



ORDEM DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS

Etiopatogenia das prionoses animais e suas bases

J.H.R. Dias Correia

A.A. Dias Correia

ORDEM DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS

**Etiopatogenia das Prionoses
Animais e suas Bases.**

2004-2005.

J.H.R. Dias Correia,
A.A. Dias Correia.

Ciisa. Departamento de Morfologia e Função. (Bioquímica)
Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa
Rua Prof. Cid dos Santos
Pólo Universitário da Ajuda
1300-477 Lisboa, Portugal

In memoriam José Leal Armas

Índice geral:

1 – Introdução.	8
2 – Agentes etiológicos das prionoses, seus precursores e condicionalismos.	11
2.1 – Propriedades gerais dos PrP.	11
2.2 – Genoma e TSE.	14
Polimorfismos do PrPc.	15
Heterogeneidade do PrPc.	16
2.3 – Estirpes dos agentes das TSE.	16
2.4 – Disseminação genérica dos príões nos organismos animais.	17
2.5 – Biologia do PrPc.	22
2.5.1 – Expressão e estrutura.	22
2.5.2 – Movimento e rearranjos moleculares.	23
2.5.3 – Biossíntese do PrPc e seu processamento.	24
2.5.4 – Topologia da proteína PrP.	26
2.5.5 – Localização sub-celular e trânsito do PrPc.	29
2.5.5.1.-Tráfego do PrPc.	31
2.5.5.1.1 –Organelos envolvidos no tráfego do PrPc.	32
2.5.5.1.2 – Tráfego do PrPc em vias endossomais mediada por caveolae	35
2.5.5.2 – Internamento dos príões.	36
2.5.6 – Transporte inclusivé retrógrado para o ER dos PrPc e possível papel das Rab proteínas.	37
2.6 – Biologia do PrPsc.	40
2.6.1 - Transferência entre células do PrPc.	40
2.6.2 – Vias de formação do PrPsc.	43
2.6.3 – Aquisição do PrPsc extracelular.	46
2.6.4 – Conversão do PrPc em PrPsc.	47
2.6.5 – Balanço entre propagação/degradação do PrPsc.	50
3 – Envolvimento nas TSE do sistema imunitário, células, tecidos, órgãos e outras funções biológicas.	53
3.1 – Sistema imunitário e TSE.	53
3.2 – Células, imunidade e suas bases.\	55
3.3 – Células dendríticas (DC) suas origens e interações.	62
3.4 – Células foliculares dendríticas (FDC) e centros germinativos (GC) suas funções e interações.	72
Papel das FDC na patogénese dos príões.	75
3.5 – Sistema complemento e príões.	77
Papel do complemento nas prionoses.	82

3.6 – Células M no intestino.	83
Células DC e transporte do PrPsc a partir do intestino.	86
Sistema nervoso entérico, PrPsc e PrPc.	87
3.7 – Características gerais do sistema nervoso e suas bases.	88
3.8 – Expressão selectiva do PrPc pelos neurónios do sistema nervoso central (CNS).	93
Transporte do PrPsc nos nervos.	94
3.9 – Expressão selectiva do PrPc em tecidos periféricos.	96
4 – Linfoinvasão, neuroinvasão e outras características dominantes na patogenia das TSE.	97
4.1 – Integração evolutiva.	97
4.2 – Linfoinvasão e neuroinvasão.	101
4.3 – Patogénese das TSE.	106
4.4 – Marcha da infecção nas TSE.	109
4.4.1 – Aspectos dominantes das TSE em bovinos, ovinos, ratos, etc.	112
4.4.2 – Distribuição das isoformas patogénicas PrP ^{Sc} em cervídeos.	114
4.4.3 – Sequência no rato (infecção oral) da evolução da infecciosidade por BSE ou por <i>scrapie</i> .	117
4.4.4 – Distribuição relativa no rato (infecção oral) da infecciosidade por BSE ou por <i>scrapie</i> .	119
4.4.5 – Comparação no rato da infecciosidade desencadeada pelas vias oral e intraperitoneal.	119
4.4.6 – Aspectos das fases finais das prionoses.	121
4.5 – Título de infecciosidade na patogenia da BSE e <i>scrapie</i> e sua distribuição por animais, tecidos e órgãos.	123
4.6 – Doenças priónicas subclínicas.	130
4.7 – Transmissão entre animais.	132
4.8 – Priões nas massas musculares.	133
4.9 – Transfusões de sangue e priões.	136
5 – Bibliografia.	138

Estruturação da obra:

O texto encontra-se organizado em cinco partes.

Na primeira parte faz-se uma introdução sucinta ao tema.

Na segunda parte procura-se rever e actualizar as propriedades gerais dos príões animais e suas interrelações com o genoma dos animais, com os polimorfismos e heterogeneidade do PrPc e com as estirpes infecciosas. Aborda-se depois a biologia dos príões celulares em diversíssimos aspectos, bem como a biologia do agente infeccioso resultante.

Na terceira parte evoca-se o papel do sistema imunitário nas TSE bem como as células e os factores possivelmente envolvidos desde a porta de entrada do agente infeccioso até à sua localização no CNS.

Na quarta parte procura-se integrar o processo evolutivo das TSE abordando a linfoinvasão e a neuroinvasão, tal como a marcha da infecção e sua patogenia sobretudo nos casos de *scrapie* e da BSE, abordando depois a distribuição da infecciosidade por processos e por animais, tecidos e órgãos, as formas subclínicas das prionoses, a possível transmissibilidade entre o animais, e ainda a provável presença de infecciosidade nas massas musculares e no sangue.

Na última parte houve a preocupação de referenciar todas as obras fundamentais (quasi quatro centenas) de apoio ao texto e cuja consulta permitirá aos leitores outras abordagens e outros desenvolvimentos em consonância com os interesses sectoriais.

Objectivos:

Os objectivos deste texto são em primeiro lugar o de contribuir para a formação de todos aqueles envolvidos com as doenças dos animais e com os seus reflexos em todo o meio envolvente, inclusivé no consumo público de produtos de origem animal.

As prionoses têm nos últimos anos surgido no nosso país com particular acuidade, tal como em todo o mundo, desencadeando inúmeros trabalhos de I&DE e de divulgação, os quais não são de fácil acesso, dada a sua dispersão e consulta por vezes morosa e até relativamente inacessível.

Entendemos que o papel dos docentes universitários passa sobretudo por uma actualização permanente de conhecimentos, em ordem a fazer a triagem de tudo aquilo que possa interessar aos seus estudantes de graduação e *post-graduação*, e também em ordem a seleccionar e divulgar aquilo que venha complementar a formação contínua indispensável dos já licenciados em função da época em que obtiveram a licenciatura e das acções de formação desencadeadas sectorialmente.

Certamente que é esta uma das razões que leva a que os trabalhos desta índole publicados no formato de *Annual Reviews* sejam de longe os trabalhos mais pontuados no *Journal Impact Factor* ou *Journal Citation Reports* que reportam o *ranking* de milhares e milhares de publicações de todo o mundo.

Destinatários do texto: médicos veterinários; estudantes de medicina veterinária e das áreas a seguir referidas: médicos de saúde pública; citologistas; patologistas; higio-sanitaristas; engenheiros zotécnicos; técnicos de produção animal; bioquímicos; biólogos celulares e moleculares; genéticistas; biotecnologistas; imunologistas.

1 – Introdução:

As prionoses ou encefalopatias espongiformes transmissíveis dos animais (TSE ou *transmissible spongiform encephalopathies*) são doenças neurodegenerativas com um longo período de incubação e cujas lesões se restringem ao sistema nervoso central (CNS ou *central nervous system*) apesar da sua patogenia implicar uma primeira replicação dos agentes infecciosos nos órgãos linfóides (nos bovinos afectados pela BSE (ou *bovine spongiform encephalopathy*) há aparentemente ausência de infecciosidade nos órgãos linfáticos (Thielen *et alii*, 2001)) seguindo-se a fase de neuroinvasão.

A patologia típica das TSE é uma vacuolização (espongiose) não inflamatória no pericárium neural e na matéria cinzenta do neuropilo, podendo ocasionalmente haver deposição de placas amilóides em certas regiões do cérebro e menos frequentemente na espinal medula, podendo os períodos de incubação da doença variar de vários meses até décadas (Weissmann *et alii*, 2001).

As TSE levam à degenerescência e morte dos neurónios na ausência de inflamação e resposta imunológica. A tríade de alterações neuropatológicas não específicas observadas em microscopia óptica são as seguintes segundo Hadlow (1999):

- a) alteração espongiforme no neuropilo da matéria cinzenta do CNS;
- b) a degenerescência neuronal afectando os corpos das células neuronais;
- c) a astrocitose com hipertrofia e hiperplasia dos astrocitos da matéria cinzenta.

A acumulação no cérebro dos animais de formas patológicas da proteína priónica formando densos agregados com uma estrutura fibrilar e propriedades tinturiais de amilóide, formando placas amilóides, são raras no *scrapie* e na BSE, e comuns na CWD (*chronic wasting disease*) dos cervídeos.

Os bovinos afectados por BSE revelam na sua fase clínica um comportamento anormal, com os animais receosos, com posicionamentos anormais com os membros muito afastados, com hiperestesia a estímulos auditivos e tácteis, marcada hipermetria dos membros posteriores, com mioclonias de músculos individuais na espádua, na região cervical ventral e na porção superior dos membros posteriores, assim como *clonus* nos membros anteriores (Scott *et alii*, 1989).

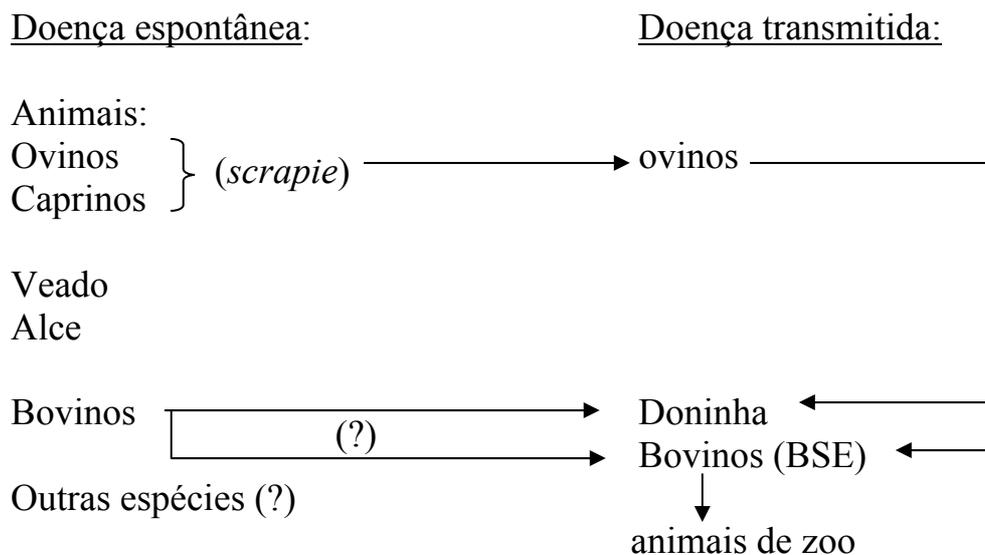
Está estabelecido pela Comissão Europeia que a incidência de BSE clínica em bovinos com menos de 30 meses de idade é de cerca de 0,05%. Dados experimentais sugerem que para vitelos expostos oralmente à infecção pela BSE são necessárias doses da ordem das 100 gramas de matéria cerebral infectada para originar um período de incubação variável mas com um mínimo de cerca de 30 meses (Wells e Hawking, 2003).

O *scrapie*, ou seja a TSE que afecta os ovinos, tem os sinais clínicos típicos com comportamento social perturbado nos animais, seguido de incoordenação motora ou ataxia com tremuras (Cockett *et alii*, 2001), prurido e estes sinais clínicos podem perdurar de duas semanas a seis meses, surgindo no cérebro durante fases mais avançadas da doença degenerescências dos neurónios, formação de vacúolos, e proliferação das células astrogliais.

O *scrapie* afecta os ovinos adultos de qualquer idade mas a incidência de sintomas clínicos predomina aos 42 meses, sendo raros casos clínicos nos ovinos com menos de um ano de idade (Heggebo *et alii*, 2002). Os sintomas clínicos são antecidos pela acumulação de PrPsc nos tecidos linfóides, o que ocorre vários meses antes da sintomatologia clínica, tendo inclusivamente sido detectado PrPsc em animais com apenas cinco meses de idade expostos ao *scrapie* natural (Heggebo *et alii*, 2002).

Os agentes causadores das TSE ou priões são compostos pela proteína do hospedeiro (PrPc) modificada (PrPsc) que se acumula nos órgãos alvo (Lasmizas, 2003).

No quadro 1 seguinte referimos, segundo Brown e Bradley (1998), as interrelações conhecidas e especulativas das TSE nos animais:



Quadro 1

O *scrapie* foi primeiramente descrito no século dezoito e em 1936 provou-se que era uma doença transmissível.

Para os estudos do *scrapie* foi um avanço extraordinário a prova, em 1961 por Dick Chandler, de que o rato de laboratório era susceptível ao agente do *scrapie* (Hadlow, 1999).

A BSE, em meados da década de 80 do século passado, surgiu em Inglaterra, e hoje está assinalada em dezanove países europeus para além de Israel, Japão e Estados Unidos da América (Belay *et alii*, 2003).

A BSE identificada em 1986 em Inglaterra é transmissível experimentalmente não apenas a bovinos mas também a ratos de laboratório, doninha, suínos, ovinos, caprinos, saguim e macaco *cynomologus* (Hadlow, 1999).

Em 1997 e 1998 foi assinalada na Itália por Zanusso *et alii* (2003) a transmissão intra e interespecies do *scrapie* após uma vacinação contra *Mycoplasma agalactiae*, e depois de decorridos dois anos após a intervenção vacinal, tratando-se portanto de *scrapie* iatrogénico, sugerindo-se que a fonte do problema está na presença de estirpes priónicas infecciosas nos homogeneizados de glândula mamária e de cérebro empregues na preparação das vacinas.

Já em 2004 investigadores italianos (Casalone *et alii*, 2004) referem a identificação de uma segunda forma de TSE bovina, cujo agente infeccioso PrP^{sc} teria características moleculares similares às encontradas num subtipo distinto da doença humana de Creutzfeld-Jakob esporádica.

Sinopse das doenças naturais dos animais por priões:

<u>Doença:</u>	<u>Hospedeiro:</u>	<u>Mecanismo da patogénese:</u>
<i>Scrapie</i>	ovinos	Infecção em ovinos geneticamente susceptíveis
BSE	bovinos	infecção com carnes, farinha de carnes ou farinha de ossos contaminadas com priões (MBM)
TME (<i>transmissible mink encephalopathy</i>)	Doninha	infecção com priões de ovinos e bovinos
CWD (<i>chronic wasting disease</i>)	Veado e Alçe	desconhecido
FSE	Gato	infecção com tecidos bovinos contaminados com priões ou MBM
Encefalopatia exótica	kudu, nyala, oryx	Infecção com MBM dos ungulados contaminadas por priões

MBM é a sigla para carnes e farinhas de carne e ossos

2 – Agentes etiológicos das prionoses, seus precursores e condicionalismos:

2.1 – Propriedades gerais dos PrP:

As formas celulares da proteína priónica normal (PrP_c) são expressas em diversos tecidos dos animais, em maior concentração no CNS e nos tecidos linforreticulares, e são ancoradas à superfície celular através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI).

A região N-terminal desta molécula de PrPc madura tem cerca de cem aminoácidos que se encontram desestruturados (numa molécula isolada) tendo na outra extremidade um região C-terminal com cerca de cem resíduos de aminoácidos, dobrando-se a cadeia peptídica numa conformação α -helicoidal e ganhando estabilidade à custa duma ponte dissulfureto.

A molécula da forma infecciosa PrPsc, que se acumula em certos tecidos no caso de doença priónica ou prionose, não se distingue quanto a ligações covalentes da molécula PrPc mas tem uma conformação completamente diferente, associando-se as moléculas em partículas que se agregam entre si. Uma simples unidade infecciosa destes PrPsc corresponde a cerca de 100 000 moléculas de PrPc (Bolton *et alii*, 1982).

Uma unidade infecciosa (IU) é a quantidade mínima necessária para infectar um animal de experiência da mesma espécie quando tal dose é injectada no cérebro (Dealer, 2002).

Na propagação dos príões infecciosos admite-se que a molécula PrPc nativa encontra-se em equilíbrio com a rara isoforma conformacional infecciosa ou PrPsc, que converte a conformação do PrPc para PrPsc, continuando depois estas formas convertidas a agregarem-se para formar um centro estável que então pode crescer por acréscimo e fragmentar-se para originar unidades infecciosas.

Na conversão da PrPc em PrPsc é necessária uma sequência homóloga entre as duas formas e a reacção depende das concentrações relativas de PrPc e PrPsc (Caughey *et alii*, 1995).

Também a desagregação completa e desnaturação do PrPsc causa perda da infecciosidade e da actividade conversora das conformações (Caughey *et alii*, 1997).

Contudo, o PrPc nativo recém sintetizado no ER (retículo endoplásmico) é transportado para a superfície celular mas depois reciclado rapidamente, em uma hora, entre a superfície e os endossomas periféricos, através dum mecanismo que envolve clatrininas (Shyng *et alii*, 1994) ou por outros meios alternativos de endocitose que abordaremos mais adiante.

Como dissemos, a região N-terminal com cerca de cem aminoácidos de uma molécula de proteína priónica isolada não está estruturada tridimensionalmente de forma sistematizável, havendo dentro desta região um segmento com cinco repetições de uma sequência de oito aminoácidos que interactua fortemente com o catião cobre.

A região C-terminal desta mesma proteína priónica está organizada tridimensionalmente numa série de três hélices α e numa pequena folha pregueada β , contribuindo para a estabilização destas estruturas uma ponte dissulfureto.

A proteína priónica parece assumir rapidamente a conformação enrolada ou desenrolada (Hosszu *et alii*, 1999).

Parece também verificar-se que a totalidade da molécula de PrP não é necessária para a propagação dos priões, podendo a parte não estruturada tridimensionalmente de forma definível, N-terminal e com noventa resíduos de aminoácidos, ser removida assim como a primeira hélice α , a segunda hélice β e parte da hélice dois. Em animais transgênicos está mesmo verificado que basta o fragmento de cento e seis aminoácidos compreendendo PrP Δ 23-88 Δ 141-176 para haver susceptibilidade e propagação dos priões (Supattapone *et alii*, 1999).

A localização precisa subcelular dos PrPsc é motivo de controvérsia, mas há fortes provas de que se encontram sobretudo em organelas do tipo endossomas mais interiores e lisossomas (Arnold *et alii*, 1995).

Os efeitos neurotóxicos da proteína priónica PrPsc parecem ter sede na região envolvendo os resíduos de aminoácidos entre 106 e 126 (Forloni *et alii*, 1993) e, embora a causa da neurodegenerescência nas prionoses não esteja esclarecida, admite-se que ela em parte resulte da perda de funções da PrPc. Por outro lado, a biossíntese de PrPc é um pré-requisito para a formação de PrPsc (Prussiner, 1998).

Foi verificado que em culturas de células infectadas com *scrapie* apenas 1 a 2% do PrPc sintetizado de novo é convertido em PrPsc (Borchelt *et alii*, 1992) o que sugere que apenas uma subfracção da PrPc é elegível para a formação de PrPsc.

Mecanismos de controlo da qualidade das proteínas biossintetizadas asseguram a identificação e rápida decomposição das proteínas mal conformadas e nas células eucariotas esses sistemas de controlo funcionam no ER e também no *post* ER/Golgi (Ellgaard *et alii*, 1999) sendo que a decomposição das proteínas priónicas nessas circunstâncias ocorre nos lisossomas ou no citosol.

Proteínas priónicas mal conformadas são transportadas retrogradamente para o citosol onde são decompostas nos proteossomas (Ma *et alii*, 2002). A inibição destes proteossomas origina a acumulação de PrP nas células induzindo elevada toxicidade, tal como em ratos transgênicos em que o PrP não possa ser transportado para o ER se origina acumulação citosólica das proteínas priónicas com os consequentes sintomas de ataxia e de atrofia cerebral (Ma *et alii*, 2002).

Refere-se que em geral os priões não são imunogênicos (Porter *et alii*, 1973 e Williamson *et alii*, 1996) apesar do sistema imunitário desempenhar um papel importante e paradoxal na transmissão dos priões infecciosos da porta de entrada periférica para o CNS, tendendo a imunossupressão não específica a diminuir a disseminação dos agentes

infecciosos a partir da periferia para o CNS (Outram, 1974) enquanto a estimulação específica aumenta a disseminação (Dickinson *et alii*, 1978).

2.2 – Genoma e TSE:

As TSE ou prionoses dos animais são doenças neurodegenerativas dos mamíferos cuja susceptibilidade para a infecção é modelada pelas características genéticas do hospedeiro (Parry, 1962).

Quer se trate de formas esporádicas, hereditárias ou infecciosas, são todas elas caracterizadas pela deposição duma proteína priónica anormal (PrP^{sc}), protease-resistente, no cérebro dos animais afectados (Prussiner, 1994).

O gene da proteína priónica (PRPN) nos ovinos contem três exões e mais de 20 Kbp (Westaway, 1994) e a sua *open reading frame* está contida no terceiro exão, estando assinaladas variantes polimórficas nesta região codificante do gene PRPN dos ovinos, variantes estas associadas com a incidência de *scrapie* experimental e natural (Clouscard, 1995 e Hunter, 1997).

Em certas raças de ovinos o alelo PRPN codificando valina no codão 136 (V136) está associado com um muito elevado risco para o *scrapie*. Esta variante 136 é rara em muitas raças de ovinos.

Noutras raças de ovinos é a variação no codão 171 que está associada com maior susceptibilidade ao *scrapie* estando assinalados três aminoácidos diferentes no codão 171 (glutamina (Q171); arginina (R171); histidina (H171)).

Ainda na raça Romanov o alelo PRPN mais resistente ao *scrapie* é AAR (codão 136, 154, 171). Outros alelos estão assinalados na resistência ou susceptibilidade dos ovinos ao *scrapie*.

Pode resumir-se que a susceptibilidade dos ovinos às TSE (Andreoletti *et alii*, 2002) é controlada principalmente pelo polimorfismo no gene PrP codificador da proteína PrP, e estando as principais mutações relacionadas com a susceptibilidade ou resistência à doença localizadas nos codões 136 (A ou V), 154 (R ou H) e 171 (R,Q ou H) (Clouscard *et alii*, 1995 e Hunter *et alii*, 1996). Os animais com genótipos PrP, V136, R154, Q171 / VRQ, ARQ/VRQ e ARQ/ARQ, são os mais susceptíveis ao *scrapie*, enquanto os animais homozigóticos ou heterozigóticos AHQ e heterozigóticos ARR são pouco susceptíveis e os ovinos ARR/ARR são clinicamente resistentes (Hunter *et alii*, 1996 e Hunter *et alii*, 1997).

Polimorfismos do PrPc:

Como referimos atrás o principal factor que influencia a incidência das prionoses desencadeadas nos ovinos é o alotipo dos aminoácidos 136, 154 e 171 da proteína priónica PrPc (Hunter *et alii*, 2000).

Estão assinalados nos ovinos dois tipos de TSE, um influenciado pelo aminoácido do codão 136 e outro pelo aminoácido na posição 171, podendo cada um destes grupos ter sub-tipos.

Contudo, os aminoácidos nas posições 136, 154 e 171 do PrPc dos ovinos não explicam tudo e as regiões flanqueadoras do gene PrP, com sequências diferentes, no controlo da expressão deste gene podem também condicionar o desenvolvimento da prionose (Hunter *et alii*, 2000).

Nas cabras há também polimorfismo do PrPc não parecendo assim suceder nos bovinos para a BSE (Hunter *et alii*, 2000).

No entanto, no gene PrP dos bovinos estão assinaladas diferentes formas de sequências (Goldmann *et alii*, 1991) que contêm cinco ou seis cópias de um curto elemento rico em GC e que codifica o octapéptido Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln ou a sua variante mais longa Pro-Gln/His-Gly-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln, havendo animais homozigóticos e heterozigóticos.

O gene PrP bovino tem dois polimorfismos conhecidos na sua região codificadora, um polimorfismo no local de restrição silenciador Hind II e uma diferença no número de repetições do octapéptido, não parecendo haver diferenças nas frequências destes genótipos PrP dos animais saudáveis para os animais com BSE (Hunter *et alii*, 1994).

A replicação do agente infeccioso está correlacionada com o genótipo do PrP hospedeiro que codifica a glicoproteína PrP. Nos ovinos estão assinalados, como já referimos, diversos polimorfismos do gene PrP e estes estão associados com a susceptibilidade e/ou o período de incubação da doença, dependendo da fonte ou das características do agente infeccioso PrPsc (Somerville *et alii*, 1997).

No gene bovino PrP também há algum polimorfismo, mas nenhum deles está associado com a incidência de BSE nos bovinos (Hunter *et alii*, 1994). Contudo, o *timing* e o perfil da deposição por órgãos do PrPsc depende da estirpe infecciosa e do genótipo do recipiente e da via de infecção ocorrida. Está por exemplo assinalado que o PrPsc é detectado nos baços de ovinos com *scrapie* natural o que não sucede com os bovinos com BSE (Somerville *et alii*, 1997).

Heterogeneidade do PrPsc (Pan *et alii*, 2002):

Estudos efectuados com PrPc presente no cérebro humano permitiram assinalar, através de imuno-electroforese, mais de cinquenta bandas de *immunoblots* diferentes, cada uma dessas bandas representando uma espécie distinta de PrPc devido a combinações de diferentes massas moleculares e diferentes pontos isoeléctricos.

A heterogeneidade verificada é devida no fundo à presença de uma forma de proteína com o comprimento total e a duas outras formas principais, truncadas no seu comprimento, e ainda consequência das diversas glicanas ligadas à maioria destas formas.

As duas formas truncadas resultam de distintas cisões ocorridas na região N-terminal da proteína priónica. Por outro lado, as glicanas ligadas na forma não truncada e nas formas truncadas do PrPc, diferem na sua estrutura e nos rácios das glicofomas, e tudo isto acaba por reflectir-se no funcionamento do PrPc podendo gerar-se assim diversas estirpes de priões consoante as quantidades relativas entre as diversas formas.

2.3 – Estirpes dos agentes das TSE:

Os agentes responsáveis pelas TSE revelam variações nas suas estirpes (Bruce *et alii*, 1993) e através de passagens em ratos estabeleceu-se que o fenótipo da doença depende da interacção da estirpe do PrPsc com factores genéticos do hospedeiro (Bruce *et alii*, 1991) sobretudo o PrPc.

Numerosas estirpes laboratoriais distintas dentro dos agentes causais das TSE estão identificadas (Bruce *et alii*, 1991). Os agentes PrPsc transportam uma informação específica da estirpe que é independente do hospedeiro.

As estirpes do agente infeccioso das TSE (PrPsc) interactuam com o PrPc influenciando as características da doença tais como o período de incubação e a respectiva neuropatologia (Bruce, 2003).

Está referido que a estirpe causadora da BSE nos bovinos também infecta os gatos domésticos e ungulados exóticos, e que diferentes estirpes de TSE estão associadas com o *scrapie* nos ovinos (Bruce, 2003).

O *scrapie* é transmissível experimentalmente entre ovinos e a BSE pode ser transmitida oralmente a ovinos, controlando o genótipo PrP dos ovinos a susceptibilidade destes animais ao *scrapie* e à BSE, apresentando ainda os ovinos infectados oralmente com BSE sintomas de infecção no seu sangue (Hunter, 2003) o que pode ter impacto na inocuidade dos produtos sanguíneos a administrar aos humanos (*vide* adiante priões e transfusões sanguíneas).

Diversidade das estirpes de priões:

Hoje em dia sabe-se que a uma determinada sequência peptídica não corresponde apenas uma única conformação tridimensional, tudo dependendo das condições em que se encontra a proteína e a qual pode adoptar diversas conformações.

Estão assinaladas várias estirpes de priões distinguíveis pelas suas propriedades biológicas, tais como períodos de incubação da doença e diversos quadros neuropatológicos em linhas de ratos com alto grau de consanguinidade (*inbred*).

Collinge *et alii* (1996) têm sugerido que esta variação entre estirpes deve-se a uma combinação da conformação de cada molécula de PrP com a sua glicosilação. Por outro lado, polimorfismos na sequência dos PrP podem ser responsáveis pelas diferentes conformações desencadeadas. Parece que a conformação teria a maior importância na caracterização de cada estirpe logo seguida da glicosilação.

Também é conhecido que a conformação da proteína pode ser influenciada pela interacção do PrP^{sc}, por exemplo, com o cobre ou o zinco (Wadsworth *et alii*, 1999).

Estão referidas diversas conformações para as diversas estirpes de PrP^{sc} (Caughey, 2001; Bensen *et alii*, 1994; Safar *et alii*, 1998).

Em condições experimentais as vias de introdução dos priões infecciosos, as estirpes destes, e as suas concentrações, têm profunda influência, na mesma espécie animal, sobre a patogenia desenvolvida até aos estádios terminais da doença (Maignien *et alii*, 1999). Vorberg e Priola (2002) demonstraram que diferentes estirpes de PrP^{sc} do rato podiam também converter diferentes glicofomas PrP^c a partir de um *pool* complexo de moléculas PrP glicosiladas produzido por células, o que sugere que em virtude do *pool* de glicofomas PrP^c poder variar consoante o tipo de células, ou consoante os seus compartimentos subcelulares, os locais dessa conversão, celular e subcelular, influenciarão o reportório do tipo de produtos dessa conversão.

2.4-Disseminação genérica dos priões nos organismos animais

As doenças priónicas ou prionoses são transmissíveis não apenas através das vias naturais, sobretudo por ingestão, mas também experimentalmente. Um aspecto peculiar dos priões é a sua extraordinária resistência aos processos de esterilização convencionais, bem como a sua capacidade para se ligarem a superfícies metálicas ou de plástico, sem perderem a sua infecciosidade.

Nas doenças priónicas não têm sido detectadas respostas imunológicas humorais nem respostas imunológicas celulares.

A transmissibilidade do *scrapie* foi demonstrada em 1936.

As prionoses não são contagiosas no sentido de que não são transmissíveis por contacto directo, sendo transmissíveis *per os* ou por vias parenterais (*vide* adiante). Nas possíveis vias de propagação dos priões ingeridos para o sistema nervoso central, admite-se que a resistência relativa dos priões ao processo digestivo (Bolton *et alii*, 1982) permita a sua passagem e sobrevivência através deste aparelho, não se conhecendo bem como os priões passam através da mucosa intestinal, embora experimentalmente as células M (*mucosal*) possam mediar este transporte (Heppner *et alii*, 2001).

Assim, os priões penetrariam na mucosa através das células M atingindo depois as placas de Peyer bem como o sistema nervoso entérico (Beeker *et alii*, 2000). Consoante os hospedeiros, outros tecidos do sistema linforreticular tais como o baço e órgãos linfáticos (Prinz *et alii*, 2002) são locais de replicação dos priões como sucede no *scrapie* dos ovinos, na BSE experimental em ovinos, vCJD em humanos e *scrapie* experimental em ratos, mas não na BSE dos bovinos (Bradley, 1999).

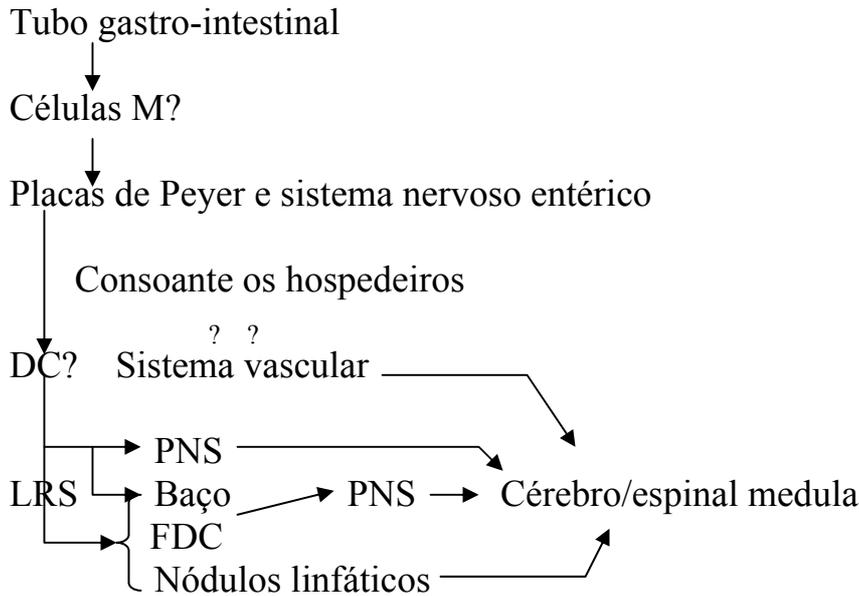
Estudos recentes (Aucouturier *et alii*, 2001; Huang *et alii*, 2002) referem que as células dendríticas (DC) mielóides medeiam o transporte de priões dentro do sistema linforreticular. As células linfocitárias B maduras são necessárias para a replicação dos priões no baço (Klein *et alii*, 1998) embora elas não sejam sede de replicação dos priões, mas são sim necessárias para a maturação das células dendríticas foliculares (FDC) que são as células onde verdadeiramente ocorre a replicação e a acumulação dos PrPsc (Montrasio *et alii*, 2000; Mabbot *et alii*, 2000). Contudo, a neuroinvasão pode ocorrer mesmo sem a presença de células FDC, o que parece indicar que existem outros tipos de células na periferia dos organismos que permitem a replicação dos priões (Prinz *et alii*, 2002; Oldstone *et alii*, 2002).

Com efeito, com doses de priões suficientemente elevadas e administradas intraperitonealmente (i.p.) a neuroinvasão pode ocorrer sem participação do sistema linforreticular (LRS).

A partir do sistema linforreticular, ou de outros locais, os priões difundem-se através do sistema nervoso periférico (PNS) até ao cérebro, quer directamente através do nervo vago (Beekes *et alii*, 1998) quer através da medula espinal envolvendo o sistema nervoso simpático (Bencsik *et alii*, 2001).

Resumem-se no esquema seguinte estas possíveis vias de propagação dos PrPsc ingeridos. (Quadro 2)

Possíveis vias de propagação dos PrPsc ingeridos:



- DC para células dendríticas
- PNS para sistema nervoso periférico
- FDC para células foliculares dendríticas
- LRS para sistema linforreticular

Como é natural a biossíntese e a disseminação dos príões depende de células que contenham PrPc.

Os linfócitos B e T esplênicos podem ambos sintetizar príões ou adquiri-los de uma outra fonte, mas só quando eles próprios expressam PrPc (Raeber *et alii*, 1999).

Pelo menos no rato a neuroinvasão não é mediada pelo transporte dos príões através da circulação (Blattler *et alii*, 1997) mas sim através do sistema nervoso periférico (Race *et alii*, 2000). Em *scrapie* experimental em ratos não foi detectada infecciosidade nos leucócitos (Raeber *et alii*, 1999) nem foi também detectada infecciosidade no sangue de bovinos infectados com BSE (Bradley, 1999) ou em ovinos infectados com *scrapie* (Hadlow *et alii*, 1982) apesar de em hamsters infectados com *scrapie* haver no sangue um baixo título reprodutível de príões (Holada *et alii*, 2002).

Parece que no transporte dos príões da periferia para o CNS o sistema linforreticular tem um papel a desempenhar. Aceita-se que as células dendríticas foliculares (FDC) que para manutenção do seu estado maduro dependem de células B, são os locais da acumulação dos príões no baço (Kitamoto *et alii*, 1991; McBride *et alii*, 1992) e que o transporte para o

CNS depende do sistema nervoso periférico (Kimberlin, 1980; Weissmann, 1999).

O PrPc é expresso em elevadas concentrações no sistema nervoso central (CNS) e pode também ser expresso numa série de tecidos periféricos, inclusivé no sistema linfóide e nas células foliculares dendríticas (FDC) (Klein e Aguzzi, 2000).

As prionoses experimentais e naturais mais frequentes resultam da exposição a priões através de vias periféricas, tais com a intraperitoneal (i.p.), a intravenosa (i.v.) e a exposição oral.

Após inoculações experimentais intracerebrais (i.c.) ou i.p., os priões acumulam-se em órgãos linfóides secundários tais como o baço e os gânglios linfáticos (Kimberlin e Walker, 1989). Diferentes estirpes de priões revelam diferentes afinidades para os tecidos linfóides. Por exemplo, na BSE os agentes parecem ter baixa afinidade para o tecido linfóide e em bovinos experimentalmente infectados a infecciosidade fica sobretudo confinada ao sistema nervoso, embora pequenas quantidades de infecciosidade se observem noutros locais como por exemplo no *ileum* terminal e na medula óssea (Klein e Aguzzi, 2000). Mas nos humanos com vCJD, provavelmente derivada da BSE, os priões infecciosos PrPsc acumulam-se nas amígdalas da garganta, baço e apêndice. No rato infectado experimentalmente, periféricamente, ocorre uma fase clínica silenciosa prolongada simultaneamente com a replicação dos priões no LRS antes da neuroinvasão. É fundamental conhecer quais são as células dentro desse tecido linfóide periférico que permitem a replicação dos priões e como são esses priões depois transportados para o CNS.

Ocorre um jogo entre as células B e as células FDC antes da neuroinvasão.

A implicação do sistema imunitário na patogénese periférica dos priões é evidente, tal como a identidade de algumas células implicadas nesta situação.

As células FDC têm sido consideradas como a principal sede de replicação dos priões dentro do tecido linfóide (Klein e Aguzzi, 2000). Parece necessária a colaboração de linfocitos e FDC para a neuroinvasão ocorrer a partir de infecções periféricas.

Parece também que as células B são críticas para a patogénese periférica do *scrapie*.

A expressão de PrPc pelos linfocitos B não é necessária para a neuroinvasão pelos priões.

Há sugestões, apoiadas em evidências experimentais, de que células cuja maturação depende das células B são responsáveis pela acumulação de priões no tecido linfóide como por exemplo o baço. As FDC, de origem um tanto obscura, são um bom candidato para o desempenho desse papel, embora se admita também que essas FDC sejam um mero

reservatório onde se acumulam os príões e que outros processos dependentes das células B estejam implicados no transporte dos príões.

Os príões podem ser transportados sobre ou no interior das células B atravessando o tecido linfóide periférico até atingirem os nervos terminais autónomos.

A patogénese periférica dos príões e a neuroinvasão dependem pois de componentes do sistema imunitário do hospedeiro.

A segunda etapa da neuroinvasão corresponde à progressão dos príões do tecido linfóide para as terminações nervosas do sistema nervoso simpático, o que pode acontecer por intermédio das FDC.

Nas etapas da neuroinvasão a marcha dos príões através dos organismos animais decorre pois em duas etapas: a linfoinvasão primeiro e depois a neuroinvasão, utilizando os príões diversos componentes do sistema imunitário para este efeito (Aguzzi, 2001). Ambas as etapas dependem da presença de linfócitos B (Klein, 1997) embora a neuroinvasão não necessite da expressão de PrPc pelas células B (Klein *et alii*, 1998) parecendo que a principal função destes linfócitos B seria a de facilitar a manutenção das FDCs fornecendo linfotóxina- β ao baço e gânglios linfáticos. A supressão do sinal linfotóxina- β impede a patogénese periférica dos príões (Montrasio *et alii*, 2000). A ligação dos príões às FDCs seria facilitada por factores complemento e seus receptores, o que sugere que os príões seriam opsonizados (Klein *et alii*, 2001).

A replicação dos príões nos órgãos linforreticulares é relativamente bem conhecida, sabendo-se duma forma muito pior o resto da viagem até ao CNS. Príões administrados oralmente podem aparentemente atingir o cérebro através do nervo vago parassimpático (Beeker *et alii*, 1998) podendo existir outras vias mais indirectas para esse efeito, sendo a via hemática uma possibilidade.

As células dendríticas (DCs) CD11c⁺ podem participar na neuroinvasão, sendo estas células distintas das FDCs (estas últimas são componentes do estroma dos órgãos linforreticulares e não são de origem hematopoiética) não tendo nada em comum.

As células DC são células apresentadoras de antígenos por excelência (APCs) e as FDCs retêm os antígenos à sua superfície através de receptores Fc γ R e para o complemento, mas não parecem processar os antígenos como as outras células APCs.

2.5 – Biologia do PrPc:

Os estudos iniciais sobre proteínas priónicas PrPc foram realizados com material biológico proveniente de frangos, tendo essas proteínas uma homologia de 30-35% com os PrPc de mamíferos.

Hoje em dia sabe-se que as propriedades celulares e bioquímicas essenciais das proteínas PrPc aviárias e mamíferas são idênticas (Lehmann *et alii*, 1994).

2.5.1 – Expressão e estrutura (Harris, 1999):

O PrPc é expresso nos neurónios e glia do cérebro e espinal medula, em diversos tecidos periféricos, e nos leucocitos (Bendheim *et alii*, 1992; Manson *et alii*, 1992; Caughey *et alii*, 1988; Dodelet *et alii*, 1998; Harris *et alii*, 1993; Moser *et alii*, 1995).

As funções hipotéticas do PrPc serão a adesão celular e o reconhecimento, a interacção com ligandos, e a transmissão transmembranária de sinais.

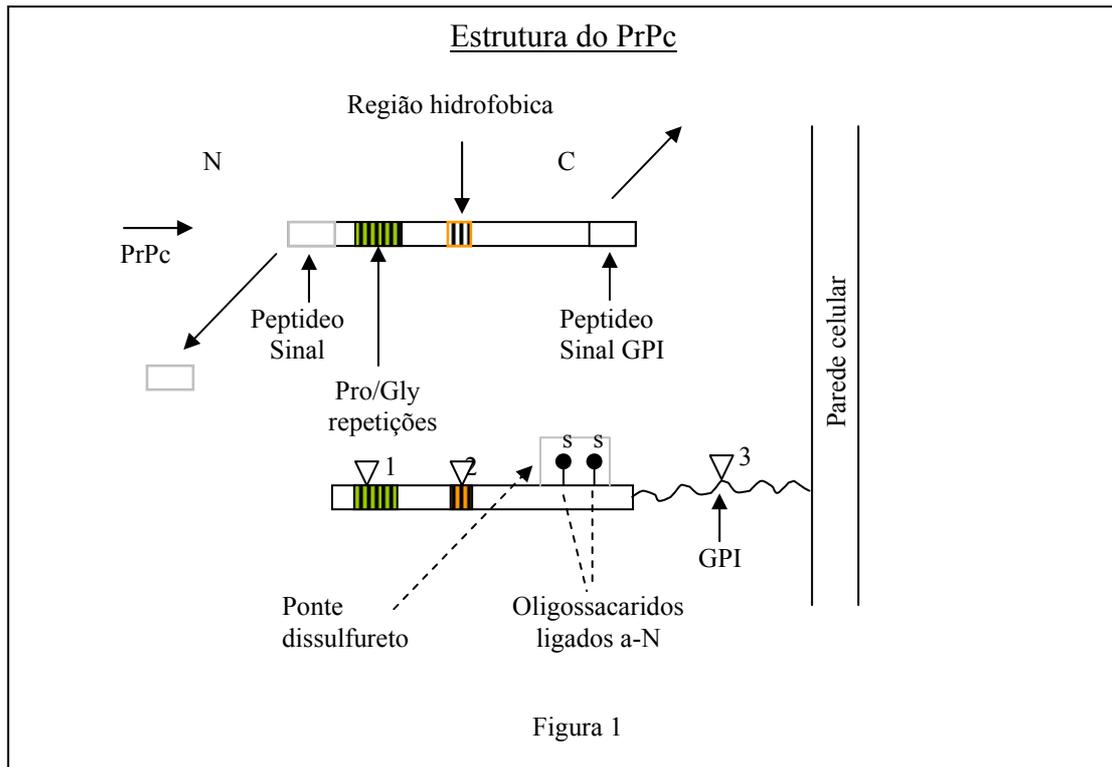
Ratos PrP -/- (desprovidos do gene PrP) não revelam anomalias anatómicas ou de crescimento, embora apresentem alterações circadianas, no perfil de sono (Taraboulos *et alii*, 1990) e na aprendizagem e memória (Niishida *et alii*, 1997) o que não foi comprovado por outros investigadores (Bueler *et alii*, 1992; Herms *et alii*, 1995; Lledo *et alii*, 1996).

O PrPc tem uma função importante na homeostasia do cobre que se liga na região peptídica repetida na estrutura do PrPc.

Ratos PrP -/- pouco cobre têm associado com as membranas celulares e têm uma actividade catalítica superóxido-dismutase cobre-zinco diminuta (Pauly e Harris, 1998).

No esquema anterior mostra-se a estrutura do PrPc em cima e o seu processamento indicado por setas após a translação para originar a proteína madura em baixo onde se indica que a âncora GPI liga a cadeia proteica do prião à membrana, indicando $\nabla 3$ e $\nabla 2$ os locais de cisão do PrPc e a $\nabla 1$ indicando o local de cisão PrPsc.

O local $\nabla 3$ encontra-se dentro da âncora GPI entre o diacilglicerol e a etanolamina que se encontra ligada ao aminoácido C-terminal. O local $\nabla 2$ situa-se na posição 110 e local $\nabla 1$ na posição 89 do polipéptido priónico.



2.5.2 – Movimentos e rearranjos moleculares do PrP:

Numa molécula proteica o seu movimento intrínseco pode assumir diversas *nuances* ao longo do tempo. Assim, a vibração e a rotação das ligações químicas ocorrem na escala dos fentossegundos (10^{-15} s), e as cadeias laterais dos aminoácidos movem-se numa escala de picossegundos a nanossegundos (10^{-12} a 10^{-9} s) (Bennion e Daggett, 2002).

Pequenos segmentos do esqueleto peptídico podem sofrer reposição de si próprios em de nanossegundos a microssegundos (10^{-9} a 10^{-6} s). O arranjo dos aminoácidos de superfície pode ser afectado por estas circunstâncias e tais mudanças na superfície da proteína podem alterar a sua capacidade de interacção com outras moléculas (Bennion e Daggett, 2002).

A completa dobragem (enrolamento) de uma proteína pode levar a ocorrer de microssegundos a milissegundos ou horas, tudo dependendo do meio envolvente, podendo ainda assumir diferentes enrolamentos consoante as condições (Carr *et alii*, 1997; Ye *et alii*, 2001; Carrel *et alii*, 1998). Recorde-se que o PrPc é um monómero enquanto o PrPsc é um oligómero. Está assinalado que o PrPc sofre alterações na sua conformação sob a influência do PrPsc, ocorrendo estes rearranjos estruturais na porção central da proteína priónica, ou seja, entre os resíduos de aminoácidos 90 e 120 que constituem na isoforma PrPc uma estrutura extensa e flexível.

Foi verificado por Leclerc *et alii* (2001) que estes rearranjos espontâneos podem acontecer nesta região da proteína priônica quando o PrP se encontra imobilizado sobre uma superfície de *chips* sensores, sem que estas moléculas PrP contactem umas com as outras, enquanto as extremidades da proteína permanecem relativamente inalteradas.

Tudo isto sugere que há uma propensão das regiões não estruturadas específicas do PrP (aminoácidos 90 a 120) para sofrerem uma mudança de conformação espontânea, potencialmente deletéria, e talvez com notáveis repercussões na biologia dos priões.

Como já referimos nas células neurais o PrPc cicla rapidamente entre a superfície celular e compartimentos endocíticos, através de vesículas revestidas com clatrina segundo alguns autores, e que têm uma vida média de 4 a 6 horas (Lehmann *et alii*, 1999).

Também tem sido sugerido que a conversão do PrPc em PrPsc acontece nestes compartimentos subcelulares (Harris *et alii*, 1996).

Há fortes provas que põem em evidência a função do PrPsc como um molde dirigindo a conversão do PrPc durante a replicação dos priões (Prusiner, 1997) e o que será eventualmente facilitado pela própria mobilidade do PrPc.

O monómero de PrPc em condições fisiológicas parece ser uma molécula intrinsecamente instável e capaz de rearranjos conformacionais ao longo do tempo (Leclerc *et alii*, 2001).

Admite-se como altamente provável que estas mudanças de conformação possam ocorrer no PrPc à superfície das células, não se podendo no entanto (mesmo especulativamente) avançar sobre aquilo que possa suceder quando estas mesmas células com PrPc exposto entram em contacto com o PrPsc, sendo que este pode actuar apenas hipoteticamente como um molde condicionador de alterações na conformação do PrPc.

2.5.3 – Biossíntese do PrPc e seu processamento:

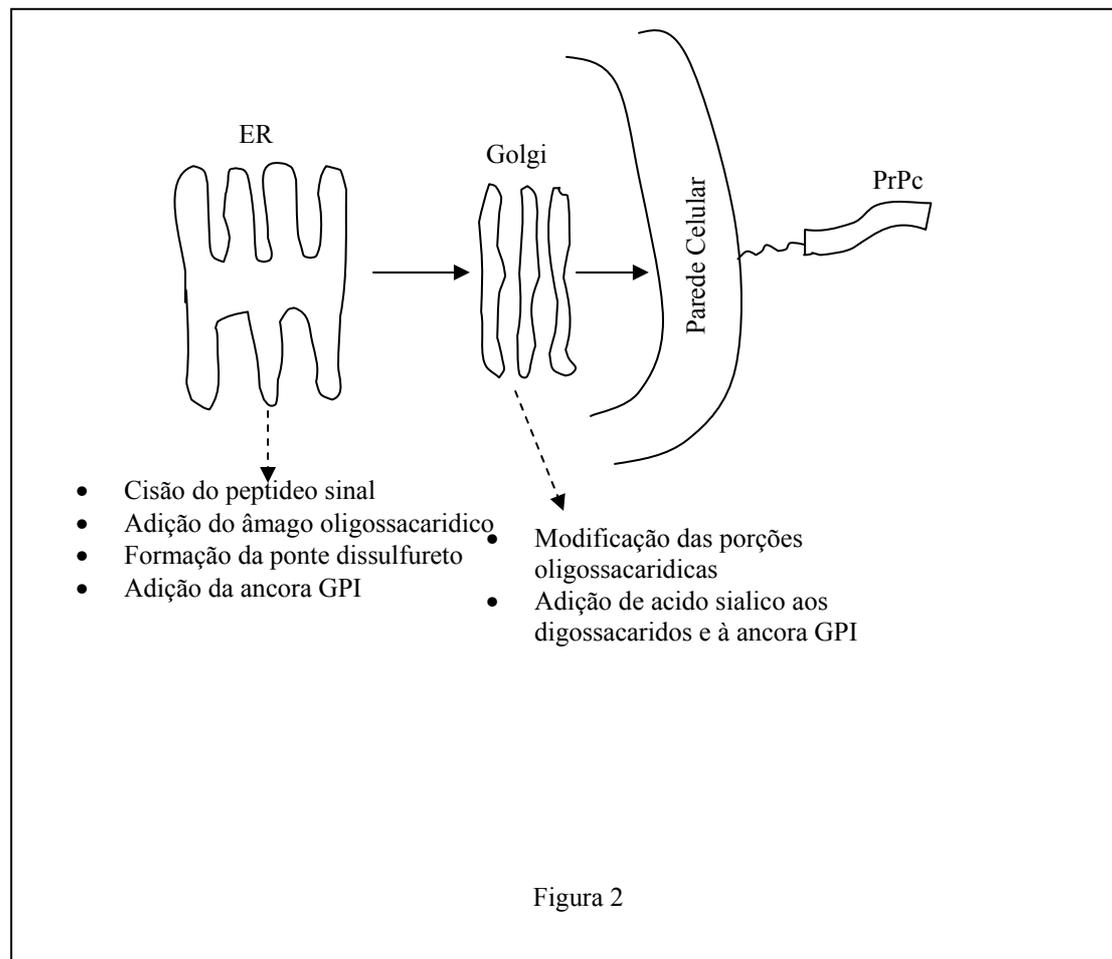
A nível celular os PrPc são biossintetizados no retículo endoplásmico rugoso (ER) e transitam pelo aparelho de Golgi para atingirem a superfície celular, sofrendo no ER diversas modificações *post*-tradução incluindo: a quebra ou cisão de um péptido sinal N-terminal; a adicção de cadeias oligossacarídicas N-ligadas em dois locais; a formação duma ponte dissulfureto; a ligação duma âncora GPI após a cisão de um péptido hidrófobo C-terminal. As cadeias oligossacarídicas do tipo alta-manose são depois modificadas durante o trânsito pelo aparelho de Golgi, passando a proteína priônica a conter ácido siálico.

Nas células de mamíferos as proteínas a segregar para o meio extracelular são habitualmente translocadas para o ER através duma via

co-translacional que necessita que a proteína nascente se ligue com uma partícula reconhecedora de sinal (SRP) sendo esta a dirigir o complexo cadeia peptídica em crescimento/ribossoma para o receptor (SRPR) sobre a membrana do ER, originando a translocação da proteína em crescimento pelo poro e a sua libertação no interior do ER logo que a sua síntese termine. Polipéptidos com menos de 75 aminoácidos podem depois de completamente biossintetizados serem canalizados para o ER independentemente do dispositivo SRP/SRPR (Heller *et alii*, 2003; Muller e Zimmermann, 1987; Schlepstedt, 1987).

Os catiões de cobre estimulam rapidamente e reversivelmente a endocitose do PrPc da plasma membrana da superfície celular para um subconjunto de endossomas periféricos e para o aparelho de Golgi (Brown e Harris, 2003).

Como se disse antes, a biossíntese do PrPc acontece no ER, fazendo depois um trajecto através do aparelho de Golgi até atingir a superfície celular, e sofrendo durante esse processo diversas modificações *post*-tradução. O processamento do PrPc nos diversos compartimentos subcelulares decorre da forma referida na figura seguinte:



Ocorre pois a cisão do péptido sinal N-terminal e a adicção em dois sítios de oligossacáridos N ligados, bem como a formação duma ponte dissulfureto e a ligação duma âncora de GPI (Haraguchi *et alii*, 1989; Stahl *et alii*, 1987; Turk *et alii*, 1988).

Os oligossacáridos são depois modificados no aparelho de Golgi com ácido siálico.

A âncora de GPI é adicionada ainda no ER após a cisão da porção hidrófoba C-terminal, estando embutida no folheto externo da bicamada lipídica da membrana celular, sendo esta âncora também modificada por adicção de ácidos siálicos, quer no PrPc quer no PrPsc (Stahl *et alii*, 1993). Há provas de que alterações na glicosilação N alteram o transporte biossintético do PrPc, não sendo no entanto necessária uma N-glicosilação correcta para o transporte dos priões.

Diferentes estirpes de priões apresentam por vezes distintos perfis de glicosilação (Collinge *et alii*, 1996; Dearmond *et alii*, 1997; Kascsak *et alii*, 1986; Monari *et alii*, 1994; Parchi *et alii*, 1996).

No entanto, as modificações *post*-tradução do PrPc fazem parte do seu metabolismo normal.

2.5.4 – Topologia da proteína PrP:

Já referimos anteriormente que a proteína PrP de animais mamíferos é composta por uma região N-terminal flexível e não estruturada, e por um domínio C-terminal globular, parecendo que a informação contida nesta última porção é necessária para a importação pelo ER do troço N-terminal (Heske *et alii*, 2004).

Fragmentos da porção N-terminal do PrP sem domínios da porção C-terminal permanecem no citosol, sem o péptido sinal cindido, e são rapidamente decompostos pelo proteossoma.

Por outro lado, domínios separados da porção C-terminal do PrP são inteiramente importados para dentro do ER.

A proteína PrP pode assumir diferentes topologias membranárias, inclusivé um forma completamente translocada denominada secPrP, e duas formas transmembranárias: as NtmPrP e as CtmPrP, e ainda uma forma citosólica (Stewart e Harris, 2003).

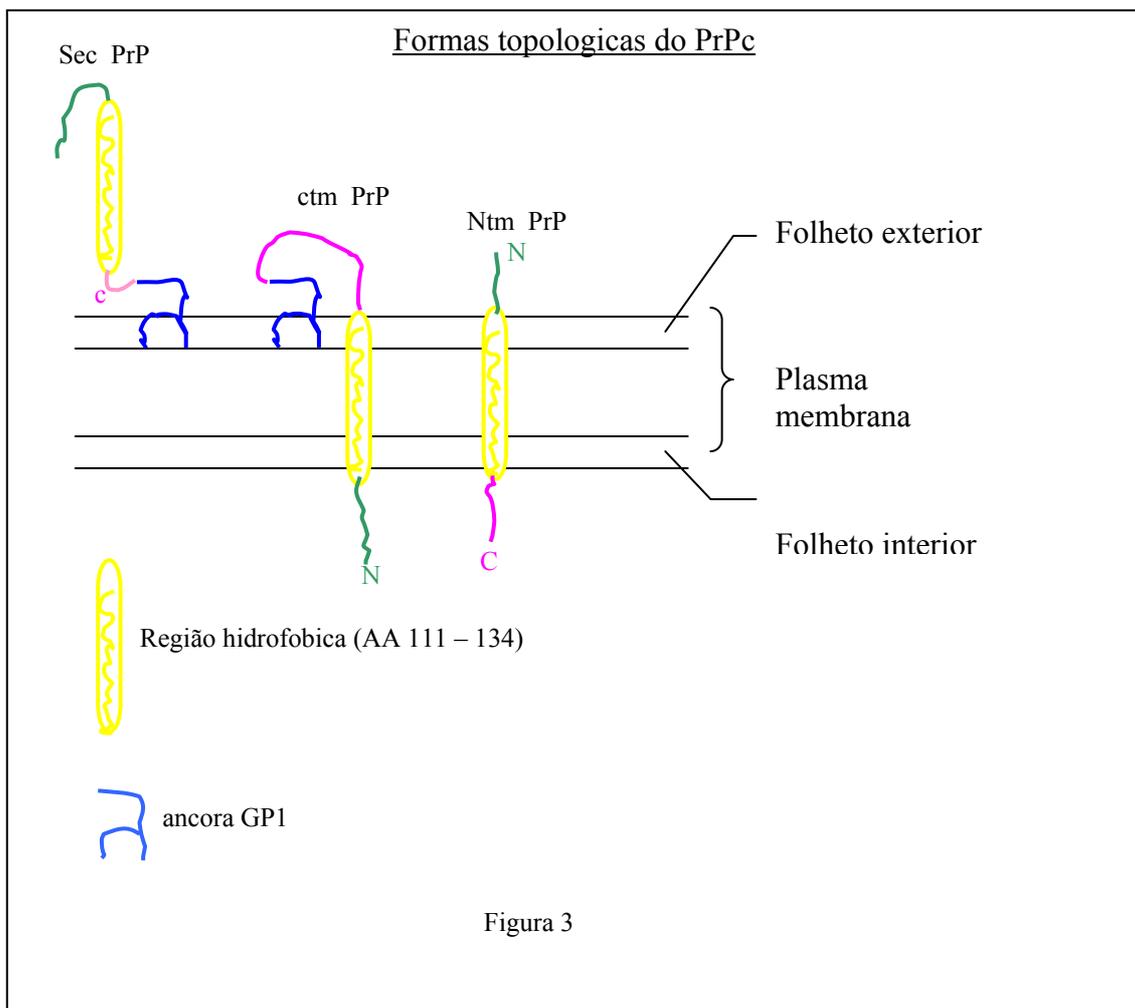
As formas CtmPrP e as formas PrP citosólicas têm sido referidas como intermediárias neurotóxicas em algumas doenças priónicas.

Tem-se verificado que a substituição de resíduos de aminoácidos carregados electricamente no âmago hidrófobo do péptido sinal do PrP aumenta a síntese de CtmPrP e diminui a sua translocação para os microsomas (Stewart e Harris, 2003). A remoção do péptido sinal bloqueia completamente a translocação.

Também substituições no domínio transmembranário do PrP podem originar a biossíntese exclusiva de formas CtmPrP.

A maioria das moléculas PrPc encontra-se ligada ao folheto externo da plasma membrana através da âncora de GPI, ligada à porção C-terminal do prião, sendo esta forma topológica denominada secPrP (Stahl *et alii*, 1990; Lehmann e Harris, 1995).

Algumas moléculas PrPc têm, no entanto, uma orientação transmembranária (DeFea *et alii*, 1994; Hedge *et alii*, 1998; Holscher *et alii*, 2001; Kim *et alii*, 2001; Rutkowsky *et alii*, 2001; Kim *et alii*, 2002) sendo designadas NtmPrP quando têm a porção N-terminal no lado extracitoplásmico da membrana e CtmPrP quando têm a porção C-terminal deste lado extracitoplásmico da membrana, atravessando a bicamada lipídica apenas uma vez através duma região hidrofoba altamente conservada no centro da molécula (aminoácidos de 111 a 134).(Figura 3)



As formas topológicas transmembranárias são produzidas em pequena quantidade: menos de 10% do PrP total.

Mutações no domínio transmembranário, ou lá perto, podem alterar as proporções entre estas diversas formas topológicas indicando que a sequência sinal assim como o domínio transmembranário são determinantes da topologia do PrP.

Tem sido proposto que as formas CtmPrP e as formas citosólicas sejam intermediárias neurotóxicas responsáveis por funções patogénicas nas doenças priónicas, enquanto os PrPsc teriam um papel infeccioso. Contudo, o estudo das variações quantitativas daquelas formas topológicas transmembranárias ainda não permitiu chegar a uma conclusão (Stewart e Harris, 2003).

Vão havendo provas de que o PrPsc só por si não é neurotóxico, parecendo que esta neurotoxicidade implica perturbações do metabolismo do PrP endógeno (Ma *et alii*, 2002). Também há a afirmação de que o PrPsc induziria a formação de CtmPrP e a quantidade desta última forma poderia aumentar quer directamente devido a mutações na molécula PrP, quer indirectamente através da formação de PrPsc (Harris, 2003).

Tal como se verificou na última figura o CtmPrP tem um modo invulgar de ligar-se à membrana pois fá-lo através dum domínio transmembranário e de uma âncora GPI da porção C-terminal.

Admite-se que a toxicidade provocada por esta forma seja devida à activação da pró-apoptose em resposta a *stress* originado no ER (Harris, 2003).

O PrPsc, a forma infecciosa do PrP, não parece ser a causa próxima do disfuncionamento neural e das degenerescências observadas nas prionoses (Chiesa *et alii*, 2003) parecendo que formas alternativas do PrP, sem serem o PrPc ou o PrPsc, sejam as responsáveis pela neurotoxicidade primária observada nas prionoses, admitindo-se que a forma CtmPrP possa ter esse papel (Chiesa e Harris, 2001) e também o PrP citoplásmico (Ma e Lindquist, 2002; Ma *et alii*, 2002).

A localização da proteína PrPc é preferencialmente no compartimento endossomal mais interior e na plasma membrana dos neurónios, embora estejam excluídos das vesículas sinápticas, mas surpreendentemente foram encontrados no citosol de subpopulações de neurónios no hipocampo, neocórtex e tálamo, mas não no cerebelo (Mironov *et alii*, 2003).

No mecanismo implicado na iniciação da formação de PrPc (embora desconhecido na maior parte) sabe-se que o PrP pode ser transportado em sentido retrógrado, para o exterior do ER, produzindo-se no citosol agregados amorfos e conformação do tipo PrPsc (Ma e Lindquist, 2002).

No citosol estes priões são degradados pelo proteossoma, mas a acumulação mesmo de pequenas quantidades de PrP citosólico é fortemente neurotóxica em células de cultura e em ratos transgênicos (Ma *et alii*, 2002). No citosol o PrP é habitualmente degradado muito rapidamente o que torna difícil detectá-lo (Ma *et alii*, 2002).

2.5.5 – Localização subcelular e trânsito do PrPc:

O PrPc encontra-se ligado à superfície celular através da âncora de GPI, havendo provas de que nos neurónios ele é transportado através dos axónios para as terminações nervosas (Borchelt *et alii*, 1994) existindo uma localização dessas proteínas a nível das sinapses, sendo então lícito admitir que tenham uma função a desempenhar no funcionamento das sinapses.

O PrPc está concentrado sobretudo nas zonas sinápticas do bulbo olfatório, estruturas límbicas, complexo estriado-nigral, parecendo porém escasso no pericárium neural (Sales *et alii*, 1998).

O PrPc após alcançar a superfície celular alterna a sua posição entre a plasma membrana e compartimentos endocíticos (Shyng *et alii*, 1993) com está esquematizado a seguir.(Figura 4).

Os priões PrPc após atingirem a superfície celular são internalizados para dentro da célula por meio de endossomas (processo de endocitose) e a partir destes podem novamente atingir a superfície celular sem proteólise. Mas, para alguns destes priões, pode ocorrer proteólise e os fragmentos assim obtidos serem exocitados posteriormente.

Também alguns PrPc ancorados na superfície celular podem ser libertados intactos para o meio extracelular (após cisão da âncora de GPI) enquanto outros podem sofrer proteólise parcial (*vide* figura anterior). Admite-se que este ciclo sofrido pelo PrPc da superfície da célula para o seu interior e *vice versa* possa servir para o transporte e metabolismo do cobre. A endocitose parece acontecer em certas regiões dobradas da plasma membrana, ou seja, nos *coated pits* com clatrininas (Schmid, 1997).

Estas clatrininas, constituídas por oligómeros de grandes proteínas, associam-se no interior das plasma membranas desencadeando nestas uma invaginação que acaba por destacar-se formando uma vesícula dentro da célula, a qual, por sua vez, pode associar-se depois a outros organelos subcelulares.

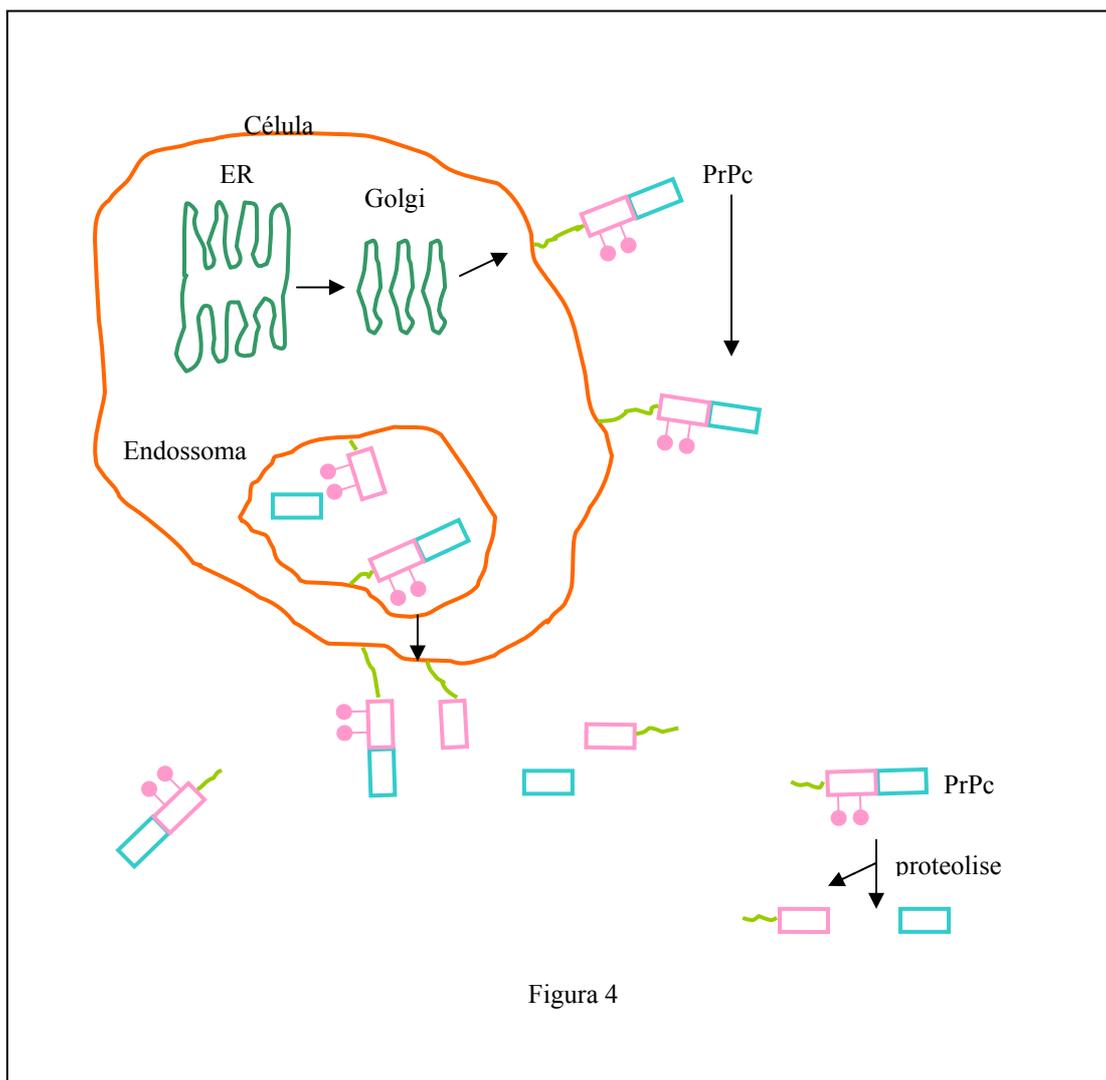


Figura 4

Estes *coated pits* com clatrina e as vesículas estão claramente implicados na endocitose do PrPc (Shyng *et alii*, 1994). Existem outras invaginações das plasma membranas que são as *caveolae* (Anderson, 1993) e que são revestidas na sua superfície citoplásmica com proteínas, as caveolinas, que são particularmente abundantes nos fibroblastos, células do músculo liso, e nas células endoteliais, não parecendo no entanto que as *caveolae*, que estão implicadas em diversos processos fisiológicos como por exemplo na transcitose, estejam implicadas no internamento dos PrPc nos neurónios (Shyng, 1994).

Existem ainda microdomínios especializados nas plasma membranas das células intactas denominados *rafts* que estão envolvidos na sinalização transmembranária e na distribuição (endereço) das proteínas membranárias (Simons e Ikonen, 1997).

Foi também admitido como hipótese a existência de um receptor transmembranário para o PrPc, receptor este que no seu domínio

citoplásmico disporia de sinais para interactuar com moléculas adaptadoras e clatrininas existentes nos *coated pits* enquanto o seu domínio extracelular interactuaria com a porção N-terminal do PrPc, porção esta indispensável para o processo de endocitose.

2.5.5.1 – Tráfego do PrPc (Prado, 2004).

Há fortes evidências de que no tráfego dos PrPc intervêm a endocitose mediada por clatrininas bem como os clássicos organelos endocíticos, tendo o domínio N-terminal do PrPc fortes implicações nos acontecimentos *sorting* que dirigem a proteína durante a sua deslocação intracelular.

Mutações na proteína PrPc implicada nas prionoses podem alterar o seu tráfego intracelular (Ivanova *et alii*, 2001).

Nos papéis fisiológicos do PrPc estão referidos por Martins *et alii* (2002) os seguintes:

- a) protecção a agressões oxidativas;
- b) intervenção na apoptose;
- c) sinalização celular;
- d) excitabilidade membranária e transmissão sináptica;
- e) neuritogénese;
- f) transporte e metabolismo do cobre.

Certamente que a endocitose ocorrida com o PrPc da superfície celular nos *rafts* lipídicos condiciona muito estes seus aspectos fisiológicos.

Endocitose do PrPc:

Os *rafts* lipídicos, ou sejam, as regiões das membranas ricas em colesterol e esfingolípido onde provavelmente ancoram as proteínas com âncoras GPI, são ricos em PrPc.

As *caveolae* são organelos relacionados em certos aspectos com os *rafts*, sendo invaginações da membrana sem revestimentos de clatrininas, parece que implicadas no internamento de proteínas com âncoras de GPI (Anderson, 1998). O internamento através de *caveolae* parece ser um dos vários mecanismos implicados na endocitose não mediada por clatrininas.

Parece mesmo que as principais formas de endocitose para proteínas com âncoras de GPI é independente das clatrininas (Nichols *et alii*, 2001).

No internamento dos PrPc ocorrem ciclos contínuos entre a plasma membrana e os compartimentos endocíticos, quer nos frangos, quer nos mamíferos (Shyng *et alii*, 1994).

O PrPc parece coexistir na superfície celular em componentes *raft* e não *rafts* da membrana, parecendo que quando saem dos *rafts* são internados através de *coated pits* (Sunyach *et alii*, 2003).

A formação de certas vesículas endocíticas a partir da plasma membrana depende de grandes GTPases da família dinamina que são necessárias para a fissão de membranas endocíticas (Damke *et alii*, 2001) parecendo que a endocitose dos PrPc é sobretudo mediada por vesículas revestidas de clatrin, assim como por outros mecanismos independentes das clatrin.

A região N-terminal do PrPc é importante para a sua endocitose e para o seu retorno à plasma membrana.

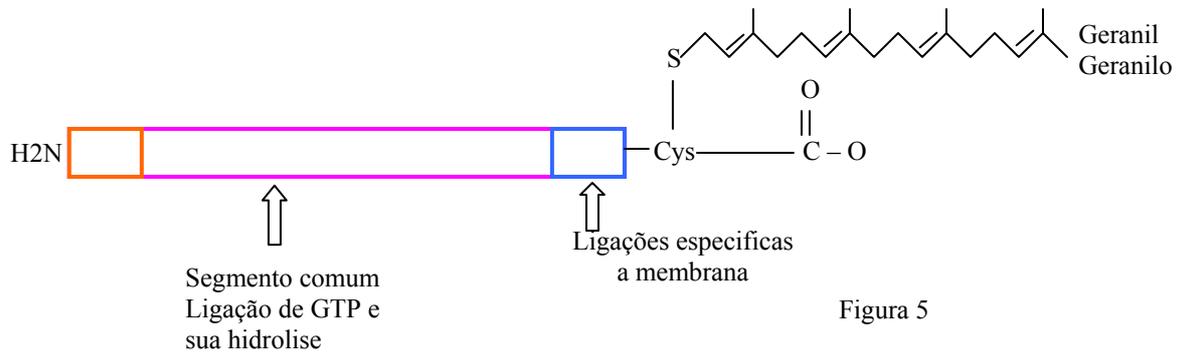
2.5.5.1.1 – Organelos envolvidos no tráfego dos PrPc:

O tráfego intracelular de proteínas é feito através do transporte em vesículas e o internamento de proteínas pode ser feito através de *caveolae* sem ser através do clássico sistema endossomas/lizossomas, ou outro tipo de endocitose sem clatrin. O transporte vesicular na endocitose e na exocitose é regulado por proteínas Rab, ou sejam, pequenas GTPases (Zerial e McBride, 2001) com diferentes destas proteínas Rab a estarem associadas com diferentes domínios dos endossomas (Sonrichesen *et alii*, 2000) (*vide* figura adiante). A Rab 5 está associada com vesículas com clatrin e com *early* endossomas (Bucci *et alii*, 1992, 1994, 1995). Os *early* endossomas são organelos que se formam a partir de vesículas revestidas por clatrin logo após elas serem formadas (*bud*) a partir da plasma membrana. As Rab 4 acoplam os primeiros compartimentos subcelulares e a reciclagem promovendo uma via directa para retorno dos receptores à plasma membrana (Daro *et alii*, 1996), A Rab 11 recicla endossomas.

As Rab 7 e Rab 9 encontram-se nos *late* endossomas sendo necessárias as Rab 7 para o transporte de moléculas dos *early* endossomas para os *late* endossomas e para os lizossomas (Feng *et alii*, 1995) e as Rab 9 para o transporte dos *late* endossomas para o trans-Golgi (Lombardi *et alii*, 1993). As Rab 6 estão implicadas no tráfego retrógrado do Golgi para o ER (White *et alii*, 1999). Admite-se que o transporte retrógrado do PrPc para o ER desencadeie neste uma maior conversão PrPc → PrPsc.

Nos neurónios o PrPc está concentrado no Golgi e nos endossomas (Laine, 2001).

O pH ácido parece ser crítico para as mudanças de conformação dos PrPc (Horhemann e Glockshuber, 1998). Na estrutura geral das Rab proteínas podem considerar-se os seguintes aspectos referidos na figura a seguir:(Figura 5)



Há uma porção central relativamente idêntica em todas as Rab proteínas, que se liga a GTP hidrolizando-o para GDP. A porção C-terminal com cerca de 35 aminoácidos é diferente consoante a Rab proteína e determina a que membrana se liga essa proteína, ligando-se um resíduo de cisteína C-terminal covalentemente a um lípido poliisoprenóide (Geranylgeranil neste exemplo).

A porção N-terminal também varia consoante a Rab proteína.

Em figura 6 adiante esquematizam-se aspectos importantes da endocitose, da exocitose e localização subcelular dos PrPc, e o papel das diferentes famílias de Rab proteínas no tráfego intracelular das proteínas priónicas.

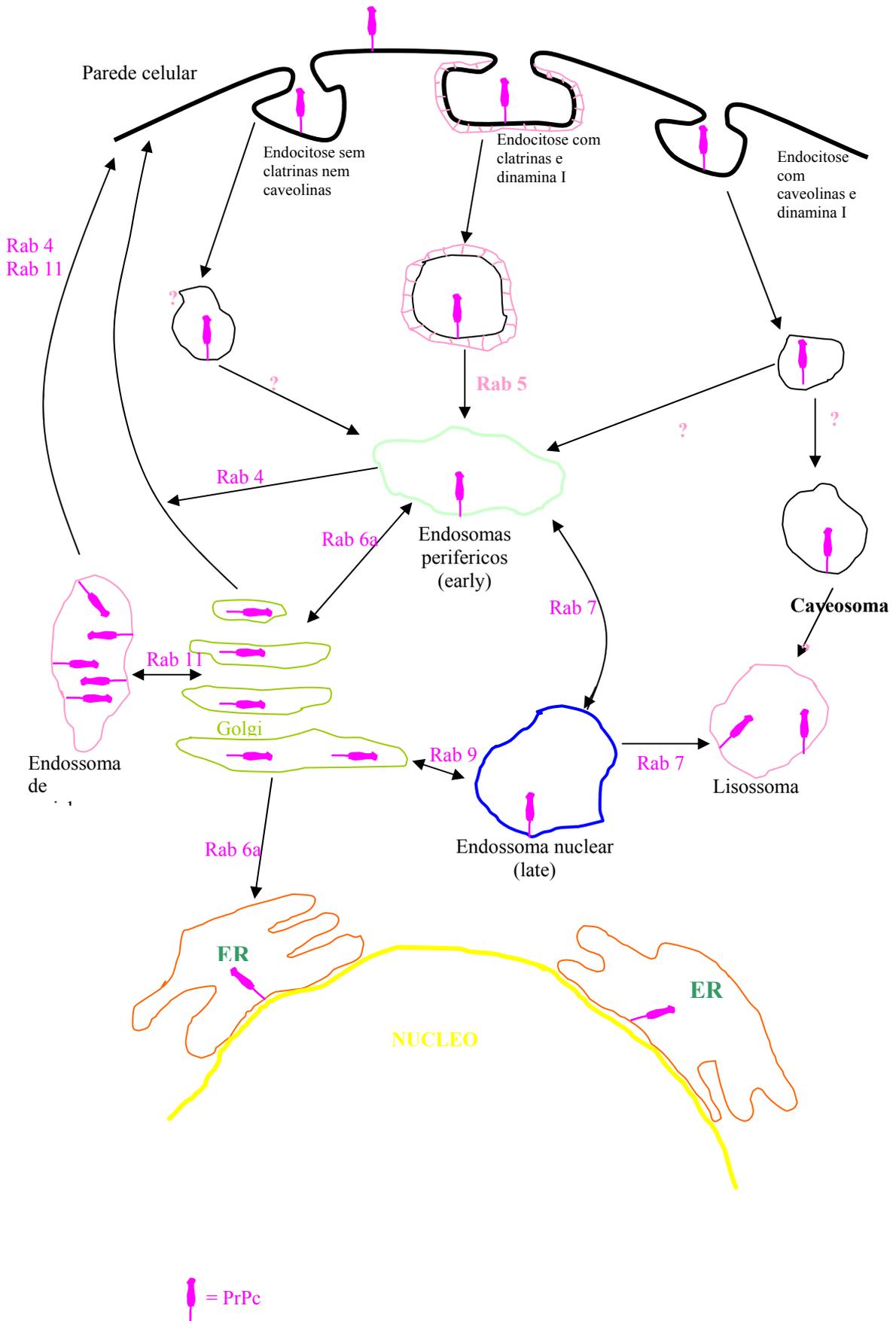


Figura 6

Na plasma membrana o PrPc pode ser internado por uma endocitose que é potenciada pelo catião cobre extracelular.

Nos neurónios a maior via de internamento do PrPc parece utilizar clatrininas e dinamina I. A endocitose auxiliada por caveolinas está assinalada para o PrPc em células gliais.

Nos neurónios está ainda assinalada a presença de PrPc no Golgi e de PrPsc nos endossomas (*late*) nuclear e nos lisossomas.

Também a interacção da Rab 6 a no transporte retrógrado para o ER e da Rab 4 na reciclagem do PrPc para a membrana estão referidos.

A produção aumentada de PrPsc verificada com mutantes da Rab 4 e Rab 6 levam a admitir que os *early* endossomas e o tráfego retrógrado para o aparelho de Golgi e ER estejam implicados na conversão PrPc → PrPsc (Beranger *et alii*, 2002).

Excesso de PrP no ER, ou conformações anormais dessas proteínas, podem originar a sua saída para o citosol onde seriam degradadas pelo proteossoma (Ma e Lindquist, 2002) desencadeando toxicidade e morte celular.

Já referimos que o PrP pode ser sintetizado em diferentes formas transmembranárias (Hedge *et alii*, 1998) e uma delas, a CtmPrP, através da sua porção N-terminal, participa na patogénese de certas prionoses.

A localização intracelular do PrPc e os organelos envolvidos no seu trânsito variam dos neurónios para linhas celulares do tipo neuroblastoma ou células gliais, dependendo portanto do tipo celular.

Como já referimos o cobre induz a endocitose dos PrPc, estando assinaladas na porção N-terminal deste uma região de 4-5 octarrepetições contendo histidina e glicina que interactua com quatro catiões cobre (Aronoff-Spencer *et alii*, 2000).

2.5.5.1.2 – Tráfego do PrPc em vias endossomais mediadas por *caveolae*:

Tem sido também observado (Peters *et alii*, 2003) que o PrPc se encontra em *caveolae* na plasma membrana e nas vias endocíticas de *caveolae*, parecendo que os PrPc transitam através de *caveolae* para a região pericentriolar e por via não clássica, através de estruturas periféricas contendo *caveolae* para endossomas/lisossomas mais interiores, ultrapassando assim o internamento mediado por vesículas com clatrininas.

Os PrPc endocitados através de *caveolae* não são dirigidos para o ER nem para o aparelho de Golgi e a sua degradação é lenta (Peters *et alii*, 2003).

Os PrPc encontram-se enriquecidos nas *caveolae* dos TGN (*trans-golgi network*) e da plasma membrana e nas cadeias de interconexão com *caveolae* endocíticas. As *caveolae* como se disse são microdomínios especializados das membranas que contêm membros da família de proteínas caveolina, sendo ricas em colesterol e glicoesfingolípido, assumindo a forma de invaginação na plasma membrana ou formando complexas cadeias de interconexão de várias *caveolae* (Parton, 2003) mediando a transdução de sinais e a transcitose.

As *caveolae* podem ser consideradas uma classe especial de *rafts* parecendo ter um papel crucial na conversão PrPc→PrPsc (Naslavsky *et alii*, 1997).

Significativamente, os neurónios, astrocitos e células dos gânglios basais contêm *caveolae*, tal como células do intestino e músculos (Peters *et alii*, 2003).

Os PrPc parecem ser cedidos através de *caveolae* para a região pericentriolar e através duma via não clássica contendo *caveolae* em estruturas endocíticas *early* para os *late* endossomas/lizossomas, fazendo assim uma ultrapassagem à via de internamento mediada por vesículas revestidas com clatrin.

O PrPc endocitado por *caveolae* não é dirigido nem para o ER nem para o aparelho de Golgi como já referimos.

Esta via endocítica não clássica, que não é partilhada por diversas outras proteínas com âncoras de GPI, talvez determine a localização subcelular da conversão PrPc→PrPsc.

Os PrPc seguem uma via diferente de outras proteínas contendo âncoras de GPI.

2.5.5.2 – Internamento dos priões:

No mecanismo de internamento dos priões ancorados através de uma âncora GPI à superfície celular há referências (Sunyach *et alii*, 2003) que revelam que a proteína priónica deixa os domínios *rafts* para entrar em domínios não *rafts* da membrana e a partir destes entrando em *coated pits*. O domínio N-terminal da proteína priónica (aminoácidos 23 a 107) é suficiente para conduzir o internamento, admitindo-se que a mudança no ambiente da membrana possa alterar a possibilidade de conversão PrPc→PrPsc.

A região N-terminal do PrP actua como um alvo do *raft* celular através do sinal compreendido entre os aminoácidos 23 a 90 do PrP (Walsmsley *et alii*, 2003).

O PrPc é abundantemente expresso nos neurónios, nas células neuroendócrinas e nas células do estroma do sistema linforreticular (Sunyach *et alii*, 2003).

2.5.6 – Transporte, inclusivé retrógrado, para o ER dos PrPc e possível papel das Rab proteínas:

No trânsito celular e subcelular das populações moleculares de PrPc e PrPsc as vias de endocitose e exocitose assumem particular importância.

Os organelos celulares comunicam entre si através de um fino sistema de transporte vesículo-tubular, quer nas vias de endocitose quer nas de exocitose (Zerial e McBride, 2001).

As Rab proteínas e os seus efectores coordenam a formação destas vesículas, a sua mobilidade, bem como a dos organelos, assim como o direccionamento das vesículas para os seus compartimentos alvo.

Estas Rab proteínas estão altamente compartimentadas consoante as membranas dos organelos, determinando a especificidade de cada transporte e a identidade dos organelos envolvidos.

As Rab proteínas, a maior família de GTPases monoméricas, ciclaram regularmente entre formas com GTP ou GDP ligado, regulando a mobilidade das vesículas sobre microtúbulos e filamentos de actina do citoesqueleto.

As proteínas Rab medeiam a interacção entre vesículas e a sua membrana alvo com a subsequente colaboração de proteínas SNARE.

As Rab proteínas encontram-se acantonadas sobretudo em domínios membranários chamados domínios Rab.

Por outro lado, as proteínas SNARE medeiam todas as fusões intracelulares de membranas (por exemplo, vesículas provenientes de uma membrana dadora para outra membrana receptora) (Chen e Scheller, 2001). Nas células de animais mamíferos existem mais de trinta membros da família SNARE e cada um deles tem uma distinta distribuição nos diversos compartimentos subcelulares.

A fusão de membranas e de vesículas utiliza proteínas SNARE de que são conhecidas mais de cem, sobretudo distribuídas em três famílias: as syntaxinas; as VAMPs; e a família SNAP-25.

Elas conferem especificidade à docagem das vesículas com uma determinada membrana receptora, e as SNARE sobre duas membranas, admitindo-se que interactuam entre si formando um complexo parcial reversível antes da fusão final ocorrer.

Na fusão de membranas as vesículas fazem portanto a docagem com a ajuda de proteínas Rab e outros factores e das SNAREs, criando curvaturas nas membranas em contacto e tensão, seguindo-se a hemifusão e depois a fusão completa (ver figura 7).

Ciclo de uma vesícula de transporte de um compartimento dador para um compartimento receptor

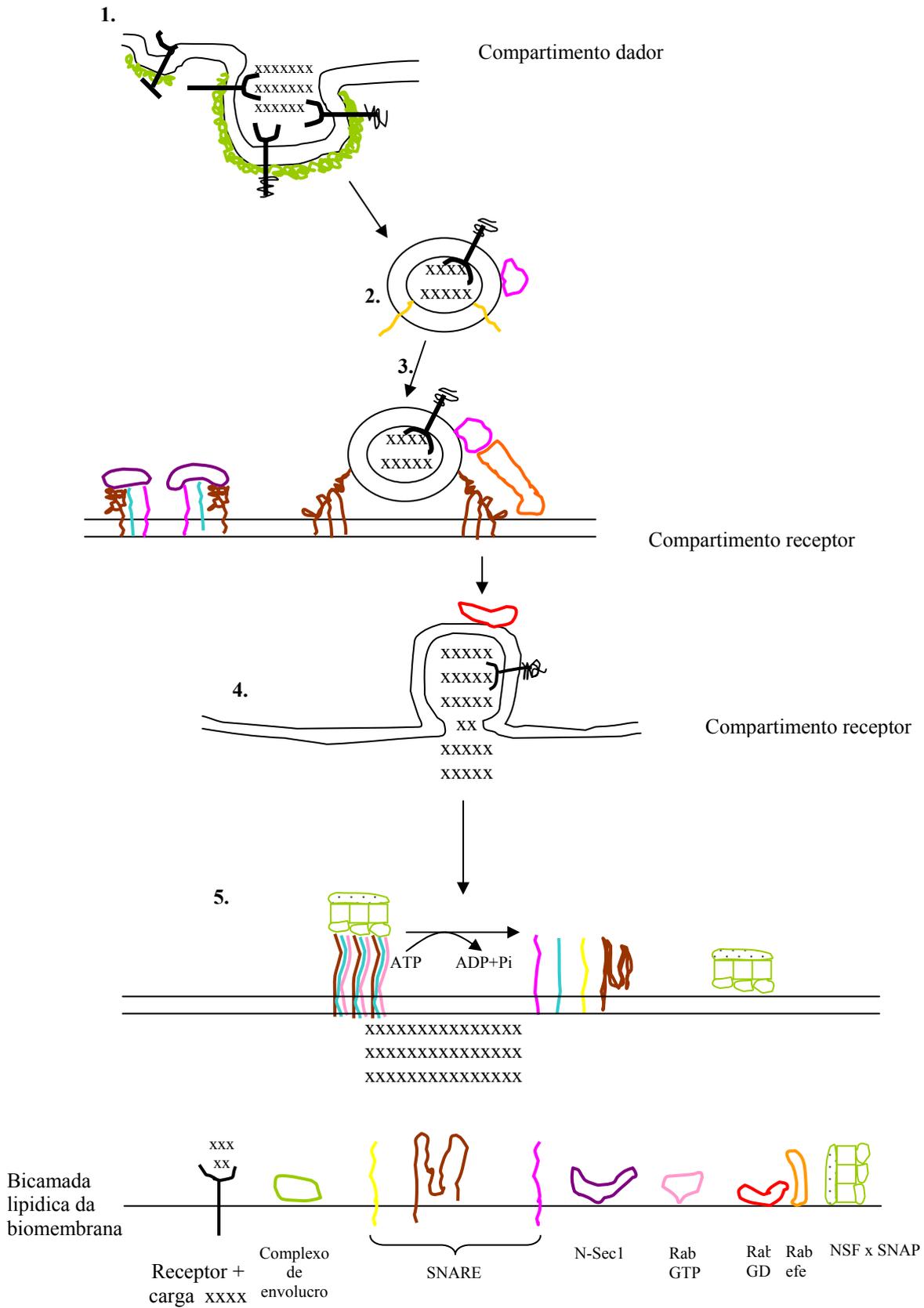


Figura 7

Ainda no que se refere à formação de vesículas e ao seu transporte de cargas moleculares de diferentes formas e tamanhos entre organelos intervêm ainda outro tipo de proteínas, as proteínas de envólucro COP I, COP II, e as clatrininas, que desencadeiam a gemulação das vesículas, funcionando o COP I no transporte através do aparelho de Golgi e no transporte retrógrado do Golgi para o ER, e o COP II no transporte do ER para o Golgi, enquanto a clatrina funciona na endocitose mediada por receptor na plasma membrana quando associada com adaptadores AP2 e no transporte trans-Golgi para os endossomas quando associada com adaptadores AP1.

Diversas proteínas acessórias intervêm nas interações que regulam a formação de *coat-clatrininas*.

É conhecido (Maxfield e McGraw, 2004) que um fibroblasto típico interna pelo menos 2% da sua plasma membrana em endossomas, em um minuto, e que é necessário para manter a homeostasia da membrana o retorno dessa fracção de plasma membrana internada nos endossomas para a plasma membrana à superfície da célula. No entanto, após a endocitose embora a maioria das proteínas e lípidos retornem à superfície celular alguns componentes da membrana são transportados para endossomas *late* ou para o aparelho de Golgi ou para lisossomas.

A via implicada no internamento molecular e sua eventual reciclagem para a superfície celular é pois extremamente complexa envolvendo uma série de acontecimentos em diversos organelos.

Pode afirmar-se que em todas as células eucariotas os processos constitutivos da exocitose e da endocitose mantêm o fluxo de materiais para a superfície celular e a partir da superfície celular (Gundelfinger *et alii*, 2003).

Nas células nervosas com origem em locais definidos da membrana celular (zonas activas) são libertadas de vesículas sinápticas grandes quantidades de neurotransmissores através de processos de exocitose e de endocitose. Curiosamente, no ER existe um sistema de controlo de qualidade de proteínas sintetizadas de novo (Ellgaard e Helenius, 2003) de forma a apenas permitir que as proteínas com conformações correctas é que chegem aos seus destinos finais. As proteínas adquirem a sua conformação no ER com a ajuda de diversos chaperones especializados e factores conformacionais. Proteínas em biossíntese que não alcancem a sua conformação normal ou que sejam incompletamente oligomerizadas são retidas no ER e se a anomalia persistir são decompostas.

Está referido que proteínas das membranas ou segregadas que são retidas no ER são por vezes sujeitas a um controlo que as retrotransloca para o citoplasma onde são decompostas pelo proteossoma (Tsai *et alii*, 2002; Bonifacino *et alii*, 1998). É o caso das proteínas anormalmente conformadas ou oligomerizadas em complexos anormais.

Foi possível verificar em cultura de células que uma pequena fracção de moléculas PrP é submetida a degradação proteossomal mas sem serem retrotranslocadas do lumén do ER. No entanto, aqui ficam associadas com a face citoplásmica da membrana ER onde são rapidamente degradadas pelo proteossoma (Harris, 2003).

2.6 – Biologia do PrPsc:

2.6.1 – Transferência de PrPc entre células :(Liu *et alii*,2002).

A transferência entre células de PrPc e a formação de PrPsc necessita da âncora GPI e contactos directos célula a célula.

In vivo os PrPsc são produzidos em diversos tipos de células inclusivé nos neurónios, astrocitos e células do sistema linforreticular (Blattler *et alii*, 1997; DeArmond *et alii*, 1987; Diedrich *et alii*, 1991; Race e Ernest, 1992). Há referências que assinalam que a proteína PrPc ligadora de metal e com propriedades anti-oxidantes, da sua superfície celular liga-se a lamininas e a glicosaminoglicanas participando na transdução de sinais (Mouiller-Richard *et alii*, 2000; Gauczynsk *et alii*, 2001; Hund *et alii*, 2001; Caughey e Raymond, 1993).

Na conversão PrPc→PrPsc está verificado (Horiuchi e Caughey, 1999) que o contacto entre as duas formas faz-se à roda dos resíduos de aminoácidos de 219 a 232, quer a nível da plasma membrana quer nos compartimentos subcelulares (Shyng *et alii*, 1993; Vey *et alii*, 1996; Lehmann e Harris, 1996; Borchelt *et alii*, 1992).

Também há provas de que o PrPc não é constituído em PrPsc quando for expresso em formas transmembranárias mais do que com âncoras GPI (Kaneko *et alii*, 1997; Taraboulos *et alii*, 1995).

Apesar do PrPc ser expresso em diversos tecidos e órgãos sem ser o sistema nervoso central (Liu *et alii*, 2001; Bendheim *et alii*, 1995; Caughey *et alii*, 1988) a patologia das TSE ocorre exclusivamente no sistema nervoso central (Gambetti *et alii*, 2001; DeArmond e Prusiner, 1995).

Tem sido verificado experimentalmente que proteínas purificadas ancoradas através de GPI podem incorporar-se espontaneamente sobre membranas celulares alvo, portanto *in vitro*, o que se designa como *cell painting* (Medof *et alii*, 1985; Tykocinsk *et alii*, 1996) havendo provas também de que estas proteínas podem destacar-se de uma dada superfície celular e associarem-se com a superfície celular de outra célula (Liu *et alii*, 2002) por exemplo, células neuronais para outro tipo de células. Esta

transferência parece ser finamente regulada e depender do estado fisiológico das células e do seu microambiente.

O contacto directo célula com célula parece ser essencial para a transferência de PrPc, havendo no entanto casos de transferência intercelular sem contacto directo célula com célula e com a intervenção de microvesículas libertadas das células dadoras (Anderson *et alii*, 1996; Miller *et alii*, 1998).

Nas prionoses infecciosas naturais como o *scrapie* nos ovinos e a BSE nos bovinos, o PrPsc entra através do tubo gastro-intestinal, migra depois para o baço no caso do *scrapie* e origina patologia no CNS tendo o PrPsc que ser transferido entre diversos tipos de células.

No caso de injeções intracerebrais de PrPsc o PrPsc tem sido primeiro detectado no baço o que leva a admitir que viaja do CNS para os tecidos periféricos (Fraser e Dickson, 1970; Eklund *et alii*, 1967).

Sabe-se também que a activação do sistema imunitário encurta o período de incubação no rato infectado experimentalmente (Dickson *et alii*, 1978; Marsh, 1981).

Ambos os PrPc e PrPsc são ancorados à superfície celular através de âncoras GPI (Vey *et alii*, 1998; Taraboulos *et alii*, 1995; Naslavsky *et alii*, 1997). Se a transferência intercelular para o PrPsc é idêntica à verificada para o PrPc é desconhecido, mas a conversão PrPc→PrPsc necessita que ambos estejam presentes na mesma membrana contínua (Baron *et alii*, 2002).

Há observações (Baron *et alii*, 2002) que avançam que a formação de novos PrPsc durante a infecção necessita da remoção de PrPc das células alvo, uma troca de membranas entre as células ou a inserção do PrPsc recém chegado ou das células dadoras aos domínios *rafts* das células receptoras tal como esboçamos na figura 8 seguinte. Sugerem-se dois mecanismos possíveis para a iniciação e a propagação do PrPsc exógeno. Num caso em cima da figura em apreço as moléculas de PrPsc são inseridas a partir de uma célula na membrana de outra célula (*paiting*). No outro caso a inserção era mediada pela tomada de micropartículas membranárias (Mack *et alii*, 2000) ou por troca de componentes membranários entre células justapostas (Batista *et alii*, 2001) como se admite para as sinapses nervosas. O primeiro caso está assinalado como ocorrendo *in vivo* (Kooyman *et alii*, 1995).

A transferência da infecciosidade do prião do *scrapie* está referida como ocorrendo pelo contacto entre células em cultura (Kanu *et alii*, 2002).

Mecanismos prováveis de transmissão de PrPsc de células infectadas para células não infectadas

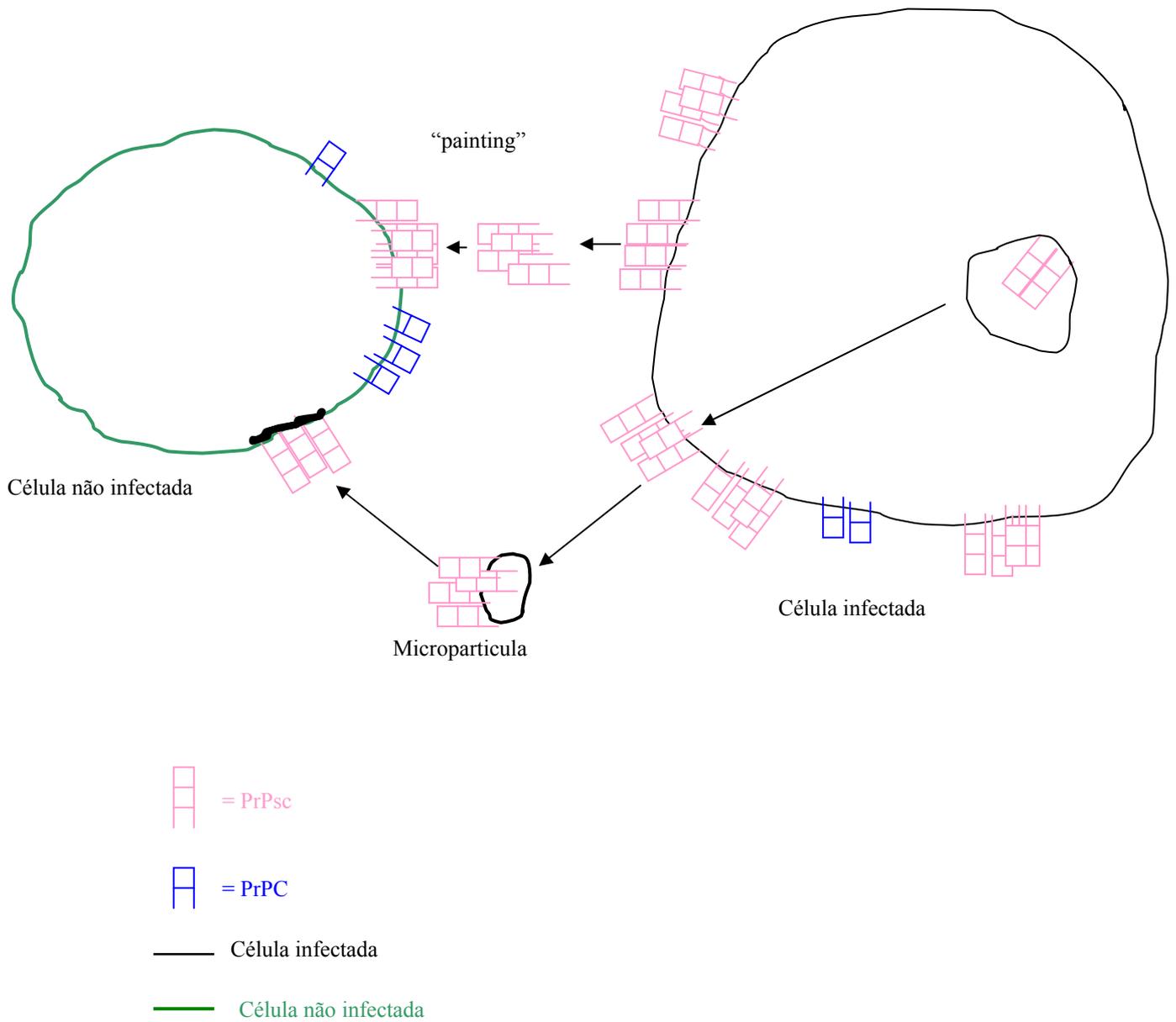


Figura 8

A interacção entre as moléculas de PrPc com PrPsc parece ocorrer na zona dos aminoácidos 219 a 232 e talvez decorra nas células na plasma membrana e em compartimentos subcelulares (Shyng *et alii*, 1993; Vey *et alii*, 1996; Lehmann e Harris, 1996; Borchelt *et alii*, 1992). Nesta conversão parecem intervir uma série de intermediários localizados em diversos tecidos até o CNS ser atingido.

Admite-se que as proteínas ancoradas através de GPI como sucede com as proteínas priónicas se possam destacar da superfície duma célula para se unirem à superfície de outra célula, admitindo-se que esta permuta seja regulada *in vivo* (Llangumaran *et alii*, 1996).

A transferência de PrPc de células neuronais para outros tipos de células é admitida, tudo dependendo do estado fisiológico das células e do seu microambiente.

O contacto directo célula a célula é essencial para a transferência de PrPc que se encontra associado com *rafts* lipídicos, ou sejam, microdomínios da membrana ricos em colesterol e glicoesfingolípido. Admite-se que os PrPc possam ser transferidos de uma célula dadora como moléculas individuais que depois se reorganizam dentro dos domínios da membrana receptora, podendo também fragmentos da membrana ou microdomínios que contêm uma série de moléculas de PrPc serem transferidos selectivamente.

Se o PrPsc se transfere de célula para célula de forma similar ao PrPc permanece por elucidar, embora se reconheça que é necessário que o PrPsc e o PrPc estejam presentes na mesma membrana contínua (Baron *et alii*, 2002). Também se admite que células pobres em PrPc possam adquirir este por transferência de outras células e contribuir assim para a conversão ulterior em PrPsc.

2.6.2 – Vias celulares de formação de PrPsc:

Esboçam-se seguidamente as vias celulares implicadas na formação de PrPsc, quer em situações infecciosas, quer em situações de mutação genética.

Situações infecciosas (Harris, 1999)(Figura 9)

A maioria das moléculas PrPc reside nos domínios *raft* das plasma membranas e só uma pequena parte sofre endocitose (Harris, 2003).

Na situação infecciosa as partículas infecciosas extracelulares interactivam com as proteínas priónicas celulares normais PrPc situadas nos *rafts* das superfícies celulares desencadeando a formação, ou melhor,

Situações infecciosas

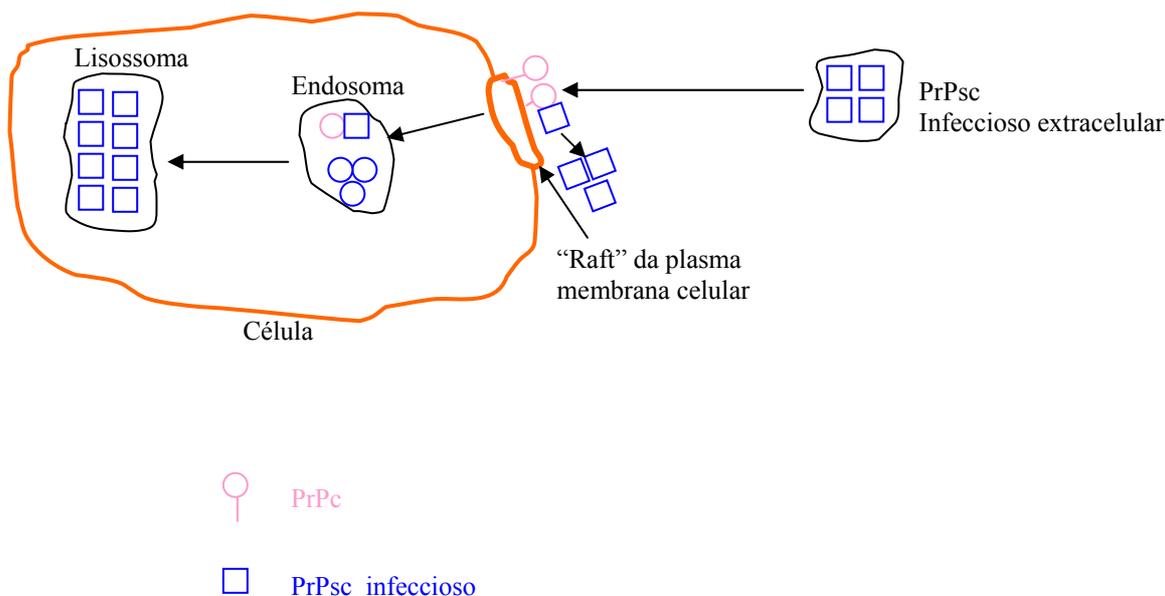


Figura 9

a conversão destas proteínas PrPc em PrPsc infecciosos. Esta conversão pode ocorrer à superfície celular ou então após a internalização destas proteínas, nos endossomas. Acumulam-se depois as proteínas PrPsc entretanto formadas nos lisossomas e provavelmente noutros compartimentos celulares.

Situações de mutação genética:(Figura 10)

No caso de mutação genética dos PrPc as proteínas mutadas formam uma série de intermediários conformacionais que acabam por atingir a superfície celular onde originam PrPsc mutados, o que também pode ocorrer em organelos endocíticos, portanto no interior da célula.

Os mecanismos de formação dos PrPsc nas formas infecciosas e nas formas genéticas são diferentes, pois no caso das formas infecciosas os PrPsc exógenos estão na base da formação de mais agentes infecciosos ao estarem envolvidos na conversão de PrPc endógeno em PrPsc, enquanto nas formas genéticas a mutante PrP transforma-se espontaneamente em PrPsc. Na localização subcelular dos PrPsc, sobretudo na apurada em experiências com células em cultura (na maior parte das vezes linhas neuronais) verificou-se que os clones e os tipos de células em cultura

condicionam muito esta localização, estando assinalado, embora nem sempre, localizações intracelulares no aparelho de Golgi, nos endossomas e lisossomas, assim como localizações à superfície celular. É claro que seria muito importante conhecer as proporções relativas dos PrPsc nestas diversas localizações subcelulares.

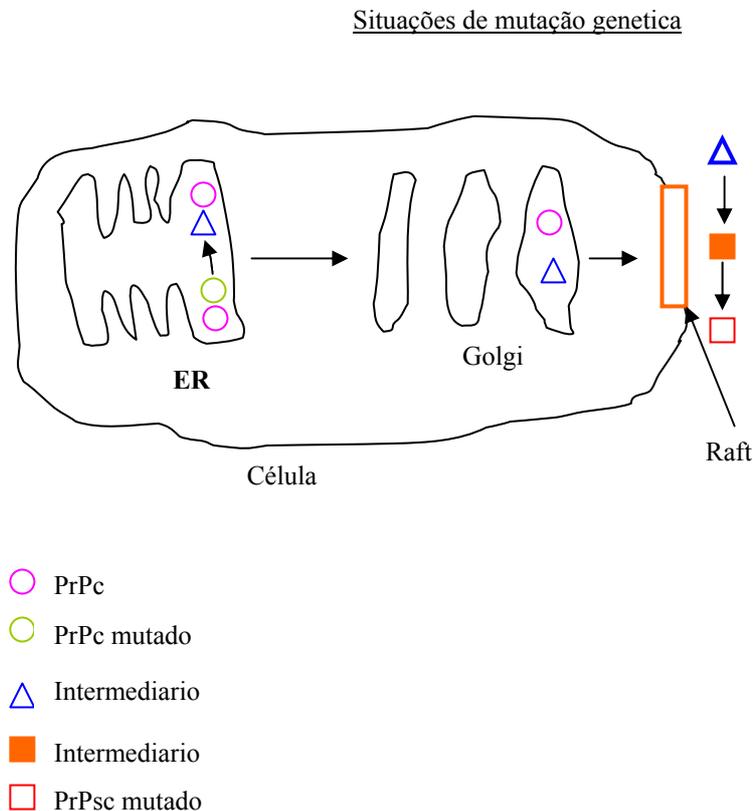


Figura 10

Na ligação à membrana celular dos PrPsc existem ainda muitas dúvidas, embora tanto os PrPc como os PrPsc possuam uma âncora de GPI C-terminal (Stahl *et alii*, 1992). Porém, a forma como os PrPc e os PrPsc se associam com as membranas são diferentes, estando esclarecido que enquanto a maioria dos PrPc se ligam à membrana celular exclusivamente através da âncora de GPI, uma subpopulação relativamente escassa destes PrPc tem, por outro lado, uma orientação transmembranária.

A transformação PrPc→PrPsc é um acontecimento que decorre após a tradução e uma vez formado o PrPsc este parece metabolicamente estável enquanto o PrPc parece ter uma semi-vida muito curta (Borchelt *et alii*, 1990; Borchelt *et alii*, 1992; Caughey e Raymond, 1991) e, pelo menos em condições experimentais em culturas celulares, apenas uma

minoria de moléculas PrPc seja convertida em PrPsc, sendo as restantes moléculas de PrPc decompostas talvez através de vias que operam em compartimentos ácidos como os endossomas e lisossomas.

A transformação do PrPc em PrPsc parece ser, pelo menos em condições experimentais em cultura de células, um processo que decorre em diversas etapas à medida que os príões PrPc atravessam os diversos compartimentos subcelulares.

Assim, após a biossíntese do PrPc, ocorrerá durante o seu percurso através do retículo endoplásmico, uma alteração da conformação da proteína priónica, seguindo-se depois em etapas mais demoradas a maturação e aquisição das características PrPsc acompanhando o trajecto que é feito até à plasma membrana ou por via endocítica.

2.6.3 – Aquisição do PrPsc extracelular:

Perfilam-se a este propósito, e dada a pouca informação disponível, várias sugestões.

Assim, admitindo-se um mecanismo de endocitose o PrPsc infeccioso interactivaria com o PrPc sobre a plasma membrana ou nos endossomas onde decorrerão portanto as etapas conversoras (Caughey e Raymond, 1991; Safar *et alii*, 1991; Taraboulos *et alii*, 1990).

No entanto existem hoje provas de que também subdomínios das plasmas membranas, os *rafts*, poderão estar implicados na formação de PrPsc a partir do PrPc. Têm sido encontrados nestes *rafts* PrPc e PrPsc (Simons e Ikonen, 1997; Naslavsky *et alii*, 1996; Taraboulos *et alii*, 1995). A formação de PrPsc parece ocorrer em duas localizações celulares distintas: a primeira delas no ER e a segunda na própria plasma membrana ou em compartimentos endocíticos ou endossomas.

De qualquer forma torna-se necessário pelo menos num dos casos que o PrPsc de proveniência externa tenha acesso ao lumén do ER para interactivar com o PrPc sintetizado de novo, sendo bem possível que aqui actuem como cofactores chaperones do ER.

O PrPsc sofre depois uma cisão proteolítica que lhe remove a porção N-terminal (Caughey *et alii*, 1991; Chen, 1995; Taraboulos *et alii*, 1992) e que ocorre num local diferente daquele onde é cindido o PrPc (*vide* figura anterior).

A cisão do PrPc em $\nabla 2$ (*vide* figura anterior) ocorre portanto dentro da região amilóidogénica e neurotóxica da molécula, enquanto a cisão do PrPsc em $\nabla 1$ deixa este segmento peptídico intacto.

A cisão do PrPc ocorre nos endossomas ou lisossomas. Uma pequena parte das moléculas de PrPsc sofrem uma cisão na porção C-terminal da cadeia polipeptídica três resíduos de aminoácidos aquém do

ponto de ligação com a âncora GPI (Stahl *et alii*, 1990) sendo esta cisão diferente daquela $\nabla 3$ (*vide* figura anterior) que ocorre sobre os PrPc, ou seja, neste caso dentro da própria estrutura da âncora.

2.6.4 – Conversão PrPc→PrPsc:

Na conversão conformacional do PrPc em PrPsc há fundamentalmente a considerar dois modelos (Weissmann *et alii*, 2002). Um deles reporta-se ao modelo de reenrolamento do prião e outro ao modelo de nucleação.

O modelo de enrolamento (Prusiner, 1991) da conformação da proteína propõe que o PrPc desenrola-se numa certa extensão e depois por influência de uma molécula de PrPsc se reenrola doutra forma, estando os dois estados conformacionais separados por uma barreira de energia de activação ultrapassada com a ajuda duma enzima ou chaperone.

Modelo de enrolamento.(Figura 11)

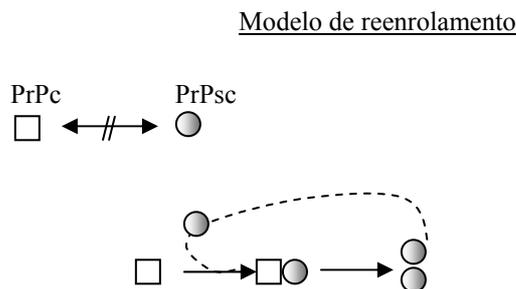


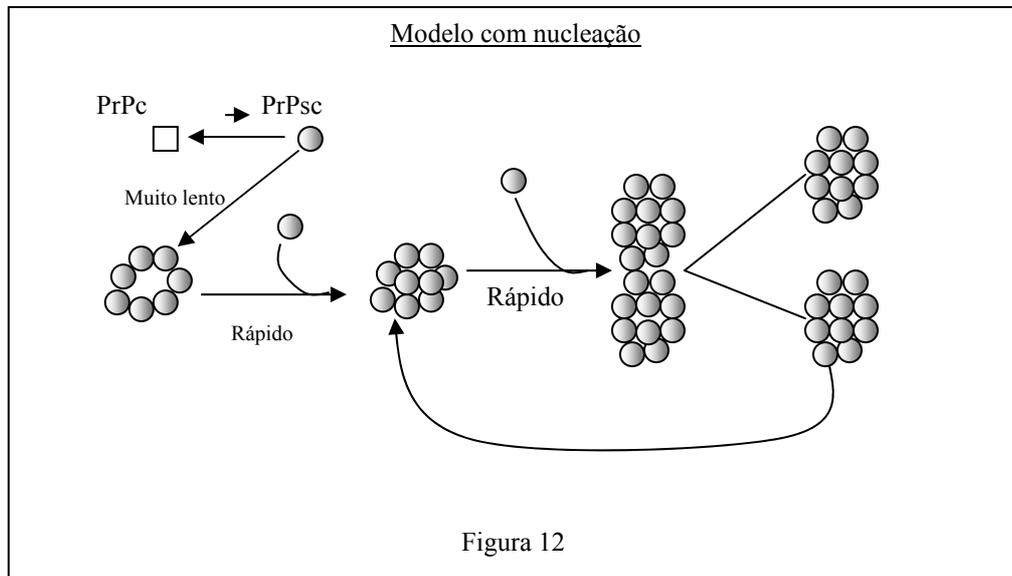
Figura 11

O modelo de nucleação (Jarret e Lansbury, 1993) postula que o PrPc se encontra em equilíbrio com o PrPsc mas este equilíbrio é grandemente a favor da forma PrPc, e o PrPsc apenas é estável quando forma um agregado multimérico ou núcleo ao qual depois se adicionam monómeros. A quebra destes agregados promove o aumento exponencial do PrPsc durante a infecção (Orgel, 1996).

Modelo de nucleação:(figura 12)

Esta conversão ocorre portanto na modificação da conformação proteica e não por alteração da covalência, tendo as duas isoformas a mesma estrutura primária e provavelmente as mesmas adições após a

tradução dos respectivos mRNA (Prusiner *et alii*, 1998; Stahl *et alii*, 1993).



A geração da isoforma PrPsc implica primeiramente alterações na metade N-terminal do polipéptido, inclusivé a conversão de hélices α em folhas pregueadas β (Peretz *et alii*, 1997) nos resíduos de aminoácidos de 90 a 121.

São conhecidas as partes do PrPc que interactuam com partes do PrPsc (Fisher *et alii*, 1996; Muramoto *et alii*, 1996) sabendo-se que na região central de cada uma destas proteínas (a PrPc e a PrPsc infecciosa) o grau de homologia dos aminoácidos respectivos afectam notavelmente a eficiência da conversão PrPc \rightarrow PrPsc (Scott *et alii*, 1993; Telling *et alii*, 1995). Um simples aminoácido pode evitar esta conversão, tal como as não homologias (Priola *et alii*, 1994; Priola *et alii*, 1995).

Nos modelos sugeridos para a formação do PrPsc a polimerização nucleada, semelhante à polimerização da actina ou da tubulina, e a assistência na moldagem feita por chaperones originando um intermediário do PrP*, poderiam actuar conjuntamente nas conversões dos PrPc em PrPsc, tendo as moléculas de PrPsc posteriormente forte tendência para agregarem-se e polimerizarem-se.

Os chaperones que existem no ER são colectivamente designados por proteína X, interactuando de forma específica com a porção C-terminal dos PrPc durante a propagação dos príões.

Estes chaperones parecem ser específicos de cada célula. Uma vez produzidos os PrPsc eles são estáveis metabolicamente e localizam-se em organelos intracelulares, embora não exclusivamente, sobretudo em endossomas e lisossomas, locais onde a porção N-terminal do polipéptido é cindida.

Resumindo, as proteínas PrPc são biossintetizadas ao longo de vias segregadoras adquirindo uma âncora de GPI que as unem à bicamada lipídica da membrana celular. Chegadas à plasma membrana os PrPc são endocitados através de vesículas revestidas de clatrina, ou por outros meios, sendo depois algumas destas moléculas sede de proteólise antes de serem devolvidas à superfície celular novamente. A eficiência da endocitose depende das características de estrutura da metade N-terminal da proteína priónica e pode ser mediada por um receptor transmembranário para as proteínas PrPc.

Os metabolismos dos PrPc e dos PrPsc são diferentes conforme se compreende pela diferente conformação destas duas isoformas e vai depender ainda dos diversos compartimentos celulares e subcelulares e respectivos conteúdos enzimáticos percorridos pelo tráfego dessas moléculas.

Podemos afirmar genericamente que as moléculas PrPsc são metabolicamente estáveis e acantonam-se parcialmente, embora não exclusivamente, em organelos intracelulares (endossomas e lisossomas) locais onde provavelmente ocorre a proteólise da porção N-terminal dessas cadeias polipeptídicas, dentro de uma região central conservada. Moléculas intactas PrP assim como fragmentos ancorados a membranas pela porção C-terminal, são depois devolvidos para a superfície celular, enquanto os fragmentos N-terminais solúveis são libertados para o meio extracelular.

A maioria das moléculas de PrPc encontra-se ligada à membrana celular exclusivamente por meio da âncora de GPI, mas existe uma subpopulação com uma orientação transmembranária.

No mecanismo de conversão PrPc→PrPsc os PrPc primeiro ligam-se ao PrPsc através dum local próximo da terceira hélice da porção C-terminal e depois a conversão é mais morosa (DeBurmman *et alii*, 1997; Horiuchi *et alii*, 1999; Vorberg e Priola, 2002). A conversão não parece ser eficiente quando o PrPc e o PrPsc se encontram em vesículas separadas, tornando-se necessária a sua fusão (Baron *et alii*, 2002) e parece que isto decorre dentro do contexto da membrana.

Há provas evidentes da disseminação no interior dos axónios dos priões no CNS (Brandner *et alii*, 1996; Fraser, 1982; Race *et alii*, 2000; Scott *et alii*, 1989). Os neurónios e os astrocitos respondem a infecções por priões induzindo o recrutamento de células microgliais para a vizinhança dos priões, originando essas alterações das células neurais e apoptose (Marella e Chabry, 2004).

2.6.5 – Balanço entre a propagação e a degradação do PrPsc:

O sistema imunitário facilita a disseminação das infecções priónicas da periferia para o CNS, podendo as células dendríticas (DC) mielóides CD11c+, dada a sua localização subepitelial e a sua capacidade migratória, contribuir para esta disseminação (Luhr *et alli*, 2002).

Experimentalmente foi possível verificar que estas células DC engolfam células GT1-1 infectadas com *scrapie* processando e degradando rapidamente os PrPsc (Luhr *et alli*, 2002) o que permite admitir que podem essas células DC desempenhar um duplo papel nas infecções priónicas, facilitando por um lado a neuroinvasão pela transferência dos PrPsc promovida, e por outro lado protegendo contra a infecção ao desencadearem uma eficiente degradação do PrPsc.

Experimentalmente observou-se naquela degradação que apareciam gradualmente três glicofomas do PrP 27-30 e depois o desaparecimento do PrPsc da cultura experimental (Luhr *et alli*, 2002).

O balanço entre a propagação e a degradação dos PrPsc nos organismos animais pode assim ser condicionado pelas células mielóides CD11c+ DC dada a sua capacidade migradora e actividade proteolítica elevada.

Os agentes PrPsc não parecem ser imunogénicos (Porter *et alli*, 1973; Williamson *et alli*, 1996) mas, paradoxalmente, o sistema imunitário é importantíssimo na transmissão dos PrPsc da periferia para o CNS, e dentro deste transporte as células dendríticas migratórias CD11c+ DC são de relevância ao tomarem e transportarem os PrPsc dos locais subepiteliais para os tecidos linfáticos (Vremec e Shortman, 1997; Liu, 2001) e destes para o CNS (Aucouterier *et alli*, 2001).

As células DC são perfeitamente distintas das FDC como veremos adiante e as FDC facilitam a disseminação dos PrPsc para o sistema nervoso servindo de local para a replicação dos priões (Brown *et alli*, 1994; McBride *et alli*, 1992; Montrasio *et alli*, 2000).

A degradação dos PrPsc exógenos admiti-se que ocorra em duas etapas: primeiro a totalidade das cadeias polipeptídicas priónicas é processada para PrP 27-30 talvez em organelos acidicos como os endossomas e depois estas formas PrP 27-30 seriam progressivamente mais sensíveis para a proteólise, inclusivé com a desagregação do PrPsc.

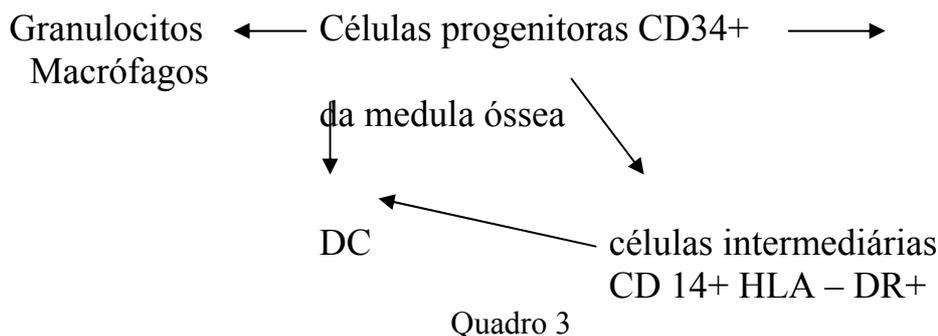
A existência de espécies de PrPsc sensíveis às proteases está demonstrada por Safar *et alli* desde 1998.

A concentração de PrPsc é pois determinada pelo estado de equilíbrio entre a sua formação e a sua degradação (Enari *et alli*, 2001) e a depleção do PrPc pode impedir a propagação do PrPsc, tal como foi verificado com cultura de células de neuroblastoma N2 infectadas com *scrapie* (Enari *et alli*, 2001). Em conclusão destes estudos foi elaborado

um modelo para explicar o desaparecimento de PrPsc na superfície celular e/ou compartimentos endocíticos/lizossomais. Os PrPsc seriam degradados neste compartimento lizossomal e se o PrPc é impedido (por exemplo, por anticorpos ou outros meios) de se converter em PrPsc, o PrPsc acaba por diminuir de concentração até desaparecer (Enari *et alli*, 2001) e daí a afirmação do parágrafo anterior sobre o estado de equilíbrio entre a formação e a degradação do PrPsc ser determinante da acumulação de PrPsc. Recentemente (Enari *et alli*, 2001; Peretz *et alli*, 2001) tem sido referido que certas células podem degradar intracelularmente os PrPsc e, por outro lado, dificultarem a formação de novo PrPsc.

A degradação dos agentes do *scrapie* por macrófagos (Beringue *et alli*, 2000; Carp e Callahan, 1981) também tem sido sugerida.

No esquema seguinte (Quadro 3) referem-se as origens e interrelações dos macrófagos nos seres humanos (Young e Steinmann, 1996).



Salienta-se no entanto um dado muito curioso que está assinalado (Oldstone *et alli*, 2002): nem as FDC, nem as CD11c+ DC são absolutamente necessárias para a neuroinvasão após inoculação experimental de ratos com elevadas doses de *scrapie*.

Em condições normais de infecção, apesar das CD11c+ DC degradarem os PrPsc, subsistirão no entanto algumas células DC contendo PrPsc, mesmo residual, células estas que migrarão da periferia para os órgãos linfóides.

Células CD11 c+ DC contendo PrPsc têm sido encontradas nos linfáticos após inoculação intestinal de ratos com *scrapie* (Huang *et alli*, 2002) bem como no baço e são capazes de transmitir os príões para o CNS (Aucouturier *et alli*, 2001). Os possíveis mecanismos de disseminação da infecciosidade para o sistema nervoso com implicação das células CD11c+ DC podem resumir-se da seguinte forma:

- a) o transporte do *scrapie* para o baço e nódulos linfáticos expõem as terminações nervosas e/ou as FDC ao agente infeccioso;
- b) o processamento do PrPsc que é encurtado;
- c) mudanças rápidas na conformação da proteína priónica nos endossomas ácidos das DCs;
- d) libertação dos exossomas contendo PrPsc libertando este para as células vizinhas.

Estão referidas conexões íntimas entre as terminações nervosas e as células DC tal como a localização de células DC na interface entre o cérebro e a circulação sanguínea a nível do plexo coróide e leptomeninges (Matyszak *et alli*, 1992; Prusiner *et alli*, 1983).

As CD11c+ DC podem pois apresentar infecciosidade priónica directamente ao sistema nervoso. Curiosamente, também está assinalado em culturas celulares *in vitro* que células CD11c+ DC derivadas da medula óssea de rato não exprimem PrPc nem PrPc mRNA antes ou depois da exposição a PrPsc (Luhr *et alli*, 2002). No entanto, é conhecido (Burthem *et alli*, 2001) que a expressão de PrPc é abundante em células DC mielóides no baço e que a sua expressão é fortemente induzida durante a maturação celular, estando até os PrPc colocalizados com moléculas de MHC da classe II.

Outros trabalhos experimentais (Beringue *et alli*, 2000) sugerem que os macrófagos do baço podem controlar parcialmente a infecção com *scrapie* nos tecidos periféricos do rato, sequestrando o inóculo infeccioso e dificultando assim a replicação precoce do agente do *scrapie* no baço. Além dos macrófagos a maioria das FDC e dos linfócitos B pensa-se que suportam a replicação dos PrPsc do *scrapie* (Beringue *et alli*, 2000).

Parece pois haver um mecanismo compensatório que seria suficiente para assegurar a persistência da infecção em fases precoces da patogénese. Noutros estudos com linhas celulares em cultura (neuroblastoma de rato – ScN 2a) foi possível verificar também a abolição da replicação e o desaparecimento de PrPsc pré-existente (portanto a sua decomposição) com a intervenção de anticorpos (Peretz *et alli*, 2001).

Em resumo pode concluir-se o seguinte:

- a) o transporte de PrPsc por células pode ocorrer sem multiplicação dos PrPsc ou com multiplicação dos PrPsc;
- b) a apresentação do PrPsc pelas células pode ocorrer à superfície das células (*painting*) ou em vesículas endocíticas;

- c) há um equilíbrio na competição, dentro duma mesma célula, entre a destruição de PrPsc provavelmente nos lisossomas e a sua biossíntese no ER atendendo à topografia dos PrPsc.

3 – Envolvimento nas TSE do sistema imunitário, células, tecidos, órgãos e outras funções biológicas:

3.1 – Sistema imunitário e TSE:

Recorda-se que no sistema imunitário, ou seja, no sistema protector dos animais contras as agressões como, por exemplo, as infecciosas, um dos processos chave neste contexto é o reconhecimento da presença de um invasor, o agente infeccioso, a que se segue um outro processo com resposta destrutiva desse agente invasor.

O processo de reconhecimento preciso é realizado por células chamadas linfocitos, enquanto a destruição é feita por linfocitos e por células chamadas macrófagos e neutrófilos.

Os macrófagos encontram-se em todos os tecidos e também em circulação no sangue, constituindo aqui os monocitos, sendo geralmente as primeiras células a encontrar as substâncias estranhas (infecciosas ou não) ao organismo, que são fagocitadas não especificamente por eles e decompostas. Os produtos peptídicos dessa decomposição são transportados para a superfície dos macrófagos onde podem ser reconhecidos pelas células T linfocitárias. Macrófagos, células B e células Th (células T amadurecidas e segregadoras de linfocinas) colaboram entre si.

O sistema linfóide ou tecido linfóide particularmente rico em linfocitos (e células acessórias como os macrófagos e células reticulares) tem sede sobretudo nos gânglios ou nódulos linfáticos, baço, timo, placas de Peyer, amígdalas da faringe, adenóides, e na bolsa de Fabricius das aves.

O sistema linfóide guarda todas as portas de entrada nos organismos animais.

As placas de Peyer encontram-se na parede intestinal dos animais onde retêm os antigénios que entram pelo tubo digestivo, sendo portanto órgãos linfóides subjacentes à mucosa intestinal e que contêm elevadas quantidades de células precursoras e sintetizadoras de IgA. As placas de Peyer têm regiões dependentes de células B e T e centros germinais.

Em geral os linfocitos nestas placas de Peyer, após activação pelo antigénio, podem migrar para fora do nódulo, por exemplo, para o sangue. No baço as células da zona marginal formam um conjunto com

diversos tipos celulares, umas com uma posição fixa nesta zona marginal, como é o caso dos macrófagos da zona marginal, dos macrófagos metalofílicos da zona marginal, e ainda em menor extensão células B da zona marginal. Para outros tipos de células, como é o caso dos linfócitos T, células B e células dendríticas (DC) a zona marginal do baço é apenas uma residência temporária (Kraal, 1992) havendo portanto uma população relativamente sésil e outra de passagem por influxo sanguíneo, tornando esta zona marginal numa zona extraordinariamente dinâmica e particularmente apta para reconhecimento e processamento de antígenos.

Em nenhum outro órgão linfóide para além do baço se encontra esta combinação única de células e respectivos funcionamentos. Os macrófagos da zona marginal revelam uma forte potencialidade fagocitária, com os fragmentos antigénicos a serem tomados pelas células dendríticas e estas apresentando os antígenos às células T, levando à aglomeração destas células T específicas do antígeno.

Está verificado o papel do sistema imunitário nas doenças priónicas, inclusivé nos linfócitos, macrófagos e células dendríticas (Prinz *et alli*, 2002) parecendo que os PrPc participam na transdução de sinal nos linfócitos.

As taxas de PrPc exposto à superfície de linfócitos T humanos é regulada em consequência da activação celular exprimindo as células T com memória mais PrPc do que as células T *naïve* (Li *et alli*, 2001).

Também diferentes fenótipos celulares exprimem PrPc diferentemente. Por exemplo, nas células T, as CD8+ exprimem mais PrPc do que as CD4+ e as CD3+ (Durig *et alli*, 2000).

A acumulação do PrPsc em ratos 57BL infectados com *scrapie* estirpe ME7, ocorre no baço aos 70 dias após a inoculação intracerebral e no estágio terminal da doença aos 170 dias (Jeffrey *et alii*, 2000) encontrando-se PrPsc nos lisossomas de macrófagos assim como no plasmalema de células foliculares dendríticas (FDC) tendo os priões infecciosos sido revelados por microscopia electrónica.

Na zona clara dos folículos dos ratos em fases terminais da doença todas as extensões ramificadas das FDC assumem formas altamente reactivas formando complexos labirínticos, glomerulares e hiperplásticos, entre os quais se encontram os PrPsc associados com complexos que se pensa serem de antígeno-anticorpo.

Encontra-se também algum PrPsc escasso em simples prolongamentos das FDCs aos 70 dias da infecção, contrastando com uma acumulação extracelular de PrPsc em complexos de extensões ramificadas glomerulares das FDCs no baço dos animais, em fases terminais da doença, o que parece sugerir que as FDCs libertam continuamente PrPsc da sua superfície sendo possível que os macrófagos

os adquiram a partir destes espaços extracelulares à volta das extensões ramificadas das FDCs (Jeffrey *et alii*, 2000).

Não parece haver uma fase intracelular de acumulação dos PrPsc nas FDCs mas sim a sua libertação para o espaço extracelular.

3.2 – Células, imunidade e suas bases:

Recorda-se que na medula óssea o tecido esponjoso mole que se encontra no centro da maioria dos ossos compridos é o produtor dos componentes celulares do sangue, glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas. O tecido mielóide na medula óssea consiste de eritrocitos, granulocitos e megacariocitos (em desenvolvimento e em estadios mais avançados) e num estroma de células reticulares e fibras com canais vasculares sinusoidais.

As células reticulares primitivas, com as suas extensões celulares, fazem contacto com outras células ao longo de uma rede de fibras reticulares formando o estroma da medula óssea e dos tecidos linfáticos.

As células estaminais (*stem cells*) pluripotentes, ou sejam, as células mais primitivas da medula óssea são células que dão origem a uma dada linhagem de células, a partir das quais se formam os vários tipos de células do sangue.

Assim, a partir duma dessas células estaminais formam-se, após divisão celular, células filhas diferentes, uma substituindo a célula estaminal original e a outra diferenciando-se depois.

As células estaminais hematopoiéticas localizadas na medula óssea são capazes de originar todos os tipos de células maduras dos sangue, inclusivé as das linhas linfóides (células B e células T) e mielóides (monocitos, granulocitos, eritrocitos, megacariocitos) e são capazes de se renovar a si próprias pois têm capacidade para dividir-se em duas células filhas com o mesmo potencial de desenvolvimento que a célula progenitora. Elas representam cerca de 0,05% de todas as células nucleadas da medula óssea adulta.

A proliferação, diferenciação e actividades funcionais mielóides são controladas pelos factores estimuladores de colónias e por outras citocinas que regulam factores de transcrição únicos das células hematopoiéticas.

Na diferenciação celular ocorre a restrição progressiva do potencial de desenvolvimento dessa célula e um aumento da especialização da sua função, o que leva à formação de células especializadas, tecidos e órgãos. Nas células do sistema imunitário entre a célula estaminal pluripotente e a célula madura decorrem a proliferação, a diferenciação e a maturação celulares.

As células mielóides são uma das duas classes de células sanguíneas derivadas da medula óssea e incluem, como já referimos, megacariócitos, precursores de eritrócitos, fagócitos mononucleares, e todos os granulócitos polimorfonucleares.

Todas estas células derivam ao fim ao cabo de uma linhagem de células estaminais, no entanto a maioria dos autores tende a restringir o termo mielóide para os grupos de células não linfócitos dos glóbulos brancos, incluindo-se nele os granulócitos, monocitos e linhagens de plaquetas.

As células linfóides derivam das células estaminais de linhagem linfóide: grandes e pequenos linfócitos, *plasma cells*, ou sejam, células da linhagem B formando anticorpos diferenciados terminalmente e segregados. O tecido linfóide é particularmente rico em linfócitos (e células acessórias como os macrófagos e células reticulares) e encontra-se como já referimos nos gânglios ou nódulos linfáticos, baço, timo, placas de Peyer do intestino, amígdalas da faringe, adenóides, e na bolsa de Fabricius das aves. Na figura 13 seguinte mostra-se um diagrama esquemático de um gânglio linfático.

O sistema reticuloendotelial é um sistema difuso de células de diversas linhagens, inclusivé macrófagos e células endoteliais fagocíticas, que bordejam os sinusóides capilares e que possuem propriedades fagocitárias. Os gânglios ou nódulos linfáticos, pequenos órgãos com forma nodosa, são constituídos por uma rede fina de tecido reticular no qual estão enredadas grandes quantidades de linfócitos, macrófagos e células acessórias ao longo de todo o sistema linfático.

Os nódulos linfáticos são pois pontos de drenagem dos fluidos dos tecidos, sendo também locais onde os antigénios estranhos presentes nos fluidos tecidulares começam a desencadear uma resposta imunológica.

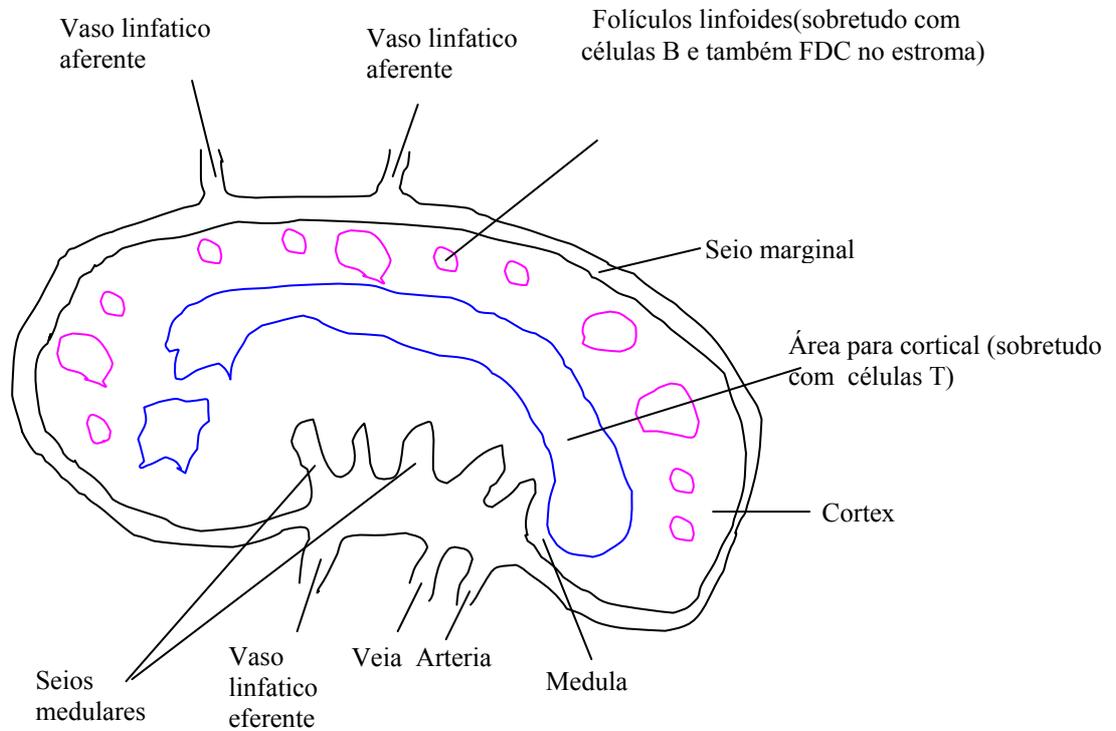
As placas de Peyer, que já referimos, são órgãos linfóides situados no tecido da submucosa do intestino dos mamíferos contendo grandes quantidades de células precursoras segregando IgA, tendo regiões dependentes com células B e T e centros germinativos, estando portanto associadas com a imunidade no intestino.

Os folículos linfóides são massas esféricas de células linfóides. O baço é um órgão que produz linfócitos, filtra o sangue e armazena células sanguíneas, destruindo aquelas que estão envelhecidas.

O timo é um órgão linfóide onde os linfócitos T amadurecem e se multiplicam, composto por um estroma (epitélio tímico) e linfócitos quase inteiramente da linhagem das células T. O timo regride à medida que os animais envelhecem.

Podemos resumir sucintamente o que anteriormente referimos.

Diagrama esquemático de um gânglio linfático



-Os linfócitos B encontram-se sobretudo no córtex em aglomerados que constituem os folículos linfóides que contêm também FDC no respectivo estroma.

-Os linfócitos T encontram-se sobretudo na área paracortical.

-As células B e T eventualmente migram para os seios medulares podendo sair do órgão linfático.

-As células APC (apresentadoras de antígenos como por ex: as DC, macrófagos, etc) entram nos órgãos linfáticos e apresentam os antígenos às células aí residentes.

Figura 13

Órgãos, tecidos e características dominantes do sistema imunitário:

Primários: Medula óssea

Timo

Bolsa de Fabricius

Fígado fetal

onde as células imunitárias se desenvolvem

Secundários:

Baço

Nódulos linfáticos

Tecidos linfóides das

Mucosas

Amígdala

onde ocorrem estádios de maturação independentes ou dependentes de antígenos

Terciários: sentinelas tecidulares

Todas as células

Papeis de órgãos e tecidos do sistema imunitário:

Medula óssea: hematopoiese (células estaminais);

Timo: maturação de linfócitos T;

Baço e nódulos linfáticos: locais de reacção, células B, células T, antígenos e anticorpos;

Sistema linfático: drenagem das células;

Células do sistema: efectores de resposta;

Células dispersas: sentinelas.

Como referimos, na formação de células do sangue todas elas provêm dum simples tipo de célula: a célula estaminal ou *stem cell* pluripotente, sendo produzidas na medula óssea (cerca de 10^{11} por dia nos seres humanos).

Estas células estaminais são muito raras (cerca de 1 em cada 10 000 células da medula óssea) e exprimem à sua superfície a proteína CD 34. Por divisão as células estaminais produzem duas espécies de descendência, ou sejam, mais células estaminais e outras células que começam a diferenciar-se produzindo diversos tipos de células sanguíneas, o que é controlado por citocinas adequadas e/ou hormonas.

Por exemplo, a interleucina-7 (IL-7) é o principal estimulante das células estaminais da medula óssea que levam à formação de diversos linfócitos (sobretudo células B e células T). *Vide* figura 14 seguinte sobre a formação de células do sangue.

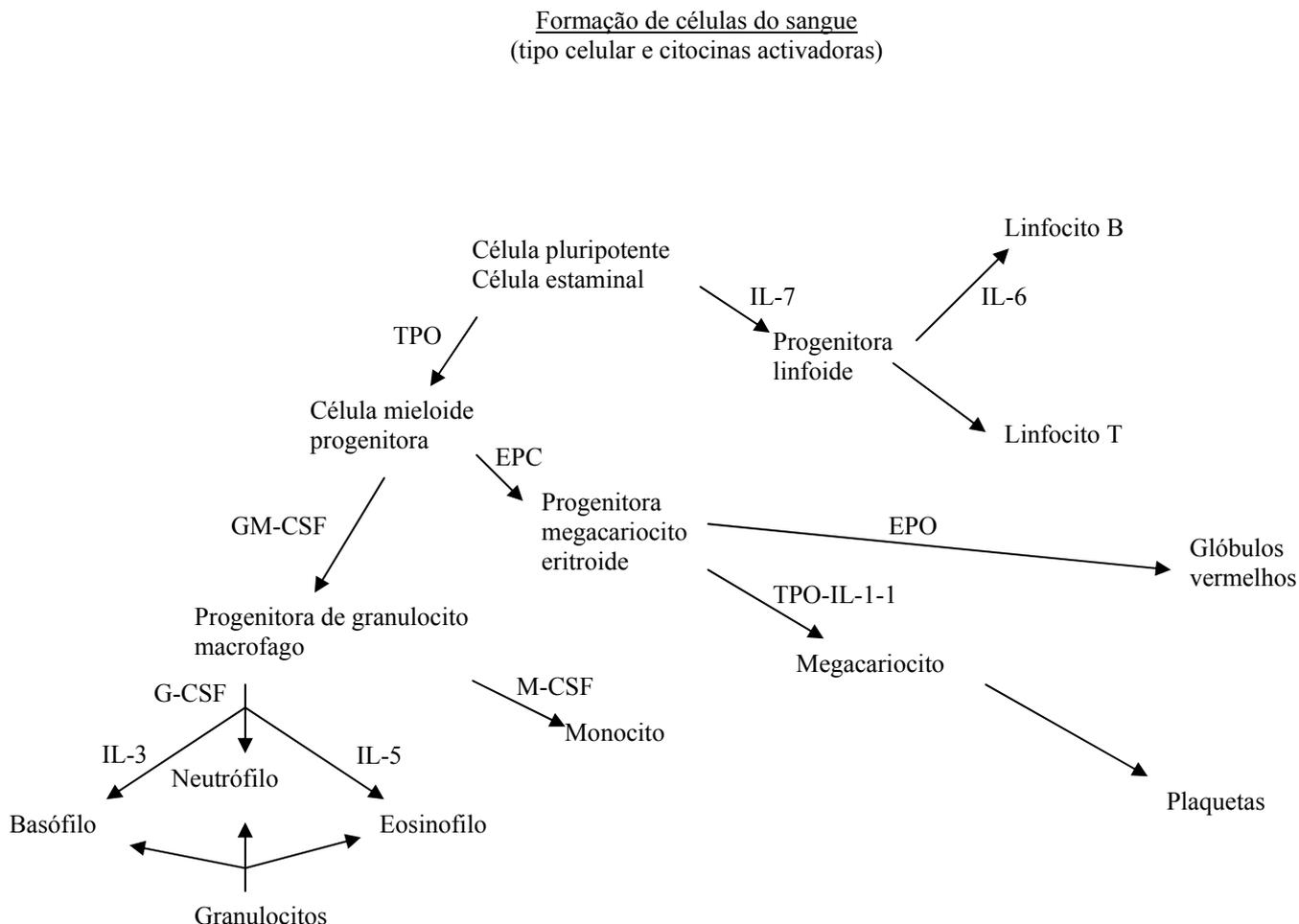


Figura 14

As células B são produzidas e amadurecidas na medula óssea, mas as precursoras das células T deixam a medula óssea e amadurecem no timo. Cada célula B e cada célula T é específica para um dado antígeno, e esta especificidade de interacção reside num receptor específico, o receptor BCR para o antígeno nas células B e o receptor TCR para o antígeno nas células T.

Estes receptores são proteínas integrais membranárias de que existem milhares de cópias à superfície de cada célula, sendo sintetizados

antes da célula encontrar o antígeno, utilizando genes codificadores montados por recombinação de segmentos de DNA, gerando-se assim uma diversidade de receptores para o antígeno.

Estes receptores têm um local único para interação com a determinante antigénica ou epitopo do antígeno, havendo complementaridade entre as suas superfícies que interactivam através de forças não covalentes, desencadeando depois sinais que levam a célula a sair da etapa G0 e entrar no seu ciclo celular, originando mitoses sucessivas um clone de células com o mesmo tipo de receptor para o antígeno específico. Claro que os receptores BCR e TCR diferem na sua estrutura, genes que os codificam, e tipo de epitopo com que interactivam.

As células B interactivam através dos seus receptores com antígenos solúveis, sendo depois essas moléculas antigénicas incorporadas no interior da célula B através de endocitose mediada pelo receptor, após o que o antígeno é fragmentado e estes fragmentos apresentados à superfície das células com a ajuda de uma molécula de histocompatibilidade da classe II (MHC II).

Células *helper* T específicas para esta estrutura, ou seja, com TCRs complementares, interactivam com as células B, como se esquematiza na figura 15 seguinte e segregam linfocinas que desencadeiam diversos efeitos.

As linfocinas segregadas pelas células T *helper* estimulam a multiplicação das células B, originando um clone de células que possuem receptores BCR idênticos (ao mesmo tempo que convertem estes receptores BCR que são proteínas integrais da membrana das células em proteínas solúveis ou sejam anticorpos) diferenciando-se depois esses clones de células em *plasma cells* que segregam anticorpos, ou sejam, as tais proteínas solúveis.

Na superfície de cada célula T existem milhares de TCR (receptores das células T) idênticos. Há dois tipos de células T que diferem quanto aos seus receptores TCR. As células T alfa/beta ($\alpha\beta$) e as células T gama/delta ($\gamma\delta$).

As células T com receptores $\alpha\beta$ interagem com um complexo biomolecular na superfície de qualquer outra célula denominada célula apresentadora de antígeno (APC), sendo esse complexo constituído por um fragmento de antígeno adaptado a uma molécula de histocompatibilidade. Os dois tipos de células T acima referidos são distinguidos pela presença à sua superfície de uma ou outra de duas glicoproteínas denominadas CD4 e CD8.

As células T com glicoproteínas CD8 interagem com epitopos que são parte da classe I de moléculas de histocompatibilidade e quase todas as células dos organismos superiores expressam estas moléculas da classe I.

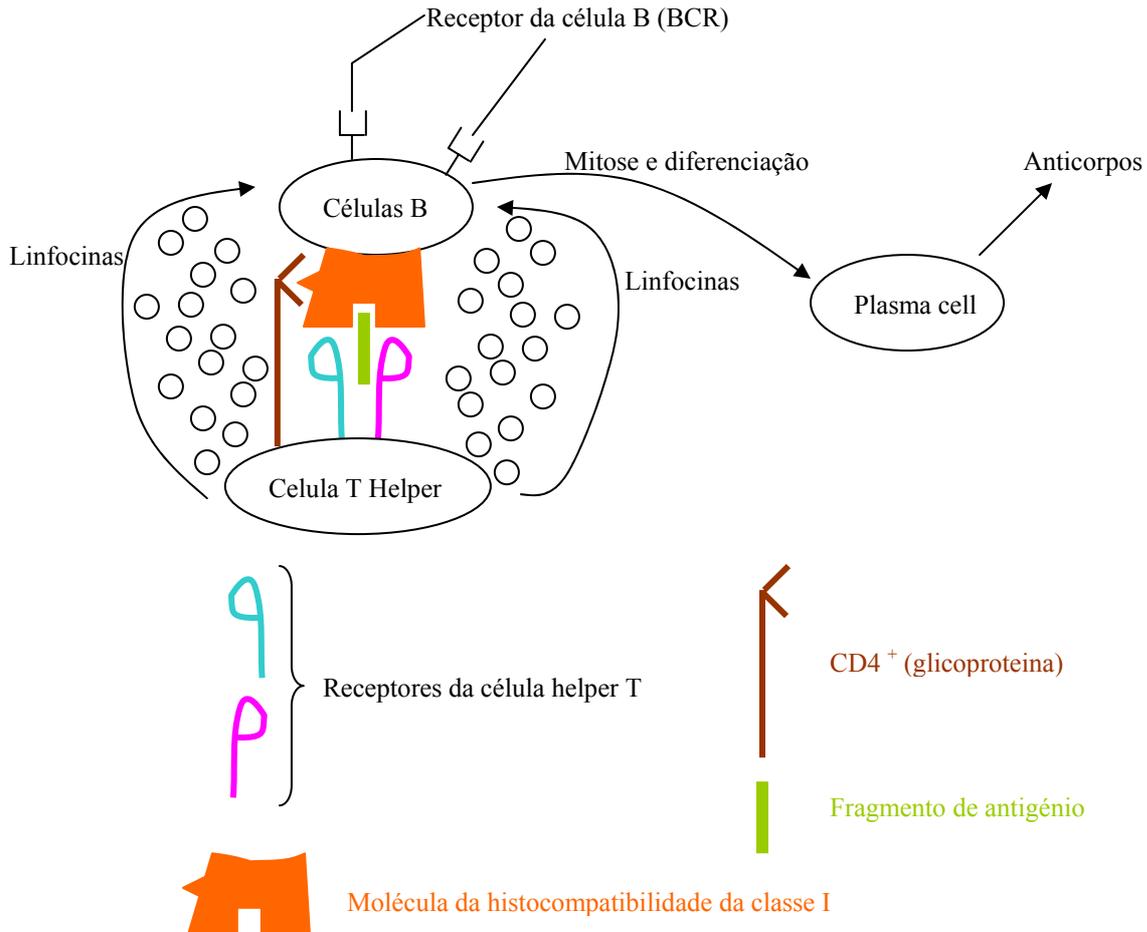


Figura 15

Os linfocitos T citotóxicos (CTLs) são células T CD8+ que segregam moléculas que destróiem as células com que se ligam. Estas células T CD8+ rastreiam as células do organismo e destróiem aquelas que apresentam quaisquer fragmentos de antígenos estranhos nas suas moléculas de classe I. As células T com glicoproteínas CD4+ interagem com epitopos que são parte da classe II de moléculas de histocompatibilidade e apenas células especializadas na apresentação de antígenos da classe II de moléculas de histocompatibilidade, como é o caso das células dendríticas (DC), de células fagocitárias como os macrófagos, e de células B, têm estas características. As células T CD4+ interagem com epitopos que sejam constituídos por um fragmento de antígeno complexado numa molécula de histocompatibilidade da classe II, sendo essas células fundamentais quer na imunidade mediada por células quer na mediada por anticorpos. No primeiro caso estas células CD4+ interactuam com o antígeno apresentado pelas células suas apresentadoras (APC) tais como os macrófagos fagocíticos e as células dendríticas, libertando linfocinas que por seu turno atraem mais células

para esta zona inflamatória desencadeando todo um processo para destruir o material antigénico.

No segundo caso as células T CD4+ também chamadas células *helper* (ver figura anterior) interactivam com células B apresentadoras de fragmentos antigénicos, originando a formação de clones ou *plasma cells* responsáveis pela formação de anticorpos contra este antigénio.

As células T gama/delta ($\gamma\delta$) diferem em vários aspectos das células T alfa/beta ($\alpha\beta$) não tendo também glicoproteínas CD8 ou CD4 à sua superfície e a sua função é por ora um mistério.

3.3 - Células dendríticas (DC) suas origens e interacções:

As células dendríticas (DC) são leucocitos especializados na captura de antigénios que iniciam respostas imunitárias mediadas por células T (Young e Steinman, 1996). As células DC são ricas em moléculas de complexos principais de histocompatibilidade (MHC) da classe I e da classe II, sendo dotadas de propriedades acessórias mais potentes que outras células apresentadoras de antigénios (APCs).

O aspecto dendrítico característico, em diagrama, de uma célula DC madura esquematiza-se seguidamente.(Figura 16)

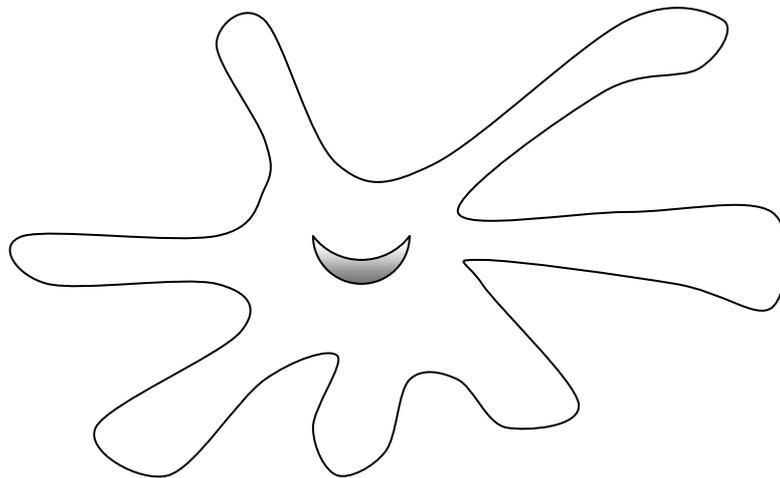


Figura 16

Sendo notório um corpo celular que emite numerosas projecções para a periferia e onde podem interactuar diversos tipos de moléculas ou células.

A célula emite pois longas extensões em várias direcções a partir do corpo celular, chegando a atingir 10 μ de comprimento, e exprimem altas taxas de produtos MHC da classe I e da classe II para apresentação de antígenos, o que só por si não produz imunidade.

Nas moléculas acessórias das DCs, que são glicoproteínas que interactuam com receptores específicos nas células T, referem-se a LFA-3 (CD58), BF-1 (CD80) e B7-2 (CD86), ICAM-1 (CD54) e ICAM-3 (CD50) e CD40.

A menor capacidade fagocítica das células DC deve-se à sua pobreza em receptores para os complexos imunes (Fc γ R) de C3 e para os seus fragmentos.

No baço as células DC encontram-se na polpa vermelha e imediatamente adjacentes à polpa branca.

O CNS é um local imunoprivilegiado dada a ausência de potentes APC (células apresentadoras de antígenos) inclusivé células dendríticas DC (Pashenkov *et alii*, 2001). Contudo, há evidências de que as células DC podem-se desenvolver a partir de células residentes no CNS e migrarem depois para o fluido cérebrospinal.

Os linfocitos B e T estão sob controlo das células DC através de citocinas (Banchereau e Steinman, 1998).

As células dendríticas foram identificadas em 1973 no baço de ratos (Steinman e Cohn, 1973) depois de terem sido primeiramente descobertas por Langerhans em 1868.

As DC derivadas dos tecidos linfóides são estimulantes potentes das respostas imunitárias primárias (Steinman *et alii*, 1974; Steinman e Witmen, 1978; Witmen e Steinman, 1984; Inaba *et alii*, 1984) encontrando-se células DC em tecidos não linfóides (Hart e Fabre, 1981; Hart *et alii*, 1983).

São células especializadas na apresentação de antígenos (APC) dotadas duma capacidade extraordinária para iniciar respostas primárias e secundárias dos linfocitos T (Steinman, 1991; Hart e Calder, 1994).

A capacidade de migração de que as células DC são dotadas é provavelmente dirigida por uma série de mediadores químicos e na apresentação de antígenos há uma interacção específica das células DC com os linfocitos T.

As células DC são distintas dos macrófagos e dos granulocitos sendo as células DC mais potentes que outras células APCs.

As células DC esplénicas podem ter diferentes características (Hart e Calder, 1994) apresentando significativas variações regionais.

Nas propriedades funcionais das DC refere-se que elas possuem capacidades limitadas de fagocitose e pinocitose que são suficientes para processar antígenos em ordem a produzir péptidos estimuladores dos linfócitos T.

A grande actividade fagocitária e proteolítica está mais a cargo dos macrófagos (Steinman, 1991).

As células DC após tomarem o antígeno migram e iniciam interações membranárias com os linfócitos T para coestimular a resposta específica destes.

A capacidade de tomada e de processamento dos antígenos pelas células DC depende do seu estado de diferenciação e duma variedade de receptores de membrana para esta tomada.

O complexo antígeno-receptor resultante pode depois transitar entre diferentes tipos de células e talvez mesmo dos macrófagos para as células DC.

Há um reportório de receptores FcR nas células DC estando também assinaladas nestas células vestígios de receptores c para o complemento.

As células dendríticas, com o formato dendrítico que lhe dá o nome, são células que derivam da medula óssea com origem nas células estaminais linfóides e mielóides que se encontram disseminadas em todos os órgãos linfóides, inclusivé no timo, baço e gânglios linfáticos, assim como em quase todos os órgãos e tecidos não linfóides (Lipscomb e Masten, 2002). Há duas espécies de células dendríticas: as DC1 que descendem de monocitos e as DC2 que parecem derivadas de linfócitos.

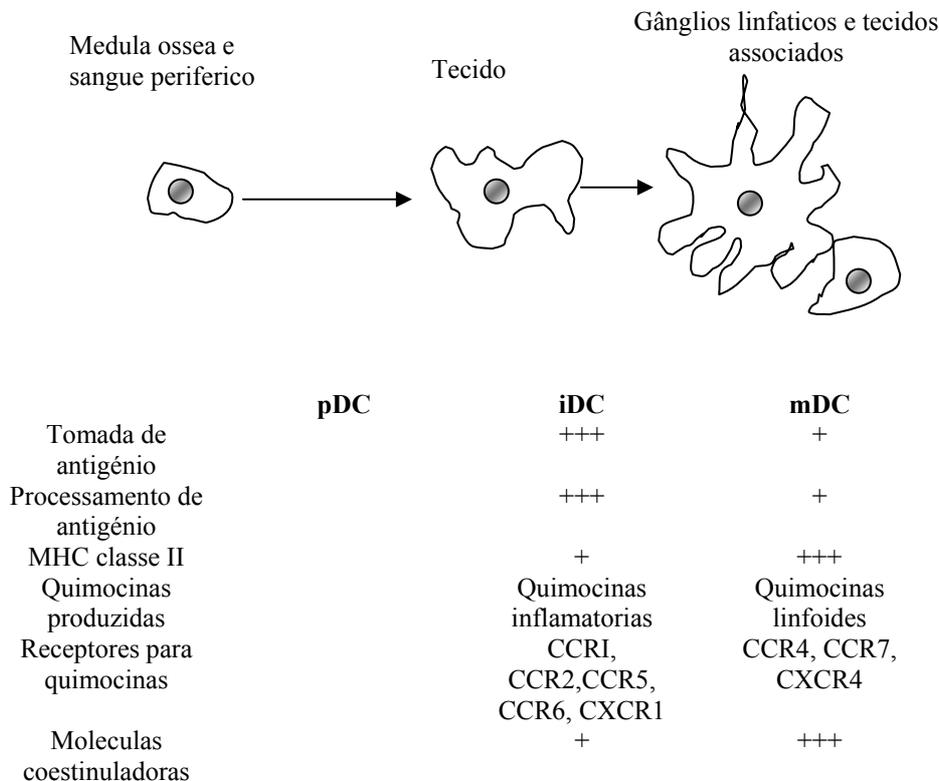
As células DC constituem um conjunto diversificado de células, todas elas com grande capacidade para apresentarem antígenos para estimularem a memória imunológica e células T efectoras. As células DC imaturas respondem aos sinais de agressão, maturando-se e diferenciando-se.

Como dissemos, as células DC expressam constitutivamente os complexos MHC da classe I e da classe II e estimulam células T do tipo CD4 e CD8 com maior eficiência do que qualquer células APCs.

As células DC imaturas têm capacidade para tomar o antígeno através de receptores ou não receptores, degradando depois este antígeno em vesículas endocíticas para produzir antígenos peptídicos capazes de ligarem-se com os MHC da classe II.

As células DC maduras e imaturas têm distintos receptores para quimocinas que regulam o seu tráfego dentro dos tecidos. As células DC maduras são células migradoras que se deslocam de um local para outro adquirindo capacidades específicas em cada local em que se encontrem e realizando funções específicas em cada um deles. No quadro 4 seguinte referem-se algumas características das pDC (da medula óssea e sangue

periférico) das iDC (células dendríticas imaturas) e das mDC (células dendríticas maduras).



(Adaptado de Lipscomb, M.R. e Masten, B.J. 2002)

Quadro 4

Os antígenios complexados com as moléculas MHC da classe II apresentados pelas células DC maduras são depois reconhecidos pelo receptor das células T (TCR) expressos em células TCD4 que são estimuladas para proliferar.

Estão descritas pelo menos cinco tipos de populações de células DC nos órgãos linfóides centrais e periféricos do rato (Lipscomb e Masten, 2002). Nas interações das DC com as células TCD4+ as DC fornecem sinais para as células T-CD4 específicas do antígeno iniciarem a sua proliferação e diferenciação. As DC tomam o antígeno e processam-no produzindo péptidos antigénicos capazes de ligarem-se ao MHC classe II. As DC exprimem à sua superfície um grande número de complexos MHC classe II ligados com os péptidos resultantes da degradação do antígeno para serem reconhecidos pelos receptores das células T (TCR) expressos pelas células TCD4+ que em resultado destas interações são estimulados na sua proliferação.

As células DC podem processar antígenos através da via que utiliza o complexo MHC da classe I ou através da via que utiliza o complexo MHC da classe II.

Faz-se seguidamente uma comparação entre o processamento do antígeno por células DC (Lipscomb e Masten, 2002) por um e por outro complexo.

Via com MHC da classe I:
(Processamento do antígeno)

Antígeno tomado por fagocitose e endocitose mediada por receptor; proteólise limitada; transporte activo para o citosol; degradação por via proteossomal no citosol; entrada no ER através de transporte associado (TAP); no ER associação com as moléculas MHC classe I a serem biossintetizadas de novo; transporte vesicular para a superfície da célula; apresentam antígenos às células TCD8+.

Via com MHC da classe II:
(Processamento do antígeno)

idem mais pinocitose da fase fluida; endossomas periféricos e centrais com alguma proteólise; entrada dos péptidos num compartimento vesicular rico em MHC classe II, ou seja, o MIIC onde se liga com MHC classe II; transporte para a superfície celular do complexo anterior; apresentam antígenos às células TCD4+.

Os antígenos de proveniência exógena podem ser tomados por diversas células apresentadoras desses antígenos (APC) como é o caso de células fagocíticas como as células dendríticas (DC), os macrófagos e os linfócitos B.

Estas células APC fagocitam os antígenos por endocitose, degradam-nos nos lisossomas, e depois apresentam os produtos desta degradação à superfície celular dentro duma molécula MHC da classe II, onde podem ser reconhecidos por células T CD4+ como se esquematiza na figura 17 seguinte.

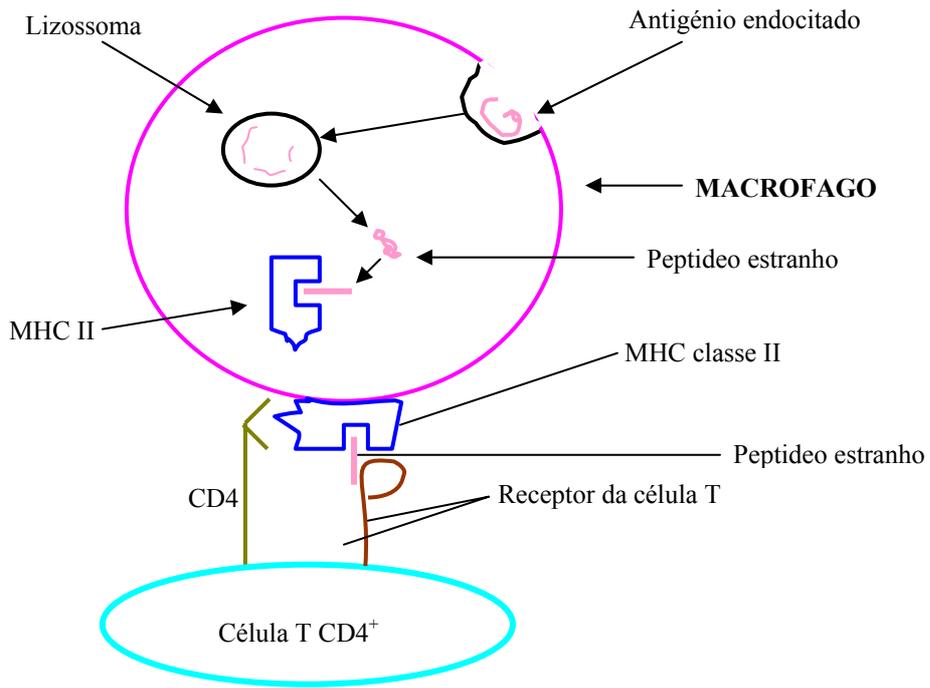


Figura 17

Os linfócitos T provêm de células estaminais linfóides que migram da medula óssea para o timo onde se diferenciam sob a influência de hormonas do timo.

Nestes linfócitos T há que considerar diversos subtipos como as células T citotóxicas, as células T auxiliares (Th ou *helper*) e ainda as células T supressoras, com funcionalidades diversas e estruturalmente diferentes.

As células T citotóxicas destróiem as células que apresentam péptidos estranhos ligados ao complexo MHC da classe I.

As células T auxiliares (Th) estimulam células B que apresentam péptidos estranhos ligados ao complexo MHC da classe II.

Na diferenciação das células Th, quando elas adquirem CD4, elas são denominadas células pré-Th, e quando contactam com um antígeno começam a proliferar e são activadas, sendo a natureza do antígeno que parece determinar a via que elas seguem, ou a via que leva às células Th1 ou a via que leva às células Th2 (*vide* figura adiante).

As células APC, como por exemplo as dendríticas (DC), como já referimos, engolfam o antígeno por fagocitose ou pinocitose, digerem-no depois, e os fragmentos resultantes são apresentados à superfície celular pelas moléculas de MHC.

As células Th1 são produzidas quando as DC do tipo DC1 apresentam o antígeno ao receptor da célula T para o antígeno e segregam interleucina 12 (IL-12) levando as Th1 a segregarem as suas próprias linfocinas (ver figura adiante) tais como o factor de necrose tumoral (TNF- β ou linfotóxina) e interferão gama (IFN- γ).

Estas linfocinas segregadas pelas células Th1 estimulam os macrófagos. As células Th2 são produzidas quando as células dendríticas do tipo DC2 apresentam o antígeno ao receptor da célula T para o antígeno, produzindo não se sabe por intermédio de que linfocina celular, pré-Th.

No entanto, as principais linfocinas segregadas por estas células Th2 são a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estimulam a formação de células B, desencadeando estas últimas a imunidade mediada por anticorpos.

Nas células T citotóxicas DC8⁺ há que considerar dois subconjuntos: as Tc1 que segregam IFN- γ como as células Th1 e as Tc2 que segregam IL-4 (como as células Th2).

Os antígenos presentes que determinam quando as células pré-Th seguem uma ou outra via (*vide* figura 18 seguinte) também regulam as respostas a obter. Assim, a Th1 inibe a via que leva a Th2 e a Th2 inibe a via que leva a Th1.

As células Th1 e Th2 têm diferentes receptores para diferentes tipos de quimocinas.

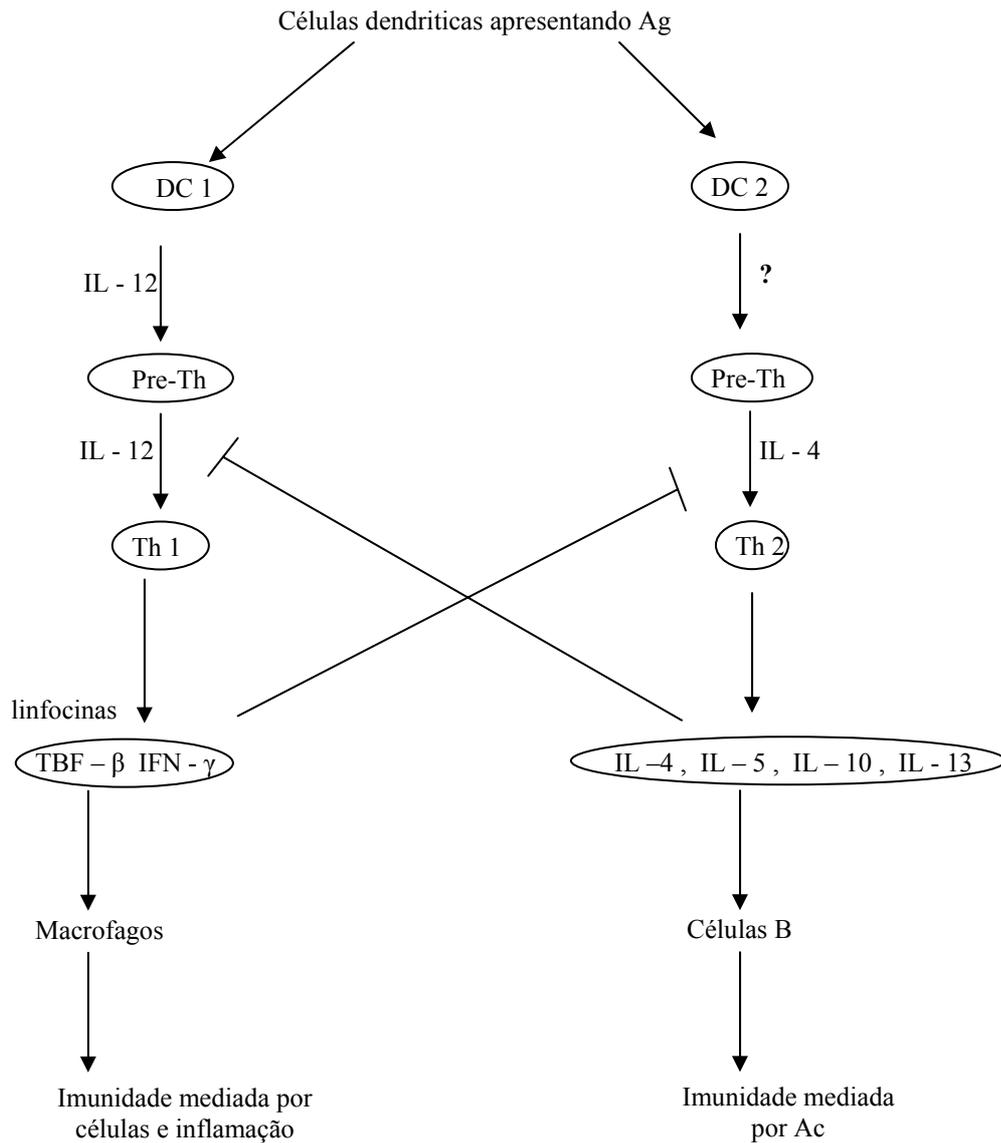


Figura 18

Sugerem resultados experimentais (Huang *et alii*, 2002) que as células DC são transportadores entre o lúmen do intestino e a maquinaria linfóide replicativa dos agentes das TSE.

As células dendríticas migradoras da medula óssea entram via sanguínea na parede intestinal, englobam antigénios a partir do lúmen do intestino e transportam-nos via linfa para os nódulos linfáticos mesentéricos (Banchereau *et alii*, 2000).

As células dendríticas mielóides CD11c⁺ localizadas subepitelialmente e dotadas de capacidade migratória, são alvos precoces da infecção príônica e podem contribuir para disseminação da infecção da periferia para o CNS (Luhr *et alii*, 2002).

Como já referimos foi possível verificar (Luhr *et alii*, 2002) com estudos *in vitro* que linhas celulares em cultura (células GTI-1) infectadas com *scrapie* eram eficientemente incorporadas por células DC e, com surpresa, verificou-se que os PrPsc contidos nessas células eram processados e rapidamente decompostos (o PrPsc é geralmente resistente à degradação proteica).

Isto leva os autores deste trabalho a admitir especulativamente que as DC-CD11c+ tenham um papel duplo nas infecções priónicas, por um lado facilitando a neuroinvasão ao transferirem o agente infeccioso como foi observado em estudos *in vivo*, e, por outro lado, protegendo os organismos dessas infecções ao degradarem eficientemente os PrPsc, resultando do equilíbrio ou desequilíbrio entre estas duas funções a propagação ou não do agente infeccioso PrPsc.

Noutros estudos (Beringue *et alii*, 2000; Carp e Callahan, 1981) também foi sugerida a degradação do *scrapie* infeccioso por macrófagos, propondo-se também um mecanismo compensatório desempenhado pelos macrófagos (Beringue *et alii*, 2000) tal como se referiu anteriormente para as DCs.

As células DC estão pois implicadas na disseminação dos PrPsc do intestino para os tecidos linfóides e destes para o CNS (Aucouturier *et alii*, 2001).

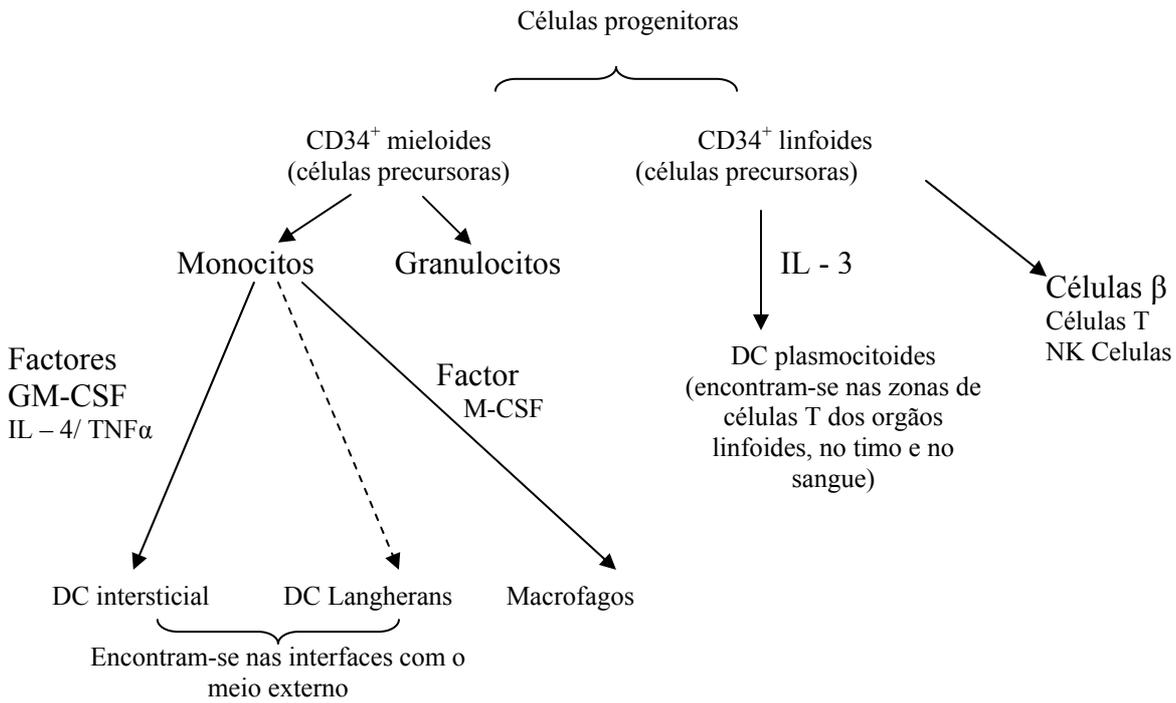
Como veremos adiante as células foliculares dendríticas (FDC) são local de replicação dos PrPsc e facilitam a disseminação das infecções para o CNS (Brown *et alii*, 1999; McBride *et alii*, 1992; Montrasio *et alii*, 2000). Abordamos seguidamente as diversas vias que podem levar à formação de células DC e alguns factores intervenientes.

Esquema proposto para a origem de subconjuntos das células DC a partir de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes progenitoras CD34+ mielóide e linfóide (Lipscomb e Masters, 2001; Shortman e Caux, 1997).

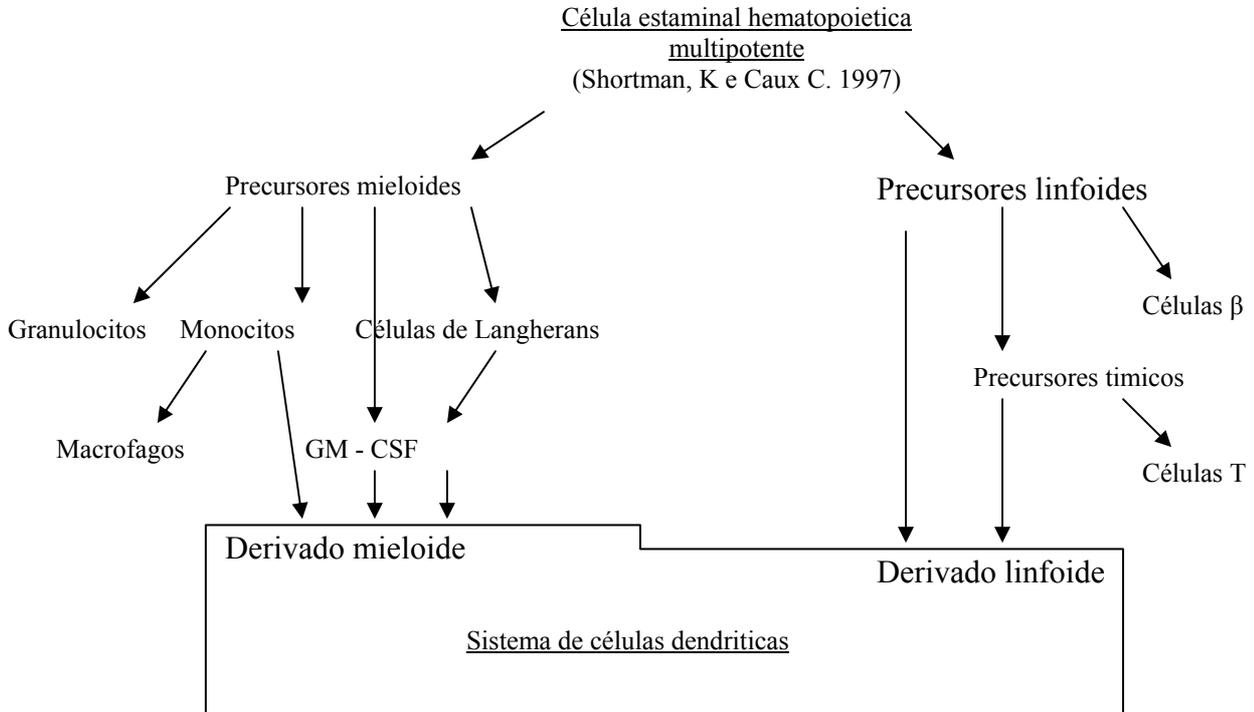
As três vias derivadas dos precursores mielóides, uma dá directamente DC a partir de monocitos do sangue, sem divisão, as outras duas dão DC por divisão e diferenciação de uma célula mielóide precursora comum sob estímulo de GM.CSF.

As vias derivadas de precursores linfóides, uma ocorre inteiramente dentro do timo, a outra fora do timo produzindo DCs que se encontram no baço e gânglios linfáticos e operam sem estímulo da hormona mielóide GM.CSF.

Os monocitos do sangue periférico podem diferenciar-se em células dendríticas ou em macrófagos consoante os sinais que lhes chegam dos meios em que migram nos tecidos periféricos. Estímulos com GM.CSF



Em diagrama mostram-se diversas vias que podem levar à formação de células DC



Quadro 5

(factor estimulante de colónias granulocito-macrófago) mais a interleucina 4 (IL-4) produzem células DC, mas se a estes estímulos se acrescentar IFN- γ (interferão gama) a diferenciação já se orienta para a produção de CD14-CD64+ macrófagos (Delneste *et alii*, 2003). As células DC são as células APC mais potentes.

As células DC imaturas captam na periferia antigénios e migram para os órgãos linfóides onde sofrem um processo de maturação, após o que activam células T específicas para o antigénio.

Os macrófagos são menos eficientes do que as células DC para estimular as células T.

O interferão gama é um potente activador dos macrófagos inclusivamente na expressão dos genes do proteossoma (Schreiber e Celada, 1985).

3.4 – Células foliculares dendríticas (FDC) e centros germinativos (GC) suas funções e interacções:

As células FDC encontram-se apenas nos folículos dos nódulos ou gânglios linfáticos e sobretudo nas zonas claras dos centros germinativos, diferindo em muitos aspectos das clássicas células dendríticas (DC) apresentadoras de antigénios às células T.

Forma dendrítica com corpo celular com variados prolongamentos e interagando com células B e T.(Figura 19)

Forma dendrítica com corpo celular com variadíssimos prolongamentos e interagando com células B e T

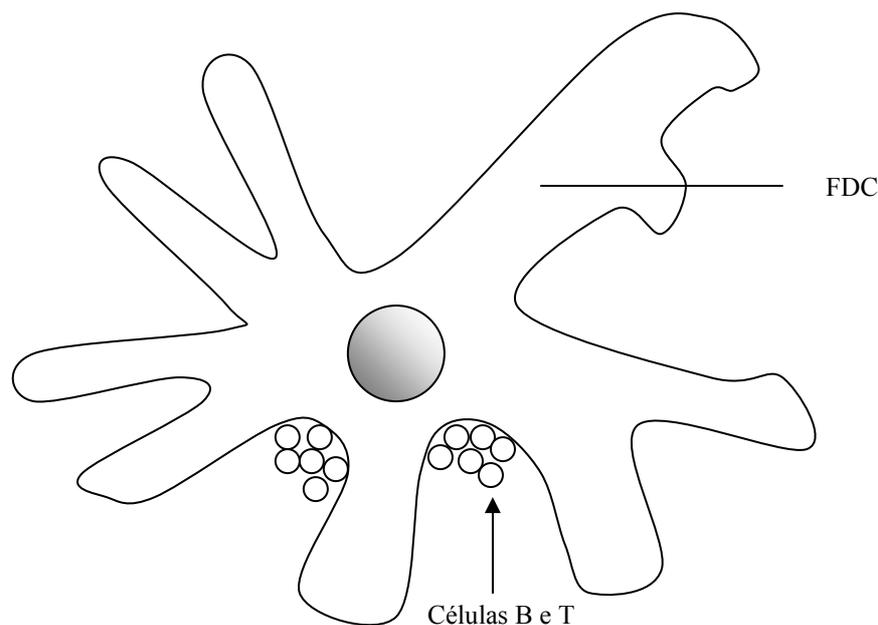


Figura 19

As FDC têm uma vida longa e derivam de células mesenquimatosas locais e possuem complexas extensões citoplásmicas revestidas com dendritos que interagem com células germinais B e T que se encontram em seu redor.

Receptores na superfície das FDCs fixam complexos imunológicos sem endocitose e essas moléculas adesivas interagem com células linfóides, influenciando a migração, activação, proliferação, sobrevivência e diferenciação das células B em células com memória e admitindo-se que actuando também nas células T dos centros germinais (Heinen, 1995).

As FDCs são pois importantes ao seleccionar linfocitos B com memória nos centros germinativos, ao apresentarem antigénios nativos às células potencialmente com memória e dentro destas apenas as células B que tenham receptores com alta afinidade para elas interagirem. Estes linfocitos B depois sobrevivem, enquanto as células B que não interagem com as FDCs sofrem apoptose (Van Nierch e Groot, 2002).

As FDCs encontram-se nos folículos dos diversos órgãos linfóides secundários e pertencem às células do estroma desses órgãos.

Numa série de doenças autoimunes e em situações inflamatórias crónicas pode verificar-se a formação de FDC ectópica, o que prova que a formação de FDC não ocorre apenas nos órgãos linfóides secundários e ela pode ocorrer quando condições locais induzem (a partir dum dado tipo de célula precursora) a maturação em células FDC, não se conhecendo quais são essas células precursoras embora se suspeite que sejam linhas celulares do tipo fibroblasto, como é o caso de células precursoras mesenquimatosas do sangue periférico (Van Niercp e Groot, 2002).

Nos folículos linfóides primários e secundários as FDCs são células unicamente do estroma (Liu *et alii*, 1996).

Os linfocitos B circulando migram através das redes de FDC onde as células B activadas sofrem um ampliação clonal dentro das redes FDC, de certa forma dependendo de células T, gerando-se assim centros germinativos (GC).

Aqui as células B sofrem mutação somática, selecção positiva e negativa, *switching* do isotipo e diferenciação, dando *plasma cells* de alta afinidade e células B com memória imunológica.

As FDCs exprimem os três tipos de receptores para o complemento, assim como os receptores Ig-Fc através dos quais os complexos imunes Ag-Ac são retidos por muito tempo, não se sabendo como é que isto ocorre, inclusivé sem internamento dos antigénios. No entanto, as FDCs contribuem para a sobrevivência e activação das células B periféricas, fazendo-se a adesão entre essas células através de ICAM-1 (CDA54), LFA-1 (CD11a) e VCAM-VLA4 (Liu *et alii*, 1996) produzindo ainda as

FDC quimocinas CXCL13 quimioatraentes para os linfócitos B (Marshall *et alii*, 2002).

As FDCs têm capacidade para tomar e manter à sua superfície antígenos por mais de um ano (MacLennan, 1994) antígeno esse que é mantido numa forma não processada, podendo depois esse antígeno ser tomado por células B, a partir da FDC, processando depois essas células B o antígeno e apresentando-o às células T. Centrócitos parecem ter seleccionado a sua capacidade para interactuar com o antígeno retido na FDC (MacLennan, 1994).

Os agentes da CJD (Creutzfeldt-Jakob disease) distribuídos à superfície das FDC em agregados de PrP patológicos podem disseminar-se por contactos célula a célula, podendo diversos tipos de leucócitos estar implicados na disseminação desses agentes, estando identificadas células da linhagem mielóide como infecciosas, havendo possibilidade de uma disseminação hematogénica (Manuelidis *et alii*, 2000). Parece pois que as FDC não são necessárias para a disseminação a partir da periferia, mas sendo as FDC necessárias para facilitar a disseminação através da acumulação à sua superfície de PrP patológicos. Onde se replicam os agentes infecciosos PrPsc não está bem esclarecido, embora os macrófagos possam sequestrar grandes quantidades de infecciosidade actuando como reservatórios em infecções latentes prolongadas.

No papel do sistema imunitário nas TSE parece que células desse sistema imunitário estariam implicadas nos locais de entrada da infecção, actuariam ainda como vias para a difusão do agente, e podiam mesmo fornecer suporte para a replicação ou acumulação do agente infeccioso.

Em ratos adaptados ao *scrapie*, por inoculação subcutânea, o agente infeccioso associa-se com leucócitos sanguíneos da circulação, tal como na CJD natural e experimental.

Estirpes particulares do agente infeccioso têm diferentes graus de linfotropismo e neurotropismo, tendo também como alvos distintas classes de células derivadas da medula óssea ou de outros órgãos linforeticulares. Nas células do baço as células B, células T, e em menor extensão os macrófagos, têm apreciáveis níveis de infecciosidade apesar de expressarem pobremente PrP (Caughey *et alii*, 1988; Kuroda *et alii*, 1983; Raeber *et alii*, 1999).

Nas FDC, células imóveis altamente especializadas dos centros germinais dos órgãos linfóides secundários, há quem refira que essas FDC são necessárias para a replicação dos agentes (Brown *et alii*, 1999; Kitamoto, 1991).

É possível que as FDC colectem infecciosidade e a transmitam a leucócitos do sangue deslocando-se estes entre os locais periféricos e o cérebro.

Trabalhos experimentais parecem revelar que as FDC não são essenciais para a replicação periférica do agente da CJD nem necessárias para a disseminação da infecção, embora se admita que as FDC favorecem a disseminação do agente da CJD.

As células FDC acumulam PrPsc em indivíduos afectados por VCJD (Burthem *et alii*, 2001) e noutras TSE animais (Kitamoto *et alii*, 1991; McBride *et alii*, 1992; Hill *et alii*, 1999).

As células FDC não migram parecendo necessário que o transporte de PrPsc do intestino para os órgãos linfóides e para o CNS recorra a outro tipo de células.

Elevadas concentrações de PrPc estão presentes nas células dendríticas mielóides (DC) que envolvem a polpa branca do baço, células estas diferentes ontologicamente e funcionalmente das células FDC. Como vimos, as células DC derivam da medula óssea a partir de células estaminais linfóides e mielóides que depois povoam todos os órgãos linfóides (inclusivé timo, baço e gânglios linfáticos) assim como quase todos os tecidos não linfóides e órgãos. As origens e diferenciação das DC são reguladas. A expressão de PrPc é fortemente induzida durante a maturação das células DC e nestas células estão colocalizados esses PrPc com moléculas de MHC da classe II. As células FDC são necessárias para a replicação do PrPsc antes da neuroinvasão (Brown *et alii*, 1999; Montrasio *et alii*, 2000).

As FDC residem dentro de áreas de células B nos órgãos linfóides onde ligam e retêm antigénios na sua superfície celular durante meses e até anos (Tew *et alii*, 1990) revelando estas células FDC um baixo *turnover* e não recirculando. Nos humanos os linfocitos B e T periféricos exprimem baixas taxas de PrPc enquanto se observam altas taxas em subconjuntos de células *killer* (NK) naturais, plaquetas e monocitos (Dodelet e Cashman, 1998; Barclay *et alii*, 1999; Durig *et alii*, 2000).

Contudo, parece que a expressão de PrPc depende da fase de desenvolvimento e activação de cada célula. Nos tecidos animais com TSE o PrPsc está particularmente concentrado nas células FDC (Hill *et alii*, 1999). Nos ratos o PrPsc tem sido detectado nas células FDC, células B e células T dos folículos linfóides (Brown *et alii*, 1999) indicando que a transmissão e propagação do PrPsc requer a interacção de diversos tipos celulares.

Papel das FDC na patogénese dos priões (Prinz *et alii*, 2002; Montrasio *et alii*, 2000; MacKay e Bowning, 1998):

Em baços de ratos inoculados experimentalmente com *scrapie* está referido o impedimento da replicação de priões na ausência de FDC funcionais (Montrasio *et alii*, 2000) o que experimentalmente pode ser

conseguido. Nestas circunstâncias a acumulação de príões no baço é abolida e há um atraso na neuroinvasão desencadeada pela inoculação intraperitoneal de *scrapie*, o que sugere que as FDC são a principal sede de replicação dos príões no baço.

As FDC, células especializadas nos centros germinais na apresentação de antígenos intactos para reconhecimento pelas células B, podem ser impedidas nessa função sendo convertidas em células FDC não funcionais. As presenças de linfotoxinas α/β (Lt α/β) e/ou TNF (factor de necrose tumoral) são necessárias para a manutenção no seu estado funcional das FDC (McKay e Browning, 1998).

A forma LT ligada à membrana (LT $\alpha 1\beta 2$ heterotrímero) é expressa nos linfócitos activados e a sinalização é feita através do receptor LT β (LT β R) exposto nas células do estroma como é o caso das FDC (Mabbolt *et alii*, 2003).

Nos ratos adultos a manutenção das redes pré-existentes de FDC no seu estado diferenciado requer a estimulação contínua através dos seus LT β R porque senão colapsa o seu estado de maturação, o que a suceder bloqueia a acumulação precoce de *scrapie* no baço.

As FDC expressando PrPc necessitam pois de linfotoxinas sinais que provêm das células B e que mantêm as FDC no seu estado diferenciado levando o eventual bloqueio deste sinal (por exemplo, pela LT β R-Ig, ou seja, a *linfotoxin β receptor imunoglobulin fusion protein*) à sua desdiferenciação temporária e supressão da expressão de PrPc com bloqueio da acumulação de PrPsc dentro do baço e reduzida susceptibilidade à prionose (Mabbot *et alii*, 2003).

Isto demonstra que as FDC maduras (diferenciadas) são críticas para a transmissão pelo menos do *scrapie* a partir do intestino. Há acumulação precoce de PrPsc nas FDC após inoculação oral de roedores (Beekey e MacBride, 2000) e em ovinos (Andreoletti *et alii*, 2000; Heggebo *et alii*, 2002).

As FDC maduras são críticas na transmissão do *scrapie* do lúmen do intestino para o CNS.

As FDC podem pois desdiferenciar-se para um estado imaturo e perderem a sua capacidade de fixação de antígenos e sofrerem apoptose (Mabbot *et alii*, 2003).

Os macrófagos têm sido propostos como substitutos das FDC, na ausência destas, como acumuladores de PrPsc (Prinz *et alii*, 2002).

Em virtude da sua mobilidade os macrófagos são um forte candidato para o transporte de PrPsc dos centros germinais para os terminais dos nervos simpáticos (Prinz *et alii*, 2002).

A actuação dos macrófagos parece no entanto depender da dose do agente infeccioso, pois uma porção substancial do inóculo pode ser

destruída por eles (Beringue *et alii*, 2000; Carp e Callahan, 1982). Assim, doses pequenas seriam facilmente destruídas pelos macrófagos enquanto com doses elevadas sobriaria sempre uma fracção do inóculo (Mabblot *et alii*, 2003).

De qualquer forma, há registos (Prinz *et alii*, 2002) de que na permanente ausência de FDC seriam os macrófagos o local da replicação dos priões e para a neuroinvasão a partir dos órgãos linfóides.

A neuroinvasão após inoculação com elevadas doses de *scrapie* poderá ocorrer pelos terminais dos nervos no local da inoculação ou após transporte para os nervos periféricos pelas células DC (Jeffrey *et alii*, 2000).

O PrPsc acumula-se dentro dos gânglios linfáticos pouco após a inoculação oral (Beekes *et alii*, 2000; McBride *et alii*, 2001).

Nas placas de Peyer as redes de FDC encontram-se situadas distalmente do lúmen do intestino e em íntima associação com as fibras nervosas que ocorrem ao longo da parede do intestino (Beekes *et alii*, 2000). É possível que após a acumulação e/ou replicação nas FDC, a neuroinvasão aconteça via nervos entéricos na parede do intestino, ou das placas de Peyer adjacentes das FDC (Beekes *et alii*, 2000; McBride *et alii*, 2001).

A replicação dos priões pode acontecer em órgãos linfóides secundários mesmo na ausência de FDC maduras (Prinz *et alii*, 2002) e a patogenia dos priões no sistema linforreticular pode ser topograficamente compartimentada e os nódulos linfáticos (mais do que o baço) representarem a principal sede de infecciosidade.

As células hematopoiéticas e as células do estroma na patogénese do priões parecem ambas intervir (Prinz *et alii*, 2002).

3.5 – Sistema complemento e priões:

A despeito da natureza infecciosa das prionoses naturais dos animais, nenhuma resposta imunológica proeminente tem sido até agora identificada. Contudo, ultimamente o complemento, um componente do sistema da imunidade inata, tem sido apontado por Kovacs *et alii* (2004) como implicado na patogénese precoce das infecções priónicas experimentais, inclusivé foi verificado em cérebros humanos de doenças priónicas a presença de compostos activos C1q e C3b do sistema complemento em depósitos da proteína priónica e em complexos de ataque a membranas nos neurónios (Kovacs *et alii*, 2004).

O sistema complemento, que faz parte do sistema imune inato, é constituído por uma série de proteínas do plasma sanguíneo e das membranas celulares que interactuam entre si, que, como o nome indica,

complementam a função dos anticorpos na eliminação de antígenos, o que é feito de três formas:

- 1) matando as células estranhas ligando-se e ligando as suas membranas celulares, o que constitui a fixação do complemento;
- 2) estimulando a fagocitose de partículas ou moléculas estranhas, o que constitui a opsonização;
- 3) desencadeando uma reacção inflamatória local na parede da área interessada e atraindo células fagocitárias.

Frequentemente as proteínas do sistema complemento conferem protecção imunitária até que os anticorpos sejam produzidos.

Este sistema complemento compreende algumas dezenas de proteínas plasmáticas distintas (uma série de serina-protease) (veja-se o quadro 6 seguinte) que interactivam em dois conjuntos de reacções relacionadas: a via clássica dependente de anticorpos e a via alternativa independente de anticorpos.

A via clássica é desencadeada pelos complexos antígeno-anticorpo, formando-se três complexos sucessivamente activados ligados às membranas, ou seja: a unidade de reconhecimento que assembla sobre a superfície celular os complexos antígeno-anticorpo; a unidade de activação que amplifica o acontecimento de reconhecimento através duma cascata proteolítica; e o complexo de ataque à membrana (MAC) que perfura a plasma membrana marcada pelo anticorpo e origina a lise celular e morte (no quadro atrás referido anotam-se os componentes proteicos actuantes nestas três fases e as suas características).(Figura 20).

Componentes proteicos do sistema complemento e suas características:

<u>Proteína:</u>	<u>Estrutura em subunidades:</u>	<u>Massa da subunidade:</u> (KD)
<u>Unidade de reconhecimento (C1)</u>		
C1q	A6B6C6	460
C1r	α_2	166
C1s	α_2	166
<u>Unidade de ativação</u>		
C2	monómero	102
C3	$\alpha\beta$	185
C4	$\alpha\beta\gamma$	200
<u>Unidade de ataque à membrana</u>		
C5	$\alpha\beta$	191
C6	monómero	120
C7	monómero	110
C8	$\alpha\beta\gamma$	151
C9	monómero	71
<u>Via alternativa</u>		
Factor B	monómero	92
Factor D	monómero	24
Properdina(P) α_4		220
<u>Proteínas reguladoras</u>		
Factor H	monómero	150
Factor I	$\alpha\beta$	88
Proteína de ligação C4b	α_2	550
Inibidor CI	monómero	110
Proteína S	monómero	83

(adaptado a partir de Reid, 1986)

Quadro 6

A via alternativa da fixação do complemento utiliza vários dos mesmos componentes da via clássica e causa, como aquela, a formação de C5 convertase que desencadeia o complexo de ataque à membrana

(MAC) diferindo as duas vias, alternativa e clássica, no facto da primeira ser independente da presença de anticorpos, actuando antes de se instalar uma resposta imunológica e intercedendo a um baixo nível (*vide* figura seguinte). O sistema complemento é regulado a fim de poder discriminar os tecidos normais das substâncias estranhas, e esta regulação pode ser alcançada por inactivação dos seus componentes, como por exemplo o espontâneo declínio de alguns desses componentes, a sua degradação por proteases específicas, ou ainda a sua inactivação por associação com proteínas inibidoras específicas.

Esta regulação destina-se pois a minimizar os estragos das células hospedeiras e a alvejar os invasores estranhos às células.

A activação do sistema complemento é um importante factor que participa nas doenças do sistema nervoso central (Rus e Niculescu, 2001). Os astrocitos e os neurónios têm capacidade para sintetizar componentes do sistema complemento (Rus e Niculescu, 2001). A mielina e oligodendrócitos (OLG) activam a via clássica do complemento *in vitro* na ausência de anticorpos. Há observações que referem que a activação do complemento e o *assemble* de C5b-9 desempenham um papel importante na patogenia das desordens do CNS.

Alguns componentes do complemento, como o C3b, possuem receptores em certos leucocitos e quando ocorre interacção entre eles desencadeia-se uma estimulação na capacidade fagocitária dessas células (opsonização).

Os antigénios são atraídos e retidos na superfície das células FDC através da interacção entre o complemento e receptores celulares para o complemento.

Está verificado por Mabbolt *et alii* (2001) que em ratos com depleção temporária do componente C3 do complemento, ou com deficiência genética do componente C1q do complemento, que após a infecção periférica com *scrapie* há um retardamento notável da doença e ainda uma redução na acumulação precoce de PrPsc no baço, o que leva a admitir que em fases iniciais da infecção os componentes C3, e talvez C1q, do complemento contribuem para a localização da infecciosidade TSE no tecido linfóide com as consequências inerentes.

O componente C1q do complemento facilita a patogénese precoce dos príões (Lotscher *et alii*, 2003) parecendo o complemento estar envolvido na patogénese periférica dos príões.

Diagrama esquemático das vias de activação do sistema complemento

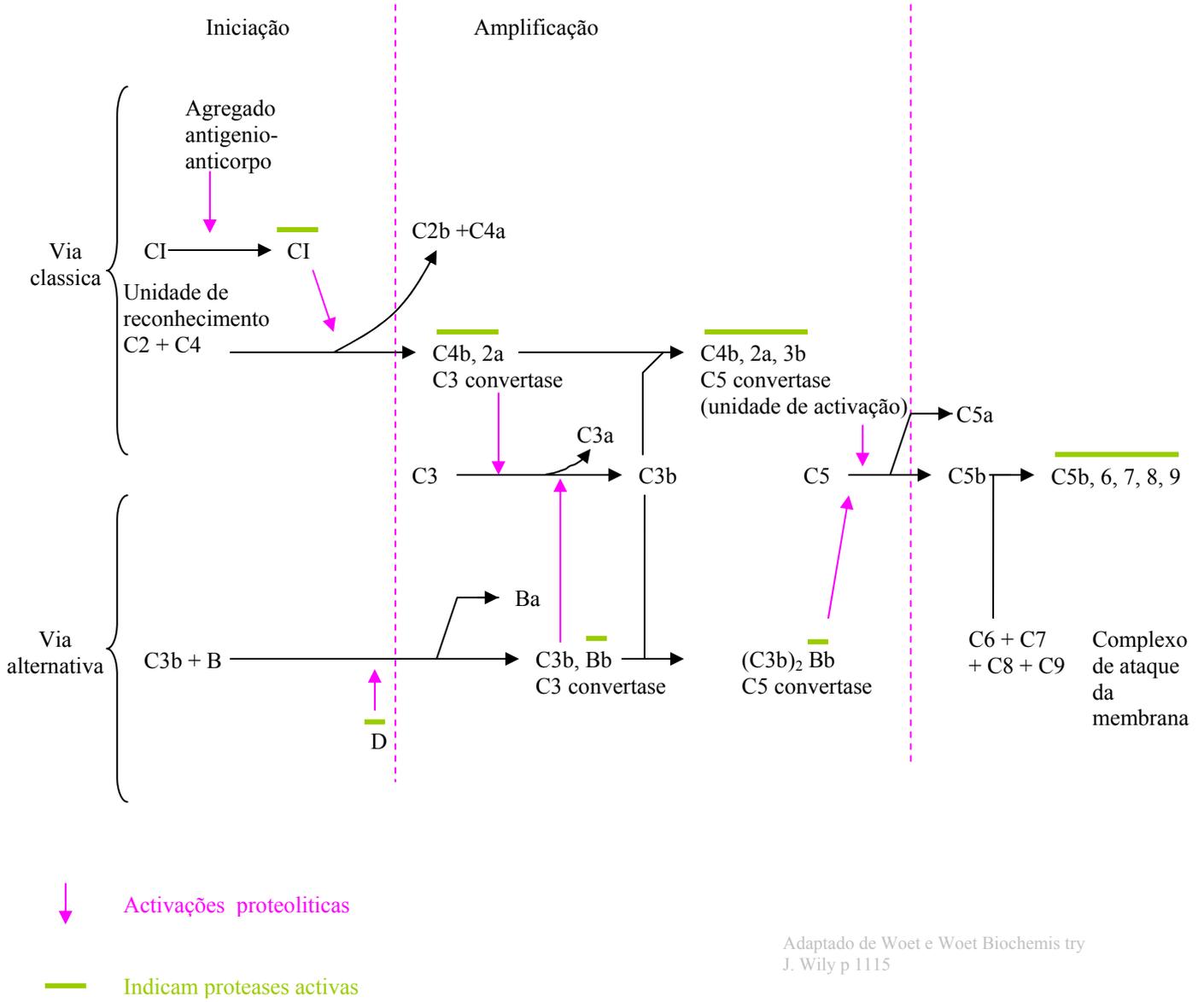


Figura 20

Duas classes de moléculas receptoras das células FDC capazes de atrair antígenos são os receptores do complemento, como por exemplo os CD21/CD35 (constitutivos) e os receptores FcγRIIB (não constitutivos). Os primeiros geram memória nos linfócitos B, parecendo que os complexos C3-antígenos, ou os complexos imunes são atraídos via CD21/CD35 (Barrington *et alii*, 2002).

Os ligandos naturais para o CD21 e o CD35 são produtos de activação do componente C3 do complemento (C3d e C3b, respectivamente) (Fisher *et alii*, 1998) que se encontram covalentemente acoplada com o antígeno.

A activação de componentes específicos do complemento está implicada na retenção inicial dos príões nos órgãos linforreticulares cedo após a infecção (Klein *et alii*, 2001).

Em ratos com *scrapie* experimental, por inoculação intra-peritoneal, a depleção de linfócitos B evita a neuropatogénese provavelmente impedindo a maturação das células FDC dependentes de linfotoxinas. As FDC, os maiores reservatórios extracerebrais de príões (Klein *et alii*, 2001) atraem complexos imunes através do receptor Fc-γ e antígenos C3d/C4b opsonizados através de receptores CD21/CD35 do complemento.

Papel do complemento nas prionoses:

O complemento tem um papel central na resposta imunitária humoral, opsonizando o antígeno ou os complexos imunológicos em ordem a que eles possam ser fixados por receptores do complemento do tipo 2 (CB2, CD21) expressos pelas células B, células foliculares dendríticas (FDC) e por algumas células T. Isto é alcançado através de diversos mecanismos e pela promoção da interacção entre as células B e as FDC (Nielsen *et alii*, 2000). A acumulação precoce de PrPsc após infecção periférica ocorre nas FDC dentro dos centros germinais dos tecidos linfóides.

Os antígenos são fixados e retidos na superfície das FDC através de interacções entre os componentes do complemento e seus receptores celulares (Mabbot *et alii*, 2001).

Os PrPsc acumulam-se nas células FDC (Kitamoto *et alii*, 1991) que funcionam como captadores de antígenos dependentes de anticorpos e complemento. Esta captura consiste essencialmente na fixação de complexos imunológicos pelos receptores Fc-γ e na ligação de antígenos opsonizados C3d-C4b (ligados covalentemente pela adição dos factores C3d e C4b do complemento) aos receptores CD21/CD35 do complemento.

Em estudos experimentais com ratos (Klein *et alii*, 2001) verificou-se que a depleção de imunoglobulinas circulantes ou de receptores Fc- γ não influenciava a patogénese do *scrapie* se a maturação das células B não fosse afectada. Mas em ratos defecientes em C3, C1q, Bf/C2 ou em receptores do complemento, ficavam parcialmente ou completamente protegidos do *scrapie*, com exposições intraperitoneais de quantidades limitadas de príões. A activação de componentes específicos do complemento e a intervenção de receptores CD21/CD35 do complemento, nas células FDC, está implicada na fixação inicial dos príões nos órgãos linforreticulares dos animais, logo após ocorrer a infecção.

As FDC para a fixação de antigénios podem utilizar um mecanismo que envolve os receptores Fc- γ que não parecem limitar a patogénese dos príões, podendo no entanto células FDC utilizar um segundo mecanismo para a fixação dos antigénios, envolvendo a ligação covalente de fragmentos proteolíticos dos componentes do complemento, C3 e C4 (Szakai e Hanna, 1968; Carrol, 1998; Yamakwa e Imai, 1992). Os receptores CD21/CD35 do complemento destas células FDC ligam C3b, iC3b, C3d e C4b através de curtas repetições do seu domínio extracelular.

O papel antipríões observado pela ausência dos receptores CD21/CD35 nas células FDC pode ser devido aos seus efeitos sobre a transdução de sinais nas células B ou à fixação de príões sobre as FDC.

Na patogénese periférica dos príões uma resposta humoral plena não parece ser necessária e há indicações de que a expressão dos CD21/CD35 nas células FDC, mais do que nos linfócitos B, é importante na patogénese dos príões.

Os efeitos mediados pelos produtos de quebra C3/C4 e sua ligação ao receptor Cr2 podem levar a um estado de diferenciação ou activação das FDC que permita a acumulação de príões, ou então a opsonização dos agentes infecciosos pode facilitar a sua acessibilidade aos centros germinais. No entanto, a administração experimental de quantidades elevadas de príões (mais de um milhão de unidades infecciosas) parece ultrapassar a necessidade de receptores funcionais para o complemento na patogénese desencadeada pelo príão.

3.6 Células M no intestino:

No tubo digestivo a mucosa epitelial consiste numa simples camada de células epiteliais dentro da qual existem algumas células especializadas na tomada de antigénios e que são as células M devido a terem na sua superfície microdobras que se encontram em cima do tecido linfóide aqui designado por placas de Peyer.

O tecido linfóide associado com a mucosa do tracto diagestivo está pois recoberto por um epitélio especializado: o epitélio associado com folículos que inclui células M especializadas na tomada e transcitose de macromoléculas (Hathaway e Kraehenbuhl, 2000).

Na transcitose o processo de transporte através do epitélio decorre com a tomada de moléculas a transportar de um lado do epitélio, através de vesículas revestidas a qual transita depois através do trans-Golgi sendo transportada para o outro lado do epitélio num outro conjunto de vesículas. A seguir à transcitose essas macromoléculas antigénicas são libertadas das células M para células do sistema imunitário dos agregados linfóides, abaixo do epitélio, onde são processadas e apresentadas para estimulação dos linfocitos B e T específicos.

A ligação das macromoléculas à membrana apical das células M pode ser não específica ou devida à sua interacção com moléculas do tipo integrinas ou lectinas.

Como dissemos atrás, após a tomada das moléculas antigénicas pelas células suas apresentadoras (APC) o seu processamento decorre e são depois apresentadas às células T que por seu turno estimulam o desenvolvimento de células B específicas.

Estas células B e T activadas especificamente deixam o local de indução e são transportadas para o nódulo linfático drenante satélite.

As células M são pois especializadas na tomada de antigénios particulados, passam-nos depois às APC nos locais de indução na mucosa, mas os antigénios solúveis podem entrar no enterocito e não atingir locais indutíveis.

No primeiro caso gera-se uma resposta imunitária e no segundo caso pode haver tolerância imunitária.

Os locais indutíveis são constituídos por agregados organizados de células linfóides associadas com o intestino (GALT) tendo uma composição celular diversificada. As placas de Peyer são folículos linfóides da parede do intestino contendo linfocitos B e T, células especializadas APC, células dendríticas (DC) e macrófagos (Hathaway e Kraehenbuhl, 2000) sendo estes folículos recobertos, como já se disse, por um epitélio que contem células M.

As células M possuem um aparelho de Golgi proeminente e diversas mitocôndrias, retículo endoplásmico rugoso, lisossomas, encontrando-se ligadas a células vizinhas por desmossomas e interdigitações, tendo um citoesqueleto com alto grau de organização.

As células M são rodeadas por células com microvilosidades e contêm vesículas dentro do seu citoplasma tendo também invaginações na membrana basal, formando uma bolsa onde se encontram as células linfóides.

A membrana das células M não é uniforme e tem condições para favorecer a endocitose de macromoléculas sendo o número de vesículas endocíticas muito grande neste tipo de células. Estas células M expressam ainda o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) da classe II na membrana basolateral do intestino de rato (Allan *et alii*, 1993).

As células M ajudam a indução da resposta imunológica ao libertarem sinais coestimuladores para a proliferação das células T e B nos GALT. Contudo, nas doenças provocadas por príões é reconhecido que o sistema imunitário dos mamíferos está consideravelmente esquecido (Aguzzi *et alii*, 2003).

Com efeito, as TSE não promovem infiltrados inflamatórios, nem anticorpos contra a proteína priónica, havendo um notável envolvimento com os órgãos linfóides com um aumento da concentração dos agentes infecciosos nas primeiras fases da doença embora vários estados de deficiência imunitária poderem abolir a patogénese periférica e evitar a infecção quando os príões são administrados perifericamente (Aguzzi *et alii*, 2003).

A tomada de antígenos no lúmen intestinal realiza-se em locais inductivos especializados (*organized mucosa associated lymphoid tissue* ou O-MALT) que surgem agregadas a isolados folículos linfóides da mucosa no intestinos (inclusivé no cólon e recto) e noutros órgãos.

Para estes antígenos desencadearem respostas imunológicas na mucosa é necessário que eles atravessem a barreira intestinal nestes locais, o que é conseguido através da indução do epitélio especializado sobre os folículos linfóides da mucosa, e este epitélio associado com o folículo contem células M, um tipo único de células epitelial especializada para transporte transepitelial de macromoléculas, partículas e microorganismos (Neutra *et alii*, 1996).

As células M podem endocitar partículas com vários μm de diâmetro ao contrário dos enterocitos (Eldrige, 1991; Neutra *et alii*, 1996).

As células M efectuem uma endocitose e transcitose eficientes, não possuindo o citoesqueleto da bordadura em escova dos enterocitos vizinhos e as suas superfícies apicais contêm microdomínios membranários largos onde ocorre a endocitose. A membrana baso-lateral das células M é profundamente invaginada formando grandes bolsas intraepiteliais onde estão contidos linfocitos T (inclusivé células CD4+ *helper* e células CD45RO+ com memória) linfocitos B e macrófagos (Neutra *et alii*, 1996) e estas invaginações profundas encurtam o trajecto para as vesículas de transcitose atravessarem a barreira epitelial. A transcitose ocorre rapidamente do lumen do intestino (face externa da célula M) para a invaginação intraepitelial (na face oposta da célula M, ou seja, na face interna) com pouca ou nenhuma retenção nos lisossomas das células M, sendo depois esses antígenos da transcitose processados e

apresentados por macrófagos, células DC e células B dentro e debaixo do epitélio.

Esses linfoblastos B específicos do antigénio podem proliferar localmente nos centros germinais de O-MALT e migrarem mesmo pela corrente sanguínea para tecidos distantes onde se podem diferenciar em *plasma cells*.

Portanto, de uma maneira geral a transcitose nas células é o início de uma resposta imunitária segregadora.

O perfil dos oligossacáridos da superfície das células M é distinto do dos enterocitos e pode variar consoante as regiões do intestino e as espécies animais, havendo mesmo num epitélio associado com folículo e contendo células M, diferenças na glicosilação consoante as células M o que pode condicionar o tropismo das macromoléculas para a transcitose.

Na transcitose o transporte de macromoléculas em vesículas de um lado para outro na célula permite que a célula o faça praticamente sem alterar a composição do seu meio intracelular (Prado *et alii*, 2004).

O transporte transepitelial de príões está indentificado (Heppner *et alii*, 2001) sendo perfeitamente possível a sua transcitose rápida directamente para as invaginações intraepiteliais onde se localizam intervenientes do sistema imunitário como é o caso dos macrófagos, células DC e linfócitos, provavelmente implicados na neuroinvasão.

Teríamos portanto as células M como porta de entrada das transmissões por via oral dos agentes infecciosos das prionoses.

Células DC e transporte de PrPsc a partir do intestino:

No transporte dos agentes das TSE entre o lumen do intestino e os centros germinais linfóides admite-se que as células DC derivadas da medula óssea, entrando no intestino a partir do sangue, tomam antigénios a partir do lumen intestinal e transportam-no para os nódulos linfáticos mesentéricos através da linfa (Liu e MacPherson, 1993).

Em roedores infectados experimentalmente com *scrapie* o PrPsc acumula-se primeiro nas placas de Peyer e gânglios do sistema nervoso entérico (Beekes e McBride, 2000) antes de ser detectável no CNS, o mesmo sucedendo com infecções experimentais em veados (*mule deer fawns*) com CWD (*chronic wasting disease*).

Nos centros germinais dos tecidos o PrPsc acumula-se nas FDC. Uma pequena subpopulação das células DC migradoras adquirem PrPsc no lumen do intestino e através dos linfáticos transportam-nos para o tecido linfóide.

O pequeno número de células DC envolvidas nesta aquisição dos PrPsc, provavelmente em conjunto com mecanismos degradativos

intracelulares parciais dos PrP^{sc}, podem explicar os longos períodos de incubação das prionoses e a reduzida eficácia da infecção quando se comparam a exposição oral com outras vias periféricas (Huang *et alii*, 2002). Dentro do tecido linfóide são depois as FDC a terem um papel importante na amplificação da infecção fora do CNS (Brown *et alii*, 1999).

Teríamos assim as DC a fazerem o transporte dos PrP^{sc} entre o lumen do intestino e o tecido linfóide replicativo encontrando-se no intestino essas células DC em íntimo contacto com as células M (Kelsail e Strober, 1996). Há no entanto aqui diversas hipóteses, assim: os PrP^{sc} podem ser tomados do lumen do intestino por células M; ou tomadas directamente por células DC; ou ainda a possibilidade duma passagem directa para os nervos entéricos expressando PrP^c (Shmakov *et alii*, 2000).

Sistema nervoso entérico, PrP^{sc} e PrP^c:

A exposição oral é uma via natural de transmissão das prionoses animais e nos roedores infectados experimentalmente por esta via o PrP^{sc} é detectado precocemente no sistema nervoso entérico (ENS)(Shmakov *et alii*, 2000; Beekes e McBride, 2000).

Nos seres humanos está demonstrada a expressão de PrP^c em diferentes elementos do ENS, estando confirmada a sua presença em fibras nervosas das células gliais entéricas (Shmakov *et alii*, 2000)tal como se encontra RNA mensageiro para o PrP em corpos de células nervosas e em células gliais dentro dos gânglios do ENS.

A justaposição das fibras nervosas expressando PrP^c com as células linfóides e epiteliais indica o possível envolvimento do PrP^c na regulação das funções imunológicas e epiteliais.

No centro germinal dos folículos também as FDC exprimem PrP^c. A justaposição íntima entre as terminações nervosas exprimindo PrP^c e as células epiteliais comprovam que apenas uma delgada camada de epitélio intestinal se interpõe entre os agentes infecciosos ingeridos PrP^{sc} das prionoses e as proteínas priónicas PrP^c dos nervos entéricos (Shmakov *et alii*, 2000).

Está assinalado nos seres humanos a expressão dum receptor de laminina 37-167 Kda (Rieger *et alii*, 1997) na mucosa do intestino delgado (na face luminal) receptor este que se liga ao PrP o que parece constituir um factor de susceptibilidade para a transferência do agente infeccioso através do epitélio para as terminações nervosas adjacentes (Shmakov *et alii*, 2000).

3.7 - Características gerais do sistema nervoso e suas bases:

Características gerais:

O sistema nervoso é habitualmente dividido em sistema nervoso central, compreendendo o cérebro ou encéfalo e a espinal medula (CNS) e em sistema nervoso periférico (PNS) subdividido por sua vez em nervos cranianos e espinais, com os seus gânglios e sistema nervoso simpático.

Esta divisão em sistemas nervosos central e periférico é arbitrária pois que as fibras de que são compostos os nervos provêm ou terminam no sistema nervoso central, constituindo parte integrante deste.

Os gânglios são massas cinzentas encontradas nos nervos espinais e noutros e que, quanto ao seu tamanho, podem ser desde microscópicos até terem vários centímetros de comprimento.

Os nervos são habitualmente classificados de acordo com as suas conexões, em dois grupos principais: os nervos cérebrospinais ou da vida animal e os nervos ganglionares ou da vida orgânica. Os primeiros emanam directamente do eixo cefalorraquidiano e dividem-se em nervos cranianos ou encefálicos e nervos espinais ou raquidianos. Os segundos (gânglionares ou da vida orgânica) constituem no seu conjunto o sistema do grande simpático. Do ponto de vista de anatomia veterinária, e no sistema nervoso autónomo, o arranjo da porção craniosacral, que compreende as partes cefálicas e pélvica, pode ser classificado como sistema parassimpático e a porção toracolombar como sistema simpático.

Os nervos ganglionares, ou da vida orgânica, que estão em comunicação com os nervos cerebrospinais, são dotados de numerosos gânglios e ligam-se ao nevraxe. A partir destes gânglios emitem uma infinidade de pequenos filetes, mais ou menos plexiformes, que se dirigem para as vísceras e para todos os órgãos da nutrição. É precisamente a multiplicidade destes gânglios, interpostos no trajecto destes nervos, que torna muito indirectas as relações dos órgãos assim enervados com o cérebro, o que explica que estes órgãos funcionem independentemente da vontade e tenham uma certa autonomia.

Com efeito, as excitações a que dão origem, são todas reflectidas pelos ditos gânglios, pela medula ou pelo seu prolongamento encefálico, de tal sorte que não são sentidas. Não obstante, o sistema de nervos do simpático, ligado ao nevraxe pelos seus ramos de comunicação, não é independente, nem do ponto de vista anatómico nem fisiológico.

O sistema nervoso periférico, tal como o central, é constituído por neurónios, ou melhor, o tecido nervoso contém dois grupos de células principais, os neurónios (células nervosas excitáveis) e as células gliais (células não excitáveis). Dentro de cada grupo existem diferentes tipos.

Os neurónios, ou células nervosas, distinguem-se das outras células funcionais do organismo devido à sua capacidade para gerar e transmitir sinais eléctricos.

Os neurónios têm corpos celulares grandes ou pequenos, mas todos são caracterizados por terem um grande núcleo com um nucléolo, um elevado teor em ribossomas no citoplasma (livres ou ligados a um extenso retículo endoplásmico) e um alto teor de mitocôndrias. Estas características estruturais permitiram deduzir que eles são células com elevada capacidade biossintética, segregadora e de produção de energia. Outras características dos neurónios são as extensões da membrana celular mais externa, chamadas axónios e dendritos, os primeiros por vezes ramificados ou envolvidos numa bainha de mielina. São os axónios sem mielina os principais condutores eferentes de impulsos eléctricos de uma célula para outra parte do sistema, sendo a interrelação estabelecida através de sinapses. Por outro lado, os dendritos são diferentes dos axónios, pois além de mais curtos e espessos, são muito ramificados, não têm a bainha de mielina e são diferentes na medida em que transportam o impulso eléctrico das sinapses para a célula nervosa.

Nas células nervosas há a considerar sobretudo três tipos: o unipolar (só um axónio); o bipolar (um axónio e um dendrito); e o multipolar (um axónio e vários dendritos).

As células gliais não são excitáveis como os neurónios e há vários tipos: o astrócito; o oligodendróglia; as células de Schwann.

Como é sabido as células nervosas comunicam entre si quimicamente através das sinapses, com os neurotransmissores armazenados em vesículas sinápticas envolvidas por membrana e que são libertadas por exocitose nas fendas sinápticas. O centro biossintético do neurónio reside no entanto no corpo da célula, necessitando o neurónio de um eficiente sistema de transporte intracelular que canalize as moléculas do centro da célula para as pontas dos axónios e dendritos. Para isto existem mecanismos de transporte rápidos e lentos. O neurónio contém inúmeros ribossomas, alguns no citosol e outros ligados ao retículo endoplásmico rugoso (ER) apesar de os dendritos poderem conter alguns ribossomas e o axónio não contendo nenhuns. O neurónio tem notáveis necessidades metabólicas uma vez que o seu volume chega por vezes a ser dez mil vezes maior do que o de um hepatócito.

As proteínas do axónio são sobretudo necessárias para formar os microtúbulos, os neurofilamentos (uma classe de filamentos intermediários) e os filamentos de actina. Estas proteínas do citoesqueleto são exportadas do corpo celular do neurónio para todo o comprimento do axónio a uma velocidade de 1 a 5 mm por dia, designando-se este

processo o transporte axonal lento. Nos dendritos ocorre um transporte análogo.

Esquema de tecido neural

Todo o tecido nervoso, central (CNS) e periférico (PNS) é constituído por dois tipos principais de células, os neurónios e as células gliais, estas últimas envolvendo as primeiras e ocupando o espaço entre elas

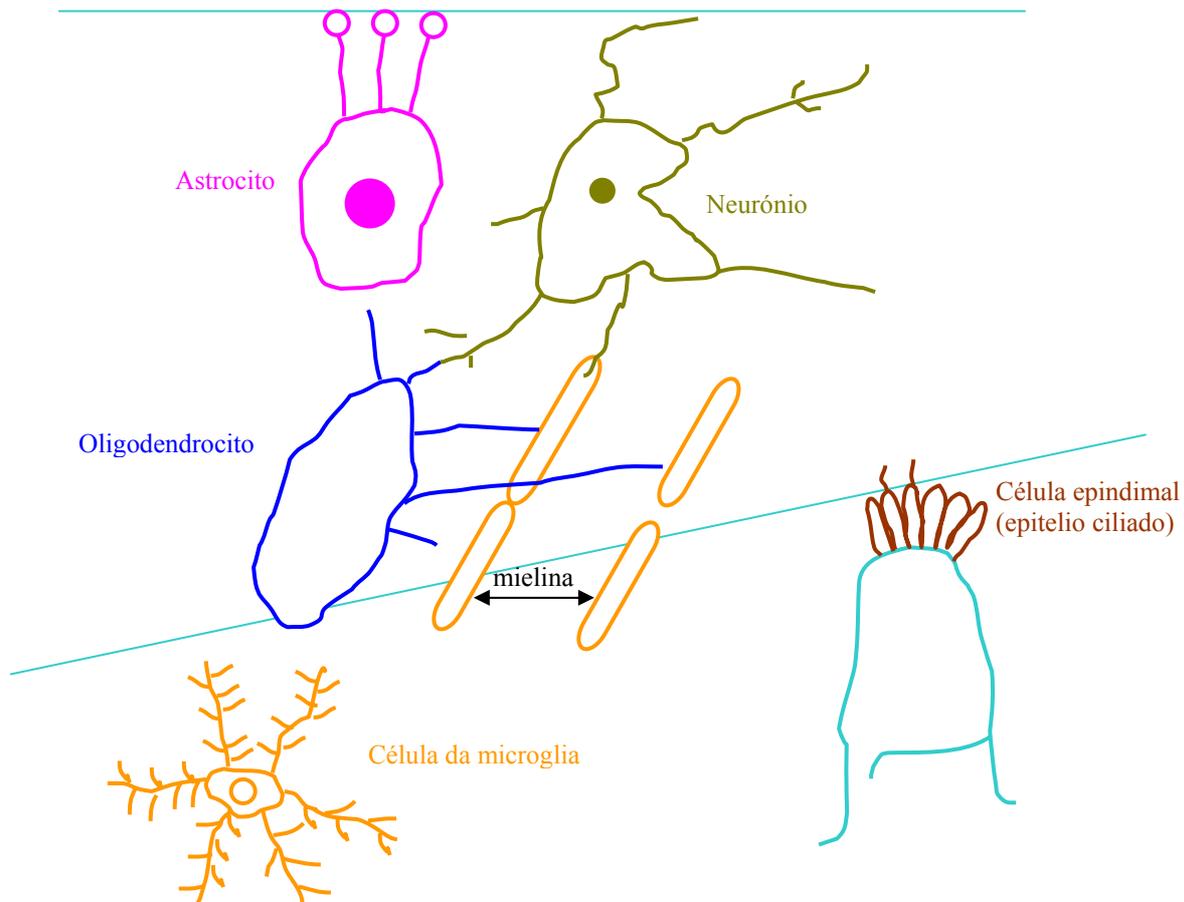


Figura 21

A exportação de proteínas segregadas pela célula nervosa e as moléculas ligadas à membrana como as de PrPc, deslocam-se para fora de uma forma mais rápida passando do seu local de síntese no ER para o aparelho de Golgi que faz face com a base do axónio. Daqui essas moléculas são englobadas em vesículas com membrana e através de um transporte axonal rápido, com velocidade até 400 mm por dia, vão ao longo das suas partes formadas pelos microtúbulos no axónio e nos dendritos, sendo as vesículas de transporte de vários e distintos tipos consoante as moléculas a transportar.

Os neurónios podem ser encarados como células segregadoras, sendo o conjunto local de moléculas de segregação transportado para uma longa distância do local em que ocorreu a sua síntese de proteínas e membranas. Existe um outro tipo de transporte: o transporte retrógrado, que permite às terminações nervosas comunicar com o centro do corpo celular.

Este movimento retrógrado ocorre a partir da membrana das extremidades das células para o seu interior e é realizado com proteínas motoras distintas transportando vesículas de maior tamanho, formadas por endocitose extensa.

Muito importante ainda é o facto de moléculas presentes no meio extracelular envolvente do axónio terminal (como pode ser o caso de PrPsc desnudado ou englobado em vesículas) poderem ser capturados nestas vesículas endocíticas e serem assim transportados do terminal do axónio para o centro do neurónio.

Os neurónios são envolvidos por diversos tipos de células gliais. Todo o tecido nervoso, central (CNS) ou periférico (PNS) consiste, como já foi referido, de duas classes principais de células: os neurónios e as células gliais de suporte (dez vezes mais células gliais que neurónios).

As células gliais envolvem os neurónios (os seus corpos celulares e os seus prolongamentos) e ocupam os espaços entre estes, sendo de considerar nelas as células de Schwann, no PNS dos vertebrados e os oligodendrócitos no CNS dos vertebrados, que revestem os axónios formando uma bainha de mielina (*vide* figura 22 seguinte).

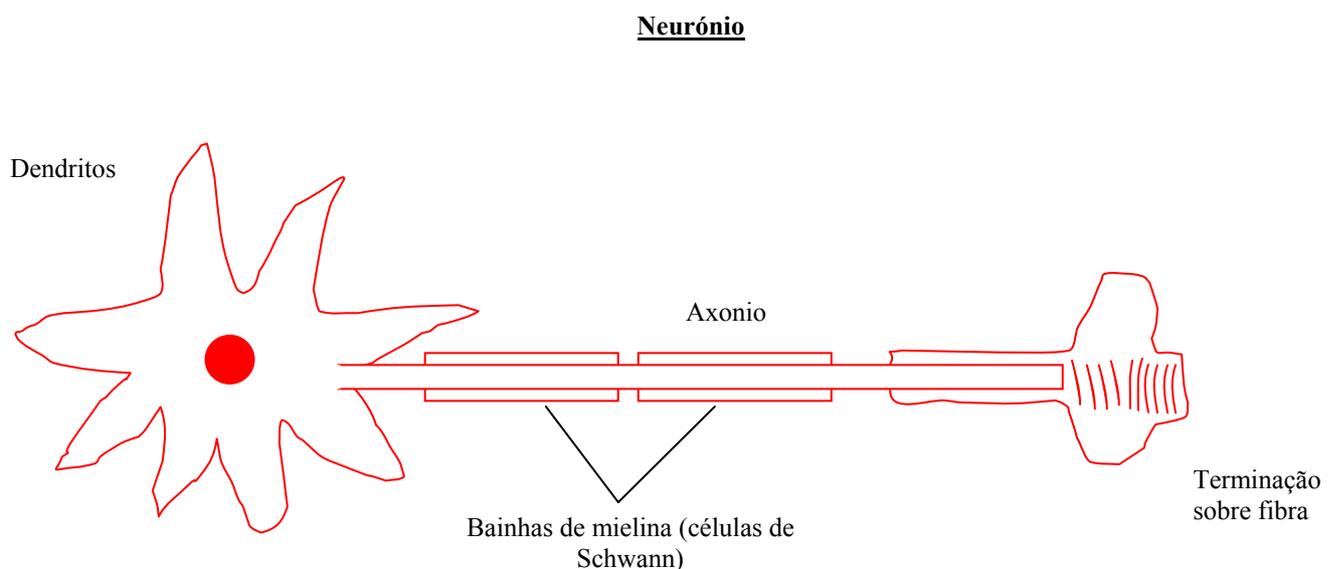


Figura 22

Outros tipos de células gliais no CNS são as microglias, células endodimais e astrocitos. As microglias, originadas no tecido hematopoiético, funcionam como os macrófagos. A maioria das células gliais possui capacidade para se dividir através de toda a vida, ao contrário do que parece suceder com os neurónios.

Os astrocitos são as células mais diversificadas dentro das células gliais, mas a sua função é bastante ignorada, estando no entanto implicadas na barreira hemato-encefálica formada por células endoteliais dos vasos sanguíneos (capilares e vénulas).

A disseminação dos agentes infecciosos (PrPsc) através do PNS é uma etapa crucial para ocorrer a neuroinvasão do CNS, embora as etapas deste desenvolvimento não estejam clarificadas.

Há no entanto provas (Archer *et alii*, 2004) de que as células gliais são alvos das infecções por priões, tendo sido até criadas linhas de cultura de células de clones de células gliais infectadas pelo *scrapie* de ovinos, tendo sido evidenciada a deposição anormal de PrPsc de *scrapie* de ovino em células gliais do PNS (Archer *et alii*, 2004).

Parece pois que o transporte de PrPsc adquirido por via oral para o CNS é feito através dos nervos periféricos. Se isto ocorre dentro dos axónios, o mecanismo de transporte dentro deste é fundamental (Maya *et alii*, 2004). Foi verificado que o PrPc é transportado de forma retrógrada a partir da extremidade do axónio o que pode ter implicações no transporte de priões infecciosos PrPsc de fora para dentro da célula nervosa.

A disseminação transneuronal dos priões infecciosos da TME (*transmissible mink encephalopathy*) está identificada (Bartz *et alii*, 2003) bem como o transporte retrógrado axonal. Há referências que dizem que a velocidade do fluxo axonal é incompatível com a lentidão da chegada do PrPsc ao cérebro, o que leva a admitir que sejam as células de Schwann a desempenhar esta função, pois até foram assinaladas moléculas de PrPc sobretudo na membrana celular (Follet *et alii*, 2002). Com efeito, a expressão de PrPc no PNS é determinante para a neuroinvasão priónica (Glatzel e Aguzzi, 2000).

No *scrapie* há muitas provas indiciando que na neuroinvasão subsequente estão implicados ambos o LRS e o PNS (Baldauf *et alii*, 1997; Lasmezas *et alii*, 1996; Klein *et alii*, 1997).

Após a ingestão do agente do *scrapie* foi identificado PrPsc no sistema nervoso entérico da submucosa e no plexo mesentérico, e no tecido linfóide associado com o intestino (Beekes e McBride, 2000; Heggebo *et alii*, 2000; McBride e Beekes, 1999; McBride *et alii*, 2001). A disseminação para o CNS pode ocorrer por transporte axonal no sistema nervoso parassimpático (por exemplo, do nervo vago para o núcleo motor dorsal do vago) e no sistema nervoso simpático segundo foi

verificado, como já referimos anteriormente, na CWD (Andreoletti *et alii*, 2000; Sigurdson *et alii*, 2001; van Keulen *et alii*, 2000; van Keulen *et alii*, 2002).

A disseminação adicional dos príões no hospedeiro pode ocorrer dentro do sistema linforreticular (LRS) originando uma infecção priónica sistémica dos órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos, baço, amígdalas da garganta e mucosa associada com o tecido linfóide).

Não há consenso quanto ao tipo de células envolvidas na replicação do PrPsc no LRS.

Há deposição do PrPsc nas FDC nos centros germinais dos órgãos linfóides secundários (Kitamoto *et alii*, 1991; McBride *et alii*, 1992) mas há dúvidas a este propósito (Manuelidis *et alii*, 2000; Oldstone *et alii*, 2002) ou melhor, duvida-se da necessidade de FDC maduras para que possa ocorrer a infecção e a neuroinvasão (Prinz *et alii*, 2002).

Para a propagação dos PrPsc no LRS parecem ser necessários subtipos de macrófagos localizados nas zonas marginais dos tecidos linfóides secundários. Estão referenciadas neuroinvasões por *scrapie* a seguir a vias de infecção periféricas, na ausência de infecção do LRS (Frigg *et alii*, 1999; Manuelidis *et alii*, 2000; Race *et alii*, 2000).

3.8 Expressão selectiva do PrPc pelos neurónios do sistema nervoso central (CNS) (Ford *et alii*, 2002):

A expressão da proteína PrPc é predominantemente neural mas difere consoante as diferentes classes de neurónios no cérebro de rato (Ford *et alii*, 2002).

Assim, neurónios imunoreactivos para o ácido γ -aminobutírico (GABA) exprimem elevadas concentrações.

Neurónios muito ramificados exprimem muito menores taxas de PrPc, sobretudo nos axónios dos tractos fibrosos mais importantes.

Alguns neurónios (aqueles positivos para a dopamina) não parecem exprimir PrPc.

No entanto, todos os neurónios, mesmo os que não exprimem a proteína PrPc, exprimem elevadas concentrações dos mensageiros dessa proteína. As células gliais é que exprimem baixas concentrações desses mensageiros e ausência de proteínas PrPc (Ford *et alii*, 2002). No entanto, está assinalado que células neurogliais periféricas do PNS cultivadas permitem a infecção pelos príões do *scrapie* (Archer *et alii*, 2004).

Parece poder concluir-se que estas diferenças notórias entre os diversos tipos de neurónios devem-se ao controlo que existe após a transcrição da respectiva mensagem, provavelmente devido a diferenças no tráfego da proteína ou à sua degradação, podendo desta forma

condicionar fortemente a disseminação e o efeito neurotóxico dentro do CNS das prionoses.

Dentro do CNS a disseminação do PrPsc e sua replicação podem portanto ser muito diversificadas consoante o tipo de células nervosas intervenientes e a respectiva via em que estão integradas nos nervos.

Nas células neuronais e nas células linfóides primárias os PrPc parecem ter um *turnover* e um desprendimento (solubilização) similares (Parizek *et alii*, 2001).

Logo, as diferenças entre estes dois tipos de tecidos no que se refere à capacidade de replicação dos priões não é devida a diferenças no *turnover* do PrPc.

Estudos efectuados com linhas celulares de neuroblastoma revelaram que o PrPc é transportado para a superfície celular uma hora após a sua biossíntese tendo uma semi-vida de 3 a 6 horas (Borchelt *et alii*, 1990; Caughey *et alii*, 1989). Uma pequena parte deste PrPc (10 a 30% da totalidade à superfície celular) é libertada no meio de cultura celular (Borchelt *et alii*, 1990; Harris, 1993). Estas formas solúveis do PrPc têm sido assinaladas também no fluido cérebro-espinhal humano (Tagliavini *et alii*, 1992).

Há provas da existência de quantidades substanciais de PrP solúveis desprendidos para o soro sanguíneo em ratos e humanos (Parizek *et alii*, 2001) o que levanta o problema da sua hipotética conversão em PrPsc, para o que não existe qualquer prova embora tenha sido assinalado que sangue de bovinos com BSE pode transmitir prionose a ovinos (Houston, 2000).

Como já referimos parece que a propagação eficiente de priões no sistema linforreticular necessita de células do estroma e hematopoiéticas que exprimem PrPc (Kaeser *et alii*, 2001).

Nem as células T (Raeber *et alii*, 1999) nem as células B são capazes de replicar priões (Montrasio *et alii*, 2001) enquanto as FDC têm um papel crucial nesta replicação (Brown *et alii*, 1999; Montrasio *et alii*, 2000; Klein *et alii*, 2001; Mabbolt *et alii*, 2000) embora constituam menos de 1% das células dos órgãos linfóides secundários. No entanto PrPc é expresso nos linfócitos.

Transporte de PrPsc nos nervos:

Enquanto o PrPc é submetido a um transporte rápido nos axónios, o mecanismo de transporte intranervos do PrPsc não é claro (Kunzi *et alii*, 2002). Experiências feitas em ratos transgénicos que superexprimem proteína tau com quatro repetições humanas (ratos portanto com deficiência no transporte axonal rápido) sugerem que os PrPsc são

transportados ao longo dos nervos periféricos sem ser por transporte axonal rápido (Thackray *et alii*, 2003) o que nos leva a admitir que possivelmente esse transporte poderá ocorrer, como admitimos noutra parte deste texto, nas células de Schwann e talvez através do efeito dominó.

Com efeito, Brandner *et alii* (1996) e Glatzel e Aguzzi (2000) propuseram um modelo de transporte do PrPsc ligado a membranas ao longo dos axónios e células de Schwann de uma forma em dominó.

Os PrPsc seriam transportados por mecanismos não canónicos, ao longo das membranas dos nervos expressando PrPc e de uma maneira em dominó, funcionando os nervos não apenas como meios de condução mas também como reservatórios dos agentes infecciosos.

A neuroinvasão directa pelos príões infecciosos através dos nervos periféricos tem sido considerada com insistência. No entanto a velocidade do fluxo axonal é incompatível com a demora que leva o PrPsc a ser detectado no cérebro, o que leva Follet *et alii* (2002) a admitir que isto possa ocorrer mas através das células de Schwann.

Estas células de Schwann exprimem PrPc sobretudo localizado na sua membrana celular e por outro lado replicam o PrPsc, sendo estes autores os primeiros a referir a infecção e replicação do PrPsc em linhas celulares de células gliais periféricas *in vitro*.

Isto sugere que a propagação dos príões pode ocorrer nos nervos periféricos através das células de Schwann, segundo uma espécie de efeito em dominó, embora sejam necessários fazer ensaios para saber da susceptibilidade das células de Schwann a outras estirpes de *scrapie*.

O transporte de PrPsc no PNS não parece ocorrer por transporte axonal como referem Glatzel e Aguzzi (2000), Groschup *et alii* (1999) e Hainfellner e Budka (1999) que calculam que a velocidade de transporte da infecciosidade no PNS é de 0,7 mm por dia. Ora este valor não corresponde nem ao transporte rápido nem lento nos axónios, sugerindo portanto outro mecanismo para esse transporte, e esse outro mecanismo poderá bem ser o da disseminação periférica dos PrPsc através do PNS ocorrer através de um efeito dominó nas células de Schwann com o PrPc lá existente a ser replicado pela conversão PrPc→PrPsc pelo PrPsc adjacente, e transmitindo-se depois através dos fragmentos membranários (*painting*) de vesículas das células de Schwann infectadas para células de Schwann não infectadas. Células neurogliais periféricas em cultura são altamente permissíveis para infecção pelos príões do *scrapie* dos ovinos e Archer *et alii* (2004) fornecem provas de que as células gliais PNS são alvos para a infecção por estes príões.

3.9 Expressão selectiva de PrPc em tecidos periféricos:

Os níveis de expressão da proteína PrPc controlam não só a velocidade mas também a via da neuroinvasão da porta de entrada periférica para o CNS. No rato adulto foi possível identificar a este propósito diversos aspectos.

A proteína PrPc é expressa em muitos tecidos mas as altas concentrações são apenas observadas em discretas subpopulações de células, sobretudo da rede neuroimune que integra o sistema de defesa imunológico e nos sistemas neuroendócrinos sob controlo do CNS, a saber (Ford *et alii*, 2002):

- 1-nervos aferentes de pequeno diâmetro no tracto digestivo;
- 2- nervos e gânglios simpáticos;
- 3- células apresentadoras de processadoras de antigénio (APC), células dendríticas foliculares (FDC) e não foliculares;
- 4-subpopulações de linfócitos sobretudo associados com tecidos linfóides do intestino;
- 5-sistemas parassimpático e nervos entéricos;
- 6-células dispersas no sistema neuroendócrino;
- 7-axónios dos sistema nervoso periférico e células de Schwann associadas.

Parecem portanto possíveis uma série de vias alternativas para a propagação e transporte dos PrPsc das portas de entrada periféricas naturais (via oral) ou experimental (por exemplo, via intraperitoneal) para o cérebro. Na transmissão a partir da periferia células reguladoras que exprimam PrPc, sobretudo células neuroendócrinas particulares da parede do intestino e células DC que transportam antigénios do epitélio intestinal para os órgãos linfóides secundários, são muito importantes.

A disseminação do agente infeccioso PrPsc através do PNS é pois um etapa crucial para a neuroinvasão do CNS.

A inervação simpática dos órgãos linfóides é um factor limitante da neuroinvasão priónica e os nervos simpáticos da baço são reservatórios extracerebrais de príões (Glatzel *et alii*, 2001).

Em enterócitos humanos está assinalada a expressão de PrPc nos domínios de junção célula-célula (Moret *et alii*, 2004) em domínios *raft* dependentes do colesterol, nas partes superiores das membranas laterais dos enterócitos, abaixo das *tight junctions*.

Portanto, a capacidade de propagação e replicação dos agentes infecciosos das TSE é muito variada consoante os tecidos e as respectivas células.

4- Linfocitose, neuroinvasão e outras características dominantes na patogénia das TSE:

4.1 – Integração evolutiva:

A maior parte dos conhecimentos disponíveis sobre a patogénia das TSE resulta de estudos experimentais com ovinos e roedores com o agente do *scrapie* tendo-se verificado nestes animais a acumulação de PrP^{sc} nos tecidos linfóides muito antes dela ser detectável no CNS. Nos tecidos linfóides, na via de infecção natural *per os*, o *scrapie* é primeiro detectado nas placas de Peyer associadas com os tecidos linfóides do intestino e só depois noutros tecidos linfóides e no CNS (van Keulen *et alii*, 1999).

Em ovinos com *scrapie* natural, em roedores com *scrapie* experimental são detectados PrP^{sc} nas FDC e nos macrófagos dos centros germinais (GC). As FDC exprimem em ratos não infectados altas concentrações de PrP^c (MacBride *et alii*, 1992). As FDC estão intimamente associadas com linfócitos que exprimem PrP^c (Mabbolt *et alii*, 1997).

Há provas de que os linfócitos T não estão envolvidos na patogénese do *scrapie* (Mabbolt e Bruce, 2001) ao contrário do que sucede com os linfócitos B, admitindo-se que estes últimos possam fisicamente transmitir infecciosidade das TSE para o CNS embora esta se não detecte nos linfócitos do sangue em circulação. Os linfócitos B transmitem muitos sinais na forma de citocinas para a manutenção e maturação de outros tipos de células dos GC (Chaplin e Fu, 1998) como é o caso das FDC tendo o factor de necrose tumoral α (TNF- α) um importante papel neste sentido.

Nesta figura 23 refere-se que a segregação de TNF- α pelos linfócitos B leva este factor a interagir com o receptor TNF-R1 expresso pelas FDC e/ou pelas células suas precursoras (Tkachuk *et alii*, 1998) induzindo a maturação destas células.

Também a interleucina-6 (IL-6) segregada pelas FDC é necessária para a maturação e desenvolvimento dos GC. A acumulação de PrP^{sc} no baço e a subsequente neuroinvasão dependem das FDC maduras. O PrP^c do baço tem uma menor massa molecular que o PrP^c do cérebro talvez devido a diverso grau de glicosilação.

O PrP^{sc} foi detectado no baço de ovinos com *scrapie* natural e também em casos experimentais.

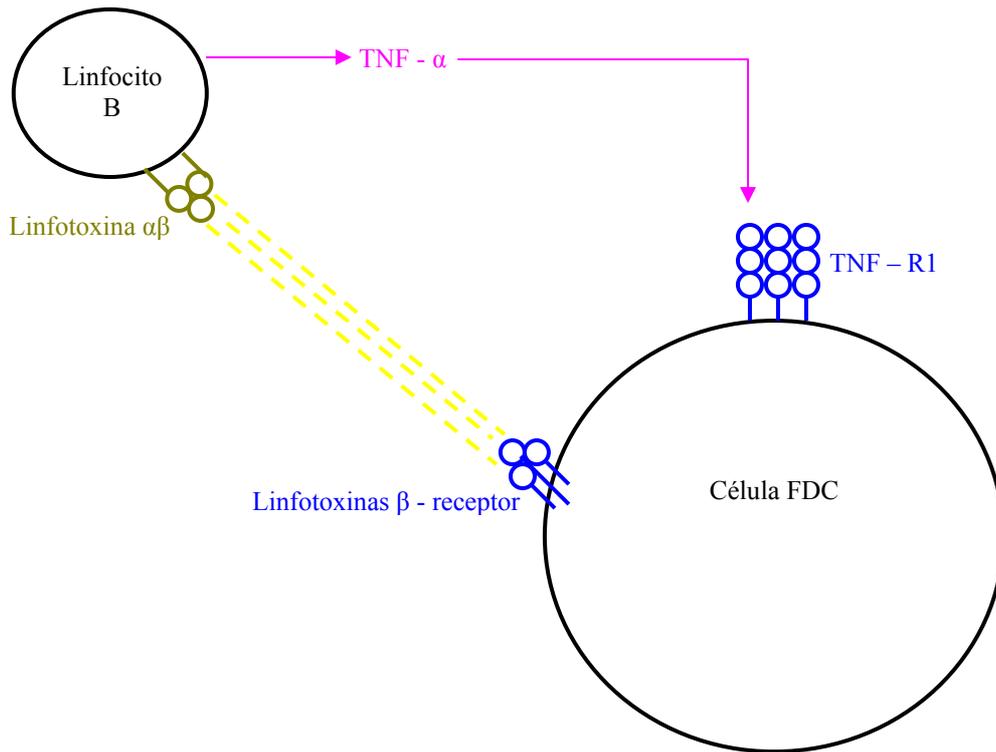


Figura 23

Nos baços de bovinos com BSE não foi detectado PrPsc, havendo portanto diferenças entre os órgãos consoante os tipos de infecção (Somerville *et alii*, 1997).

Como já referimos, as FDC não parecem ser de origem hematopoiética mas derivarem de células precursoras do estroma, dentro dos tecidos linfóides, do baço e dos gânglios linfáticos.

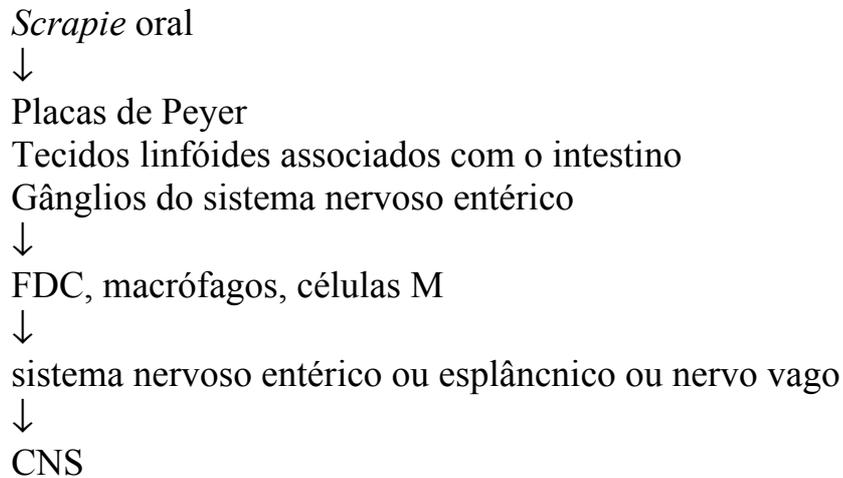
Dentro dos GC os macrófagos removem linfócitos B apoptóticos e endocitam FDC com antigénios icosomais sugerindo que os macrófagos podem sequestrar a infecciosidade pelo *scrapie* dificultando a replicação inicial dos príões infecciosos. Certamente que ao nível do baço se pode criar uma competição entre a destruição pelos macrófagos dos PrPsc e a sua acumulação pelas FDC.

As FDC fixam e retêm nas suas superfícies os antigénios na forma de complexos imunes Ag/Ac e o componente C3 do complemento.

Provas recentes (Klein *et alii*, 2001; Mabbot *et alii*, 2001) sugerem que o complemento tem um importante papel na localização e retenção do *scrapie* nas FDC durante os primeiros dias após a infecção.

Não há provas da disseminação hemática das TSE dos tecidos periféricos para o CNS (Mabbot e Bruce, 2001).

A neuroinvasão até ao CNS parece depender dos nervos periféricos que também exprimem PrPc nos animais (Heggebo *et alii*, 2000; Shmakov *et alii*, 2000). Em esquema (Quadro 7)



Quadro 7

Na figura 24 seguinte esboça-se a possível via de disseminação da infecciosidade (*scrapie*) do tubo digestivo para o sistema nervoso.

Como os GC dentro dos tecidos linfóides são pobremente enervados permanece ignorada a forma como os PrPsc atingem as terminações dos nervos periféricos a partir das FDC.

No entanto RNA mensageiro do PrPc e proteína priónica são expressos em elevadas concentrações nos neurónios adultos do CNS e do sistema nervoso periférico (Shmakov *et alii*, 2000). Também as FDC exprimem altas taxas de PrPc (Mabbolt *et alii*, 2000).

Os neurónios e as FDC são células de semi-vida muito longa e mitoticamente inactivas.

As células FDC são altamente estimuladas nos tecidos limfoides infectados com TSE (Jeffrey *et alii*, 2000).

Como já referimos, os antigénios são fixados e retidos na superfície das FDC através de interacções entre o complemento e receptores celulares do complemento sem estarem envolvidos anticorpos ou receptores de anticorpos (Fc- γ receptores). Investigações recentes revelaram que o complemento e seus receptores são importantes na associação dos PrPsc com os folículos linfóides (Klein *et alii*, 2001; Mabbolt *et alii*, 2001).

Há também estudos que sugerem que a neuroinvasão nas TSE pode ocorrer por vias independentes das FDC sobretudo com a utilização de altas doses dos agentes infecciosos (Mabbolt e Bruce, 2001).

Disseminação possível do agente infeccioso PrPsc
(adaptado de Mabbot e Bruce, M.E., 2001)

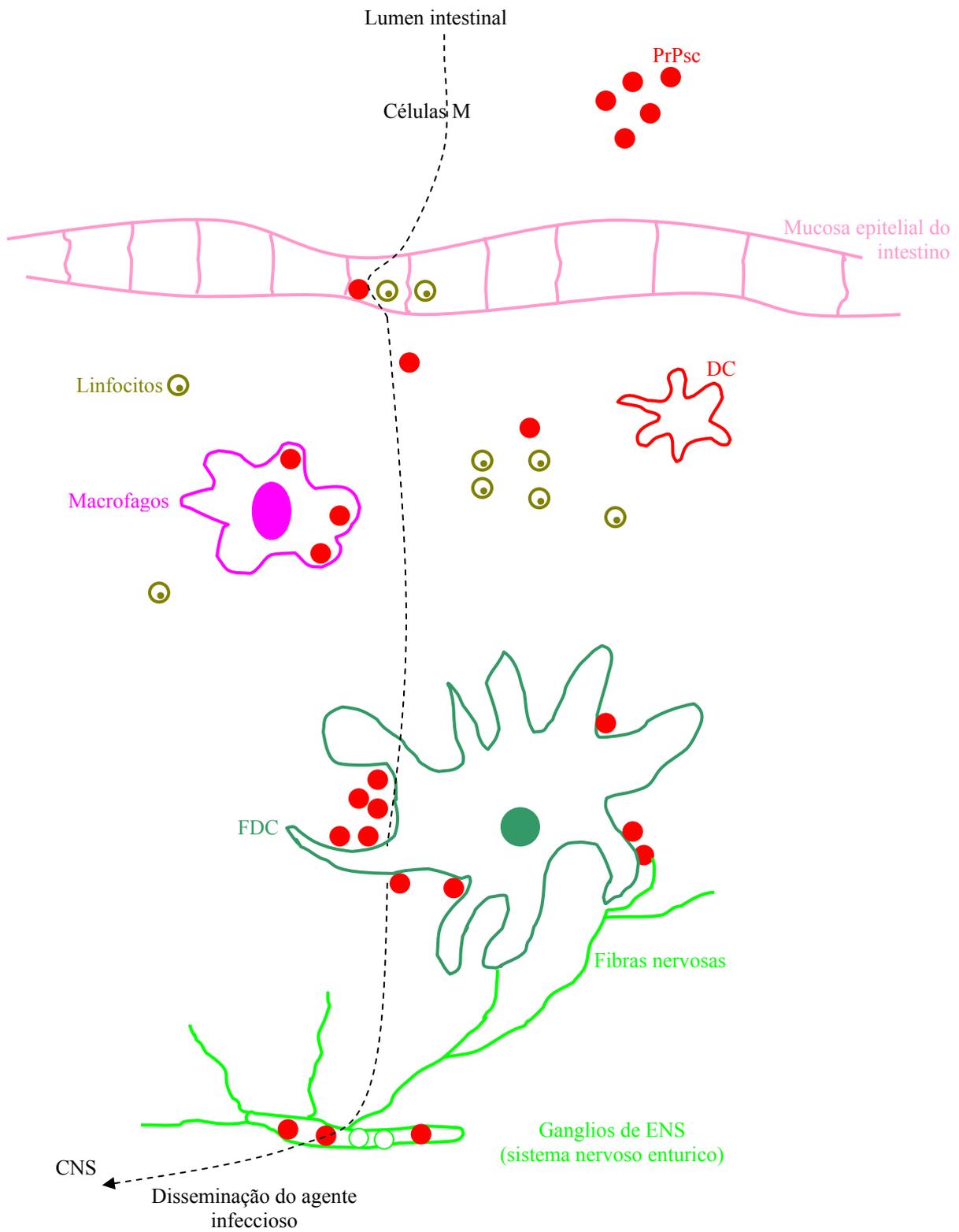


Figura 24

Em estudos efectuados com células FDC isoladas de bovino (Thielen *et alii*, 2001) sugere-se que estas células exprimem uma forma particular de PrPc, sendo possível que esta isoforma particular esteja relacionada com a aparente ausência de infecciosidade nos órgãos linfóides dos bovinos afectados pela BSE. Esta variação de homologia entre as isoformas PrPc e o PrPsc em células imunitárias dos bovinos poderia explicar a ausência de infecciosidade observada na maioria dos órgãos linfáticos desta espécie animal, uma vez que aquela isoforma particular não seria convertível em PrPsc.

Na identificação dos subtipos de células que suportam a replicação e propagação dos príões nos seus locais de entrada até aos locais da neuroinvasão, as FDC e as DC parecem ser de grande importância, embora a linfoinvasão não dependa apenas de um simples tipo de célula e necessite de um conjunto coordenado, em rede, de células. É natural ainda que estas características variem consoante as estirpes de príões. De qualquer maneira, em todo este contexto vislumbram-se interrelações não convencionais entre os príões e o sistema imunitário.

4.2 – Linfoinvasão e neuroinvasão:

O processo através do qual os príões infecciosos migram da porta de entrada (por exemplo, tubo digestivo) para o CNS chama-se neuroinvasão e decorre em diversas etapas.

A primeira delas é denominada a linfoinvasão e a segunda a neuroinvasão propriamente dita.

Na linfoinvasão, na passagem através da mucosa intestinal, os príões servem-se de diversos componentes do sistema imunitário, para se moverem através do corpo dos animais, afirmando-se que a linfoinvasão e a neuroinvasão dependem da presença de linfócitos B (Klein *et alii*, 1997) e como a expressão por estas células B da proteína priónica PrPc não é necessária para a neuroinvasão (Klein *et alii*, 1998) parece que o seu papel consiste em contribuir para a manutenção das FDC ao fornecerem β -linfotóxina ao baço e aos gânglios linfáticos. Por outro lado, a docagem dos príões às FDC é facilitado por factores do complemento e seus receptores, sugerindo a opsonização dos príões (Klein *et alii*, 2001). Nesta opsonização que tornaria os PrPsc mais eficientemente engolfados pelos fagocitos as opsoninas mais importantes para este efeito derivariam do complemento (C3b ou C3bi) ou de imunoglobulinas que se ligariam através de receptores Fc.

Recorda-se que as FDC humanas exprimem PrPc *in vitro* e *in vivo* (Thielen *et alii*, 2001). As células FDC são componentes do estroma dos órgãos linforreticulares, não sendo de origem hematopoiética, nem

devido ser confundidas com as células dendríticas (DC) pois são células distintas. Com efeito, estas células DC são células especializadas na apresentação de antígenos (APC) enquanto as FDC retêm os antígenos à sua superfície através de receptores FcγR e receptores para o complemento, mas não processam os antígenos como fazem as APC. Continuando a desenvolver a neuroinvasão os príões após terem entrado oralmente através do organismo animal atravessam a parede do intestino provavelmente através de células M deste (Kaeser *et alii*, 2001) e em trânsito para o cérebro atravessam vários órgãos utilizando diversos tipos de células para realizarem esse trajecto. Está assinalado (Aucouturier *et alii*, 2001) que as células dendríticas (DC) do baço e também células linfóides participam neste acontecimento pelo menos em ratos com *scrapie* experimental.

As células DC (ao contrário das células B) são necessárias mas não suficientes para ocorrer a neuroinvasão pelo *scrapie* pelo menos em ratos transgénicos deficientes em células B e T (Aguzzi *et alii*, 2001). Contudo, se está bem referida a replicação de príões em órgãos linforreticulares é pior conhecido o resto do seu trajecto até ao CNS, estando no entanto assinalado em hamsters com *scrapie* experimental (Beekes *et alii*, 1998) que após a ingestão dos príões este trajecto pode ser feito através do nervo vago parassimpático.

Outras vias mais indirectas podem constituir um meio para se atingir o CNS a partir do intestino como sucede no caso da injeção intraperitoneal de príões com a via simpática dos órgãos linforreticulares a intervir nesta situação (Glatzel *et alii*, 2001).

A infecção periférica e a neuroinvasão podem ser independentes do sistema linforreticular (LRS) e sugerem a infecção directa do sistema nervoso como uma via alternativa de infecção.

Há mesmo quem admita que o trajecto dos príões em ratos para o CNS se possa fazer por via hemática dado estar verificada a transmissão em ovinos da BSE por transfusão de sangue (Houston *et alii*, 2000) (*vide* texto adiante).

Na figura 25 seguinte esquematizam-se alguns aspectos celulares e moleculares da neuroinvasão por príões desde a entrada por via digestiva até ao CNS (Aguzzi, 2001).

Após a entrada dos agentes infecciosos no intestino, através das células M e das placas de Peyer, esses agentes seriam tomados pelas células foliculares dendríticas (FDC) (células fixas nos tecidos) e passariam depois para células dendríticas (DC) que os transportariam para os neurónios simpáticos ou parassimpáticos (PNS) de onde progrediriam até ao CNS.

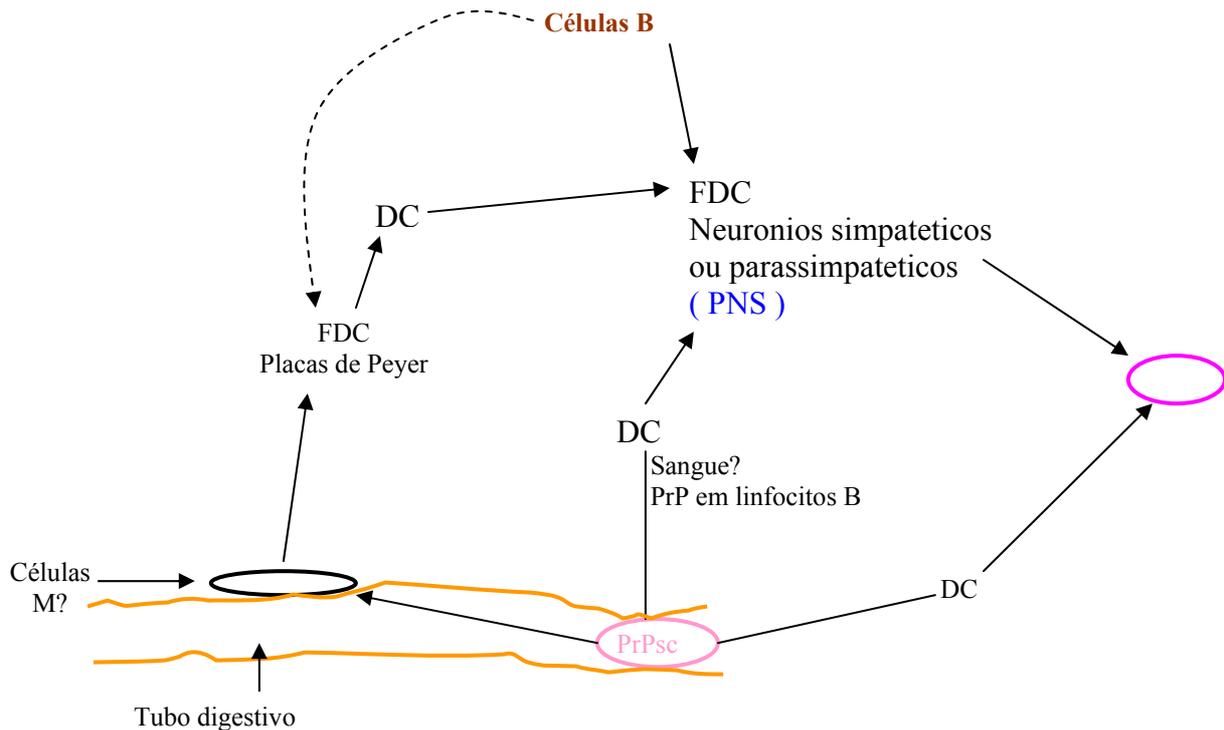


Figura 25

As FDC necessitam dos linfócitos B para desempenharem a sua actividade. Outra hipótese seria a dos agentes infecciosos, por via sanguínea, atingirem directamente o CNS, numa etapa mediada por células DC ou então atingirem por via sanguínea as FDC no PNS (Aucouturier *et alii*, 2001).

Nas TSE as vias de neuroinvasão podem portanto incluir (Brown, 2001):

- a) o trânsito neural directo para o cérebro a partir dos locais de infecção.
- b) A replicação no baço e entrada neural através da espinal medula;
- c) A disseminação hematogénica.

Poderemos de forma um tanto sistematizada delinear os seguintes acontecimentos seus condicionadores quanto à patogenia dos prionoses animais:

- 1 – a quantidade de agentes infecciosos PrPsc, suas estirpes e características e tipos celulares intervenientes;
- 2 – as características genéticas do hospedeiro (em relação às características do PrPc) e de todas as células imunoendócrinas participando na infecção;
- 3 – as portas de entrada: nas vias naturais, por via oral, as células M no intestino (parece ser o caso da BSE e do *scrapie*; nas vias experimentais diversas portas de entrada;

4 – ao nível do tubo digestivo será extraordinariamente importante a dose, ou seja, o título de infecciosidade do PrPsc;

5 – depois a passagem de PrPsc para as células M do epitélio intestinal a partir daqui diversas vias são possíveis.

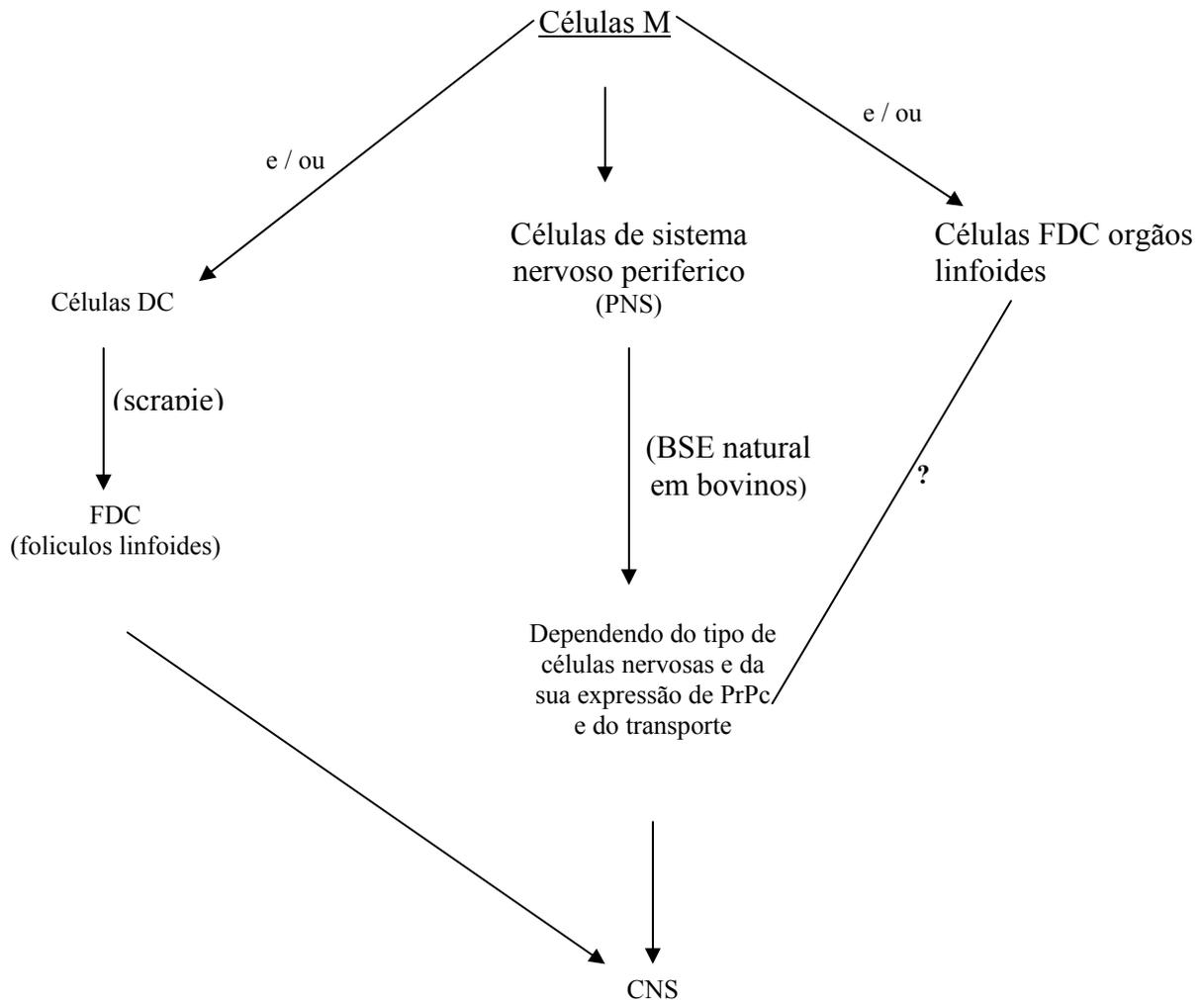


Figura 26

Assim:

5A – a passagem directa do PrPsc para células nervosas do PNS (parece ser o caso da BSE natural);

5B – a passagem directa para DC migrantes, de origem hemática, e daqui para as FDC fixas nos órgãos linfóides secundários (parece ser o caso do *scrapie*);

5C – a passagem directa para as FDC;

6 – a partir de 5B e 5C penetração nos filetes simpáticos e/ou parassimpáticos;

7 – a permuta dos PrPsc entre células e seus possíveis transportes intercelulares e intracelulares;

8 – a capacidade de cada célula interveniente e num dado momento de exprimir PrPc;

9 – a simples disseminação do PrPsc ou sua replicação;

10 – o balanço, ou seja, o equilíbrio favorável ou desfavorável da relação fagocitose e destruição do PrPsc infeccioso *versus* a biossíntese do complexo PrPc→PrPsc em cada célula interveniente.

Em cada um dos sistemas celulares intervenientes seriam determinantes:

- a) o seu estado de diferenciação e conseqüente ausência ou presença da sua capacidade proteolítica ou replicativa;
- b) a capacidade fagocitária sobre o PrPsc;
- c) a capacidade biossintetizadora de PrPc;
- d) as características de endocitose, exocitose e/ou transcitose dos priões.

Em ratos infectados com *scrapie* há provas (Aucouturier *et alii*, 2001) de que as células dendríticas CD11c+DC podem propagar os priões da periferia para o CNS na ausência de qualquer elemento linfóide adicional. De qualquer forma, resultados publicados (Klein *et alii*, 1997) referem que são necessárias células B maduras e centros germinais e rede de FDC para a instalação de quadros clínicos de *scrapie* após injeção periférica de doses patogénicas habituais, embora se reconheça (Montrasio *et alii*, 2001) que os linfócitos B não replicam os PrPsc mas adquirem-nos passivamente por contacto com as FDC.

De qualquer modo, a participação respectiva de FDC e de células CD11c+DC variam de acordo com as condições da invasão e via de neuroinvasão, dependendo das estirpes de *scrapie* utilizadas. Usando-se a estirpe 139A foi possível verificar que as células DCCD11c+ são capazes de prover a infecção para o CNS sem qualquer acumulação no baço. Enquanto a replicação dos priões no cérebro é acompanhada de neurodegenerescência, a multiplicação eficiente dos priões no sistema linforreticular não apresenta qualquer patologia detectável (Parizek *et alii*, 2001).

No entanto, a propagação eficiente linforreticular dos priões necessita de PrPc nas células do estroma e nas células hematopoiéticas.

Em hamsters infectados oralmente com *scrapie* foi evidenciada a presença precoce de PrPsc em diversos componentes dos tecidos linfóides associados com o intestino e em gânglia do sistema nervoso submucosal e mientérico parecendo ocorrer a neuroinvasão através duma disseminação centrípeta vaginal do intestino para o cérebro.

4.3 – Patogénese das TSE:

A patogénese das TSE e as suas etapas é determinada pelo tráfego e acumulação do PrP^{sc} e depende de (Farquhar *et alii*, 1994):

- a) estirpe de agente infeccioso;
- b) genótipo do hospedeiro;
- c) via de infecção.

Em roedores com infecção experimental com *scrapie* (por via oral ou intragástrica) a infecciosidade surge pela seguinte ordem (Beekes e McBride, 2000):

- a) placas de Peyer;
- b) tecidos linfóides associados com o intestino e gânglios do sistema nervoso entérico.

Mais tarde surge no CNS.

Em veados e corças (*mule deer fawn*) com infecção experimental *per os* com CWD a infecciosidade surge primeiramente nos tecidos linfóides drenando o tracto gastro-intestinal.

Em ovinos com *scrapie* natural a ordem é a seguinte:

- a) placas de Peyer;
- b) tecidos linfóides associados com o intestino (nas FDC dentro dos centros germinais).

Após inoculação experimental intracerebral ou periférica do rato com príões do *scrapie* a infecciosidade surge primeiro no baço e depois no cérebro.

Nos baços desses ratos os príões encontram-se associados com linfocitos B e T e em menor extensão com o estroma que contem FDC, mas não com células não B ou células não T (Weissmann *et alii*, 2001). Não foi observada nesses ratos qualquer infecciosidade nos linfocitos do sangue.

Os linfocitos do baço parecem adquirir os príões a partir de uma outra fonte ou então replicam-nos a partir de outras células que exprimam PrP. As células FDC têm um papel essencial na replicação dos príões no baço.

As TSE são por vezes adquiridas perifericamente por ingestão ou por exposição iatrogénica. Depois os agentes das TSE acumulam-se nas FDC nos tecidos linfóides muito antes da infecção se estender ao cérebro. Esta neuroinvasão é muito dificultada na ausência de FDC maduras.

O mecanismo de disseminação dos agentes das TSE das portas de entrada periféricas para o CNS (neuroinvasão) é complexo pois enquanto os órgãos linfáticos revelam tipicamente uma acumulação precoce de príões, as células B e as FDC são necessárias para este efeito, mas a

entrada no CNS ocorre provavelmente através dos nervos periféricos e pode utilizar mecanismos dependentes do PrPc (Glatzel e Aguzzi, 2000).

Na maioria das TSE os príões devem transitar através do LRS antes de atingirem o CNS. As células FDC e as DC estão envolvidas nesta situação, havendo no entanto discrepâncias acerca dos modelos utilizados consoante as estirpes priónicas implicadas (Aucouturier e Carnaud, 2002).

Em condições de campo a infecção natural das doenças priónicas dos animais ou prionoses, com o *scrapie* nos ovinos e a BSE nos bovinos, são sobretudo adquiridas por via gastro-intestinal.

Em condições experimentais o agente infeccioso é eficientemente transmitido por inoculação intracerebral ou intraperitoneal, parecendo esta última, no caso do rato, imitar melhor a infecção natural.

Em diversos animais, sobretudo no rato, a infecção ocorre com os primeiros acontecimentos a decorrerem no sistema linforreticular (LRS) que precede a neuroinvasão e replicação do agente infeccioso no cérebro (Bueler *et alii*, 1993) não revelando o hospedeiro a clássica resposta imunológica provavelmente devido ao facto da proteína celular normal (PrPc) indispensável, derivar do próprio hospedeiro.

Diversas observações implicam as células FDC na formação de príões PrPsc no baço, embora o transporte eficiente dos príões da periferia para o CNS dependa de elementos do LRS, havendo no entanto também situações em que não intervem nesse transporte o LRS, o que apesar de menos eficiente, corresponde à disseminação neural da doença da periferia para o CNS.

Os príões não são apenas transportados da periferia para o CNS através do sangue ou da linfa necessitando de outros sectores que expressem PrP com é o caso do sistema nervoso periférico (PNS).

Para ocorrer a neurodegenerescência do CNS associada com as TSE ou prionoses infecciosas transmissíveis, torna-se necessária a presença no CNS da proteína celular normal PrPc e da proteína priónica anormal PrPsc resistente a proteases. No esquema seguinte (Figura 27) esboçamos as vias da marcha dos príões PrPsc da periferia para o CNS, periferia esta que no caso das prionoses infecciosas naturais corresponde à via oral.

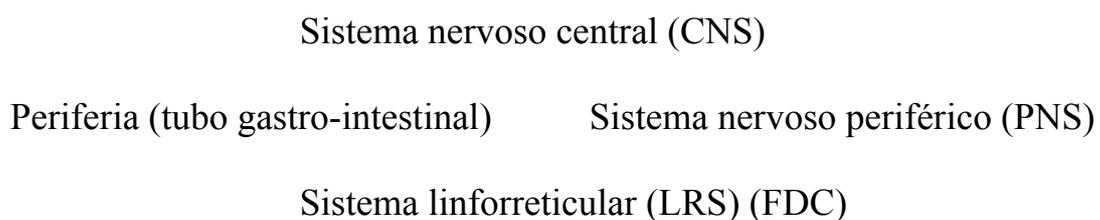


Figura 27

Os príões infecciosos parecem resistir à travessia do tubo gastrointestinal dada a sua resistência a proteólise e (embora não esteja provado) admite-se que aqui atravessam a mucosa intestinal através das células M seguindo depois para as placas de Peyer onde se replicam. É bem provável que depois esses príões sejam transferidos para outros tecidos linforreticulares, sobretudo baço talvez através de células móveis do sistema linfohematopoiético (Weissmann *et alii*, 2001) como é o caso dos macrófagos, células dendríticas e linfócitos.

Os príões depois, através do sistema nervoso vegetativo ou periférico, transitam para a espinal medula atingindo finalmente o cérebro (CNS).

Os órgãos linforreticulares, sobretudo o baço, são sede de replicação dos PrPsc e parece não restarem dúvidas que isto decorre aqui ao nível das FDC. Os linfócitos B e T recuperados do baço revelam poder infeccioso priónico, o que não sucede com os linfócitos em circulação no sangue; contudo, é aceite que os príões PrPsc não são sintetizados nos linfócitos sendo sim adquiridos das FDC com as quais estão em contacto íntimo nos centros germinativos destes órgãos. Por seu lado, a manutenção das células FDC maduras depende da estimulação directa pelos linfócitos maduros (Gonzalez *et alii*, 1998).

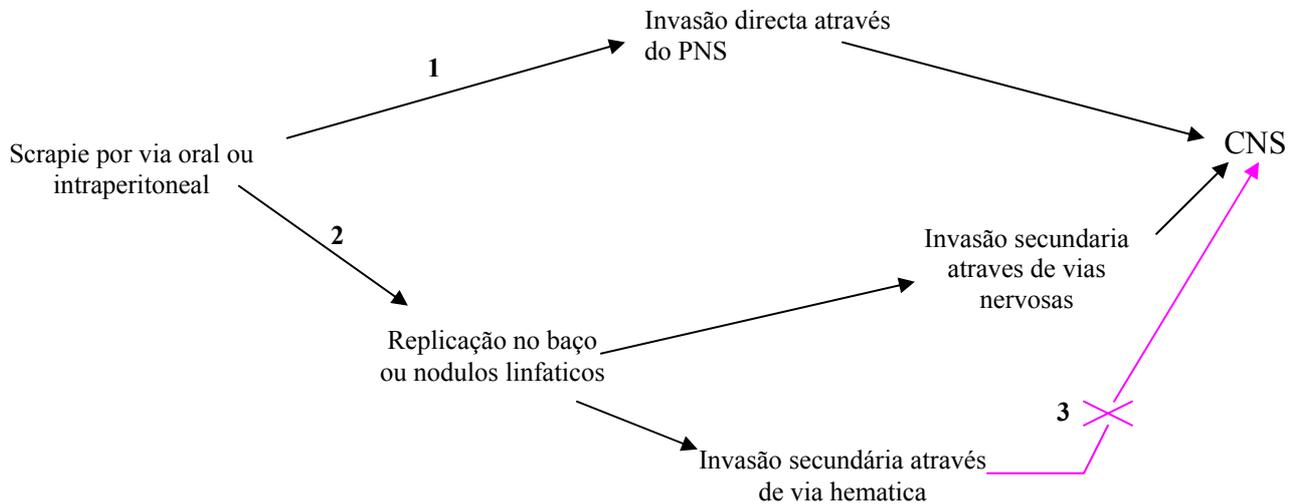
Após replicação dos PrPsc no LRS esses príões invadem o CNS não parecendo que os linfócitos da circulação sejam o transportador (pelo menos no rato) havendo diversas provas de que esse papel é desempenhado pelo PNS. Com efeito, após infecção periférica os príões aparecem no PNS antes de se replicarem no CNS (Beeker *et alii*, 1996; Kimberlin, 1979) sendo a expressão do PrP no PNS uma condição necessária para ocorrer a neuroinvasão (Race *et alii*, 2000). A neuroinvasão a partir do LRS começa nas terminações nervosas do PNS não estando no entanto esclarecido se os príões PrPsc se replicam aqui ou se são simplesmente transportados ao longo das fibras nervosas do PNS. Sabe-se que a inervação do tecido linfóide é regulada em parte por linfócitos, quer os B quer os T, que segregam factores de crescimento dos nervos (Straub *et alii*, 1998).

Estão no entanto descritas situações em que a replicação dos príões PrPsc no LRS é ultrapassada, sendo a neuroinvasão nestes casos desencadeada pela infecção intraneural no nervo ciático que leva seguidamente à infecção directa do CNS (Kimberlain *et alii*, 1983).

Os nervos periféricos e os tecidos linfóides podem ser ambos implicados na neuroinvasão, tudo dependendo em condições experimentais realizadas da dose e da estirpe do agente da TSE (Race *et alii*, 2000). Altas doses parece que não necessitam da replicação dos príões no baço para desencadarem a infecção do CNS e a prionose, enquanto baixas doses do agente infeccioso tornam necessária a

replicação nos tecidos linforreticulares antes da invasão do CNS (Fraser *et alii*, 1996; Lasmizas *et alii*, 1996).

Na figura 28 seguinte representamos esquematicamente as possíveis vias da neuroinvasão do CNS após infecção periférica com o agente do *scrapie* (Race *et alii*, 2000).



- 1 – altas doses do agente infeccioso ou estirpes muito neuroinvasivas
- 2 – baixa doses do agente infeccioso ou estirpes pouco neuroinvasivas
- 3 – não ocorre ou ocorre apenas raramente

Figura 28

4.4 Marcha da infecção nas TSE.

No quadro 8 seguinte ordenam-se as prováveis vias de disseminação dos agentes da BSE em bovinos com infecção natural e em ovinos e roedores com infecção experimental e ainda em bovinos com infecção experimental *per os*.

No mesmo quadro incluem-se as prováveis vias de disseminação do *scrapie* em roedores por infecção experimental oral e periférica e em ovinos com infecção natural, bem como as TSE (CWD) em gamos e doninhas.

Vias de disseminação dos agentes infecciosos das TSE em infecções naturais e experimentais, bem como a sequência do aparecimento dessa infecciosidade															
TSE	Especie animal	Infecção		Ileum distal	Placas de Peyer	Macrófago	FDC	Folículos	Neurônios	PNS	LRS	Tecido	Gânglio	Outros tecidos	CNS
		Natural	experimental												
BSE	Bovinos	+		+ ?	+(4 meses)				esc.			-			+
BSE	Ovinos		+								±				+
BSE	Roedores	+									±				+
BSE	Bovinos		+(oral)	+ 1°	+	+	+	+	esc. 2°	+ 2°	-		-	-	+ 3° (32 meses)
Scrapie	Roedores		Oral	+ 1°						+ 2°					+ 3°
Scrapie			Periférica não neural							+ 2°	+ 1°				+ 3°
	Ovinos	+		+ 1°	+		+			+ 3°	+ 2°				+ 4°
	Roedores		+(oral)	+ 1°						+ 3°	+ 2°				+ 4°
CWD (osvideo)			+(oral)												
Doninha															

Quadro 8

Nos bovinos com BSE natural as placas de Peyer revelaram infecciosidade aos 4 meses (Wells *et alii*, 1998; Terry *et alii*, 2003) enquanto no ileum distal se revela uma escassa infecciosidade, com negatividade do tecido linfóide do ileum distal e claro, com o CNS com franca infecciosidade mais tarde.

Em bovinos com BSE experimental por via oral, a infecciosidade surge primeiro no ileum distal, sendo infecciosas as placas de Peyer, macrófagos, FDC, folículos, enquanto os neurónios do plexo mesentérico do ileum distal e o PNS revelam infecciosidade depois do ileum distal logo seguido pelo aparecimento de infecciosidade no CNS (o LRS, os gânglios linfáticos mesentéricos e outros tecidos do tracto digestivo são negativos).

Nos ovinos e ratos com BSE experimental o LRS revela pouca infecciosidade sendo os gânglios linfáticos mesentéricos negativos e o CNS francamente positivo.

Quanto ao *scrapie* natural em ovinos observa-se infecciosidade no ileum distal, sendo positivas as placas de Peyer, FDC e folículos, seguidos pelo LRS, PNS e depois pelo CNS. Nos ovinos com *scrapie* natural e em estudos experimentais o agente infeccioso dissemina-se para

grandes doses administradas às vitelas no estudo referido anteriormente e do qual tirámos o organigrama anterior.

4.4.1. Aspectos dominantes das TSE.

Resumimos nos quadros sinópticos seguintes alguns aspectos dominantes das TSE nos animais.

BSE natural em bovinos:

- Infecciosidade detectada nas placas de Peyer até aos 40 meses.
- Nos neurónios do plexo mesentérico do ileum distal foi assinalada escassa infecciosidade.
- Nas placas de Peyer a infecciosidade parece residir nos *body* macrófagos, sobretudo no compartimento lisossomal (Jeffrey *et alii*, 2000).
- Admite-se que o PrP se acumula mais lentamente nas FDC dos bovinos, de forma tal que permita que os macrófagos possam eliminar algum do PrPsc acumulado antes de se acantonarem à superfície da célula em quantidades detectáveis de PrPsc, podendo depois declinar essa actividade dos macrófagos ao longo de fases mais tardias da doença.
- Na maioria dos casos naturais de BSE admite-se que as doses de material infeccioso são muito mais pequenas que no caso de BSE experimental.
- Nada se conhece sobre os efeitos das doses dos agentes infecciosos que infectam animais, com a sua acumulação no intestino.

BSE experimental (por via oral) em bovinos:

- Infeciosidade detectada, após administração oral, nas placas de Peyer a partir dos 6 meses até aos 40 meses (fim da experiência) .
- Nos neurónios do plexo mesentérico do ileum distal raramente foi determinada infeciosidade (o ileum distal de bovinos jovens pode conter mais de 100 000 folículos (Landsverk *et alii*, 1991).
- Noutros tecidos do tracto gastro-intestinal não foi detectada infeciosidade.
- Gânglios linfáticos mesentéricos sem infeciosidade aos 6 meses.
- O CNS revelou infeciosidade aos 32 meses.
- O agente da BSE é tomado numa forma muito limitada no ileum, pelos folículos associados com o epitélio intestinal, ou melhor a replicação dos agentes infecciosos dentro das placas de Peyer é restrita ou então ocorrem mecanismos para a eliminação destes agentes neste local.
- Parece haver uma aparente falha de disseminação dos agentes infecciosos que entre os folículos quer para outros tecidos linfóides.
- O ileum distal nos bovinos expostos por via oral parece ser a porta de entrada para os agentes infecciosos.
- A ausência de infeciosidade nos gânglios linfáticos mesentéricos aos 6 meses após a infecção, é surpreendente indicando, uma vez que estes gânglios drenam a linfa a partir do tubo gastro-intestinal, que outros órgãos linfóides também sejam negativos, o que foi confirmado (Wells *et alii*, 1998) tal como sucedeu com outros tecidos do sistema linforreticular.

Ovinos e ratos com BSE experimental:

- Revelam infeciosidade largamente disseminada através do sistema linforreticular (LRS).
- A distribuição da infeciosidade no LRS parece ser determinada pelo hospedeiro e seu genótipo do PrP.
- Nos bioensaios em ratos o período de incubação depende do títulos de infeciosidade do material inoculado (mais curto para doses maiores de inóculo infeccioso) não havendo comparação possível entre o título de infeciosidade com o número de folículos positivos no ileum distal dos ratos entre os 6 e os 14 meses.

Ovinos com *scrapie* natural:

- O sistema linforreticular revela precocemente infecciosidade.
- No caso de ovinos e ratos com *scrapie* parece que essa infecciosidade está associada com células FDC, enquanto nos bovinos em fase pré-clínica isto não é observável não se sabendo se isto se deve à diferente distribuição das FDC nas duas espécies animais ou à acumulação limitada de PrPsc nestas células.

Outros animais (gamos e doninhas) com TSE:

- A infecciosidade no LRS é notória em diferentes extensões.
- Assim, na CWD nos gamos infectados por via oral observa-se infecciosidade no tecidos linfóides semelhante ao *scrapie* (*vide* figura seguinte).
- Na TSE da doninha ocorre pouca replicação extra-neural na fase pré-clínica da doença.

O mecanismo de disseminação dos PrPsc dos locais de entrada periférica para o CNS (neuroinvasão) é pois complexo e apesar dos órgãos linfáticos tipicamente apresentarem uma acumulação precoce de príões, as células FDC e os linfócitos B são necessários para uma neuroinvasão eficiente, sendo a entrada para o CNS provavelmente através da via dos nervos periféricos e talvez utilizando uma via dependente do PrPc.

Em ratos os príões PrPsc tendem sempre a acumular-se no baço mesmo quando os príões são injectados directamente no nervo ciático (Glatzel e Aguzzi, 2000) indicando portanto nessa disseminação uma sequência linfo-neural.

Há provas de que a entrada dos PrPsc no CNS ocorre através do sistema nervoso periférico (Glatzel *et alii*, 2001; Sigurdson *et alii*, 2001) parecendo que a inervação periférica simpática dos órgãos linfóides é condicionadora da neuroinvasão e que os nervos simpáticos do baço podem actuar como reservatórios extracerebrais dos príões (Glatzel *et alii*, 2001).

4.4.2. Distribuição das isoformas patogénicas PrP^{Sc} em cervídeos:

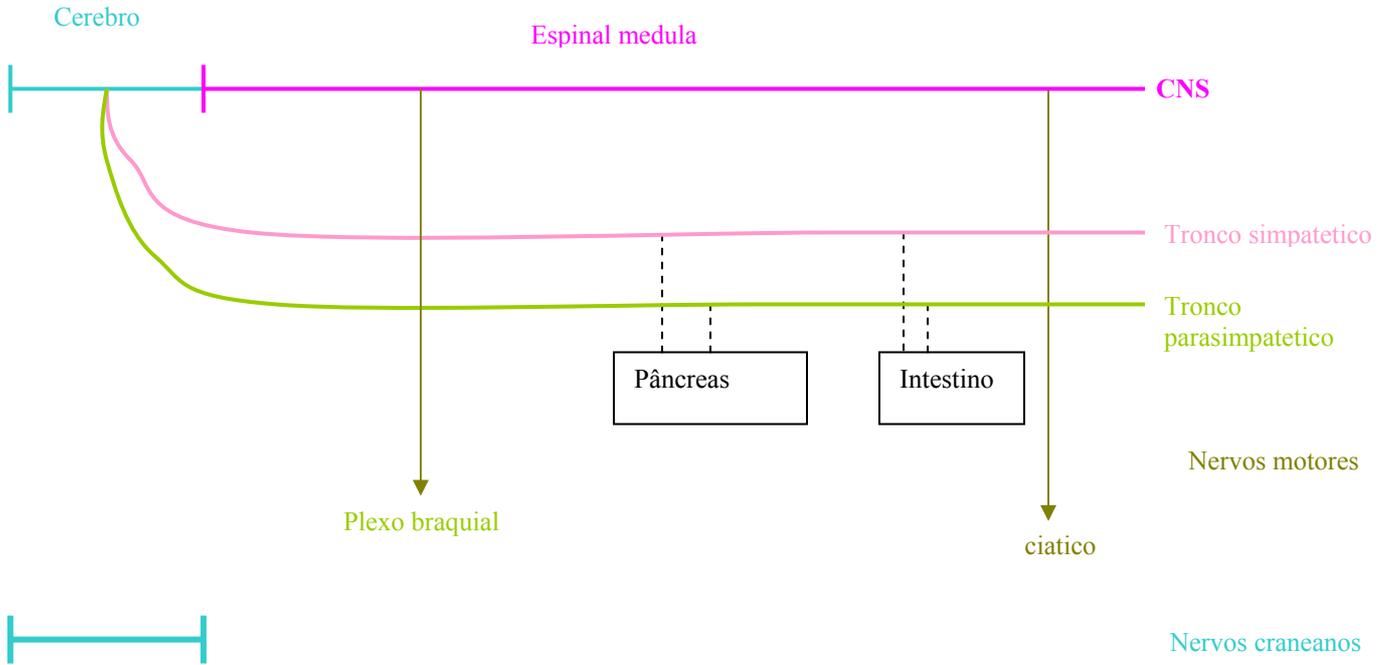
No caso das TSE dos cervídeos (CWD) parece poder aceitar-se (Sigurdson *et alii*, 2001) que o trânsito do PrP^{Sc} nos nervos, quer

centrifugamente quer centriptamente, é uma via para o tráfego de príões e invasão de órgãos, podendo os órgãos endócrinos também ser local de acumulação destes príões patogénicos.

No esquema da figura 29 seguinte (Sigurdson *et alii*, 2001) mostra-se a distribuição das isoformas patogénicas PrP^{Sc} nos sistemas nervosos simpáticos, parassimpáticos, cranianos e nervos motores em animais com infecções naturais certamente adquiridas por via oral, com sinais clínicos de CWD, sujeitos a eutanásia e examinados imunohistoquimicamente.

Tratava-se de gamos (*Odocoileus hemionus*) em cativeiro com CWD clínica e sujeitos a eutanásia. A infecciosidade foi determinada nos tecidos por via histoquímica como afirmamos.

Distribuição da infecciosidade PrP CWD em cervídeos nos troncos parassimpático, simpático, nervos cranianos e motores e CNS



Percentagem de casos positivos com infecciosidade em seis cervídeos para cada tecido examinado

0 (%)	{	Gânglio de Gasser Gânglio craniano cervical Gânglio coeliaco
+ (50% dos casos)	{	Plexo braquial Tronco simpático Ciático
++ (51 a 75% dos casos)	supra renais	
+++ (75 a 100% dos casos)	{	Pituitária, cérebro Gânglio inferior do vago Espinal medula Plexo intestino/mesenterio Pâncreas

Figura 29

4.4.3. Sequência no rato (infecção oral) da evolução da infecciosidade por BSE e por *scrapie*:

No esquema da figura 30 seguinte refere-se a sequência, por órgãos, da acumulação do PrPsc em ratos contaminados por via oral com agentes do *scrapie* e da BSE (Maignien *et alii*, 1999).

Conforme se verifica após a contaminação oral, os dois tipos de agentes infecciosos (*scrapie* e BSE) evidenciam-se ao mesmo tempo em alguns órgãos (primeiro nas placas de Peyer e gânglios linfáticos mesentéricos e depois no baço e gânglios linfáticos sub-maxilares).

Mas no que se refere às glândulas salivares, pâncreas, gânglios linfáticos axilares e CNS há diferenças notórias consoante o agente infeccioso.

Parece que a via de infecção é a mesma para as duas estirpes de agentes ensaiados, sendo primeiramente estes replicados nos órgãos LRS associados ao tubo digestivo (placas de Peyer e gânglios linfáticos mesentéricos) seguindo-se os órgãos do LRS não relacionados com este tubo digestivo como o baço e gânglios linfáticos axilares.

Tudo isto sugere que a propagação do agente infeccioso a partir do intestino se faz para os gânglios linfáticos mesentéricos por via linfática, transitando depois por via hemática para atingir alvos secundários do sistema linforreticular (baço e nódulos linfáticos associados com outros órgãos). O pâncreas e glândulas salivares são irregularmente atingidos.

Sequencia da acumulação do PrP^{sc} nos ratos contaminados por via oral com agentes da *Scrapie* ou BSE (em numero de dias após inoculação)

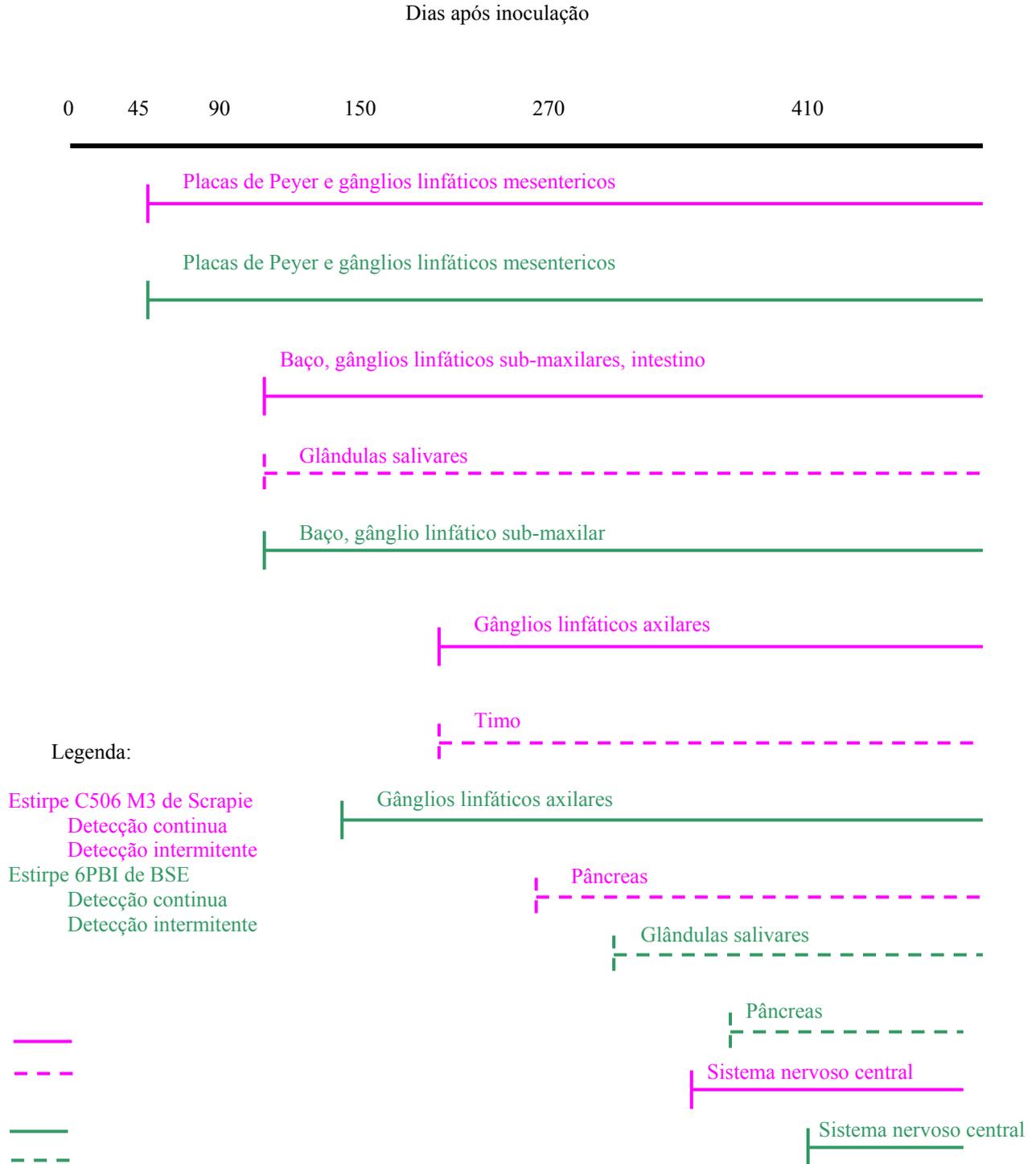


Figura 30

4.4.4. Distribuição relativa no rato (infecção oral) da infecciosidade por BSE e por *scrapie*:

Concentrações relativas dos PrPsc nos diversos órgãos de ratos após infecção oral com agente do *scrapie* ou da BSE (Maignien *et alii*, 1999):

- A – concentrações de PrPsc nas placas de Peyer e nos gânglios linfáticos mesentéricos: 1/20 da infecciosidade observada no cérebro (em estados finais da doença);
- B – concentrações de PrPsc no baço: 1/30 da infecciosidade observada no cérebro (em estados finais da doença);
- C – concentrações de PrPsc no pâncreas e glândulas salivares: revelam também infecciosidade mas inconsistentemente. 1/500 da infecciosidade observada no cérebro em estadios finais da doença;
- D – concentrações de PrPsc no timo: negativo no caso de agentes da BSE; inconstantemente positivo no caso do *scrapie*;
- E – ausência de infecciosidade da *scrapie* e da BSE: fígado, supra-renais, omentum, medula óssea no fémur, formações linfóides do palatino.

Apenas no caso da inoculação com o PrPsc do *scrapie* o estômago, duodeno, jejuno, ileum (após remoção das placas de Peyer) cecum e colon exibem concentrações de PrPsc da ordem de 1/200 a 1/40 daquelas observadas no baço (os valores mais baixos são observados no estômago).

4.4.5. Comparação, no rato, da infecciosidade desencadeada pelas vias oral e intraperitoneal:(Figura 31).

Salienta-se nesta situação que o baço é o primeiro órgão a denotar infecciosidade após a administração intraperitoneal do agente, e só depois os gânglios linfáticos mesentéricos, as placas de Peyer e gânglios linfáticos axilares.

Comparativamente é interessante verificar que por via intraperitoneal logo aos cinco dias observa-se infecciosidade no baço, enquanto por via oral só aos quarenta e cinco dias ocorre infecciosidade nas placas de Peyer e gânglios linfáticos mesentéricos, a despeito da dose inoculada por via intraperitoneal ser dez vezes menor que a administrada *per os*.

Parece portanto que só uma pequena parte das partículas infecciosas do inóculo administrado *per os* consegue efectivamente atravessar a barreira intestinal muito provavelmente através das células M.

As vias de propagação parecem portanto ser diferentes da via oral para a via intraperitoneal. Na primeira o local da replicação primária são as placas de Peyer e gânglios linfáticos mesentéricos e depois os outros

gânglios linfáticos, como os axilares, enquanto na segunda é o baço o primeiro órgão da replicação.

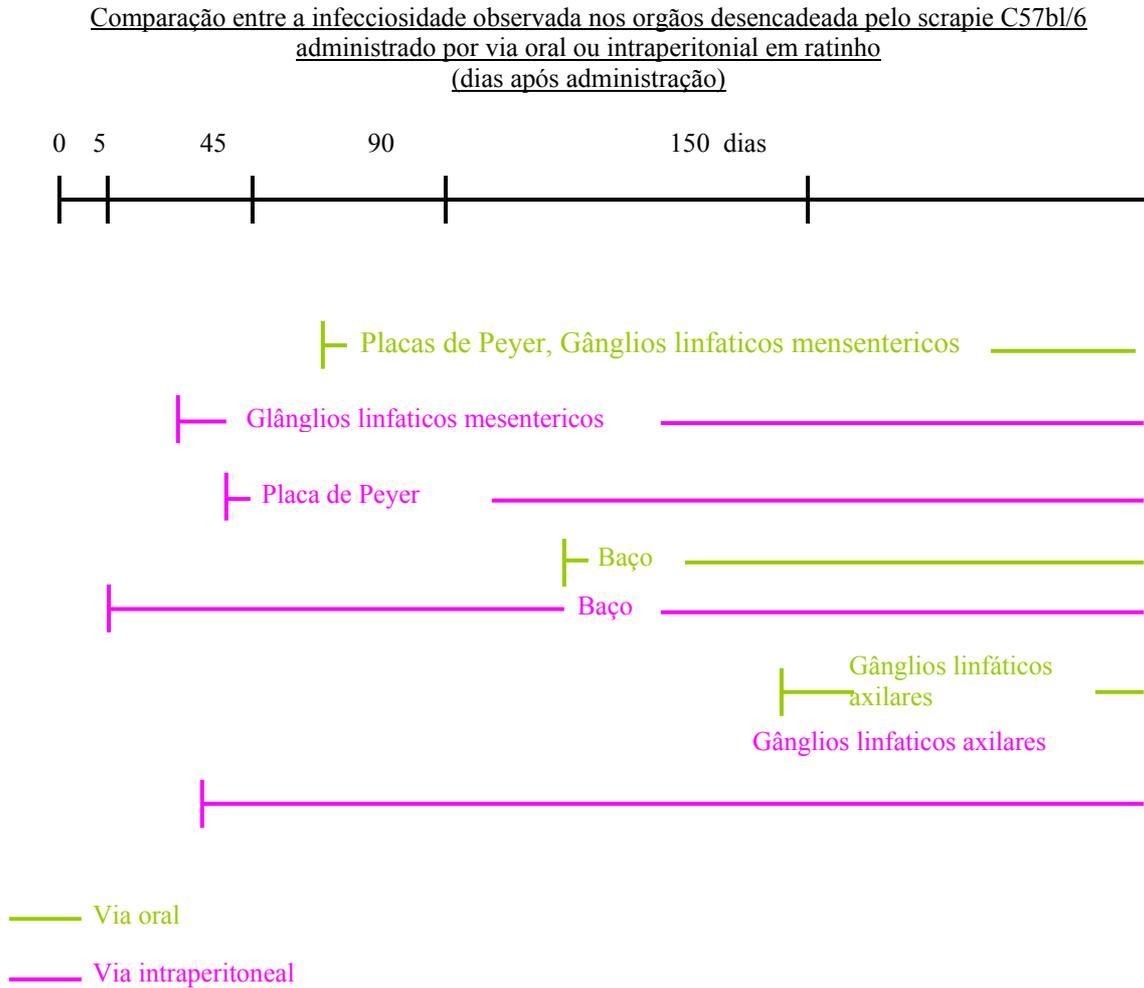


Figura 31

As placas de Peyer estão em contacto directo com o epitélio intestinal e ligadas com vasos linfáticos que drenam os gânglios linfáticos mesentéricos, enquanto as células linfóides presentes na cavidade peritoneal entram na corrente sanguínea através dos capilares sanguíneos que vão primeiro ao baço.

O grau de envolvimento do baço depende da via de inoculação (Kimberlain e Walter, 1989). Salienta-se ainda que nos dois estudos graficados por nós anteriormente foi observado sempre um diferente perfil electroforético entre os agentes da BSE e do *scrapie*, observando-se ainda variações neste perfil para a mesma estirpe do agente infeccioso consoante os diferentes órgãos estudados, o que provavelmente se deve às diferentes actividades enzimáticas desempenhadas em cada um destes órgãos sobretudo no que se refere à adicção de diferentes tipos de

açúcares e aos diferentes tamanhos e locais de glicosilação (Hill *et alii*, 1999).

4.4.6. – Aspectos das fases finas das prionoses:

Na distribuição pelos diversos órgãos dos animais dos PrPsc nos estádios finais das prionoses observam-se algumas características curiosas (Maignien *et alii*, 1999). Assim:

1 – em ratos experimentalmente infectados com agentes do *scrapie* ou da BSE:

- órgãos do sistema linforreticular – presença positiva;
- sistema nervoso central – presença positiva;
- pâncreas e glândulas salivares – ora positiva ora negativa;
- fígado – negativo;
- epiploon – negativo.

2 – em bovinos com BSE natural:
apenas sistema nervoso central positivo.

3 – em bovinos com BSE experimental adquirida por via oral:
- apenas positiva no sistema nervoso central (Wells *et alii*, 1998) no íleum e no sistema nervoso periférico.

A distribuição do agente da BSE parece depender do património genético do hospedeiro. No tubo digestivo dos animais relatados nas experiências anteriores (ratos com *scrapie* e BSE e bovinos) apenas no caso do *scrapie* foi assinalada infecciosidade do estômago ao cólon, inclusive no íleum sem placas de Peyer.

No caso do agente da BSE o íleum foi negativo enquanto as placas de Peyer foram positivas.

Admite-se que no *scrapie* natural o PrPsc se encontre ao longo do tubo digestivo, sobretudo no tecido linfóide com ele associado e/ou no plexus do sistema nervoso entérico. Estes plexus estão conectados com os neurónios do nervo vago podendo este contribuir para a difusão do agente infeccioso dos órgãos viscerais para o CNS (Beekes *et alii*, 1998) além da neuroinvasão através da espinal medula torácica.

Portanto as fibras parassimpáticas do vago e as fibras simpáticas que se ligam ao segmento da espinal torácica, podem ser ambas vias para a disseminação para o CNS, tudo dependendo das propriedades neuroinvasivas dos agentes das TSE.

Parece pois haver uma série de entradas para o agente infeccioso atingir o CNS.

Em ovinos infectados experimentalmente *per os* com agentes da BSE nas fases terminais da prionose desencadeada ocorre uma distribuição similar de elevadas concentrações do PrPsc através do CNS e também no sistema linfóide, inclusivé partes do tubo digestivo e alguns componentes do sistema nervoso periférico, ao contrário dos bovinos infectados com BSE que revelam pobremente PrPsc nos tecidos periféricos (Foster *et alii*, 2001).

No entanto, sabe-se que a permeabilidade paracelular do cólon descendente dos bovinos é muito mais alta que a dos ovinos (McKie *et alii*, 1999). Parece haver uma boa correlação entre a susceptibilidade à infecção oral por príões e o número de placas de Peyer, e uma independência notável em relação ao número de linfócitos associados com essas placas de Peyer (Prinz *et alii*, 2003).

No entanto está bem assinalado que após infecção oral de hamsters com *scrapie* os agentes infecciosos utilizam a via neural e gânglios do sistema nervoso periférico para atingir locais alvo no CNS (McBride e Beekes, 1999).

Na infecção natural de ovinos com *scrapie* é conhecido que o sistema imunitário está implicado nas primeiras fases da patogenia do processo. A infecção natural decorre por via oral através das placas de Peyer, seguindo-se a replicação do agente infeccioso nos tecidos linfóides associados com o intestino (GALT). A dispersão para o CNS é feita depois pelas fibras nervosas autonómicas inervando o tubo digestivo (Andreoletti *et alii*, 2000). A migração das células dendríticas (DC) a partir do intestino parece ser um meio celular para o transporte dos agentes infecciosos para os centros germinativos linfóides (Huang *et alii*, 2002) admitindo-se que as DC derivadas da medula óssea, entrando na parede intestinal através do sangue, tomem depois os antigénios PrPsc do lumen do intestino e os transportem para os gânglios linfáticos mesentéricos (Huang *et alii*, 2002).

Em todo este trajecto entre as portas de entrada do agente infeccioso das TSE e o CNS parecem existir diversas células transportadoras além das DC. É sabido que o PrPsc se acumulam em FDC (que são distintos ontologicamente e funcionalmente das DC) que se sabe também que não migram extensamente, sendo portanto necessário outras células para o transporte dos agentes infecciosos do local de ingestão para os órgãos linfóides (Burthem *et alii*, 2001) e para o CNS. As células DC expressam elevadas concentrações de PrPc, tal como o complexo de histocompatibilidade (MHC) da classe II e essas células envolvem a polpa branca esplénica.

4.5. Título de infecciosidade na patogenia da BSE e *scrapie*, e sua distribuição por animais, tecidos e órgãos:

Uma unidade infecciosa (IU) é a quantidade mínima necessária para infectar um outro animal do mesmo tipo quando injectada no cérebro ou por outra via adequada.

Uma simples unidade infecciosa corresponde a cerca de 100000 moléculas de PrPsc (Bolton *et alii*, 1982). Contudo, a relação das quantidades de PrPsc para a infecciosidade pode variar.

A dose infecciosa é a dose capaz de estabelecer uma infecção e é expressa em título (ID50/grama de tecido de uma dada espécie/estirpe animal, por uma via específica de inoculação) vezes a quantidade de tecido (gramas).

A ID50 é definida como a quantidade de infecciosidade que transmite doença a metade dum grupo de animais inoculados. Por exemplo, se volumes de 1 ml de sucessivas diluições a 1/10 de uma dada amostra são inoculados a um grupo de 20 ratos por cada diluição (0,05 ml por animal) uma ID50 estará presente naquela diluição que transmita a doença a 50% (10/20) dos animais inoculados, exprimindo-se os resultados em unidades de ID50/por grama de tecido.

Na utilização do conceito de ID50 no contexto das TSE os valores de ID50 devem sempre ser expressos como um valor de ID50 para uma dada via de infecção, para uma dada espécie e para uma dada raça. Atender pois a espécies, raças (ou estirpe no caso de animais de laboratório) do hospedeiro, via utilizada, ID50 por unidade de massa.

Nos modelos animais de TSE a via oral é a menos eficiente de todas as vias utilizáveis para efeito de transmissibilidade.

Calcula-se para a BSE uma redução de 100000 na eficiência duma transmissão intracerebral (i.c.) comparativamente a uma transmissão oral dentro duma mesma espécie animal. O título de infecciosidade por grama de tecido, no CNS, de bovino com BSE, é de 100000000 ID50 determinado por via i.c. em bovino.

O título de infecciosidade ID50 é de 1000 a 100000 por grama de tecido do CNS em bovino com BSE se medido por via intracerebral em rato.

A sensibilidade do ensaio em rato em relação ao ensaio em bovino, para medir a infecciosidade derivada do CNS de bovino com BSE, é pelo menos 1000 vezes menos sensível no rato (por via intracerebral) em bovino 1000000 ID50 por grama e em rato 1000 ID50 por grama.

Métodos bioquímicos correntes não permitem detectar quantidades de infecciosidade abaixo de cerca de 1000-10000 ID50.

A técnica de *Western blotting* é relativamente insensível quando comparada com a sensibilidade da injeção num animal (rato).

Foi assinalado há pouco tempo (Klohn *et alii*, 2003) um ensaio para quantificar príões *in vitro* que não se baseia no bioensaio pela inoculação intracerebral do rato, que é um processo lento, impreciso e caro, mas sim baseado em sublinhas celulares de neuroblastoma N2a altamente susceptível a príões de rato. Este ensaio SC é tão sensível como o bioensaio no rato e é 10 vezes mais rápido, duas vezes mais barato, e presta-se a ser robotizado (Klohn *et alii*, 2003).

O *Scientific Steering Committee* (SSC) da *European Commission* num *meeting* efectuado em 10-11 de Janeiro de 2002, elaborou quadros com a distribuição da infecciosidade das TSE dos tecidos de ovinos e bovinos, no sentido de ajudar a definir o que deve ser considerado material de risco especificado e as boas práticas de higiene a adoptar nos matadouros.

Foram elaborados quadros da infecciosidade dos tecidos aplicável aos pequenos ruminantes (*scrapie* em pequenos ruminantes e BSE em pequenos ruminantes) e aos bovinos com BSE, que passamos a transcrever seguidamente (*Update of the opinion on TSE infectivity distribution in ruminant's tissues. Initially adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting on 10th 11th January, 2002, and amended at its meeting on 7th 8th November, 2002. European Commission. <http://european.int/comm/food/fs>).*

Títulos de infecciosidade no *scrapie* natural em ovinos e caprinos em fases pré-clínicas e clínicas (bioensaio em ratos suíços).(Quadro 10)

Títulos de infecciosidade

(Log₁₀ LD₅₀ em ratos por via intracerebral por 30mg de tecidos)

A=alta (≥10000) B=média (1000 – 10000) C=baixa (≤1000)

D=indectável

Titulos de infecciosidade no scrapie natural em ovinos e caprinos em fases pré-clínicas e clínicas (bioensaio em ratos suíços)

Titulos de infecciosidade: A = alta ($? 10^{4.0}$)
 B = ($10^{3.2} - 10^{4.0}$)
 (log₁₀ LD50 em ratos por via intracerebral por 30mg de tecido) C = baixa ($? 10^{3.2}$ ou desconhecida)
 D = indetectaveis

Idade (meses)	Fases pre-clínicas				Fases clínicas	
	? 8	10 – 14	25	> 25	34.37	38.39
Idade (meses)	? 8	10 – 14	25	> 25	34.37	38.39
Numeros positivos /examinados	0/16	8/15	1/13	1/6	9/9	3/3
Cérebro					A	A
Cerebro (medulla)		D	C			
Cerebro (medulla/diencefalo)			C			
Cerebro (cortex “mid-brain”)			D			
Pituitaria					C	B
Espinal medula			D		A	A
Fluido cerebro – espinal					C	C
Timo	D		D		C**	C**
Tiroide					D	
Baço	D	B	C		B	B
Amígdala	D	C	B		B	
Nodulo linfático(retrofaringeo, mesenterico portal)	D	B	B		B	B
Nodulo (bronco mediastinico)		D	C		B	B
Nodulo (pre-escapular, pre-femoral)	D	C	C			
Nodulo (supra-mamario)			D		C	B
Colon proximal		B	B		B	B
Colon distal		D	D		C	C
Ileum	D					
Ileum distal		B	B		B	
Ileum proximal						B
Recto-distal					B	B
Pancreas					C**	
Supra-renal			D		C	C
Mucosa nasal			D		C	C
Medula ossea					C**	D
Fígado					C**	
Sangue coagulado		D			D	D
Soro sanguineo		D			D	D
Glandulas salivares			D		D	D
Saliva					D	
Musculos do esqueleto					D	D
Coração					D	
Rins					D	D
Pulmão					D	
Ovario					D	D

** vestígios ou excepcional *vestígios ou

Quadro 10

Grupo	Título de infecciosidade	Pré-clínica				Clínica	
		ovinos				Ovinos	Caprinos
		< 8 meses 0/16	10 – 14 meses 8/15	25 meses 1/13	>25 meses 1/6	34-57 meses (9/9)	38-49 meses 3/3
A	Alto ≥ 4.0					Cerebro Espinal medula	Cerebro Espinal medula
B	Media 3.2-4.0		Cólon proximal ileum distal. Nódulos linfáticos, retrero faríngeo, mesenterico e para o baço	Cólon proximal ileum distal. Nódulos linfáticos, retrero faríngeo, mesenterico e para o baço		Cólon proximal, ileum distal, amígdala, nódulos linfáticos	Cólon proximal, ileum proximal, nódulos linfáticos, pituitária, baço, rectodistal.
C	Baixa ≤ 3.2 Timo ou desconhecido		Nódulos linfáticos, pré-escapular, pré-femural. amígdala	Cérebro (medula/di encefalo), nódulos linfáticos, baço		Supra renal, medula óssea, cólon distal, liquido cefaloraquidiano, fígado**, nódulo mamário, mucosa nasal, pâncreas, pituitária, nervo ciático, timo, placenta*	Supra renal, cólon distal, liquido cefaloraquidiano, mucosa nasal, nervo ciático, timo
D	não detectavel	Ileum, timo, amígdala, baço, nódulos linfáticos, pré-escapular, pré-femural, retrofaríngeo, mesenterico portal	Sangue coagulado, cérebro(medula), cólon distal, fezes, nódulo bronco mediastinal, soro	Supra renal, cérebro, cólon distal, nódulos linfáticos(mamário), mucosa nasal, glândulas salivares, espinal medula, timo	Colostro	Sangue coagulado, feto, coração, rim, pulmão, mama, músculos do esqueleto, ovário, saliva, glândulas salivares, vesícula seminal, testículos, tiróide, útero	Sangue coagulado, medula óssea, fezes, rim, mama, leite, músculos do esqueleto, ovário, glândulas salivares, soro, útero

** excepcional

* negativo em outro estudo

Quadro 11

Tecidos sem infecciosidade de bovinos com BSE experimental: (bioensaios em ratos inoculados por via intracerebral e intraperitoneal) (Kimberlin, 1996):

Tecidos nervosos: fluído cérebro-espinal; cauda equina; nervos periféricos (ciático; tibialis; esplâncnicos).

Tecidos linforreticulares: baço; amígdalas; nódulos linfáticos (pré-femural; mesentéricos; retro-faríngeos); a amígdala foi positiva em bioensaios em bovinos.

Tracto alimentar: esófago; reticulum; rumén (pilar); rumén (ansa esofágica); omaso; abomaso; intestino delgado proximal e distal; colón distal; recto. Tecidos reprodutivos: testículos; próstata; epididímo; vesículas seminais; sémen; ovário; carúnculas uterinas; cotilédones da placentae; fluídos placentários (amniótico e alantóide); úbere; leite.

Outros tecidos: sangue; medula óssea; gordura; coração; rins; fígado; pulmão; músculo (semitendinoso; diafragma; *longissimus dorsi*; masséter); pâncreas; pele; traqueia. Estes títulos de infecciosidade do *scrapie* natural em ovinos e caprinos em fases pré-clínicas e clínicas da doença podem ser arrumados de outra forma em ordem a tornar mais fácil a sua leitura por grau de infecciosidade.

Tentativa de classificação da infecciosidade de tecidos de bovinos com BSE natural ou experimental *per os*:(Quadro 12)

Título de infecciosidade (esta classificação é preliminar e arbitrária e não corresponde aos grupos de categorias utilizadas no quadro anterior do *scrapie* natural em ovinos e caprinos).

Tentativa de classificação da infecciosidade de tecidos de bovinos
com BSE natural ou experimental per os

Titulos de infecciosidade (esta classificação é preliminar e arbitraria e não corresponde aos grupos de categorias utilizadas no quadro anterior do scrapie natural em ovinos e caprinos)

- A = alta $10^{3.0} - 10^{5.0}$ no rato, $10^{5.7} - 10^{7.7}$ nos bovinos
 B = media $10^{1.5} - 10^{3.0}$ no rato, $10^{3.3} - 10^{5.6}$ nos bovinos
 C = baixa $\leq 10^{1.5}$ no rato, $\leq 10^{3.2}$ nos bovinos

	Experimental				Natural
				Clinica	Clinica
Meses após a exposição	6-14	18	32	36-40	
Cerebro			B/C	C	A
Retina					?
Espinal medula			C	C	A
Ganglios da raiz dorsal				C	
Ganglios trigeminal				C	
Ileum distal	B/C	C		C	
Amigdalla palatina	C*				D
Ganglio mesenterico					D
Ganglio popliteo					D

* provas preliminares apontam para um titulo $<10^1$ nos bovinos

Quadro 12

No quadro 13 seguinte ordenamos estes dados sobre a classificação da infecciosidade nos tecidos bovinos com BSE por experimentação oral ou natural, de outra forma, e atendendo aos títulos de infecciosidade observados nos bioensaios efectuados em ratos e em bovinos.

Através dos quadros anteriores é possível verificar que a infecciosidade dos tecidos dos animais tende a ser mais elevada nas fases clínicas do que nas fases pré-clínicas no *scrapie* natural em ovinos e caprinos, isto em certos órgãos (por exemplo, cérebro e medula espinal - os títulos mais altos $\geq 10^{4.0}$; pituitária $10^{3.2} - 10^{4.0}$; baço $10^{3.2} - 10^{4.0}$ e nódulos linfáticos). Curiosamente, nestes casos o ileum distal tende a manter a infecciosidade ($10^{3.2} - 10^{4.0}$) para desaparecer depois aos 38-39 meses, na última fase clínica dos animais.

No que se refere à infecciosidade dos tecidos de bovinos com BSE experimental por via oral, ou por infecção natural, com bioensaios em ratos e em bovinos, é possível verificar que a infecciosidade tende a ser mais elevada na fase clínica na infecção natural do que na experimental.

Título de infecciosidade (valores aproximados)		Experimental			Natural	
Em rato	Em bovino*	Fases pré-clínicas (meses após a exposição)			Fases clínicas (meses após a exposição)	Fases (clínicas)
		6 -14	18	32		
Alta (10 ^{3.0} – 10 ^{5.0})	Alta (10 ^{5.7} – 10 ^{7.7})					Cérebro Espinal medula ?retina (dados não publicados)
Media (10 ^{1.5} – 10 ^{3.0})	Media (10 ^{3.3} – 10 ^{5.6})	Ileum distal (10 meses)		Cérebro		
Baixa (≤ 10 ^{1.5})	Baixa (≤ 10 ^{3.2})	Ileum distal Ileum distal (6 meses) Amígdala (10 meses)	Ileum distal	Cérebro espinal medula Ganglio da raiz dorsal	Cérebro Espinal medula Ganglios da raiz dorsal Ganglios trigemio Ileum distal Medula ossea (38 meses)	
Indetectável ? (<10 ^{1.0})	Indetectável ? (<10 ⁰)	Ver a lista de tecidos em quadros anteriores				Nódulos linfáticos .retrofaringeo, mesentérico, poplíteo (ver para outros tecidos lista de tecidos em quadros anteriores).

* os valores referidos em lilás são baseados no bioensaio em bovinos

Quadro 13

Assim, no cérebro da infecção natural o título é da ordem dos 10^{3.0} a 10^{5.0} (em rato) e 10^{5.7} – 10^{7.7} (em bovino) enquanto a infecciosidade experimental é de 10^{1.5} (em rato). No baço não é detectada infecciosidade nem numa série de nódulos linfáticos enquanto nos gânglios neurais esses valores podem atingir 10^{1.5} no rato e <10^{3.2} nos bovinos.

Nos agentes da TSE, sobretudo no *scrapie*, após a tomada oral de agentes infecciosos estes parecem replicar-se no tecido linfático e/ou no tecido neural do intestino delgado e depois sobem ao cérebro e espinal medula através de tractos do sistema nervoso autónomo parassimpático e simpático. No *scrapie* natural e experimental o PNS, sobretudo as vias motoras eferentes do sistema nervoso autónomo, estão envolvidas patogenicamente. Após atingirem o CNS a infecção dissemina-se a partir da porta de entrada na direcção cranial e caudal dentro do CNS e pode, a

partir daqui, difundir-se para o organismo através das vias nervosas. No caso da BSE se for aplicável este modelo, após a ingestão oral dos agentes, os gânglios pré-para e vertebral devem ser utilizados pelos agentes patogénicos.

Em ensaios em ratos para aquilatar da infecciosidade do PNS de bovinos com BSE foi verificada negatividade no nervo esplâncnico e no nervo ciático por i.c. e i.p. (o limite de detecção era de cerca de $10^{1.4} \log_{10}$ no rato – i.c./i.p. – ID₅₀/g admitindo-se o efeito duma barreira de espécie da ordem de $10^{2.7}$. O ileum distal por imunohistoquímica revela a presença mínima de infecciosidade nos neurónios do plexo mesentérico dos bovinos.

Em consonância com as características das TSE há que considerar os prováveis materiais de risco para o consumo público resultantes da produção animal obtida a partir desses animais.

É possível através da interpretação da patogenia e da indentificação dos agentes infecciosos das TSE nos diferentes tecidos animais definir aquilo que se convencionou designar por materiais de alto risco.

Como se compreende, a leitura dos quadros anteriores permite não só deduzir as vias de disseminação provável, desde a porta de entrada até aos diversos órgãos e tecidos, mas também a maior ou menor capacidade replicativa operada pelos agentes infecciosos em cada um dos sectores referidos.

4.6. Doenças priónicas sub-clínicas:

Após a infecção oral, na transmissão natural das prionoses, o sistema nervoso periférico e o sistema linforreticular (fase de silêncio quanto a sinais clínicos) estão implicados na subsequente neuroinvasão do CNS pelos priões, o que nem sempre desencadeia sinais clínicos de doença terminal. Esta doença priónica sub-clínica pode ocorrer e é caracterizada pela presença de infecciosidade e PrP^{sc} na ausência de sintomas clínicos evidentes (Thackray *et alii*, 2003).

Nos sistemas nervoso central e no sistema reticuloendotelial têm sido verificadas elevadas concentrações de PrP^{sc} em fases subclínicas da doença (Thackray *et alii*, 2002; Hill e Collinge, 2002).

Após o período de incubação específico de cada estirpe de prião esta fase pré-clínica habitualmente desemboca numa doença terminal clinicamente evidente. Contudo, tem sido assinalado que animais infectados com PrP^{sc}, portanto infecciosos, parecem não afectados grosseiramente durante o seu período de vida normal, a seguir à inoculação com priões, podendo pois ser considerados como tendo uma

infecção sub-clínica em oposição à infecção pré-clínica (Dickinson *et alii*, 1975).

Está demonstrado que uma estirpe de priões do hamster tida como não patogénica para ratos convencionais pode desencadear a replicação dos priões até elevadas concentrações sem originar doença clínica nestes ratos (Hill *et alii*, 2000).

A transmissão experimental da mesma espécie de priões, por via oral a diversos animais da mesma espécie, pode originar doença priónica sub-clínica sendo o nível da expressão do PrPc pelo animal hospedeiro um factor que regula este desenvolvimento da doença priónica terminal (Thackray *et alii*, 2003). Aumento da expressão de PrPc pode predispor um animal infectado para uma patologia mais agressiva.

Tem sido possível verificar em doenças priónicas experimentais provocadas em ratos Tga20 (que exprimem elevadas taxas de proteína PrP) e após inoculação com baixas doses do agente infeccioso (Thackray *et alii*, 2002) que podem ser detectados altos níveis de infecciosidade e a presença de PrPsc em animais com doença sub-clínica, o que sugere que para desencadarem a doença clínica terminal além da simples acumulação de PrPsc outros acontecimentos terão de intervir.

As prionoses sub-clínicas são pois caracterizadas pela presença de infecciosidade e PrPsc (no cérebro) na ausência de sintomas clínicos evidentes (Thackray *et alii*, 2003).

Em que circunstâncias ou quais os factores que são responsáveis pelas prionoses clínicas ou sub-clínicas não é conhecido.

No entanto, o aumento da expressão de PrPc pelo hospedeiro pode aumentar a susceptibilidade dos animais infectados para efeitos mais deletérios da patologia priónica.

Estudos em ratos sugerem que o nível de expressão pelo hospedeiro de PrPc contribui para a regulação do desenvolvimento de prionoses sub-clínicas por via oral.

Independentemente de quando a prionose é terminal ou sub-clínica, após a inoculação oral, o tecido esplénico dos ratos acumula baixas doses de infecciosidade ao contrário do que sucede com a inoculação intraperitoneal. Os níveis de infecciosidade do cérebro são similares nos dois casos. Apesar de se encontrar baixa infecciosidade no baço nos ratos infectados por via oral, níveis mais elevados de infecciosidade são detectados nos gânglios mesentéricos.

Parece que o baço é um importante reservatório de infecciosidade priónica quando a inoculação é intraperitoneal.

Na infecção oral o PNS (Jansen *et alii*, 2001; Kimberlin *et alii*, 1983; Kimberlin e Waker, 1998) é a principal via para a neuroinvasão, até porque o PrPsc é constitutivamente expresso nos gânglios entéricos e

elementos neurais e nas terminações nervosas associadas com as células epiteliais de rato (Shmakov e Ghosh, 2001).

Estão inclusivé assinaladas prionoses na ausência de expressão de PrP no tecido linfóide (Race *et alii*, 2000).

Tudo isto sugere que o PNS é a principal via para a neuroinvasão após a inoculação oral, embora outros tecidos linfóides possam acumular priões, mas com pouca expressão para a progressão da doença, o que explicaria em parte os baixos níveis de PrPsc detectados no tecido linfático (por exemplo, o baço) nos bovinos com BSE natural provavelmente adquirida por via oral (Phillips *et alii*, 2000). Segundo sugestões de Thackray (2003) o estado fisiológico do tracto gastrointestinal dos animais (inflamações periféricas *versus* animais saudáveis) pode determinar face à infecção por priões se os animais sucubem a uma prionose terminal ou se desenvolvem uma prionose sub-clínica, podendo inclusivamente esta argumentação explicar a baixa incidência de bovinos com BSE terminal em explorações afectadas.

4.7. – Transmissão entre animais:

A via oral ou intragástrica para transmissão dos agentes infecciosos é a menos eficiente de todas as vias utilizáveis.

A eficiência relativa dessa transmissão entre as vias intracerebral e oral nos roedores varia entre 10^5 no rato e 10^9 nos hamsters (Prusiner *et alii*, 1985).

No que se refere à transmissão materna parece que a BSE apenas se dissemina através de infecção veiculada pela alimentação.

Há no entanto provas que põem em evidência a transmissão natural do *scrapie* através da placenta. No que se refere à BSE em bovinos não há provas por ora dessa transmissibilidade através da placenta.

Também não há provas da transmissibilidade da BSE através do colostro e do leite (Heeschen, 2002).

No que se refere à transmissão directa horizontal experimental o *scrapie* pode transmitir-se por contacto entre ratos. Dickinson *et alii* (1964) e Brotherton *et alii* (1968) assinalam também a mesma transmissibilidade entre cabras.

Andreoletti *et alii* (2000) verificaram que a distribuição do PrPsc nos tecidos linfóides de ovinos com *scrapie* aumenta à medida que a doença avança o que sugere que a infecção destes tecidos linfóides associados com o intestino pode levar à libertação dessa infecciosidade PrPsc para o ambiente contribuindo indirectamente para a transmissão horizontal do *scrapie* observada em condições naturais de campo.

Quanto à transmissão natural por contactos directos de todas as TSE ocorrendo naturalmente apenas o *scrapie* parece implicado na transmissão horizontal.

No que se refere à transmissão indirecta a partir de origens animais, quanto a fezes, saliva e urina, pode referir-se o seguinte: em fezes de caprinos e ovinos com *scrapie* não tem sido detectada infecciosidade. Em relação a bovinos com BSE não existem bioensaios conclusivos.

No que se refere à cabra aquilo que foi realizado em cabras com *scrapie* indica um risco de transmissão muito baixo.

Quanto à urina Shaked *et alii* (2001) revelam que bovinos com BSE excretam uma forma proteica resistente de PrP na urina (UPrP) o mesmo sucedendo em hamsters com *scrapie* experimental e em humanos com CJD familiar. Noutros estudos (MAFF, 2000) é referido que o rim não apresenta infecciosidade detectável.

Quanto à possível presença de UPrPsc na urina ela poderá ser devida a uma massa molecular do PrP abaixo do *cut off* de filtração através das células renais e ainda pelo facto da urina poder concentrar até cerca de 120 vezes a concentração de proteínas existentes no sangue, o que tornaria muito fácil a sua detecção na urina mais do que no sangue.

Admite Shaked *et alii* que a UPrPsc possa diferir na sua conformação da PrPsc do cérebro, e daí o seu comportamento experimental, quando inoculada via i.c. em hamsters não originar sintomas de prionose até aos 270 dias o que parece sugerir que é diferente nas suas propriedades patogénicas do PrPsc do cérebro.

4.8. – Priões nas massas musculares:

Já em 2004 Hamir *et alii* trabalhando com amostras de músculos estriados (língua, coração, diafragma e masséteres) de vinte animais inoculados experimentalmente (bovinos, ovinos, alces e *raccons*) não detectaram neles PrPsc por métodos imunohistoquímicos (IHC) embora os tenham identificado no cérebro desses animais, resultados que contradizem estudos anteriores que assinalaram PrPsc na língua e noutros músculos estriados, referindo ainda Hamir *et alii* que provavelmente isto se deveria ao facto de terem utilizado neste último caso (língua e músculos estriados) estirpes de TSE adaptadas no laboratório que poderiam ter adquirido a capacidade para amplificar a resposta nos músculos estriados.

Pode argumentar-se que a técnica utilizada por Hamir *et alii*, a IHC, não é tão sensível como por exemplo a de *Western blotting*, mas Hamir *et alii* referem que na experiência deles a IHC tem uma sensibilidade igual se não ligeiramente superior para a detecção de PrPsc (Hamir *et alii*,

2001). Thomzing *et alii* (2003) descreveram uma acumulação extensa de PrPsc nos músculos de hamsters infectados oralmente com *scrapie* e abatidos em fase terminal da doença clínica, e cujos tecidos foram analisados por *Western blotting* dando resultados positivos nos músculos do esqueleto dos membros anteriores, posteriores, cabeça e espádua, língua (mais elevado o título de infecciosidade neste órgão).

As diversas TSE afectando naturalmente os animais (*scrapie* em ovinos, BSE em bovinos e possivelmente CWD) são causadas pela ingestão dos agentes infecciosos.

Parece poder concluir-se deste estudo de Thomzing *et alii* que após a infecção oral dos hamsters com a estirpe do *scrapie* 263K que a disseminação centrípta da infecção para o cérebro e espinal medula envolve componentes do tecido linfóide associado com o intestino e do sistema entérico, assim como fibras autónomas dos nervos esplâncnico e vago (McBride *et alii*, 2001). Após atingir o CNS a infecção pode disseminar-se centrifugamente no sentido contrário para o sistema nervoso periférico (PNS) distribuindo-se depois o agente infeccioso através do organismo animal. Assim é possível que os músculos após a infecção oral sejam infectados através das vias seguintes:

- a) vias neurais directa ou indirectamente ligadas que permitam o acesso dos PrPsc ao cérebro e espinal medula, inclusivé as associadas com o LRS;
- b) projecções do PNS mediando disseminações centrífugas da infecção a partir do CNS;
- c) disseminações linfáticas ou hemáticas após a invasão do LRS.

De qualquer forma não se sabe com se passarão as coisas nos estudos de transmissão em bovinos, apesar de saber-se que não tem sido detectada infecciosidade nos músculos do esqueleto e no nervo ciático de bovinos com BSE analisados por bioensaio em ratos e titulações em espécies bovinas (*European Comission*, 2002).

Há indicações (*Prions in muscle*, 2002) de que os músculos do esqueleto de ratos infectados com *scrapie* contêm e amplificam o PrPsc (Bosque *et alii*, 2002) que foi detectado nos músculos dos membros posteriores de ratos (doentes terminais) inoculados i.c. e i.p. com duas estirpes de *scrapie* adaptadas ao rato (RML e Me7).

Os títulos de infecciosidade nos músculos foi de $10^{5.2}$ a $10^{6.4}$ ID50 unidades/grama de músculos (em fases terminais da doença) o que corresponde a 1000 vezes menos do que o título encontrado no cérebro.

O PrPsc foi detectado nos músculos pela técnica de *Western blotting*. (Esta técnica é relativamente insensível quando comparada com a sensibilidade da injeção numa animal como por exemplo o rato. O teste mais sensível para determinar a infecciosidade pela BSE em músculos bovinos é a transmissão bovino a bovino e isto está a ser feito desde Abril

de 2002 no Reino Unido). A eficiência desta acumulação de PrPsc parece variar consoante os grupos de músculos amostrados de diferentes regiões do organismo animal.

Admite-se que a eficiência da acumulação de priões nos músculos varie consoante as espécies de animais hospedeiros ou a estirpe de priões em causa.

Por outro lado, não pode deixar de se sopesar que a transmissão oral é ineficiente em comparação com a inoculação i.c. (no hamster por exemplo é de 10^5 a 10^9 menos eficiente). A própria barreira de espécie terá que ser encarada.

Chiesa *et alii* (2001) detectaram também elevadas concentrações de PrPsc pelo método de *Western blotting* em coração e músculos do esqueleto em ratos transgênicos expressando uma mutação inserida de nove octapéptidos no gene da proteína priónica (Prnp).

Bosque *et alii* no trabalho referido anteriormente utilizaram uma técnica de *Western blotting* mais sensível embora também Bosque *et alii*, para este trabalho, tenham produzido animais (ratos) que exprimem PrPc quasi exclusivamente nos músculos, ou seja, mais de cem vezes do que a expressão de PrPc nos animais normais (ratos selvagens).

Há sugestões no sentido de que os miócitos (e também os hepatócitos) não são tão eficientes para a propagação dos PrPsc com o são os neurónios.

Mas como a i.c. é 10^5 a 10^9 mais eficiente que a infecção oral, possuirão apenas uma capacidade marginal para transmitir a doença a ratos. Contudo, a repetição da exposição oral aos agentes infecciosos das TSE pode aumentar o risco de transmissão da infecção (Diringer *et alii*, 1998) pois repetidas doses de PrPsc administradas a animais têm um mais alto potencial de transmissão do processo do que uma única exposição oral.

Em 1990 Pattison em 14 cabras inoculadas com músculos de cabras infectadas com *scrapie* encontrou uma cabra que desenvolveu doença clínica.

No entanto, experiências feitas com músculos de bovinos não têm até hoje (Abril de 2002) segundo a *European Commission (Prions in muscle, meeting 4th 5th April 2002)* provado infecciosidade, embora essas experiências tenham sido feitas com um modelo de sensibilidade limitada (rato tipo selvagem) ou no caso de ensaios com bovinos terem sido incompletos.

Estes factores levaram a *European Commission*, através do *Scientific Steering Committee*, a não rever a sua posição no que se refere à adequação dos músculos de bovinos e ovinos para consumo público, dado que a infecciosidade presente a muitos baixos níveis, abaixo dos limites

de detecção correntes, e o risco de exposição a infecciosidade pela BSE ser reduzida ou negligível.

No entanto, certos subprodutos e despojos (*offals*) especificados, inclusivé tecidos neurais e linfáticos que se supõe conterem elevadas concentrações de príões continuam a ser excluídos do consumo público (Phillips *et alii*, 2000). Também em amígdalas da faringe de bovino foi assinalado recentemente, 2002, infecciosidade pela BSE sendo considerado material de risco específico (SRM) pela União Europeia.

Bartz *et alii* (2003) verificaram uma rápida neuroinvasão pelos príões a seguir à infecção da língua em hamsters e mais, que a inoculação dos PrPsc de agentes da TME da doninha (*transmissible mink encephalopathy*) nas línguas de hamsters é 100000 vezes mais eficiente do que a ingestão oral do agente infeccioso, parecendo ocorrer uma disseminação transneuronal do agente da TME.

Neste estudo assinala-se que a TME pode replicar-se na língua e nos seus nódulos linfáticos regionais, mas a via mais rápida de invasão do cérebro é por via do transporte axonal retrógrado dentro do nervo hipoglossal para o núcleo hipoglossal.

Em hamsters infectados por via oral com *scrapie* foi evidenciado por Diringer *et alii* (1998) que comparadas com uma simples administração oral, administrações orais repetidas originam doença com uma incidência mais elevada e o risco de infecção é maior quanto mais curto for o intervalo entre cada administração.

A infecção oral ou intragástrica é 50.000 a 100.000 vezes menos eficiente no rato e no hamster do que a via intracerebral.

Também está referido por Diringer *et alii* (1994) que doses de infecciosidade em hamsters que originam doença quando dadas de uma só vez, originam baixa incidência dos casos de *scrapie* quando dadas repetidamente. Estudos relatados em 2003 (Glatzel *et alii*, 2003) em seres humanos afectados pela doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica revelaram a localização extraneural de PrPsc em baços e músculos de cerca de 1/3 de 30 espécimens analisados (o método de detecção foi o de *Western blotting* após precipitação diferencial). Esta deposição extraneural do PrPsc em humanos parece estar correlacionada com uma larga duração da doença.

4.9. – Transfusões de sangue e príões:

Estudos desta natureza são muitas vezes inconclusivos dadas as limitações dos bioensaios em espécies animais diferentes e ainda devido aos pequenos volumes de sangue que podem ser injectados por via intracerebral. Em estudos feitos com animais dadores e recipientes da

mesma espécie aumenta-se consideravelmente a sensibilidade do bioensaio e grandes volumes de sangue podem ser injectados por via intravenosa.

Estão assinalados dois casos de transmissão de BSE por esta via e mais quatro casos de transmissão de *scrapie* também por esta via (Hunter *et alii*, 2002). As transmissões positivas surgiram com sangue de animais em fases pré-clínicas e clínicas da infecção parecendo que a deposição de PrPsc nos tecidos periféricos é mais escassa do que a produzida por via oral.

A transmissão de BSE a um ovino por transfusão de sangue de outro ovino com infecção experimental de BSE em fase pré-clínica está também comprovada (Houston *et alii*, 2000; Hunter *et Houston*, 2002).

Está também referida a transmissibilidade a suínos do agente da BSE (Wells *et alii*, 2003) após estudos iniciados em 1989 e referidos agora em 2003. A inoculação parenteral do PrPsc por três vias simultaneamente (i.c.; i.v.; i.p.) produziram doença em suínos depois dum período de incubação de 69 a 150 semanas, tendo a infecciosidade sido detectada por bioensaio em ratos de CNS de suíno, com infecciosidade no estômago, jejuno, ileum distal e pâncreas de suínos afectados terminalmente.

A administração por via oral com elevadas doses de cérebro de bovinos afectados com BSE não provocaram doenças nos suínos observados durante sete anos, nem infecciosidade nos tecidos analisados inclusivé no tracto alimentar.

5 – Bibliografia:

- Aguzzi, A. (2001). Peripheral prion pursuit. *Journal of Clinical Investigation*. 108, 661-662.
- Aguzzi, A. *et alii* (2003). Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. *British Medical Bulletin*. 66, 141-159.
- Allan, C.H. *et alii* (1993). Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology*. 104, 698-708.
- Anderson, R.G.W. (1993). Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Current Opinion on Cell Biology*. 5, 647-652.
- Anderson, R.G.W. (1998). The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry*. 67, 199-225.
- Anderson, S.M. *et alii* (1996). Intercellular transfer of a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein: release and uptake of CD4-GPI from recombinant adeno-associated virus-transduced HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93, 5894-5898.
- Andreoletti, O. *et alii* (2000). Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissue of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 81, 3115-3126.
- Andreoletti, O.; Lacrou, C.; Chabet, A.; Monnerieu, L.; Tabouret, G.; Lantier, F.; Aberthou, D.; Eychene, F.; Lapond-Benestad, S.; Elsen, J.M. e Schelcher, F. (2002). PrP^{Sc} accumulation in placenta of ewes exposed to natural scrapie: influence of faetal PrP gene type and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology*. 83, 2607-2616.
- Archer, F. *et alii* (2004). Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *Journal of Virology*. 78, 482-490.
- Arnold, J.E.; Tipler, C.; Laszlo, L.; Hope, J.; Landon, M. e Mayer, R.J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulated in late endosome-like organelles in scrapie infected mouse brain. *Journal of Pathology*. 176, 403-411.
- Aronoff-Spencer, E. *et alii* (2000). Identification of the Cu²⁺ binding sites in N-terminal domain of the prion protein by EPR CD spectroscopy. *Biochemistry*. 39, 13760-13771.
- Aucouturier, P. e Carnaud, C. (2002). The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *Journal of Leukocyte Biology*. 72, 1075-1083.
- Aucouturier, P.; Geissmann, P.; Damatte, D.; Saborui, G.P.; Meekes, H.C.; Kasosak, R.; Carp, R.I. e Wisniewski, T. (2001). Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *Journal of Clinical Investigation*. 108, 703-708.
- Baldauf, E. *et alii* (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *Journal of General Virology*. 78, 1187-1197.
- Banchereau, J. e Steinman, B.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392, 245-252.
- Banchereau, J. *et alii* (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 18, 767-811.
- Barclay, G.B. *et alii* (1999). Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *British Journal of Hematology*. 107, 809-814.
- Barrington, R.A. *et alii* (2002). B lymphocyte memory. *The Journal of Experimental Medicine*. 196, 1189-1200.
- Bartz, J.C. *et alii* (2003). Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *Journal of Virology*. 77, 583-591.
- Baron, G.S. *et alii* (2002). Conversion of raft-associated prion protein to the protease resistant state requires insertion of PrP^{res} (PrP^{Sc}) into contiguous membranes. *EMBO Journal*. 21, 1031-1040.
- Batista, F.D. *et alii* (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*. 411, 489-494.
- Beekes, M. *et alii* (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *Journal of General Virology*. 97, 1925-1934.
- Beekes, M.; McBride, P.A. e Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *Journal of General Virology*. 79, 601-607.
- Beekes, M. e McBride, P.A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neuroscience Letters*. 278, 181-184.
- Belay, E.D.; Maddox, R.A.; Gambetti, P. e Schonberger, L. (2003). Monitoring the occurrence of emerging forms of Creutzfeldt-Jakob disease in the United States. *Neurology*. 60, 176-181.
- Bencsik, B.; Lezmi, S.; Hunsmann, G. e Baron, T. (2001). Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *Dev. Immunology*. 8, 23-41.
- Bendheim, P.E. *et alii* (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*. 42, 149-156.
- Bennion, B.J. e Dagg, V. (2002). Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. *Clinical Chemistry*. 48, 2105-2114.

- Bensen, R.A. e Marsh, R.P. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology*. 68, 7859-7868.
- Beranger, F. *et alii* (2002). Stimulation of PrP^C retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases the accumulation of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 38972-38977.
- Beringer, V. *et alii* (2000). Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *Journal of Pathology*. 190, 495-502.
- Blattler, T.; Brande, S.; Rauben, A.J.; Klein, M.A.; Weissmann, C. e Aguzzi, A. (1997). PrP expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature*. 389, 69-73.
- Bolton, D.C.; McKinley, M.P. e Prusiner, S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*. 218, 1309-1311.
- Bonifacino, J.S. e Weissmann, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annual Review of Cell Development and Biology*. 14, 19-57.
- Borchelt, D.R. *et alii* (1990). Scrapie and cellular prion protein differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *Journal of Cell Biology*. 110, 743-752.
- Borchelt, D.R. *et alii* (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion protein in the endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 267, 16188-16199.
- Borchelt, D.R. *et alii* (1994). Rapide anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the periphereal and central nervous systems. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 14711-14714.
- Borchelt, D.R.; Taraboulos, A. e Prusiner, S.B. (1992). Evidence of synthesis of scrapie prion protein in the endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 267, 16188-16199.
- Bosque, P.J. *et alii* (2002). Prions in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99, 3812-3817.
- Bradley, R. (1999). BSE transmission studies with particular reference to blood. *Dev. Biol. Stand.* 99, 35-40.
- Brandner, S. *et alii* (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 379, 339-343.
- Broltherston, J.G. *et alii* (1968). Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 78, 9-17.
- Brown, K.L. *et alii* (1999). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nature Medicine*. 5, 1308-1312.
- Brown, L.R. e Harris, D.A. (2003). Coper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosome and the Golgi. *Journal of Neurochemistry*. 87, 353-363.
- Brown, P. e Bradley, R. (1998). 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *British Medical Journal*. 317, 1688-1692.
- Bruce, M.E. (2003). TSE strain variation. *British Medical Bulletin*. 66, 99-108.
- Bruce, M.E.; McConnell, I.; Fraser, H. e Dickinson, A.G. (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in sinu congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *Journal of General Virology*. 72, 595-603.
- Bruce, M.E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin*. 49, 822-838.
- Bucci, C. *et alii* (1992). The small GTPase rab 5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*. 70, 715-728.
- Bucci, C. *et alii* (1994). Rab 5 is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 91, 5061-5065.
- Bucci, C. *et alii* (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three Rab 5 isoforms. *FEBS Letters*. 366, 65-71.
- Bueler, H. *et alii* (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 356, 577-582.
- Bueler, H. *et alii* (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 73, 1339-1347.
- Burthem, J. *et alii* (2001). The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood*. 98, 3733-3738.
- Carp, B.I. e Callahan, S.M. (1981). In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology*. 16, 8-13.
- Carp, B.I. e Callahan, S.M. (1982). Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology*. 17, 201-207.
- Carr, C.M.; Chaudhry, C. e Kim, P.S. (1997). Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94, 14306-14313.
- Carrel, R.W. e Gooptu, B. (1998). Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's. *Current Opinions in Structural Biology*. 8, 799-809.
- Carrol, M.C. (1998). CD21/CD35 in B cell activation. *Seminar Immunology*. 10, 279-286.

- Casalone, C.; Zanusso, G.; Acutis, P.; Ferrari, S.; Capucci, L.; Tagliavin, F.; Monaco, S. e Caranaelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloid spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 10, 1073.
- Caughey, B. (2001). Prion protein interconversion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B.* 356, 197-202.
- Caughey, B. *et alii* (1988). Detection of prion protein in RNA in normal and scrapie infected tissues and cell lines. *Journal of General Virology.* 69, 711-716.
- Caughey, B. *et alii* (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *Journal of Virology.* 63, 175-181.
- Caughey, B. *et alii* (1991). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal proteases: implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *Virology.* 65, 6597-6603.
- Caughey, B.; Kocisko, D.A.; Raymond, G.J. e Lansbury, P.T. (1995). Aggregates of scrapie associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chemical Biology.* 2, 807-817.
- Caughey, B. e Raymond, G.J. (1991). The scrapie associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease and phospholipase sensitive. *Journal of Biological Chemistry.* 266, 18217-18223.
- Caughey, B. e Raymond, G.J. (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *Journal of Virology.* 67, 643-650.
- Caughey, B.; Raymond, G.J.; Kocisko, D.A. e Lansbury, P.T. (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance and aggregation of scrapie associated prion protein in guanidine denaturation studies. *Journal of Virology.* 71, 4107-4110.
- Chaplin, D.D. e Fu, Y.X. (1998). Cytokine regulation of secondary lymphoid organ development. *Current Opinions in Immunology.* 16, 289-297.
- Chen, S.G. *et alii* (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *Journal of Biological Chemistry.* 270, 19173-19180.
- Chen, Y. e Scheiler, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature Reviews on Molecular Cell Biology.* 2, 98-106.
- Chiesa, R. *et alii* (2001). Primary myopathy and accumulation of PrP^{Sc}-like molecule in peripheral tissue of transgenic mice expressing a prion protein insertional mutation. *Neurobiological Disease.* 8, 279-288.
- Chiesa, R. *et alii* (2003). Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *Journal of Virology.* 77, 7611-7622.
- Chiesa, R. e Harris, D.A. (2001). Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiology Diseases.* 8, 743-763.
- Cloucard, C.; Beaudry, P.; Elsen, J.M.; Milan, D.; Dussaucey, M.; Bounneau, C.; Schelcher, F.; Chattelain, J.; Launay, J.M. e Laplanche, J.L. (1995). Different allelic effects of codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology.* 76, 2097-2101.
- Cockett, N.E.; Shay, T.L. e Smit, M. (2001). Analysis of the sheep genome. *Physiological Genomics.* 7, 69-78.
- Collinge, J.; Sidle, K.C.L.; Meads, J.; Ironside, J. e Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* 383, 685-690.
- Damke, H. *et alii* (2001). Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Molecular Biology of the Cell.* 12, 2578-2589.
- Daro, E. *et alii* (1996). Rab4 and cell debris define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93, 9559-9564.
- Dealer, S. (2002). A commentary on the study by Bosque *et alii*, 2002, showing that prions were found in the skeletal muscle of mice in substantial titres – Priondata.org.newanalysis. Updated April 20, 2002. http://www.priondata.com/data/A_muscle.html.
- Dearmond, S.J. *et alii* (1987). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology.* 37, 1271-1280.
- Dearmond, S.J. *et alii* (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron.* 19, 1337-1348.
- Dearmond, S.J. e Prusiner, S.B. (1995). Etiology and pathogenesis of prion diseases. *American Journal of Pathology.* 146, 788-811.
- DeBurmman, M. *et alii* (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94, 13938-13943.
- Defea, K.A. *et alii* (1994). Determinants of carboxyl-terminal domain translocation during prion protein biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry.* 24, 16810-16820.
- Delneste, Y. *et alii* (2003). Interferon- γ switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood.* 101, 143-150.

- Dickinson, A.G. *et alii* (1964). Transmission by contact of scrapie in mice. *Journal of Comparative Pathology*. 74, 250-254.
- Dickinson, A.G. *et alii* (1975). Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature*. 256, 732-733.
- Dickinson, A.G.; Fraser, H.; McConnel, I. e Outrans, G.W. (1978). Mitogenic stimulation of the host enhances susceptibility to scrapie. *Nature*. 272, 54-55.
- Diedrich, J.F. *et alii* (1991). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 88, 375-379.
- Diringer, H. *et alii* (1994). The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Annals of the New York Academy of Science*. 724, 246-258.
- Diringer, H. *et alii* (1998). Effect of repeated oral infection of hamsters with scrapie. *Journal of General Virology*. 79, 609-612.
- Dodelet, V.C. e Cashman, R.R. (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood*. 91, 1556-1561.
- During *et alii* (2000). Differential constitutive and activation dependent expression of prion protein in human peripheral blood leukocytes. *British Journal of Haematology*. 108, 488-495.
- Ellgaard, L. e Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews on Molecular Cell Biology*. 4, 181-191.
- Ellgaard, L.; Molinari, M. e Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*. 286, 1882-1888.
- Eklund, C.M. *et alii* (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *Journal of Infectious Diseases*. 117, 15-22.
- Enari, M. *et alii* (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 98, 9295-9299.
- European Commission (2002). *Prions in muscle*. Statement adopted by the scientific steering committee at its meeting of 4-5 April 2002.
- European Commission (2002). *Update of the opinion on TSE infectivity in ruminant tissues*. http://www.europa.eu.int/comm/food/fg/sc/ssc/outcome_en.htm
- Farquhar, C.F. *et alii* (1996). Protease resistant PrP deposit in brain and non-central nervous system tissues of a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology*. 77, 1941-1946.
- Feng, Y. *et alii* (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *Journal of Cell Biology*. 131, 1435-1452.
- Fisher, M.B. *et alii* (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO Journal*. 15, 1255-1264.
- Fisher, M.B. *et alii* (1998). Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science*. 280, 582-585.
- Follet, J. *et alii* (2002). PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *Journal of Virology*. 76, 2434-2439.
- Ford, M.J. *et alii* (2002). A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience*. 111, 533-551.
- Ford, M.J. *et alii* (2002). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience*. 113, 177-192.
- Forloni, G.; Angeretti, N.; Chiesa, R.; Monzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O. e Tagliavivii, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*. 362, 543-546.
- Foster, J.D. *et alii* (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *Journal of General Virology*. 82, 2319-2326.
- Fraser, H. (1982). Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*. 295, 149-150.
- Fraser, H. e Foster, J. (1996). Transmissible spongiform encephalopathies: a consultation on BSE with scientific veterinary committee of the Commission of the European Community held in Brussels, September 14-15, 1993. Editors: R. Bradley; B.M. Marchante. Document VI/4131/94-EN. Brussels. European Commission of Agriculture. Page 145.
- Fraser, H. e Dickinson, A.G. (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*. 226, 462-463.
- Frigg, R. *et alii* (1999). Scrapie pathogenesis in subclinically infected B cell deficient mice. *Journal of Virology*. 73, 9584-9588.

- Gambetti, P. *et alii* (2001). Mechanisms of phenotypic heterogeneity in prion, Alzheimer and other conformational diseases. *Journal of Alzheimer Disease*. 3, 87-95.
- Gauczynk, S. *et alii* (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptors acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO Journal*. 20, 5863-5873.
- Glatzel, M. e Aguzzi, A. (2000). PrP^{Sc} expression in peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *Journal of General Virology*. 81, 2813-2821.
- Glatzel, M. *et alii* (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron*. 31, 25-34.
- Glatzel, M. *et alii* (2003). Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *New England Journal of Medicine*. 349, 1812-1820.
- Goldmann, W.; Hunter, N.; Martin, T.; Dawson, M. e Hope, J. (1991). Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short G-C rich element within the protein coding exon. *Journal of General Virology*. 72, 201-204.
- Gonzalez, M. *et alii* (1998). The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *Journal of Experimental Medicine*. 187, 997-1007.
- Groschup, M.H. *et alii* (1999). Deposition of disease associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathologica*. 98, 453-457.
- Gundelfinger, E.D. *et alii* (2003). Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nature Reviews on Molecular Cell Biology*. 4, 127-139.
- Hadlow, W.J. (1999). Reflections on the transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary Pathology*. 36, 523-529.
- Hadlow, W.J.; Kennedy, R.C. e Race, R.E. (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *Journal of Infectious Diseases*. 146, 657-664.
- Hainfellner, J.A. e Budka, H. (1999). Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathologica*. 98, 458-460.
- Hamir, A.N. *et alii* (2001). Diagnosis of preclinical and subclinical scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing available postmortem diagnostic techniques. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*. 13, 152-154.
- Hamir, A.N. *et alii* (2004). Failure to detect prion protein (PrP^{Sc}) by immunohistochemistry in striated muscle tissues of animals experimentally inoculated with agents of transmissible spongiform encephalopathy. *Veterinary Pathology*. 41, 78-81.
- Haraguchi, T. *et alii* (1989). Asparagine linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 274, 1-13.
- Harris, D.A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 429-444.
- Harris, D.A. (2003). Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *British Medical Bulletin*. 66, 71-85.
- Harris, D.A. *et alii* (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry*. 32, 1009-1016.
- Harris, D.A. *et alii* (1996). Cell biology of the prion protein. In: Prusiner, S.B. (editor) *Prions, prions, prions*. Volume 207. Páginas 77-91. Berlim. Springer-Verlag.
- Harris, D.A.; Lele, P. e Snider, W.D. (1993). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 90, 4309-4113.
- Hart, D.N.J. e Caldeira, V.L. (1994). Human dendritic cells: function and cytokine production. Immunopharmacology of macrophages and other antigen presenting cells. In: Bruijnzeel-Koomen, C.F.A.M. e Hoefsmit, E.C. (Editores) *Handbook of immunopharmacology*. Página 63. Londres. Academic Press.
- Hart, D.N.J. *et alii* (1983). Major histocompatibility complex antigens in the rat pancreas, isolated pancreatic islets, thyroid and adrenal: localization with monoclonal antibodies and demonstration of interstitial dendritic cells. *Transplantation*. 36, 431.
- Hart, D.N.J. e Fabre, J.W. (1981). MHC antigens in rat kidney, ureter and bladder: localization with monoclonal antibodies and demonstration of a positive dendritic cells. *Transplantation*. 31, 318.
- Hart, D.N.J. e Fabre, J.W. (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissue of rat heart and other tissues but not brain. *Journal of Experimental Medicine*. 153, 347.
- Hathaway, L.J. e Kraehenbuhl, J.B. (2000). The role of M cells in mucosal immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57, 323-332.
- Hedge, R.S. *et alii* (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*. 279, 827-834.
- Heeschen, W.H. (2002). BSE: milk and risk potential? *Deutsch Tierärztl Wochenschr*. 109, 350-353.

- Heggebo, R. *et alii* (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *Journal of General Virology*. 81, 2327-2337.
- Heggebo, R.; Press, C.M.; Gunnes, G.; Gonzalez, L. e Jeffrey, M. (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie affected Suffolk sheep. *Journal of General Virology*. 83, 479-489.
- Heinen, E. (1995). Follicular dendritic cells: phenotype, origin and functions. *Pathological Biology*. 43, 847-857.
- Heller, U. *et alii* (2003). Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 36139-36147.
- Heppner, F.L.; Christ, A.D.; Klein, M.A.; Prinz, M.; Fried, M.; Kraehenbuhl, J.P. e Aguzzi, A. (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine*. 7, 976-977.
- Heppner, F.L. *et alii* (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine*. 7, 976-977.
- Hermes, J.W. *et alii* (1995). Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *European Journal of Neurosciences*. 7, 2508-2512.
- Heske, J. *et alii* (2004). The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 5435-5443.
- Hill, A.F. e Edlinge, J. (2002). Species barrier independent prion replication in apparently resistant species. *APMIS*. 110, 44-53.
- Hill, A.F. *et alii* (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*. 353, 183-189.
- Hill, A.F. *et alii* (2002). Species barrier independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 97, 10248-10253.
- Holada, K.; Vostal, J.G.; Theisen, P.W.; MacAuley, C.; Gregori, L. e Rohwer, R.G. (2002). Scrapie infectivity in hamsters blood is not associated with platelets. *Journal of Virology*. 76, 4649-4650.
- Holscher, C. *et alii* (2001). Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 13388-13394.
- Horiuchi, M. e Caughey, B. (1999). Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease resistant state. *EMBO Journal*. 18, 3193-3203.
- Hornemann, S. e Glockshuber, R. (1998). A scrapie like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP (121-231) induced by acidic pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 95, 6010-6014.
- Hosszu, L.L.P.; Baxter, N.J.; Jackson, G.S.; Power, A.; Clark, A.R.; Waltho, J.P.; Craven, C.J. e Collinge, J. (1999). Structural mobility of the human prion protein probed by backbone hydrogen exchange. *Nature Structural Biology*. 6, 740-743.
- Houston, F. *et alii* (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*. 356, 999-1000.
- Huang, F.P. *et alii* (2002). Migrating intestinal dendritic cells transport PrPsc form gut. *Journal of General Virology*. 83, 267-271.
- Huang, F.P.; Farquhar, C.F.; Mabbot, N.A.; Bruce, M.E. e McPherson, G.G. (2002). Migrating intestinal dendritic cells transport PrPsc from the gut. *Journal of General Virology*. 83, 267-271.
- Hundt, C. *et alii* (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *EMBO Journal*. 18, 3193-3203.
- Hunter, N. *et alii* (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *Journal of General Virology*. 83, 2897-2905.
- Hunter, N.; Foster, J.D.; Goldman, W.; Stear, M.J.; Hope, J. e Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Archives of Virology*. 141, 809-824.
- Hunter, N.; Goldman, W.; Smith, G. e Hope, J. (1994). Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Veterinary Record*. 135, 400-403.
- Hunter, N.; Goldman, W.; Marshall, E. e O'Neill, G. (2000). Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing the incidence of the disease. *Archives of Virology Supplement*. 1, 181-188.
- Hunter, N. e Houston, F. (2002). Can prion diseases be transmitted between individuals via blood transfusion: evidence from sheep experiments. *Developmental Biology*. 108, 193-198.
- Hunter, N.; Moore, L.; Hosie, B.D.; Dingwall, W.S. e Grieg, A. (1997). Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk shepp in Scotland. *Veterinary Record*. 140, 59-63.
- Ivanova, L. *et alii* (2001). Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 42409-42421.
- Inaba, K. *et alii* (1984). Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes and histocompatibility B cells during primary antibody response in vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 160, 858.
- Jansen, K. *et alii* (2001). Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biological Chemistry*. 382, 683-691.

- Jarret, J.T. e Lansbury, P.J. (1993). Seeding one dimensional crystalization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie. *Cell*. 73, 1055.
- Jeffrey, M. *et alii* (2000). Sites of prion protein accumulation in scrapie infected mouse spleen revealed by immunoelectro microscopy. *Journal of Pathology*. 191, 323-332.
- Kaesler, P.S. *et alii* (2001). Efficient lymphoreticular prion propagation requires PrPc in stromal and hematopoietic cells. *Journal of Virology*. 75, 7097-7106.
- Kanu, N. *et alii* (2002). Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Current Biology*. 12, 523-536.
- Kaneko, K. *et alii* (1997). COOH terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94, 2333-2338.
- Kasesak, R.J. *et alii* (1986). Immunological comparison of scrapie associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *Journal of Virology*. 59, 676-683.
- Kelsail, B.L. e Strober, W. (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial clone and T cell regions of the murine Peyer's patch. *Journal of Experimental Medicine*. 183, 237-247.
- Kim, S.J. *et alii* (2001). Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 26132-26140.
- Kim, S.J. e Hedge, R.S. (2002). Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. *Molecular Biology of the Cell*. 13, 3775-3786.
- Kimberlin, R.H. (1979). Early events in the pathogenesis of scrapie in mice: biological and biochemical studies. In: S.B. Prusiner e H.J. Hadlow (editores) *Pathogenesis, immunology, virology and molecular biology of the spongiform encephalopathies*. Páginas 33-54. Londres. Academic Press.
- Kimberlin, R.H. *et alii* (1983). Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *Journal of Neurological Science*. 61, 315-325.
- Kimberlin, R.H. *et alii* (1983). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *Journal of General Virology*. 64, 713-718.
- Kimberlin, R.H. *et alii* (1988). Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie dependent mainly on the dynamics of agent replication within the nervous system and not the lymphoreticular system. *Journal of General Virology*. 69, 2953-2980.
- Kimberlin, R.H. e Walker, C.A. (1980). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *Journal of General Virology*. 51, 183-187.
- Kimberlin, R.H. e Walker, C.A. (1989). The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Research*. 12, 201-211.
- Kitamoto, T.; Maramoto, T.; Mohri, S. e Doh-Urak Tateishi, J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Virology*. 65, 6292-6295.
- Klein, M.A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*. 390, 687-690.
- Klein, M.A. e Aguzzi, A. (2000). The neuroimmune interface in prion diseases. *New Physiological Science*. 15, 250-255.
- Klein, M.A. *et alii* (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nature Medicine*. 4, 1429-1433.
- Klein, M.A. *et alii* (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nature Medicine*. 7, 488-492.
- Klein, M.A.; Frigg, R.; Raebler, A.J.; Flechsig, E.; Hegrij, I.; Zinkernagel, R.M.; Weissmann, C. e Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nature Medicine*. 4, 1429-1433.
- Klohn, P.C. *et alii* (2003). A quantitative, highly sensitive cell based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 100, 11666-11671.
- Kooyman, D.L. *et alii* (1995). In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science*. 269, 89-92.
- Kovacs, G.G. *et alii* (2004). Complement activation in human prion disease. *Neurobiology of Disease*. 15, 21-28.
- Kraal, G. (1992). Cells in the marginal zone of the spleen. *International Review of Cytology*. 132, 31-74.
- Kunzi, V. *et alii* (2002). Unhindered prion neuroinvasion despite impaired fast axonal transport in transgenic mice overexpressing four repeat tan. *Journal of Neuroscience*. 22, 7471-7477.
- Kuroda, Y. *et alii* (1983). Creutzfeldt-Jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low density lymphocytes. *Infectious Immunology*. 41, 154-161.
- Laine, J. *et alii* (2001). Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *European Journal of Neuroscience*. 14, 47-56.

- Landsverk, T. *et alii* (1991). The intestinal habitat for organized lymphoid tissue in ruminants: comparative aspects of structure, function and development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 28, 1-16.
- Lasmezas, C.I. (2003). The transmissible spongiform encephalopathies. *Reviews in Science and Technology*. 22, 23-36.
- Lasmezas, C.I. *et alii* (1996). Immune system dependent and independent replication of the scrapie agent. *Journal of Virology*. 70, 1292-1295.
- Leclerc, E. *et alii* (2001). Immobilized prion protein undergoes spontaneous rearrangements to a conformation having features in common with the infectious form. *EMBO Journal*. 20, 1547-1554.
- Lehmann, S. e Harris, D.A. (1995). A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 24589-24597.
- Lehmann, S.; Milhvet, O. e Mange, A. (1999). Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomedical Pharmacotherapy*. 53, 39-46.
- Lehmann, S.; Shyng, S.L. e Harris, D.A. (1994). Cellular processing of normal and mutant mammalian prion proteins. *Neurobiology of Aging*. 15, 587-588.
- Lhangermaran, S. *et alii* (1996). *Trends in Cell Biology*. 6, 163-167.
- Li, R. *et alii* (2001). The expression and potential functions of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunology*. 207, 49-58.
- Lipscomb, M.F. e Master, B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiological Reviews*. 82, 97-130.
- Liu, M. e MacPherson, G.G. (1993). Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigens administered orally and can prime naïve T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 177, 1299-1307.
- Liu, T. *et alii* (2001). Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hematopoietic cells. *Journal of Immunology*. 166, 3733-3742.
- Liu, T. *et alii* (2002). Intercellular transfer of the cellular prion protein. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 47671-47678.
- Liu, Y.J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 106, 259-262.
- Liu, Y.J. *et alii* (1996). Follicular dendritic cells and germinal centers. *International Review of Cytology*. 166, 139-179.
- Lledo, P.M. *et alii* (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93, 2403-2407.
- Lombardi, D. *et alii* (1993). Rab 9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO Journal*. 12, 677-682.
- Lotscher, M. *et alii* (2003). Immunologically induced complement dependent up regulation of the prion protein in the mouse spleen: follicular dendritic cells versus capsule and trabeculae. *Journal of Immunology*. 170, 6040-6047.
- Luhr, K.M. *et alii* (2002). Dendritic cell subsets and lineages and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 106, 259-262.
- Luhr, K.M. *et alii* (2002). Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c+ myeloid dendritic cells in vitro. *Journal of Virology*. 76, 12259-12264.
- Ma, J. e Lindquist, S. (2002). Conversion of PrP to self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science*. 298, 1785-1788.
- Ma, J.; Wollmann, R. e Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*. 298, 1781-1785.
- Mabbolt, N.A. e Bruce, M.E. (2001). The immunology of TSE diseases. *Journal of General Virology*. 82, 2307-2318.
- Mabbolt, N.A.; MacKay, F.; Minns, F. e Bruce, M.E. (2000). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion in scrapie. *Nature Medicine*. 6, 719-720.
- Mabbolt, N.A. *et alii* (1997). T lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology*. 92, 161-165.
- Mabbolt, N.A. *et alii* (2001). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays the onset of scrapie. *Nature Medicine*. 7, 485-487.
- Mabbolt, N.A. *et alii* (2003). Follicular dendritic cells dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *Journal of Virology*. 77, 6845-6854.
- MacBride, P.A. e Beekes, M. (1999). Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neuroscience Letters*. 265, 135-138.

- MacBride, P.A.; Eikelenboon, P.; Kraal, G.; Frase, H. e Bruce, M.E. (1992). PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymphonodes in uninfected and scrapie infected mice. *Journal of Pathology*. 168, 413-418.
- MacBride, P.A. *et alii* (2001). Early spread of scrapie from gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *Journal of Virology*. 75, 9320-9327.
- Mack *et alii* (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Medicine*. 6, 769-775.
- MacKay, F. e Browning, J.L. (1998). Turning off follicular dendritic cells. *Nature*. 395, 26-27.
- MacKie, A.T. *et alii* (1999). Comparison of cattle and sheep colonic permeabilities to horseradish peroxidase and hamster scrapie prion protein in vitro. *Gut*. 45, 879-888.
- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annual Review of Immunology*. 12, 117-139.
- MAFF (2000). *Bovine spongiform encephalopathies: a progress report*. June 2000. Londres. Ministry of Agriculture, Food and Fisheries.
- Maignien, T.; Lasmez, C.J.; Beringe, K.; Dormont, D. e Deslys, J.-P. (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Journal of General Virology*. 80, 3035-3042.
- Manson, J.C. *et alii* (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. 115, 117-122.
- Manuelidis, L. *et alii* (2000). Follicular dendritic cells and dissemination of Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Virology*. 74, 8614-8622.
- Marella, M. e Chabry, J. (2004). Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *Journal of Neuroscience*. 24, 620-627.
- Marsh, R.F. (1981). Effect of vaccinia activated macrophages on scrapie infection in hamsters. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 134, 359-363.
- Marshall, A.J. *et alii* (2002). FDC-SP: a novel secreted protein expressed by follicular dendritic cells. *Journal of Immunology*. 169, 2381-2389.
- Martins, V.R. *et alii* (2002). Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Letters*. 512, 25-28.
- Matyszak, M.K. *et alii* (1992). Stromal macrophages of the choroid plexus situated at the interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens. *Journal of Neuroimmunology*. 40, 173-181.
- Maxfield, F.R. e MacGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Reviews on Molecular Cell Biology*. 5, 121-131.
- Maya, K.L. *et alii* (2004). Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrP^{Sc} in peripheral nerve. *Journal of Neurochemistry*. 88, 155-160.
- Medof, M.E. *et alii* (1985). Amelioration of lytic abnormalities of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with decay accelerating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 82, 2980-2984.
- Miller, J.L. *et alii* (1998). Variegated transfer of recombinant glycosylphosphatidylinositol anchored CD4 among cultured cells: correlation of flow cytometric and microscopic observations. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 131, 215-221.
- Mironov, A.Jr. *et alii* (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *Journal of Neuroscience*. 23, 7183-7193.
- Monari, L. *et alii* (1994). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jacob disease: a different prion protein determined by a DNA polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 91, 2839-2842.
- Morel, E. *et alii* (2004). The cellular prion protein PrP^{Sc} is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 14999-15505.
- Montrasio, F. *et alii* (2001). B lymphocyte restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 98, 4034-4037.
- Montrasio, F.; Fring, R.; Glatzel, M.; Klein, M.A.; McKay, F.; Aguzzi, A. e Weissmann, C. (2000). Impaired prion replication in spleen of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*. 288, 1257-1259.
- Moullier-Richard, S. *et alii* (2000). Signal transduction through prion protein. *Science*. 289, 1925-1928.
- Muller, G. e Zimmermann, R. (1987). Import of honeybee prepro-milittin into the endoplasmic reticulum: structured basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO Journal*. 6, 2099-2107.
- Muramoto, T. *et alii* (1996). Recombinant scrapie like prion protein of 106 aminoacids is soluble. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93, 15457-15462.
- Naslavsky, N. *et alii* (1996). Characterization of detergent insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 6324-6331.
- Neutra, M.R. *et alii* (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*. 86, 345-348.

- Nichols *et alii* (2001). Rapid recycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *Journal of Cellular Biology*. 153, 529-541.
- Nielson, C.H. *et alii* (2000). The role of complement in the acquired immune response. *Immunology*. 100, 4-12.
- Nishida, N. *et alii* (1997). Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell Molecular and Neurobiology*. 17, 537-545.
- Oldstone, M.B.; Race, R.; Thomas, D.; Lewisch, H.; Homann, D.; Smelt, S.; Holz, A.; Kon, P.; Lo, D.; Chesebro, B. e Flavell, R. (2002). Lymphotoxin- α and lymphotoxin- β deficient mice differ in susceptibility to scrapie: evidence against dendritic cell involvement in neuroinvasion. *Journal of Virology*. 76, 4357-4363.
- Orgel, L.E. (1996). Prion replication and secondary nucleation. *Chemical Biology*. 3, 413-414.
- Outram, G.W.; Dickinson, A.G. e Fraser, H. (1974). Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration. *Nature*. 249, 855-856.
- Pan, T.; Li, R.; Wong, B.S.; Liu, T.; Gambetti, P. e Sy, M.S. (2002). Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms. *Journal of Neurochemistry*. 81, 1092-1101.
- Parchi, P. *et alii* (1996). Molecular basis of phenotype variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of Neurology*. 39, 767-778.
- Parizek, P. *et alii* (2001). Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 44627-44632.
- Parry, H.B. (1962). Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity*. 17, 75-105.
- Parton, R.G. (2003). Caveolae from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nature Reviews on Molecular and Cell Biology*. 4, 162-167.
- Pashenkov, M. *et alii* (2001). Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*. 124, 480-482.
- Pattison, I.H. (1990). Scrapie agent in muscle. *Veterinary Record*. 126, 3.
- Pauly, P.G. e Harris, D.A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 33107-33110.
- Peretz, D. *et alii* (1997). A conformational transition at the N-terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *Journal of Molecular Biology*. 273, 614-622.
- Peretz, D. *et alii* (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*. 412, 739-743.
- Peters, P.J. *et alii* (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *Journal of Cell Biology*. 162, 703-717.
- Phillips, N.A. *et alii* (2000). *The inquiry into BSE and variant CJD in the United Kingdom*. Londres. Her Majesty's Stationary Office. <http://www.bseinquiry.gov.uk/index.htm>.
- Phillips, N.A. *et alii* (2000). *The BSE inquiry*. Volume 4. Página 79. Londres. Her Majesty's Stationary Office.
- Porter, D.D.; Porter, H.G. e Cox, N.A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *Journal of Immunology*. 111, 1407-1410.
- Prado, M.A.M. *et alii* (2004). PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *Journal of Neurochemistry*. 88, 769-781.
- Prinz, M. *et alii* (2003). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *American Journal of Pathology*. 162, 1103-1111.
- Prinz, M.; Montrasio, F.; Klein, M.A.; Schwartz, P.; Priller, J.; Odermatt, B.; Pfeffer, K. e Aguzzi, A. (2002). Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99, 919-924.
- Priola, S.A. *et alii* (1994). Heterologous PrP molecule interfere with accumulation of protease resistant PrP in scrapie infected murine neuroblastoma cells. *Journal of Virology*. 68, 4873-4878.
- Priola, S.A. *et alii* (1995). A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease resistant PrP in scrapie infected mouse neuroblastoma cells. *Journal of Virology*. 69, 7757-7758.
- Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*. 252, 1515-1522.
- Prusiner, S.B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science*. 278, 245-251.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 95, 13363-13383.
- Prusiner, S.B. *et alii* (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid like birefringent rods. *Cell*. 35, 349-358.
- Prusiner, S.B. *et alii* (1985). Transmission of scrapie in hamsters. *Journal of Infectious Diseases*. 152, 971-978.
- Prusiner, S.B. *et alii* (1998). Prion protein biology. *Cell*. 93, 337-348.
- Prusiner, S.B. e Hsiao, K.K. (1994). Human prion disease. *Annals of Neurology*. 35, 385-395.
- Race, R.E. e Ernst, D. (1992). Detection of proteinase K resistant prion protein and infectivity in mouse spleen by two weeks after scrapie agent inoculation. *Journal of General Virology*. 73, 3319-3322.

- Race, R.; Oldstone, M. e Chesebra, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *Journal of Virology*. 74, 828-833.
- Raeber, A.J. *et alii* (1999). Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 96, 3987-3992.
- Raeber, A.J.; Klein, M.A.; Frig, R.; Flechsing, E.; Aguzzi, A. e Weissmann, C. (1999). PrP dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie infected mice. *EMBO Journal*. 18, 2702-2706.
- Reid, K.B.M. (1986). *Essays in Biochemistry*. 22, 30.
- Rieger, R. *et alii* (1997). The human 37 kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nature Medicine*. 3, 1383-1388.
- Rus, H. e Niculescu, F. (2001). The complement system in central nervous system diseases. *Immunological Research*. 24, 79-86.
- Rutkowski, D.T. *et alii* (2001). Substrate specific regulation of the ribosome translocon junction by N-terminal signal sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 14, 7823-7828.
- Safar, J. *et alii* (1991). Differences in the membrane interaction of scrapie amyloid precursor proteins in normal and scrapie or Creutzfeldt-Jakob disease infected brains. *Journal of Infectious Diseases*. 163, 488-494.
- Safar, J.; Wille, H.; Itri, V.; Groth, D.; Searban, I.; Torchia, M.; Cohen, F. e Prusiner, S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(sc) molecules with different conformation. *Nature Medicine*. 4, 1157-1165.
- Salec, N. *et alii* (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *European Journal of Neuroscience*. 10, 2464-2471.
- Schlenstedt, G. e Zimmermann, R. (1987). Import of fros propeptide Gla into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO Journal*. 6, 699-703.
- Schmid, S.L. (1997). Clathrin coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annual Review of Biochemistry*. 66, 511-548.
- Schreiber, R.D. e Celada, A. (1985). Molecular characterization of interferon-gama as a macrophage activating factor. *Lymphokines*. 11, 87-118.
- Scott, J.R. e Frazer, H. (1989). Transport and targeting of scrapie infectivity and pathology in the optic nerve projections following intraocular injection. *Progress in Clinical Biology and Research*. 317, 645-652.
- Scott, M.R. *et alii* (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*. 73, 979-988.
- Scott, P.R.; Aldrige, B.M.; Clark, M. e Will, R. (1989). Bovine spongiform encephalopathy in a cow in the United Kingdom. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 195, 1745-17473.
- Shaked, G.M. *et alii* (2001). A protease resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 31479-31482.
- Shmakov, A.N. *et alii* (2000). Cellular prion protein is expressed in the human enteric nervous system. *Nature Medicine*. 6, 840-841.
- Shmakov, A.N. e Ghosh, S. (2001). Prion proteins and the gut: une liasion dangereuse? *Gut*. 48, 443-447.
- Shortman, K. e Caux, C. (1997). Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells*. 15, 409-419.
- Shyng, S.L. *et alii* (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 15922-15928.
- Shyng, S.L.; Heuser, J.T. e Harris, D.A. (1994). A glycolipid anchored prion protein is endocytized via clathrin coated pits. *Journal of Cell Biology*. 125, 1239-1250.
- Sigurdson, C.J. *et alii* (2001). PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *Journal of General Virology*. 82, 2327-2334.
- Simons, K. e Ikonem, E. (1997). Functional rafts in cell membrane. *Nature*. 387, 569-572.
- Somerville, R.A.; Birkett, C.R.; Farquhar, C.F.; Hunter, N.; Goldman, W.; Dornay, J.; Grover, D.; Hemion, R.M.; Percy, C.; Foster, J. e Jeffrey, M. (1997). Immunodetection of PrPsc in spleens of some scrapie infected sheep but not BSE infected cows. *Journal of General Virology*. 78, 2389-2396.
- Sonrichsen, B. *et alii* (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5 and Rab11. *Journal of Cell Biology*. 149, 901-914.
- Stahl, N. *et alii* (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 51, 229-249.
- Stahl, N. *et alii* (1990). Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol specific phospholipase C. *Biochemistry*. 29, 5405-5412.
- Stahl, N. *et alii* (1990). Identification of glycoinositolphospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry*. 29, 8879-8884.

- Stahl, N. *et alii* (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*. 31, 5043-5053.
- Stahl, N. *et alii* (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*. 32, 1991-2002.
- Steinmann, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology*. 9, 271.
- Steinmann, R.M. e Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*. 137, 1422.
- Steinmann, R.M. *et alii* (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. III. Functional properties in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 139, 1431.
- Steinmann, R.M. e Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 75, 5132.
- Stewart, R. e Harris, D.A. (2003). Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 45960-45968.
- Straub, R.H. *et alii* (1998). Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunology Today*. 19, 409-413.
- Sunyach, C. *et alii* (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol anchored prion protein. *EMBO Journal*. 22, 3591-3601.
- Supattapone, S. *et alii* (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, 96, 869-878.
- Szakai, A.J. e Hanna, M.G. (1968). The ultrastructure of antigen localization and virus-like particles in mouse spleen germinal centres. *Experimental Molecular Pathology*. 8, 75-89.
- Tagliavini, F. *et alii* (1992). A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion related encephalopathies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 184, 1398-1404.
- Taraboulos, A. *et alii* (1980). Acquisition of protease resistance by prion protein in scrapie infected cells does not require asparagine linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 87, 8262-8266.
- Taraboulos, A. *et alii* (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Molecular Biology of the Cell*. 3, 851-863.
- Taraboulos, A.; Scot, A. *et alii* (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH terminal targeting sequence of the prion protein inhibits formation of the scrapie isoform. *Journal of Cell Biology*. 129, 121-132.
- Telling, G.C. *et alii* (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*. 83, 79-90.
- Terry, L.A. *et alii* (2003). Detection of disease specific PrP in distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record*. 29, 387-392.
- Tew, J.G. *et alii* (1990). Follicular cells as accessory cells. *Immunology Reviews*. 117, 185-211.
- Thackray, A.M. *et alii* (2002). Chronic subclinical prion disease induced by low dose inoculum. *Journal of Virology*. 76, 2510-2517.
- Thackray, A.M. *et alii* (2003). Subclinical prion disease induced by oral inoculation. *Journal of Virology*. 77, 7991-7998.
- Thielen, C. *et alii* (2001). Human FDC express PrP^{Sc} in vivo and in vitro. *Developments on Immunology*. 8, 259-266.
- Thielen, C.; Melot, F.; Jolais, O.; Leclercq, F.; Tsunada, R.; Frobert, Y.; Heinen, E. e Antoine, N. (2001). Isolation of bovine follicular dendritic cells allows the demonstration of a particular cellular prion protein. *Cell and Tissue Research*. 306, 49-55.
- Thomzig, A. *et alii* (2003). Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Reports*. 4, 530-533.
- Tkachuk, M. *et alii* (1998). Crucial role of tumor necrosis factor receptor 1 expression on nonhematopoietic cells for B cell localization within splenic white pulp. *Journal of Experimental Medicine*. 187, 469-477.
- Tsai, B. *et alii* (2002). Retro-translocation of protein from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Reviews on Molecular and Cell Biology*. 3, 246-255.
- Turk, E. *et alii* (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *European Journal of Biochemistry*. 176, 21-30.
- Tykocinski, M.L. *et alii* (1996). Antigen presenting cell engineering. The molecular toolbox. *American Journal of Pathology*. 148, 1-16.
- VanKeulen, L.J. *et alii* (1999). Scrapie associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with scrapie. *Journal of Comparative Pathology*. 121, 55-63.

- VanKeulen, L.J. *et alii* (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Archives of Virology Supplement*. 16, 57-71.
- VanKeulen, L.J. *et alii* (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*. 110, 32-32.
- VanNiercp, K. e Groot, C. (2002). Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Seminars in Immunology*. 14, 251-257.
- Vey, M. *et alii* (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion protein in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93, 14945-14949.
- Vorberg, I. e Priola, S.A. (2002). Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 36775-36781.
- Vremec, D. e Shatman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen and lymph nodes. *Journal of Immunology*. 159, 565-573.
- Wadsworth, J.D.F.; Hill, A.F.; Joiner, S.; Jackson, G.S.; Clarke, A.B. e Collinge, J. (1999). Strain specific prion protein conformation determined by metal ions. *Nature Cell Biology*. 1, 55-59.
- Walsmsley, A. *et alii* (2003). The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 37241-37248.
- Weissmann, C. (1999). Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 3-6.
- Weissmann, C. *et alii* (2002). Transmission of prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99, 16378-16383.
- Weissmann, C.; Raeber, A.; Montrasio, F.; Heggi, I.; Frig, R.; Klein, M.A. e Aguzzi, A. (2001). Prions and the lymphoreticular system. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 356, 177-184.
- Wells, G.A.H. *et alii* (1996). *Bovine spongiform encephalopathy: the BSE dilemma*. (J. Gibbs (editor)). Página 28. Nova Iorque. Springer-Verlag.
- Wells, G.A.H. *et alii* (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Veterinary Record*. 31, 103-106.
- Wells, G.A.H. *et alii* (2003). Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Journal of General Virology*. 84, 1021-1031.
- Wells, G.A.H. e Hawking, S.A.C. (2003). Dados não publicados referidos em *European Commission Scientific Steering Committee*. Encontro de 6 e 7 de Março de 2003.
- Westaway, D.; Suliani, V.; Cooper, C.M.; Costa, M.D.; Neuman, S.; Jenny, A.L.; Detwiler, L. e Prusiner, S.B. (1994). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes and Development*. 8, 959-969.
- White, J. *et alii* (1999). Rab 6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *Journal of Cell Biology*. 147, 743-760.
- Witman, M.D. e Steinman, R.M. (1984). The anatomy of peripheral light microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node and Peyer's patch. *American Journal of Anatomy*. 70, 465.
- Williamson, R.A.; Peretz, D.; Smorochinsky, N.; Bartidas, R.; Serban, H.; Mehlhou, I.; DeArmand, S.J.; Prusiner, S.B. e Burton, D.R. (1996). Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93, 7279-7282.
- Yamakawa, M. e Imai, Y. (1992). Complement activation in the follicular light zone of human lymphoid tissues. *Immunology*. 76, 378-384.
- Ye, S. e Goldsmith, E.J. (2001). Serpins and other covalent proteases inhibitors. *Current Opinions on Structural Biology*. 11, 740-745.
- Young, J.W. e Steinman, R.M. (1996). The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem Cells*. 14, 376-387.
- Zanusso, G.; Casalone, C.; Acutis, P.; Bozetta, E.; Farinazz, A.; Gelati, M.; Fiorini, M.; Sunsy, M.; Monaco, S. e Caramelli, M. (2003). Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy. *Journal of General Virology*. 84, 1047-1052.
- Zerial, M. e MacBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews on Molecular Cell Biology*. 2, 107-117.