito do

estresse. Smith e colaboradores demonstraram um aumento e uma correlação direta entre os níveis séricos de TGF- β e cortisol em primatas submetidos a estresse por confinamento (SMITH *et al.*, 2002). É possível que a inibição parcial, e não total, do RU486 seja devida a um aumento do TGF- β sérico, que em conjunto com a corticosterona, atuaria positivamente na regulação da PrP^C no modelo de estresse.

É importante observar que o tratamento de macrófagos peritoneais, residentes ou inflamatórios, e de linfócitos do baço com TGF- β ou DEX não afetou os níveis basais de PrP^C nessas células. Por outro lado, não apenas os neutrófilos *naive* obtidos da medula óssea, mas também os inflamatórios, provenientes do peritônio de animais estimulados com tioglicolato, responderam ao tratamento com uma das drogas aumentando a expressão de PrP^C. Ao contrário do que acontece com linfócitos, o tratamento de neutrófilos humanos e de outros mamíferos com GCs, incluindo DEX, inibe a apoptose espontânea dessas células, prolongando, assim, sua sobrevivência (COX, 1995; LILES *et al.*, 1995; MEAGHER *et al.*, 1996; NITTOH *et al.*, 1998). Uma vez que os neutrófilos constituem um dos principais componentes celulares inflamatórios, o prolongamento de sua sobrevivência poderia favorecer o controle dos eventos disparadores da inflamação. Se a proteína príon tiver alguma participação nesse fenômeno, então ela poderia atuar na potenciação da resposta imune, da forma semelhante ao que acontece na formação da sinapse imunológica entre linfócitos e DCs (BALLERINI *et al.*, 2006).

A proteção contra estresse oxidativo constitui uma das principais funções da PrP^C (para revisão, ver MILHAVET & LEHMANN, 2002). Tendo em mente que neutrófilos ativados produzem grande quantidade de ROS (EL-BENNA *et al.*, 2008), a expressão da PrP^C por essas células poderia contribuir para limitar os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo, colaborando inclusive com um prolongamento na sobrevivência dos neutrófilos. Nesse

caso, o TGF- β , que também protege contra estresse celular (BARCELLOS-HOFF, 2005), os GCs, e a PrP^C atuam de forma sinérgica, um induzindo e/ou amplificando o efeito do outro.

Ainda nesse contexto, é possível que a PrP^C atue protegendo o organismo contra sinais de perigo na inflamação. Sabe-se que o sistema imune inato tem a capacidade de reconhecer as “assinaturas” dos microrganismos, coletivamente chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses PAMPs levam à ativação de receptores específicos, denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 1998). Diversas famílias de PRRs foram identificadas, dentre elas os TLRs, os receptores semelhantes a RIG-I (RLRs), e os receptores semelhantes a NOD (NLRs) (MEYLAN *et al.*, 2006). Os NLRs constituem a maior família de PRRs intracelulares, com mais de vinte membros identificados em humanos (MARTINON & TSCHOPP, 2005). Eles participam do reconhecimento de bactérias, e muitos deles, em conjunto com os TLRs, reconhecem sinais de perigo, como ácido úrico, ATP, Hsps, nucleotídeos, produtos provenientes da degradação da matriz extracelular, ROS e uma série de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IFNs, liberados por células sob condições adversas, sugerindo que tais sinais contribuem para a patologia das doenças autoimunes e outras condições inflamatórias (GALLUCCI & MATZINGER, 2001; MARTINON, 2008).

Uma das principais funções do sistema imune é a sua capacidade em diferenciar o que é próprio do organismo e o que não é, e responder ao que é próprio com tolerância ou montar uma resposta imune contra o não-próprio. Recentemente, Matzinger propôs a hipótese de que o sistema imune responde com tolerância à maioria dos antígenos, e que o que desencadeia a resposta imune é a apresentação de um antígeno no contexto de um sinal de perigo, e não no fato do antígeno ser estranho ao organismo (MATZINGER, 1994; MATZINGER, 2002). Atualmente acredita-se que ambos os modelos atuam em conjunto, determinando a qualidade

e a extensão da ativação do sistema imune inato. Futuros experimentos serão necessários para se verificar a real contribuição da proteína príon nesse contexto.

Finalmente, é importante notar que apenas doses elevadas de LPS induzem aumento na expressão da PrP^C em neutrófilos. Seria interessante analisar como a proteína se comporta em modelos de inflamação aguda local como, por exemplo, após injeção intraperitoneal de bactérias. Se os efeitos na regulação da proteína forem observados apenas após a administração de altas doses de microrganismos, a interpretação das funções da PrP^C em neutrófilos poderia ser limitada mais especificamente ao eixo antiinflamatório (DEX/TGF- β) do que ao eixo pró-inflamatório. Até o momento, não há evidências de PAMPS ou PRRs como ligantes da PrP^C, o que corrobora com essa interpretação.

6 CONCLUSÕES

- A endotoxemia provocada por LPS em um modelo murino de inflamação aguda induz aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos por uma via dependente dos antiinflamatórios TGF- β e GCs;
- O tratamento *in vitro* com TGF- β ou DEX induz aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos da medula óssea ou neutrófilos inflamatórios, mas não em linfócitos e macrófagos;
- O tratamento *in vivo* de camundongos com DEX induz aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos da medula óssea;
- O estresse por confinamento induz aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos da medula óssea de maneira dependente de GCs e, possivelmente, de TGF- β .

Em resumo, a endotoxemia causada pelo LPS e o estresse por confinamento induzem aumento na expressão da PrP^C em neutrófilos por mecanismos dependentes de TGF- β e/ou GCs (Fig 21). Esses dados mostram, pela primeira vez, a participação direta de componentes antiinflamatórios na regulação da PrP^C em neutrófilos sob condições de estresse.

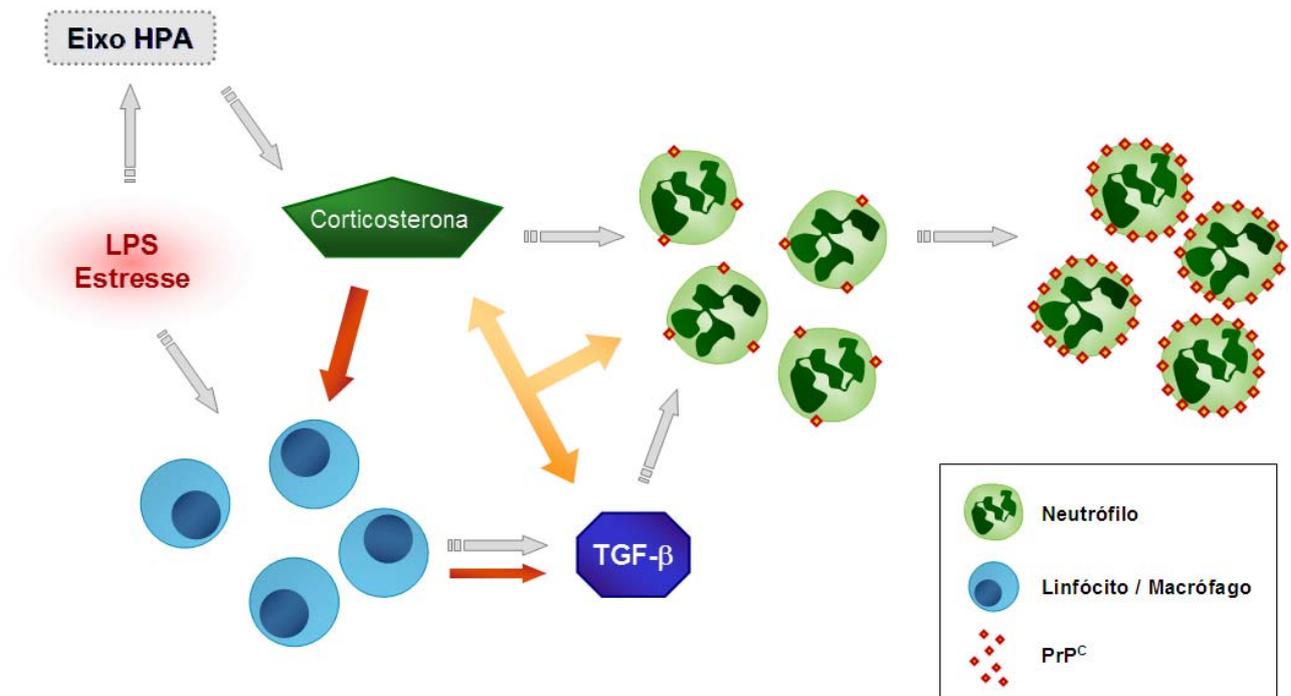


Figura 21. Modelo de regulação da PrP^C em neutrófilos induzida por estresse. O estresse atua no eixo HPA estimulando a liberação de corticosterona, que por sua vez induz aumento na expressão de PrP^C em neutrófilos de maneira direta, atuando sobre os próprios neutrófilos, ou indireta, induzindo a liberação de TGF-β por outros componentes celulares (setas vermelhas). Por outro lado, o efeito do estresse sobre macrófagos ou linfócitos induz a liberação, por essas células, de TGF-β, que por sua vez atuará regulando a PrP^C em neutrófilos. Finalmente, a corticosterona e o TGF-β podem atuar de maneira sinérgica na amplificação do efeito (setas laranjas).

7 REFERÊNCIAS

AGELAKI, S., TSATSANIS, C., GRAVANIS, A., MARGIORIS, A.N. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages *in vitro* and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6068-6074, 2002.

AGUZZI, A. Peripheral prion pursuit. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 5, p. 661-662, 2001.

AGUZZI, A. Prion diseases, blood and the immune system: concerns and reality. **Haematologica**, v. 85, n. 1, p. 3-10, 2000.

AGUZZI, A., BAUMANN, F., BREMER, J. The prion's elusive reason for being. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, p. 439-477, 2008.

AGUZZI, A., HEIKENWALDER, M. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 765-775, 2006.

AHMED, S.A., SRIRANGANATHAN, N. Differential effects of dexamethasone on the thymus and spleen: alterations in programmed cell death, lymphocyte subsets and activation of T cells. **Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 55-66, 1994.

AMERICO, T.A., CHIARINI, L.B., LINDEN, R. Signaling induced by hop/STI-1 depends on endocytosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 620-625, 2007.

ANDERSON, D.C., SPRINGER, T.A. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. **Annual Review of Medicine**, v. 38, p. 175-194, 1987.

APPEL, H., NEURE, L., KUHNE, M., BRAUN, J., RUDWALEIT, M., SIEPER, J. An elevated level of IL-10- and TGFbeta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 23, n. 5, p. 435-440, 2004.

ARNOLD, J.E., TIPLER, C., LASZLO, L., HOPE, J., LANDON, M., MAYER, R.J. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. **The Journal of Pathology**, v. 176, n. 4, p. 403-411, 1995.

ATOUF, F., SCHARFMANN, R., LASMEZAS, C., CZERNICHOW, P. Tight hormonal control of PrP gene expression in endocrine pancreatic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 3, p. 1220-1226, 1994.

AUCOUTURIER, P., CARP, R.I., CARNAUD, C., WISNIEWSKI, T. Prion diseases and the immune system. **Clinical Immunology**, v. 96, n. 2, p. 79-85, 2000.

AUCOUTURIER, P., GEISSMANN, F., DAMOTTE, D., SABORIO, G.P., MEEKER, H.C., KASCSAK, R., KASCSAK, R., CARP, R.I., WISNIEWSKI, T. Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 5, p. 703-708, 2001.

AYANLARBATUMAN, O., FERRERO, A.P., DIAZ, A., JIMENEZ, S.A. Regulation of transforming growth factor-beta 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1574-1580, 1991.

BAINBRIDGE, J., WALKER, K.B. The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. **Immunology Letters**, v. 96, n. 1, p. 147-150, 2005.

BALLERINI, C., GOURDAIN, P., BACHY, V., BLANCHARD, N., LEVAVASSEUR, E., GRÉGOIRE, S., FONTES, P., AUCOUTURIER, P., HIVROZ, C., CARNAUD, C. Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7254-7262, 2006.

BARCELLOS-HOFF, M.H. How tissues respond to damage at the cellular level: orchestration by transforming growth factor- β (TGF- β). **BJR Supplement**, v. 27, p. 123-127, 2005.

BAYBUTT, H., MANSON, J. Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. **Gene**, v. 184, n. 1, p. 125-131, 1997.

BEISHUIZEN, A., THIJS, LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 1, p. 3-24, 2003.

BERG, L.J. Insights into the role of the immune system in prion diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 2, p. 429-432, 1994.

BLACKMAN, M., KAPPLER, J., MARRACK, P. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. **Science**, v. 248, n. 4961, p. 1335-1341, 1990.

BLÄTTLER, T., BRANDNER, S., RAEBER, A.J., KLEIN, M.A., VOIGTLÄNDER, T., WEISSMANN, C., AGUZZI, A. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. **Nature**, v. 389, n. 6646, p. 69-73, 1997.

BOCHE, D., CUNNINGHAM, C., DOCAGNE, F., SCOTT, H., PERRY, V.H. TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 22, n. 3, p. 638-650, 2006.

BORCHELT, D.R., TARABOULOS, A., PRUSINER, S.B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 23, p. 16188-16199, 1992.

BORGES, V.M., FALCÃO, H., LEITE-JÚNIOR, J.H., ALVIM, L., TEIXEIRA, G.P., RUSSO, M., NÓBREGA, A.F., LOPES, M.F., ROCCO, P.M., DAVIDSON, W.F., LINDEN, R., YAGITA, H., ZIN, W.A., DOSREIS, G.A. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 2, p. 155-164, 2001.

BORREGAARD, N., SØRENSEN, O.E., THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 8, p. 340-345, 2007.

BOUNHAR, Y., ZHANG, Y., GOODYER, C.G., LEBLANC, A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 39145-39149, 2001.

BRANDNER, S., RAEBER, A., SAILER, A., BLÄTTLER, T., FISCHER, M., WEISSMANN, C., AGUZZI, A. Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 23, p. 13148-13151, 1996.

BROWN, D.R. Microglia and prion disease. **Microscopy Research and Technique**, v. 54, n. 2, p. 71-80, 2001.

BROWN, D.R., HERMS, J., KRETZSCHMAR, H.A. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. **Neuroreport**, v. 5, n. 16, p. 2057-2060, 1994.

BROWN, D.R., KRETZSCHMAR, H.A. Microglia and prion disease: a review. **Histology and Histopathology**, v. 12, n. 3, p. 883-892, 1997.

BROWN, D.R., NICHOLAS, R.S., CANEVARI, L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. **Journal of Neuroscience Research**, v. 67, n. 2, p. 211-224, 2002.

BROWN, D.R., QIN, K., HERMS, J.W., MADLUNG, A., MANSON, J., STROME, R., FRASER, P.E., KRUCK, T., VON BOHLEN, A., SCHULZ-SCHAEFFER, W., GIESE, A., WESTAWAY, D., KRETZSCHMAR, H. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. **Nature**, v. 390, n. 6661, p. 684-687, 1997a.

BROWN, D.R., SCHMIDT, B., KRETZSCHMAR, H.A. Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 961-972, 1997b.

BROWN, D.R., SCHMIDT, B., KRETZSCHMAR, H.A. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. **Nature**, v. 380, n. 6572, p. 345-347, 1996.

BROWN, D.R., SCHULZ-SCHAEFFER, W.J., SCHMIDT, B., KRETZSCHMAR, H.A. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. **Experimental Neurology**, v. 146, n. 1, p. 104-112, 1997c.

BROWN, K.L., RITCHIE, D.L., MCBRIDE, P.A., BRUCE, M.E. Detection of PrP in extraneural tissues. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 1, p. 40-45, 2000.

BROWN, K.L., STEWART, K., RITCHIE, D.L., MABBOTT, N.A., WILLIAMS, A., FRASER, H., MORRISON, W.I., BRUCE, M.E. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1308-1312, 1999.

BRUCE, M.E., BROWN, K.L., MABBOTT, N.A., FARQUHAR, C.F., JEFFREY, M. Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. **Immunology Today**, v. 21, n. 9, p. 442-446, 2000.

BÜELER, H., AGUZZI, A., SAILER, A., GREINER, R.A., AUTENRIED, P., AGUET, M., WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73, n. 7, p. 1339-1347, 1993.

BÜELER, H., FISCHER, M., LANG, Y., BLUETHMANN, H., LIPP, H.P., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., AGUET, M., WEISSMANN, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 577-582, 1992.

BURKLE, A., KRETZSCHMAR, H.A., BROWN, D.R. Poly(ADP-ribose) immunostaining to detect apoptosis induced by a neurotoxic fragment of prion protein. **The Histochemical Journal**, v. 31, n. 11, p. 711-716, 1999.

BURTHEM, J., URBAN, B., PAIN, A., ROBERTS, D.J. The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3733-3738, 2001.

CABRAL, A.L., LEE, K.S., MARTINS, V.R. Regulation of the Cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5675-5682, 2002.

CAETANO, F.A., LOPES, M.H., HAJJ, G.N., MACHADO, C.F., PINTO ARANTES, C., MAGALHÃES, A.C., VIEIRA M.P., AMÉRICO, T.A., MASSENSINI, A.R., PRIOLA, S.A., VORBERG, I., GÓMEZ, M.V., LINDEN, R., PRADO, V.F., MARTINS, V.R., PRADO, M.A. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 26, p. 6691-6702, 2008.

CAMPBELL, I.L., EDDLESTON, M., KEMPER, P., OLDSTONE, M.B., HOBBS, M.V. Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2383-2387, 1994.

CARDONE, F., POCCHIARI, M. A role for complement in transmissible spongiform encephalopathies. **Nature Medicine**, v. 7, n. 4, p. 410-411, 2001.

CASHMAN, N.R., LOERTSCHER, R., NALBANTOGLU, J., SHAW, I., KASCSAK, R.J., BOLTON, D.C., BENDHEIM, P.E. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. **Cell**, v. 61, n. 1, p. 185-192, 1990.

CAUGHEY, B., RAYMOND, G.J. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 27, p. 18217-18223, 1991.

CAUGHEY, B., RAYMOND, G.J., ERNST, D., RACE, R.E. N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. **Journal of Virology**, v. 65, n. 12, p. 6597-6603, 1991.

CEREGHETTI, G.M., SCHWEIGER, A., GLOCKSHUBER, R., VAN DOORSLAER, S. Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu²⁺ to the C-terminal domain of the murine prion protein. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 1, p. 516-525, 2001.

CHEN, S., MANGÉ, A., DONG, L., LEHMANN, S., SCHACHNER, M. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 22, n. 2, p. 227-333, 2003.

CHEN, S., SMITH, D.F. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 52, p. 35194-35200, 1998.

CHEN, Z., HERMAN, A.E., MATOS, M., MATHIS, D., BENOIST, C. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 10, p. 1387-1397, 2005.

CHIARINI, L.B., FREITAS, A.R., ZANATA, S.M., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R., LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3317-3326, 2002.

CHOI, S.H., KIM, I.C., KIM, D.S., KIM, D.W., CHAE, S.H., CHOI, H.H., CHOI, I., YEO, J.S., SONG, M.N., PARK, H.S. Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus. **Genomics**, v. 87, n. 5, p. 598-607, 2006.

CHOI, S.I., JU, W.K., CHOI, E.K., KIM, J., LEA, H.Z., CARP, R.I., WISNIEWSKI, H.M., KIM, Y.S. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent. **Acta Neuropathologica**, v. 96, n. 3, p. 279-286, 1998.

CHRÉTIEN, F., DORANDEU, A., ADLE-BIASSETTE, H., EREAU, T., WINGERTSMANN, L., BRION, F., GRAY, F. A process of programmed cell death as a mechanisms of neuronal death in prion Diseases. **Clinical and Experimental Pathology**, v. 47, n. 3-4, p. 181-191, 1999.

CHUANG, T.H., ULEVITCH, R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. **European Cytokine Network**, v. 11, n. 3, p. 372-378, 2000.

CIFONE, M.G., MIGLIORATI, G., PARRONI, R., MARCHETTI, C., MILLIMAGGI, D., SANTONI, A., RICCARDI, C. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. **Blood**, v. 93, n. 7, p. 2282-2296, 1999.

COLEMAN, A.E., FOREST, S.T., MCNEIL, N., KOVALCHUK, A.L., RIED, T., JANZ, S. Cytogenetic analysis of the bipotential murine pre-B cell lymphoma, P388, and its derivative macrophage-like tumor, P388D1, using SKY and CGH. **Leukemia**, v. 13, n. 10, p. 1592-1600, 1999.

COLLINGE, J., WHITTINGTON, M.A., SIDLE, K.C., SMITH, C.J., PALMER, M.S., CLARKE, A.R., JEFFERYS, J.G. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature**, v. 370, n. 6487, p. 295-297, 1994.

COMBS, C.K., JOHNSON, D.E., CANNADY, S.B., LEHMAN, T.M., LANDRETH, G.E. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 928-939, 1999.

CORDIER-DIRIKOC, S., CHABRY, J. Temporary depletion of CD11c+ dendritic cells delays lymphoinvasion after intraperitoneal scrapie infection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8933-8936, 2008.

CORDIER-DIRIKOC, S., ZSÜRGER, N., CAZARETH, J., MÉNARD, B., CHABRY, J. Expression profiles of prion and doppel proteins and of their receptors in mouse splenocytes. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 8, p. 2131-2141, 2008.

CORREALE, J., ARIAS, M., GILMORE, W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3365-3374, 1998.

COX, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 9, p. 4719-4725, 1995.

CRIADO, J.R., SÁNCHEZ-ALAVEZ, M., CONTI, B., GIACCHINO, J.L., WILLS, D.N., HENRIKSEN, S.J., RACE, R., MANSON, J.C., CHESEBRO, B., OLDSTONE, M.B. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 19, n. 1-2, p. 255-265, 2005.

CUADROS, M.A., NAVASCUÉS, J. The origin and differentiation of microglial cells during development. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 173-189, 1998.

CUNNINGHAM, C., BOCHE, D., PERRY, V.H. Transforming growth factor beta1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 28, n. 2, p. 107-119, 2002.

CUNNINGHAM, C., CAMPION, S., LUNNON, K., MURRAY, C.L., WOODS, J.F., DEACON, R.M., RAWLINS, J.N., PERRY, V.H. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. **Biological Psychiatry**, 2008 (no prelo - doi: 10.1016/j.biopsych.2008.07.024).

DAMKE, H., BABA, T., WARNOCK, D.E., SCHMID, S.L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 915-934, 1994.

DAMKE, H., BINNS, D.D., UEDA, H., SCHMID, S.L., BABA, T. Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 9, p. 2578-2589, 2001.

DAVIES, P., BAILEY, P.J., GOLDENBERG, M.M., FORD-HUTCHINSON, A.W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 335-357, 1984.

DE ALMEIDA, C.J., CHIARINI, L.B., DA SILVA, J.P., SILVA, P.M., MARTINS, M.A., LINDEN, R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 2, p. 238-246, 2005.

DINARELLO, C.A., GATTI, S., BARTFAI, T. Fever: links with an ancient receptor. **Current Biology**, v. 9, n. 4, p. R147-R150, 1999.

DIOMEDE, L., SOZZANI, S., LUINI, W., ALGERI, M., DE GIOIA, L., CHIESA, R., LIEVENS, P.M., BUGIANI, O., FORLONI, G., TAGLIAVINI, F., SALMONA, M. Activation effects of a prion protein fragment PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ on human leucocytes. **The Biochemical Journal**, v. 320, n. Pt 2, p. 563-570, 1996.

DODELET, V.C., CASHMAN, N.R. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. **Blood**, v. 91, n. 5, p. 1556-1561, 1998.

DORANDEU, A., WINGERTSMANN, L., CHRÉTIEN, F., DELISLE, M.B., VITAL, C., PARCHI, P., MONTAGNA, P., LUGARESI, E., IRONSIDE, J.W., BUDKA, H., GAMBETTI, P., GRAY, F. Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. **Brain Pathology**, v. 8, n. 3, p. 531-537, 1998.

DU, X., POLTORAK, A., WEI, Y., BEUTLER, B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. **European Cytokine Network**, v. 11, n. 3, p. 362-371, 2000.

DÜRIG, J., GIESE, A., SCHULZ-SCHAEFFER, W., ROSENTHAL, C., SCHMÜCKER, U., BIESCHKE, J., DÜHRSEN, U., KRETZSCHMAR, H.A. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. **British Journal of Haematology**, v. 108, n. 3, p. 488-495, 2000.

EL-BENNA, J., DANG, P.M., GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, n. 3, p. 279-289, 2008.

EYLES, J.L., ROBERTS, A.W., METCALF, D., WICKS, I.P. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 9, p. 500-510, 2006.

FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FREED, P.W., WESTCOTT, J.Y., HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 890-898, 1998.

FAURSCHOU, M., BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FERRER, I., PUIG, B., BLANCO, R., MARTI, E. Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neuroscience**, v. 97, n. 4, p. 715-726, 2000.

FERRER, I., RIVERA, R., BLANCO, R., MARTÍ, E. Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurobiology of Disease**, v. 6, n. 2, p. 92-100, 1999.

FÉVRIER, B., RAPOSO, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 415-421, 2004.

FÉVRIER, B., VILETTE, D., LAUDE, H., RAPOSO, G. Exosomes: a bubble ride for prions? **Traffic**, v. 6, n. 1, p. 10-17, 2005.

FISCHER, M., RULICKE, T., RAEBER, A., SAILER, A., MOSER, M., OESCH, B., BRANDNER, S., AGUZZI, A., WEISSMANN, C. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 6, p. 1255-1264, 1996.

FISCHER, M.B., ROECKL, C., PARIZEK, P., SCHWARZ, H.P., AGUZZI, A. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 479-483, 2000.

FONTES, P., ALVAREZ-MARTINEZ, M.T., GROSS, A., CARNAUD, C., KÖHLER, S., LIAUTARD, J.P. Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6229-6236, 2005.

FOURNIER, J.G., ESCAIG-HAYE, F., BILLETTE DE VILLEMEUR, T., ROBAIN, O., LASMEZAS, C.I., DESLYS, J.P., DORMONT, D., BROWN, P. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrPc) in extracerebral tissues. **Cell and Tissue Research**, v. 292, n. 1, p. 77-84, 1998.

FOURNIER, J.G., ESCAIG-HAYE, F., BILLETTE DE VILLEMEUR, T., ROBAIN, O. Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences III**, v. 318, n. 3, p. 339-344, 1995.

FUKUI, M., IMAMURA, R., UMEMURA, M., KAWABE, T., SUDA, T. Pathogen-associated molecular patterns sensitize macrophages to Fas ligand-induced apoptosis and IL-1 beta release. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 4, p. 1868-1874, 2003.

GALLUCCI, S., MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 1, p. 114-119, 2001.

GIESE, A., BROWN, D.R., GROSCUP, M.H., FELDMANN, C., HAIST, I., KRETZSCHMAR, H.A. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. **Brain Pathology**, v. 8, n. 3, p. 449-457, 1998.

GILL, A.C., RITCHIE, M.A., HUNT, L.G., STEANE, S.E., DAVIES, K.G., BOCKING, S.P., RHIE, A.G., BENNETT, A.D., HOPE, J. Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure *in vivo*. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 20, p. 5324-5331, 2000.

GORDON, S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. **Immunology Letters**, v. 65, n. 1-2, p. 5-8, 1999.

GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., FORLENZA, O.V., CABRAL, A.L., VEIGA, S.S., JULIANO, M.A., ROESLER, R., WALZ, R., MINETTI, A., IZQUIERDO, I., MARTINS, V.R., BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 76, n. 1, p. 85-92, 2000.

GRATCHEV, A., KZHYSHKOWSKA, J., KANNOOKADAN, S., OCHSENREITER, M., POPOVA, A., YU, X., MAMIDI, S., STONEHOUSE-USSELMANN, E., MULLER-MOLINET, I., GOOI, L., GOERDT, S. Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 10, p. 6553-6565, 2008.

GRAY, F., CHRÉTIEN, F., ADLE-BIASSETTE, H., DORANDEU, A., EREAU, T., DELISLE, M.B., KOPP, N., IRONSIDE, J.W., VITAL, C. Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-

Jakob disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 58, n. 4, p. 321-328, 1999.

GRIFFITHS, R.E., HEESOM, K.J., ANSTEE, D.J. Normal prion protein trafficking in cultured human erythroblasts. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4518-4525, 2007.

HACHIYA, N.S., IMAGAWA, M., KANEKO, K. The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 3, p. 670-673, 2007.

HAFIZ, F.B., BROWN, D.R. A model for the mechanism of astrogliosis in prion disease. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 16, n. 3, p. 221-232, 2000.

HAJJ, G.N., LOPES, M.H., MERCADANTE, A.F., VEIGA, S.S., DA SILVEIRA, R.B., SANTOS, T.G., RIBEIRO, K.C., JULIANO, M.A., JACCHIERI, S.G., ZANATA, S.M., MARTINS, V.R. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. Pt 11, p. 1915-1926, 2007.

HALLIDAY, S., HOUSTON, F., HUNTER, N. Expression of PrP^C on cellular components of sheep blood. **The Journal of General Virology**, v. 86, n. Pt 5, p. 1571-1579, 2005.

HARRIS, D.A. Cellular biology of prion diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 429-444, 1999.

HASNAIN, S.S., MURPHY, L.M., STRANGE, R.W., GROSSMANN, J.G., CLARKE, A.R., JACKSON, G.S., COLLINGE, J. XAFS study of the high-affinity copper-binding site of human PrP(91-231) and its low-resolution structure in solution. **Journal of Molecular Biology**, v. 311, n. 3, p. 467-473, 2001.

HEIKENWALDER, M., FEDERAU, C., BOEHMER, L., SCHWARZ, P., WAGNER, M., ZELLER, N., HAYBAECK, J., PRINZ, M., BECHER, B., AGUZZI, A. Germinal center B cells are dispensable in prion transport and neuroinvasion. **Journal of Neuroimmunology**, v. 192, n. 1-2, p. 113-123, 2007.

HERMS, J.W., TINGS, T., DUNKER, S., KRETZSCHMAR, H.A. Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. **Neurobiology of Disease**, v. 8, n. 2, p. 324-330, 2001.

HERRMANN, L.M., DAVIS, W.C., KNOWLES, D.P., WARDROP, K.J., SY, M.S., GAMBETTI, P., O' ROURKE, K.I. Cellular prion protein is expressed on peripheral blood mononuclear cells but not platelets of normal and scrapie-infected sheep. **Haematologica**, v. 86, n. 2, p. 146-153, 2001.

HOLADA, K., SIMAK, J., BROWN, P., VOSTAL, J.G. Divergent expression of cellular prion protein on blood cells of human and nonhuman primates. **Transfusion**, v. 47, n. 12, p. 2223-2232, 2007.

HORIUCHI, M., ISHIGURO, N., NAGASAWA, H., TOYODA, Y., SHINAGAWA, M. Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. **Animal Genetics**, v. 29, n. 1, p. 37-40, 1998.

HORIUCHI, M., YAMAZAKI, N., IKEDA, T., ISHIGURO, N., SHINAGAWA, M. A cellular form of prion protein (PrP^C) exists in many non-neuronal tissues of sheep. **The Journal of General Virology**, v. 76, n. Pt 10, p. 2583-2587, 1995.

HORNEMANN, S., GLOCKSHUBER, R. A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP¹²¹⁻²³¹ induced by acidic pH. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6010-6014, 1998.

HORNSHAW, M.P., MCDERMOTT, J.R., CANDY, J.M. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 207, n. 2, p. 621-629, 1995.

HORWICH, A.L., WEISSMAN, J.S. Deadly conformations--protein misfolding in prion disease. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 499-510, 1997.

HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K., AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 9, p. 3749-3752, 1999.

HOUSTON, F., MCCUTCHEON, S., GOLDMANN, W., CHONG, A., FOSTER, J., SISO, S., GONZALEZ, L., JEFFREY, M., HUNTER, N. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. **Blood**, 2008 (no prelo - doi 10.1182/blood-2008-04-152520).

HUEHN, J., SIEGMUND, K., LEHMANN, J.C., SIEWERT, C., HAUBOLD, U., FEUERER, M., DEBES, G.F., LAUBER, J., FREY, O., PRZYBYLSKI, G.K., NIESNER, U., DE LA ROSA, M., SCHMIDT, C.A., BRÄUER, R., BUER, J., SCHEFFOLD, A., HAMANN, A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 3, p. 303-313, 2004.

HUME, D.A., PERRY, V.H., GORDON, S. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. **The Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 1, p. 253-257, 1983.

HUR, K., KIM, J.I., CHOI, S.I., CHOI, E.K., CARP, R.I., KIM, Y.S. The pathogenic mechanisms of prion diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, n. 12, p. 1637-1647, 2002.

HUTTER, G., HEPPNER, F.L., AGUZZI, A. No superoxide dismutase activity of cellular prion protein *in vivo*. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 9, p. 1279-1285, 2003.

INOUE, S., TANAKA, M., HORIUCHI, M., ISHIGURO, N., SHINAGAWA, M. Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 3, p. 175-183, 1997.

ISAACS, J.D., GARDEN, O.A., KAUR, G., COLLINGE, J., JACKSON, G.S., ALTMANN, D.M. The cellular prion protein is preferentially expressed by CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. **Immunology**, 2008 (no prelo - doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02853.x).

ISAACS, J.D., JACKSON, G.S., ALTMANN, D.M. The role of the cellular prion protein in the immune system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 1-8, 2006.

IVANOVA, L., BARMADA, S., KUMMER, T., HARRIS, D.A. Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42409-42421, 2001.

JACKSON, G.S., MURRAY, I., HOSSZU, L.L., GIBBS, N., WALTHO, J.P., CLARKE, A.R., COLLINGE, J. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8531-8535, 2001.

JOBLING, M.F., HUANG, X., STEWART, L.R., BARNHAM, K.J., CURTAIN, C., VOLITAKIS, I., PERUGINI, M., WHITE, A.R., CHERNY, R.A., MASTERS, C.L., BARROW, C.J., COLLINS, S.J., BUSH, A.I., CAPPAL, R. Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶. **Biochemistry**, v. 40, n. 27, p. 8073-8084, 2001.

KÄGI, D., HO, A., ODERMATT, B., ZAKARIAN, A., OHASHI, P.S., MAK, T.W. TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 8, p. 4598-4605, 1999.

KANAANI, J., PRUSINER, S.B., DIACOVO, J., BAEKKESKOV, S., LEGNAME, G. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons *in vitro*. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, n. 5, p. 1373-1386, 2005.

KANATANI, Y., KASUKABE, T., OKABE-KADO, J., HAYASHI, S., YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y., MOTOYOSHI, K., NAGATA, N., HONMA, Y. Transforming growth factor beta and dexamethasone cooperatively enhance c-jun gene expression and inhibit the growth of human monocytoid leukemia cells. **Cell Growth & Differentiation**, v. 7, n. 2, p. 187-196, 1996.

KAPETANOVIC, R., CAVAILLON, J.M. Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 7, n. 6, p. 907-918, 2007.

KIM, J.I., JIN, J.K., CHOI, E.K., CHOI, S.I., CARP, R.I., KIM, Y.S. Overexpression of cyclooxygenase-2 mRNA and protein in the brain of scrapie-infected mice. **Neurobiology of Aging**, v. 21, s. 1, p. 87, 2000.

KIM, J.I., JU, W.K., CHOI, J.H., CHOI, E., CARP, R.I., WISNIEWSKI, H.M., KIM, Y.S. Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 73, n. 1-2, p. 17-27, 1999.

KIMBERLIN, R.H., WALKER, C.A. Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, n. 4, p. 551-562, 1979.

KIMBERLIN, R.H., WALKER, C.A. Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 75, n. 8, p. 618-624, 1982.

KING, F.W., WAWRZYNOW, A., HÖHFELD, J., ZYLICZ, M. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 22, p. 6297-6305, 2001.

KINGSBURY, D.T., SMELTZER, D.A., GIBBS, C.J. JR., GAJDUSEK, D.C. Evidence for normal cell-mediated immunity in scrapie-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 32, n. 3, p. 1176-1180, 1981.

KITAMOTO, T., MURAMOTO, T., MOHRI, S., DOH-URA, K., TATEISHI, J. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. **Journal of Virology**, v. 65, n. 11, p. 6292-6295, 1991.

KLAMT, F., DAL-PIZZOL, F., CONTE DA FROTA, M.L. JR., WALZ, R., ANDRADES, M.E., DA SILVA, E.G., BRENTANI, R.R., IZQUIERDO, I., FONSECA MOREIRA, J.C. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 10, p. 1137-1144, 2001.

KLEIN, M.A., FRIGG, R., FLECHSIG, E., RAEBER, A.J., KALINKE, U., BLUETHMANN, H., BOOTZ, F., SUTER, M., ZINKERNAGEL, R.M., AGUZZI, A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. **Nature**, v. 390, n. 6661, p. 687-690, 1997.

KLEIN, M.A., FRIGG, R., RAEBER, A.J., FLECHSIG, E., HEGYI, I., ZINKERNAGEL, R.M., WEISSMANN, C., AGUZZI, A. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. **Nature Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1429-1433, 1998.

KLEIN, M.A., KAESER, P.S., SCHWARZ, P., WEYD, H., XENARIOS, I., ZINKERNAGEL, R.M., CARROLL, M.C., VERBEEK, J.S., BOTTO, M., WALPORT, M.J., MOLINA, H., KALINKE, U., ACHA-ORBEA, H., AGUZZI, A. Complement facilitates early prion pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 7, n. 4, p. 488-492, 2001.

KONG, F.K., CHEN, C.L., COOPER, M.D. Reversible disruption of thymic function by steroid treatment. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6500-6505, 2002.

KREBS, B., DORNER-CIOSSEK, C., SCHMALZBAUER, R., VASSALLO, N., HERMS, J., KRETZSCHMAR, H.A. Prion protein induced signaling cascades in monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 1, p. 13-22, 2006.

KUBOSAKI, A., NISHIMURA-NASU, Y., NISHIMURA, T., YUSA, S., SAKUDO, A., SAEKI, K., MATSUMOTO, Y., ITOHARA, S., ONODERA, T. Expression of normal cellular prion protein (PrP^C) on T lymphocytes and the effect of copper ion: Analysis by wild-type and prion protein gene-deficient mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 4, p. 810-813, 2003.

KUBOSAKI, A., YUSA, S., NASU, Y., NISHIMURA, T., NAKAMURA, Y., SAEKI, K., MATSUMOTO, Y., ITOHARA, S., ONODERA, T. Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 1, p. 103-107, 2001.

KUWAHARA, C., TAKEUCHI, A.M., NISHIMURA, T., HARAGUCHI, K., KUBOSAKI, A., MATSUMOTO, Y., SAEKI, K., MATSUMOTO, Y., YOKOYAMA, T., ITOHARA, S., ONODERA, T. Prions prevent neuronal cell-line death. **Nature**, v. 400, n. 6741, p. 225-226, 1999.

LAGASSE, E., WEISSMAN, I.L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 197, n. 1-2, p. 139-150, 1996.

LAINÉ, J., MARC, M.E., SY, M.S., AXELRAD, H. Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. **The European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 47-56, 2001.

LASMÉZAS, C., DESLYS, J.P., DORMONT, D. Recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I induce PrP gene expression in PC12 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 196, n. 3, p. 1163-1169, 1993.

LAZARINI, F., CASTELNAU, P., CHERMANN, J.F., DESLYS, J.P., DORMONT, D. Modulation of prion protein gene expression by growth factors in cultured mouse astrocytes and PC-12 cells. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 22, n. 1-4, p. 268-274, 1994.

LAZARINI, F., DESLYS, J.P., DORMONT, D. Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 10, n. 4, p. 343-346, 1991.

LE, Y., YAZAWA, H., GONG, W., YU, Z., FERRANS, V.J., MURPHY, P.M., WANG, J.M. The neurotoxic prion peptide fragment PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1448-1451, 2001

LEE, D.W., SOHN, H.O., LIM, H.B., LEE, Y.G., KIM, Y.S., CARP, R.I., WISNIEWSKI, H.M. Alteration of free radical metabolism in the brain of mice infected with scrapie agent. **Free Radical Research**, v. 30, n. 6, p. 499-507, 1999.

LEE, K.S., MAGALHÃES, A.C., ZANATA, S.M., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R., PRADO, M.A. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 1, p. 79-87, 2001.

LI, A., SAKAGUCHI, S., ATARASHI, R., ROY, B.C., NAKAOKE, R., ARIMA, K., OKIMURA, N., KOPACEK, J., SHIGEMATSU, K. Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 20, n. 5, p. 553-567, 2000.

LIEBERBURG, I. Developmental expression and regional distribution of the scrapie-associated protein mRNA in the rat central nervous system. **Brain Research**, v. 417, n. 2, p. 363-366, 1987.

LILES, W.C., DALE, D.C., KLEBANOFF, S.J. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. **Blood**, v. 86, n. 8, p. 3181-3188, 1995.

LINDEN, R., MARTINS, V.R., PRADO, M.A., CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., BRENTANI, R.R. Physiology of the prion protein. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 673-728, 2008.

LING, E.A., WONG, W.C. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 9-18, 1993.

LLEDO, P.M., TREMBLAY, P., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., NICOLL, R.A. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2403-2407, 1996.

LOPES, M.H., HAJJ, G.N., MURAS, A.G., MANCINI, G.L., CASTRO, R.M., RIBEIRO, K.C., BRENTANI, R.R., LINDEN, R., MARTINS, V.R. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11330-11339, 2005.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MABBOTT, N.A., BROWN, K.L., MANSON, J., BRUCE, M.E. T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. **Immunology**, v. 92, n. 2, p. 161-165, 1997.

MABBOTT, N.A., BRUCE, M.E., BOTTO, M., WALPORT, M.J., PEPYS, M.B. Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. **Nature Medicine**, v. 7, n. 4, p. 485-487, 2001.

MABBOTT, N.A., MACPHERSON, G.G. Prions and their lethal journey to the brain. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 201-211, 2006.

MAGALHÃES, A.C., SILVA, J.A., LEE, K.S., MARTINS, V.R., PRADO, V.F., FERGUSON, S.S., GÓMEZ, M.V., BRENTANI, R.R., PRADO, M.A. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 33311-33318, 2002.

MAGLIO, L.E., MARTINS, V.R., IZQUIERDO, I., RAMIREZ, O.A. Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. **Brain Research**, v. 1097, n. 1, p. 11-18, 2006.

MAGLIO, L.E., PEREZ, M.F., MARTINS, V.R., BRENTANI, R.R., RAMIREZ, O.A. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 131, n. 1-2, p. 58-64, 2004.

MAHAL, S.P., ASANTE, E.A., ANTONIOU, M., COLLINGE, J. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. **Gene**, v. 268, n. 1-2, p. 105-114, 2001.

MAISSEN, M., ROECKL, C., GLATZEL, M., GOLDMANN, W., AGUZZI, A. Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. **Lancet**, v. 357, n. 9273, p. 2026-2028, 2001.

MANSON, J., WEST, J.D., THOMSON, V., MCBRIDE, P., KAUFMAN, M.H., HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development**, v. 115, n. 1, p. 117-122, 1992.

MANSON, J.C., CLARKE, A.R., HOOPER, M.L., AITCHISON, L., MCCONNELL, I., HOPE, J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Molecular Neurobiology**, v. 8, n. 2-3, p. 121-127, 1994.

MARC, D., MERCEY, R., LANTIER, F. Scavenger, transducer, RNA chaperone? What ligands of the prion protein teach us about its function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 7-8, p. 815-829, 2007.

MARIE, C., PITTON, C., FITTING, C., CAVAILLON, J.M. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS-and/or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. **Mediators of Inflammation**, v. 5, n. 5, p. 334-340, 1996.

MARTINON, F. Detection of immune danger signals by NALP3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 507-511, 2008.

MARTINON, F., TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 8, p. 447-454, 2005.

MARTINS, V.R., LINDEN, R., PRADO, M.A., WALZ, R., SAKAMOTO, A.C., IZQUIERDO, I., BRANTANI, R.R. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Letters**, v. 512, n. 1-3, p. 25-28, 2002.

MATTEI, V., GAROFALO, T., MISASI, R., CIRCELLA, A., MANGANELLI, V., LUCANIA, G., PAVAN, A., SORICE, M. Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. **FEBS Letters**, v. 560, n. 1-3, p. 14-18, 2004.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301-305, 2002.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 991-1045, 1994.

MCBRIDE, P.A., EIKELENBOOM, P., KRAAL, G., FRASER, H., BRUCE, M.E. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. **The Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 413-418, 1992.

MCKINLEY, M.P., HAY, B., LINGAPPA, V.R., LIEBERBURG, I., PRUSINER, S.B. Developmental expression of prion protein gene in brain. **Developmental Biology**, v. 121, n. 1, p. 105-110, 1987.

MCKINLEY, M.P., TARABOULOS, A., KENAGA, L., SERBAN, D., STIEBER, A., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., GONATAS, N. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. **Laboratory Investigation**, v. 65, n. 6, p. 622-630, 1991.

MEAGHER, L.C., COUSIN, J.M., SECKL, J.R., HASLETT, C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 11, p. 4422-4428, 1996.

MEDA, L., CASSATELLA, M.A., SZENDREI, G.I., OTVOS, L. JR., BARON, P., VILLALBA, M., FERRARI, D., ROSSI, F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. **Nature**, v. 374, n. 6523, p. 647-650, 1995.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C.A. JR. An ancient system of host defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 1, p. 12-15, 1998.

MEYLAN, E., TSCHOPP, J., KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, 2006.

MIELE, G., ALEJO BLANCO, A.R., BAYBUTT, H., HORVAT, S., MANSON, J., CLINTON, M. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. **Gene Expression**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2003.

MIELE, G., JEFFREY, M., TURNBULL, D., MANSON, J., CLINTON, M. Ablation of cellular prion protein expression affects mitochondrial numbers and morphology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 2, p. 372-377, 2002.

MILHAVET, O., LEHMANN, S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. **Brain Research Brain Research Reviews**, v. 38, n. 3, p. 328-339, 2002.

MOBLEY, W.C., NEVE, R.L., PRUSINER, S.B., MCKINLEY, M.P. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9811-9815, 1988.

MONTRASIO, F., FRIGG, R., GLATZEL, M., KLEIN, M.A., MACKAY, F., AGUZZI, A., WEISSMANN, C. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. **Science**, v. 288, n. 5469, p. 1257-1259, 2000.

MOORE, R.C., LEE, I.Y., SILVERMAN, G.L., HARRISON, P.M., STROME, R., HEINRICH, C., KARUNARATNE, A., PASTERNAK, S.H., CHISHTI, M.A., LIANG, Y., MASTRANGELO, P., WANG, K., SMIT, A.F., KATAMINE, S., CARLSON, G.A., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B., MELTON, D.W., TREMBLAY, P., HOOD, L.E., WESTAWAY, D. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 4, p. 797-817, 1999.

MOYA, K.L., SALÈS, N., HÄSSIG, R., CRÉMINON, C., GRASSI, J., DI GIAMBERARDINO, L. Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 1, p. 58-65, 2000.

NAIR, A., BONNEAU, R.H. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 171, n. 1-2, p. 72-85, 2006.

NASLAVSKY, N., SHMEEDA, H., FRIEDLANDER, G., YANAI, A., FUTERMAN, A.H., BARENHOLZ, Y., TARABOULOS, A. Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 30, p. 20763-20771, 1999.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

NEGRO, A., BALLARIN, C., BERTOLI, A., MASSIMINO, M.L., SORGATO, M.C. The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 17, n. 3, p. 521-538, 2001.

NEWBURGER, P.E. Disorders of neutrophil number and function. **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 104-110, 2006.

NICOTERA, P. A route for prion neuroinvasion. **Neuron**, v. 31, n. 3, p. 345-348, 2001.

NIELSEN, C.H., FISCHER, E.M., LESLIE, R.G. The role of complement in the acquired immune response. **Immunology**, v. 100, n. 1, p. 4-12, 2000.

NISHIMURA, T., SAKUDO, A., NAKAMURA, I., LEE, D.C., TANIUCHI, Y., SAEKI, K., MATSUMOTO, Y., OGAWA, M., SAKAGUCHI, S., ITOHARA, S., ONODERA, T. Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, n. 1, p. 218-222, 2004.

NITTOH, T., FUJIMORI, H., KOZUMI, Y., ISHIHARA, K., MUE, S., OHUCHI, K. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 354, n. 1, p. 73-81, 1998.

NORDEEN, S.K., SUH, B.J., KÜHNEL, B., HUTCHISON, C.A. 3D. Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 12, p. 1866-1873, 1990.

NUNZIANTE, M., GILCH, S., SCHÄTZL, H.M. Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3726-3734, 2003.

O'DONNELL, E., VEREKER, E., LYNCH, M.A. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. **The European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 345-352, 2000.

OESCH, B., WESTAWAY, D., WÄLCHLI, M., MCKINLEY, M.P., KENT, S.B., AEBERSOLD, R., BARRY, R.A., TEMPST, P., TEPLow, D.B., HOOD, L.E., PRUSINER, S.B., WEISSMANN, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, v. 40, n. 4, p. 735-746, 1985.

PAMMER, J., CROSS, H.S., FROBERT, Y., TSCHACHLER, E., OBERHUBER, G. The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. **Virchows Archiv**, v. 436, n. 5, p. 466-472, 2000.

PAMMER, J., WENINGER, W., TSCHACHLER, E. Human keratinocytes express cellular prion-related protein *in vitro* and during inflammatory skin diseases. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1353-1358, 1998.

PAN, K.M., BALDWIN, M., NGUYEN, J., GASSET, M., SERBAN, A., GROTH, D., MEHLHORN, I., HUANG, Z., FLETTERICK, R.J., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 10962-10966, 1993.

PAULY, P.C., HARRIS, D.A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33107-33110, 1998.

PERERA, W.S., HOOPER, N.M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. **Current Biology**, v. 11, n. 7, p. 519-523, 2001.

PERRY, V.H., BELL, M.D., BROWN, H.C., MATYSZAK, M.K. Inflammation in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 5, p. 636-641, 1995.

PERRY, V.H., BOLTON, S.J., ANTHONY, D.C., BETMOUNI, S. The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. **Research in Immunology**, v. 149, n. 7-8, p. 721-725, 1998.

PERRY, V.H., CUNNINGHAM, C., BOCHE, D. Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 15, n. 3, p. 349-354, 2002.

PERRY, V.H., LAWSON, L.J., REID, D.M. Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 3, p. 399-406, 1994.

PFEFFER, K., MATSUYAMA, T., KÜNDIG, T.M., WAKEHAM, A., KISHIHARA, K., SHAHINIAN, A., WIEGMANN, K., OHASHI, P.S., KRÖNKE, M., MAK, T.W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 457-467, 1993.

PHAM, C.T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 6-7, p. 1317-1333, 2008.

POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M.Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B., BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998.

PORTER, D.D., PORTER, H.G., COX, N.A. Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. **Journal of Immunology**, v. 111, n. 5, p. 1407-1410, 1973.

PORTO-CARREIRO, I., FEVRIER, B., PAQUET, S., VILETTE, D., RAPOSO, G. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. **Blood Cells Molecules & Diseases**, v. 35, n. 2, p. 143-148, 2005.

PRADO, M.A., ALVES-SILVA, J., MAGALHÃES, A.C., PRADO, V.F., LINDEN, R., MARTINS, V.R., BRENTANI, R.R. PrP^C on the road: trafficking of the cellular prion protein. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, n. 4, p. 769-781, 2004.

PREMZL, M., DELBRIDGE, M., GREASY, J.E., WILSON, P., JOHNSON, M., DAVIS, J., KUCZEK, E., MARSHALL GRAVES, J.A. The prion protein gene: identifying regulatory signals using marsupial sequence. **Gene**, v. 349, p. 121-134, 2005.

PRESKY, D.H., LOW, M.G., SHEVACH, E.M. Role of phosphatidylinositol-anchored proteins in T cell activation. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 3, p. 860-868, 1990.

PRINZ, M., HEIKENWALDER, M., SCHWARZ, P., TAKEDA, K., AKIRA, S., AGUZZI, A. Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signalling. **EMBO Reports**, v. 4, n. 2, p. 195-199, 2003.

PRUSINER, S.B. An introduction to prion biology and diseases. In: _____. **Prion biology and diseases**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. p. 1-66.

PRUSINER, S.B. Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prions. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 3, n. 1-2, p. 52-78, 1989.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13363-13383, 1998.

PRUSINER, S.B., GROTH, D., SERBAN, A., KOEHLER, R., FOSTER, D., TORCHIA, M., BURTON, D., YANG, S.L., DEARMOND, S.J. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 22, p. 10608-10612, 1993.

PRUSINER, S.B., SCOTT, M., FOSTER, D., PAN, K.M., GROTH, D., MIRENDA, C., TORCHIA, M., YANG, S.L., SERBAN, D., CARLSON, G.A., HOPPE, P.C., WESTAWAY, D., DEARMOND, S.J. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. **Cell**, v. 63, n. 4, p. 673-686, 1990.

PUCKETT, C., CONCANNON, P., CASEY, C., HOOD, L. Genomic structure of the human prion protein gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 2, p. 320-329, 1991.

RAEBER, A.J., KLEIN, M.A., FRIGG, R., FLECHSIG, E., AGUZZI, A., WEISSMANN, C. PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 10, p. 2702-2706, 1999.

RAYMOND, C.R., AUCOUTURIER, P., MABBOTT, N.A. *In vivo* depletion of CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7758-7766, 2007.

REEVES, E.P., LU, H., JACOBS, H.L., MESSINA, C.G., BOLSOVER, S., GABELLA, G., POTMA, E.O., WARLEY, A., ROES, J., SEGAL, A.W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 291-297, 2002.

REZAIIE, P., LANTOS, P.L. Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. **Brain Research Brain Research Reviews**, v. 35, n. 1, p. 55-72, 2001.

RIZZARDINI, M., CHIESA, R., ANGERETTI, N., LUCCA, E., SALMONA, M., FORLONI, G., CANTONI, L. Prion protein fragment 106-126 differentially induces heme oxygenase-1 mRNA in cultured neurons and astroglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 2, p. 715-720, 1997.

ROSSI, D., COZZIO, A., FLECHSIG, E., KLEIN, M.A., RÜLICKE, T., AGUZZI, A., WEISSMANN, C. Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 4, p. 694-702, 2001.

ROUCOU, X., LEBLANC, A.C. Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 1, p. 3-11, 2005.

SAEKI, K., MATSUMOTO, Y., HIROTA, Y., MATSUMOTO, Y., ONODERA, T. Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. **Virus Genes**, v. 12, n. 1, p. 15-20, 1996a.

SAEKI, K., MATSUMOTO, Y., MATSUMOTO, Y., ONODERA, T. Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, n. 1, p. 47-52, 1996b.

SAEZ-VALERO, J., ANGERETTI, N., FORLONI, G. Caspase-3 activation by beta-amyloid and prion protein peptides is independent from their neurotoxic effect. **Neuroscience Letters**, v. 293, n. 3, p. 207-210, 2000.

SAKAGUCHI, S., KATAMINE, S., NISHIDA, N., MORIUCHI, R., SHIGEMATSU, K., SUGIMOTO, T., NAKATANI, A., KATAOKA, Y., HOUTANI, T., SHIRABE, S., OKADA, H., HASEGAWA, S., MIYAMOTO, T., NODA, T. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature**, v. 380, n. 6574, p. 528-531, 1996.

SALÈS, N., RODOLFO, K., HÄSSIG, R., FAUCHEUX, B., DI GIAMBERARDINO, L., MOYA, K.L. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. **The European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 2464-2471, 1998.

SANTUCCIONE, A., SYTNYK, V., LESHCHYNS'KA, I., SCHACHNER, M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. **The Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 2, p. 341-354, 2005.

SATOH, J., KUROHARA, K., YUKITAKE, M., KURODA, Y. Constitutive and cytokine-inducible expression of prion protein gene in human neural cell lines. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 57, n. 2, p. 131-139, 1998.

SAUER, H., WEFER, K., VETRUGNO, V., POCCHIARI, M., GISSEL, C., SACHINIDIS, A., HESCHELER, J., WARTENBERG, M. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 6, p. 586-594, 2003.

SCHMIERER, B., HILL, C.S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 970-982, 2007.

SETHI, S., LIPFORD, G., WAGNER, H., KRETZSCHMAR, H. Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. **Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 229-230, 2002.

SHYNG, S.L., HEUSER, J.E., HARRIS, D.A. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. **The Journal of Cell Biology**, v. 125, n. 6, p. 1239-1250, 1994.

SHYNG, S.L., HUBER, M.T., HARRIS, D.A. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15922-15928, 1993.

SHYNG, S.L., MOULDER, K.L., LESKO, A., HARRIS, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 24, p. 14793-14800, 1995.

SHYU, W.C., HARN, H.J., SAEKI, K., KUBOSAKI, A., MATSUMOTO, Y., ONODERA, T., CHEN, C.J., HSU, Y.D., CHIANG, Y.H. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. **Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2002.

SHYU, W.C., KAO, M.C., CHOU, W.Y., HSU, Y.D., SOONG, B.W. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. **Neuroreport**, v. 11, n. 4, p. 771-774, 2000.

SMITH, E.L., BATUMAN, O.A., TROST, R.C., COPLAN, J.D., ROSENBLUM, L.A. Transforming growth factor-beta 1 and cortisol in differentially reared primates. **Brain Behavior and Immunity**, v. 16, n. 2, p. 140-149, 2002.

SMOAK, K.A., CIDLOWSKI, J.A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 10-11, p. 697-706, 2004.

SPINNER, D.S., CHO, I.S., PARK, S.Y., KIM, J.I., MEEKER, H.C., YE, X., LAFAUCI, G., KERR, D.J., FLORY, M.J., KIM, B.S., KASCSAK, R.B., WISNIEWSKI, T., LEVIS, W.R., SCHULLER-LEVIS, G.B., CARP, R.I., PARK, E., KASCSAK, R.J. Accelerated prion disease pathogenesis in Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling-mutant mice. **Journal of Virology**, 2008 (no prelo - doi:10.1128/JVI.00522-08).

SPINNER, D.S., KASCSAK, R.B., LAFAUCI, G., MEEKER, H.C., YE, X., FLORY, M.J., KIM, J.I., SCHULLER-LEVIS, G.B., LEVIS, W.R., WISNIEWSKI, T., CARP, R.I., KASCSAK, R.J. CpG oligodeoxynucleotide-enhanced humoral immune response and production of antibodies to prion protein PrP^{Sc} in mice immunized with 139A scrapie-associated fibrils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 6, p. 1374-1385, 2007.

STEELE, A.D., EMSLEY, J.G., OZDINLER, P.H., LINDQUIST, S., MACKLIS, J.D. Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3416-3421, 2006.

STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nature Immunology**, v. 5, n. 6, p. 575-581, 2004.

STUART, L.M., EZEKOWITZ, R.A. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 539-550, 2005.

SUGIMOTO, N., OIDA, T., HIROTA, K., NAKAMURA, K., NOMURA, T., UCHIYAMA, T., SAKAGUCHI, S. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. **International Immunology**, v. 18, n. 8, p. 1197-1209, 2006.

SUNYACH, C., JEN, A., DENG, J., FITZGERALD, K.T., FROBERT, Y., GRASSI, J., MCCAFFREY, M.W., MORRIS, R. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 14, p. 3591-3601, 2003.

TABETA, K., GEORGEL, P., JANSSEN, E., DU, X., HOEBE, K., CROZAT, K., MUDD, S., SHAMEL, L., SOVATH, S., GOODE, J., ALEXOPOULOU, L., FLAVELL, R.A., BEUTLER, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3516-3521, 2004.

TAKAHASHI, T., TANAKA, M., BRANNAN, C.I., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., SUDA, T., NAGATA, S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 969-976, 1994.

TAKEDA, K., AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TATEISHI, J., KITAMOTO, T., KRETZSCHMAR, H., MEHRAEIN, P. Immunohistological evaluation of Creutzfeldt-Jakob disease with reference to the type PrPres deposition. **Clinical Neuropathology**, v. 15, n. 6, p. 358-360, 1996.

THOMAS, L.J., DEGASPERI, R., SUGIYAMA, E., CHANG, H.M., BECK, P.J., ORLEAN, P., URAKAZE, M., KAMITANI, T., SAMBROOK, J.F., WARREN, C.D., YEH, E.T. Functional analysis of T-cell mutants defective in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor. Relative importance of glycosylphosphatidylinositol anchor versus N-linked glycosylation in T-cell activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23175-23184, 1991.

TOBLER, I., GAUS, S.E., DEBOER, T., ACHERMANN, P., FISCHER, M., RÜLICHE, T., MOSER, M., OESCH, B., MCBRIDE, P.A., MANSON, J.C. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. **Nature**, v. 380, n. 6575, p. 639-642.

TONI, M., MASSIMINO, M.L., GRIFFONI, C., SALVATO, B., TOMASI, V., SPISNI, E. Extracellular copper ions regulate cellular prion protein (PrP^C) expression and metabolism in neuronal cells. **FEBS Letters**, v. 579, n. 3, p. 741-744, 2005.

VARELA-NALLAR, L., TOLEDO, E.M., LARRONDO, L.F., CABRAL, A.L., MARTINS, V.R., INESTROSA, N.C. Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 290, n. 1, p. C271-C281, 2006.

VASSELON, T., DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1033-1041, 2002.

VEREKER, E., O'DONNELL, E., LYNCH, A., KELLY, A., NOLAN, Y., LYNCH, M.A. Evidence that interleukin-1beta and reactive oxygen species production play a pivotal role in stress-induced impairment of LTP in the rat dentate gyrus. **The European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1809-1819, 2001.

VEY, M., PILKUHN, S., WILLE, H., NIXON, R., DEARMOND, S.J., SMART, E.J., ANDERSON, R.G., TARABOULOS, A., PRUSINER, S.B. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14945-14949, 1996.

VILES, J.H., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B., GOODIN, D.B., WRIGHT, P.E., DYSON, H.J. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2042-2047, 1999.

WAGGONER, D.J., DRISALDI, B., BARTNIKAS, T.B., CASARENO, R.L., PROHASKA, J.R., GITLIN, J.D., HARRIS, D.A. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7455-7458, 2000.

WALLACH, D., VARFOLOMEEV, E.E., MALININ, N.L., GOLTSEV, Y.V., KOVALENKO, A.V., BOLDIN, M.P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 331-367, 1999.

WALZ, R., AMARAL, O.B., ROCKENBACH, I.C., ROESLER, R., IZQUIERDO, I., CAVALHEIRO, E.A., MARTINS, V.R., BRENTANI, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia**, v. 40, n. 12, p. 1679-1682, 1999.

WATARAI, M., KIM, S., ERDENEBAATAR, J., MAKINO, S., HORIUCHI, M., SHIRAHATA, T., SAKAGUCHI, S., KATAMINE, S. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 1, p. 5-17, 2003.

WECHSELBERGER, C., WURM, S., PFARR, W., HÖGLINGER, O. The physiological functions of prion protein. **Experimental Cell Research**, v. 281, n. 1, p. 1-8, 2002.

WEST, A.P., KOBLANSKY, A.A., GHOSH, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 409-437, 2006.

WESTAWAY, D., COOPER, C., TURNER, S., DA COSTA, M., CARLSON, G.A., PRUSINER, S.B. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 14, p. 6418-6422, 1994.

WHITE, A.R., COLLINS, S.J., MAHER, F., JOBLING, M.F., STEWART, L.R., THYER, J.M., BEYREUTHER, K., MASTERS, C.L., CAPPAL, R. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 5, p. 1723-1730, 1999.

WILLIAMSON, R.A., PERETZ, D., SMORODINSKY, N., BASTIDAS, R., SERBAN, H., MEHLHORN, I., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., BURTON, D.R. Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 14, p. 7279-7282, 1996.

WION, D., L.E., BERT. M., BRACHET, P. Messenger RNAs of beta-amyloid precursor protein and prion protein are regulated by nerve growth factor in PC12 cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 387-393, 1988.

WYSS-CORAY, T., LIN, C., VON EUW, D., MASLIAH, E., MUCKE, L., LACOMBE, P. Alzheimer's disease-like cerebrovascular pathology in transforming growth factor-beta 1 transgenic mice and functional metabolic correlates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 903, p. 317-323, 2000.

WYSS-CORAY, T., MASLIAH, E., MALLORY, M., MCCONLOGUE, L., JOHNSON-WOOD, K., LIN, C., MUCKE, L. Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 603-606, 1997.

YOO, H.G., SHIN, B.A., PARK, J.S., LEE, K.H., CHAY, K.O., YANG, S.Y., AHN, B.W., JUNG, Y.D. IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 2, p. 251-256, 2002.

ZABEL, M.D., HEIKENWALDER, M., PRINZ, M., ARRIGHI, I., SCHWARZ, P., KRANICH, J., VON TEICHMAN, A., HAAS, K.M., ZELLER, N., TEDDER, T.F., WEIS, J.H., AGUZZI, A. Stromal complement receptor CD21/35 facilitates lymphoid prion colonization and pathogenesis. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6144-6152, 2007.

ZANATA, S.M., LOPES, M.H., MERCADANTE, A.F., HAJJ, G.N., CHIARINI, L.B., NOMIZO, R., FREITAS, A.R., CABRAL, A.L., LEE, K.S., JULIANO, M.A., DE OLIVEIRA, E., JACHIERI, S.G., BURLINGAME, A., HUANG, L., LINDEN, R., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307-3316, 2002.

ZARBOCK, A., LEY, K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 1-7, 2008.

ZAWEL, L., DAI, J.L., BUCKHAULTS, P., ZHOU, S., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., KERN, S.E. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. **Molecular Cell**, v. 1, n. 4, p. 611-617, 1998.

ZAWLIK, I., WITUSIK, M., HULAS-BIGOSZEWSKA, K., PIASKOWSKI, S., SZYBKA, M., GOLANSKA, E., LIBERSKI, P.P., RIESKE, P. Regulation of PrP^C expression: nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells. **Neuroscience Letters**, v. 400, n. 1-2, p. 58-62, 2006.

ZHANG, C.C., STEELE, A.D., LINDQUIST, S., LODISH, H.F. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2184-2189, 2006.

ZHANG, J., RIVEST, S. Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 3, p. 855-864, 2001.

ZHANG, X., KIMURA, Y., FANG, C., ZHOU, L., SFYROERA, G., LAMBRIS, J.D., WETSEL, R.A., MIWA, T., SONG, W.C. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement *in vivo*. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 228-236, 2007.

ZOU, S., FANG, C.T., SCHONBERGER, L.B. Transfusion transmission of human prion diseases. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 22, n. 1, p. 58-69, 2008.

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](#)