

Catarina Joaquina Pereira de Oliveira Pinto

O papel dos metais nas doenças priónicas

Universidade Fernando Pessoa

Porto | 2016

Catarina Joaquina Pereira de Oliveira Pinto

O papel dos metais nas doenças priónicas

Universidade Fernando Pessoa

Porto | 2016

Catarina Joaquina Pereira de Oliveira Pinto

O papel dos metais nas doenças priónicas

Catarina Joaquina Pereira de Oliveira Pinto

Projeto de Pós-Graduação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Fernanda Leal

Sumário

As doenças priônicas são um conjunto de patologias que afetam irreversivelmente o sistema nervoso central. Na despoletar destas doenças estão as proteínas infecciosas, os priões. Existem várias doenças que se inserem nesta categoria, no entanto pode-se destacar em particular a doença de Creutzfeldt-Jakob.

Metais como o cobre, ferro e manganês são metais cruciais e necessários aos processos fisiológicos. Existem vários mecanismos antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase, essenciais para combater o stress oxidativo na célula que por vezes é provocado por estes metais.

Atualmente pensa-se que os metais com atividade redox têm um papel importante na evolução das doenças neurodegenerativas. A interação entre os metais e as proteínas do sistema nervoso central mostra-se crucial no desenvolvimento ou ausência de neurodegeneração. Os agentes quelantes de metais podem desta forma ser usados como terapêuticas em doenças associadas a metais.

Palavras-chave: Prião; Doenças neurodegenerativas; Metais; Cobre; Ferro; Manganês

Abstract

The prion diseases are a group of diseases that irreversibly affects the central nervous system. At the onset of these diseases are infectious proteins, prions. There are several diseases that fall into this category, but we can highlight in particular the Creutzfeldt-Jakob disease.

Metals such as copper, iron and manganese metals are critical and required for physiological processes. There are several antioxidants mechanisms , such as superoxide dismutase and catalase, which are essential to combat oxidative stress in the cell which is sometimes caused by these metals.

Currently it is believed that the metals with redox activity play an important role in development of neurodegenerative diseases. The interaction between the metals and the central nervous system proteins shown to be crucial in the development or absence of neurodegeneration. The metal chelating agents may thereby be used as therapeutics in diseases associated with metals.

Keywords: Prion, Neurodegenerative diseases; Metals; Copper; Iron; Manganese

Agradecimentos

Nesta secção cabe-me agradecer a todos aqueles que acompanharam o meu percurso universitário.

Agradeço aos meus pais que desde sempre me apoiaram, e possibilitaram que o meu percurso académico fosse possível. Aos meus irmãos e avós quero agradecer todo o apoio que me deram ao longo desta caminhada. Querendo deixar aqui um enorme obrigada por acreditarem em mim, no que faço e ainda todos os ensinamentos que me transmitiram. Espero que o terminar desta etapa, possa de alguma forma retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que sempre me deram. A eles, dedico todo este trabalho.

Às minhas tias/tios e primos agradeço também por toda a disponibilidade e hospitalidade ao longo destes cinco anos, e o apoio que sempre demonstraram.

Ao José Marinho agradeço por todo o apoio e carinho que demonstrou em todos os momentos. Pela paciência que sempre teve e por me ajudar sempre que precisei.

Às minhas amigas agradeço todos os bons momentos que passamos ao longo desta caminhada. Pelos desabafos, pelas longas conversas, pela interajuda e ainda por todas as gargalhadas. Às minhas amigas que ao longo desta caminhada não puderam estar tão presentes, agradeço o apoio que sempre me deram.

À Professora Doutora Fernanda Leal agradeço toda a disponibilidade e orientação nesta reta final do meu percurso, foi sem dúvida um grande apoio no culminar deste percurso académico.

Por fim agradeço a todos os que me acompanharam nesta caminhada.

O meu muito obrigada a todos!

Índice

Sumário.....	I
Abstract.....	II
Agradecimentos	III
Índice de figuras	V
Índice de Tabelas	VI
Abreviaturas.....	VII
I. Introdução.....	1
II. As doenças priónicas.....	4
2.1. O prião	6
2.2. Doença de Kuru	8
2.3. Síndrome Gerstmann Straussler-Scheinker	9
2.4. Insónia familiar fatal.....	10
2.5. Doença de Creutzfeldt-Jakob.....	12
2.5.1. Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica	12
2.5.2. Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar	13
2.5.3. Doença de Creutzfeldt-Jakob adquirida	14
III. Os metais e as doenças priónicas.....	16
3.1. Cobre	18
3.2. Ferro	20
3.3. Manganês.....	22
IV. Terapêutica das doenças priónicas	24
4.1. PrP ^{Sc} como alvo da terapêutica.....	25
4.2. Oligômeros de PrP como alvo da terapêutica.....	28
4.3. PrP ^C como alvo da terapêutica	29
4.4. Imunoterapia.....	29
4.5. Quelantes de metais	30
V. Conclusão	33
VI. Bibliografia.....	34

Índice de figuras

Figura 1. Esquema da proteína prião	7
Figura 2. Representação das isoformas normais e patológicas da PrP. A PrPC é considerada a proteína prião na sua forma nativa.....	7
Figura 3. Mapa representativo das tribos afetadas	8
Figura 4. Interação esquemática da proteína com os metais	16
Figura 5. Formação de placas amilóides	17
Figura 6. Reação de Fenton	21
Figura 7. Possíveis terapêuticas das doenças priónicas	24
Figura 8. Estrutura do HPA-23.....	25
Figura 9. Estrutura do DS 500.....	25
Figura 10. Estrutura do PPS	26
Figura 11. Estrutura do Vermelho de Congo.....	26
Figura 12. Estrutura da Anfotericina B.	27
Figura 13. Estrutura da PAMAM (Adaptado de	27
Figura 14. Estrutura da Tetraciclina	28
Figura 15. Estrutura do Azul de metileno	29
Figura 16. Estrutura do Tacrolímus.....	29
Figura 17. Estrutura da Penicilina	31
Figura 18. Estrutura do CDTA.	31
Figura 19. Estrutura do CQ.....	32

Índice de Tabelas

Tabela 1. As doenças priónicas.	5
Tabela 2. Os efeitos que podem ser provocados pelo cobre.....	20
Tabela 3. Os efeitos que podem ser provocados pelo manganês.....	23

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CDTA	Ácido ciclohexileno-dinitrileno tetracético
CQ	Clioquinol
CR	Vermelho de Congo (do inglês <i>Congo Red</i>)
DCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob
DS 500	Sulfato de dextrano 500
eDCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
EEM	Encefalopatia espongiforme marta
EET	Encefalopatias espongiformes transmissíveis
eIF	Insónia fatal esporádica
fDCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
HPA-23	Heteropoli-anião 23
iDCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob iantrogénica
IFF	Insónia familiar fatal
OR	Repetição de octapéptido (do inglês <i>octapeptide repeat</i>)
PAMAM	Poliamido-amina
PK	Proteinase K
PMCA	Amplificação Cíclica de Proteínas Mal Dobradas (do inglês <i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i>)
PPS	Poli-sulfato de pentosano
PrP	Prião
PrP ^C	Prião na forma ubíqua
PrP ^{Res}	Prião resistente à proteinase K
PrP ^{Sc}	Prião scrapie
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
SGSS	Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase

Tf	Transferrina
TfR	Recetor de transferrina
vCJD	Doença Creutzfeldt-Jakob variante

I. Introdução

As doenças priónicas, também designadas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET), são um conjunto de doenças de cariz neurodegenerativo que podem incidir tanto na espécie humana como na espécie animal. Resultam na degeneração progressiva e/ou completa das células nervosas, traduzindo-se num estado debilitante e incurável, levando à morte. Após o indivíduo contrair a doença os sinais motores extrapiramidais (tremores, ataxia, mioclonia e instabilidade postural) vão ser afetados (Martin et al., 2011).

Os agentes causadores das EET são os priões. Os priões, ou PrP, são partículas infecciosas transmissíveis de natureza proteica, que se encontram presentes em muitos mamíferos. A função destas proteínas normais ainda não é completamente conhecida. No entanto, esta proteína normal pode converter-se em anormal ou infecciosa, designada por PrP^{Sc}. Esta mal formação deve-se à dobragem anormal dos priões, levando assim à ocorrência de danos cerebrais característicos da doença (Ferreira, 2006).

As doenças priónicas identificadas em humanos são a doença de Creutzfeldt-Jakob, a síndrome Gerstmann Straussler-Scheinker, a Insónia familiar fatal e a doença de Kuru. Destas, destaca-se em particular a doença de Creutzfeldt-Jakob (Wadsworth e Collinge, 2011).

A doença de Creutzfeldt-Jakob é a mais comum das doenças priónicas. A sua manifestação em idades abaixo de 40 anos é invulgar. Ainda assim, a sua incidência é muito baixa tratando-se de uma doença rara. Existem 4 tipos de variantes: a esporádica, a familiar, a iatrogénica e a variante. Esta doença apresenta um quadro de depressão com perda de memória evoluindo para um estado de demência e posteriormente a morte (Manix et al., 2015).

Atualmente a doença de Kuru encontra-se praticamente extinta. Após a sua descoberta, e de acordo com as investigações efetuadas, concluiu-se que esta teria origem num ritual efetuado na tribo Fore da Papuásia, Nova Guiné. O ritual consistia em ingerir partes de um cadáver por um parente próximo, ao longo da cerimónia fúnebre. Devido a medidas

O papel dos metais nas doenças priónicas

governamentais, conseguiu-se demover a tribo da prática destes rituais, levando à extinção da doença (Ferreira, 2006).

A síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker surge, em regra, mais cedo que a doença de Creutzfeldt-Jakob. Verificam-se sintomas piramidais e de demência. A frequência deste tipo de doença priónica é muito rara (Ferreira, 2006).

A Insónia familiar fatal é outra doença priónica que tem uma particularidade relativamente às outras, pois apresenta lesões limitadas a nível do tálamo. Ocorrem também estados de alucinações e posteriormente manifesta-se um estado de verdadeira demência (Ferreira, 2006).

Os metais têm vindo a apresentar grande importância no desenvolvimento de doenças priónicas. As proteínas têm a capacidade de se ligar aos metais. Metais como o cobre, zinco e manganês (metais bivalentes) ligam-se nas sequências repetidas de péptidos octavalentes na cadeia N-terminal do PrP. Ao ocorrer a ligação surgem mudanças estruturais e funcionais nos priões, que provocam alterações nos níveis dos metais. Desta forma, a capacidade celular antioxidante fica comprometida. Com este comprometimento da atividade antioxidante, ocorre stress oxidativo que está relacionado com o processo neurodegenerativo associado a estas doenças (Choi et al., 2006).

Os agentes quelantes de metais podem ser usados como terapêutica em doenças neurodegenerativas. O uso da terapia à base de agentes quelantes permite um aumento da fase de incubação da doença, sendo este um aspeto bastante positivo na terapêutica deste tipo de doenças. (Sigurdsson et al., 2003).

O desenvolvimento da revisão bibliográfica tem como principal objetivo abordar a importância dos metais nas doenças priónicas. Pretende-se, também clarificar quais as doenças priónicas e o conceito de prião e esclarecer questões relacionadas com cada tipo de doença, abordando sintomas, diagnóstico e etiologia da doença. Pretende-se ainda abordar a terapêutica por agentes quelantes de metais em doenças priónicas.

O papel dos metais nas doenças priónicas

A revisão bibliográfica foi efetuada com o auxílio da base de dados PubMed e consulta de livros. A pesquisa foi realizada em artigos publicados no período de 1982 a 2015. Foi também utilizado o programa EndNote. A pesquisa dos artigos foi efetuada entre setembro de 2015 e setembro de 2016.

II. As doenças priónicas

As doenças priónicas são consideradas doenças neurodegenerativas progressivas que podem afetar tanto humanos como animais. São essencialmente caracterizadas por longos períodos de incubação, perda neural, e falha de indução de uma resposta inflamatória pelo ser vivo afetado (Cdc, 2015).

Na tabela 1 estão resumidas todas as doenças priónicas, estando ainda, sub-divididas as que afetam os animais e as que afetam os humanos.

As doenças causadas por priões que se manifestam nos animais são a Scrapie, a Encefalopatia espongiforme bovina (EEB), a encefalopatia espongiforme marta (EEM) e a encefalopatia espongiforme felina. As doenças causadas por priões em humanos são a doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), a síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (SGSS), a Insónia familiar fatal (IFF) e a doença de Kuru (Tabela 1).

As doenças priónicas em humanos podem ser subcategorizadas em três tipos pela forma como a doença é contraída. Os subtipos são esporádico, genético e adquirido. Na primeira categoria podemos encontrar a doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica (eDCJ) e Insónia fatal esporádica (eIF). Pode, também ter causas genéticas e nesta divisão temos a doença de Creutzfeldt-Jakob Familiar (fDCJ), a SGSS e a IFF. Por fim a terceira subcategoria em que a doença é adquirida, com a doença iatrogénica de Creutzfeldt-Jakob (iDCJ) e a doença variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Tabela 1) (Imran e Mahmood, 2011).

O papel dos metais nas doenças priónicas

Tabela 1. As doenças priónicas (Adaptado de Imran e Mahmood, 2011).

Doença	Anfitrião	Etiologia	Ano de descrição
Doenças provocadas por priões em animais			
Scrapie	Ovelhas e gado	Infeção por priões. Origem desconhecida	Meados do século XVIII
Encefalopatia espongiforme marta	Martas	Infeção por priões. Origem em ovelhas e gado	1947
Encefalopatia espongiforme bovina	Gado	Infeção por priões. Origem desconhecida	1986
Encefalopatia espongiforme felina	Gatos	Infeção por priões. Origem encefalopatia espongiforme bovina	1990
Doenças provocadas por priões em humanos			
Kuru	Humano	Rituais de canibalismo	1957
Creutzfeldt-Jakob esporádica	Humano	Conversão espontânea de PrP ^C em PrP ^{Sc}	1920
Creutzfeldt-Jakob Familiar	Humano	Mutação no PrP	1924
Gerstmann-Straussler-Scheinker	Humano	Mutação no PrP	1936
Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	Humano	Infetados por priões de origem humana	1974
Insónia familiar fatal	Humano	Haplótipo 178N-129m PrP	1986
Creutzfeldt-Jakob variante	Humano	Infetado com priões de origem BSE	1996
Insónia fatal esporádica	Humano	Conversão espontânea ou mutação somática de PrP ^C em PrP ^{Sc}	1999
Prionopatia variável sensíveis à protease	Humano	Conversão espontânea ou mutação somática de PrP ^C em PrP ^{Sc}	2008

2.1. O prião

Os priões são agentes infecciosos que provocam as EETs. Estas doenças foram designadas desta forma pois podem ser transmitidas de animais para humanos e além disso, ocorre uma degeneração na forma de vacúolos, sendo uma das características neuropatológicas da doença (Prusiner, 1998).

No decorrer de diversas investigações sobre o prião, onde foram testados experimentalmente a sua resistência a procedimentos que atacam os ácidos nucleicos, resistência à inativação por calor, e o seu tamanho aparentemente pequeno, conclui-se que o prião é uma nova identidade infecciosa, pois apresenta propriedades diferentes dos vírus, viroides e plasmídeos (Prusiner, 1982).

O nome de prião foi referenciado pela primeira vez por Prusiner que, após uma contemplação sugeriu o termo "prion", devido a tratar-se de um agente proteico infeccioso. Ou seja, do inglês *proteinaceous and infectious*, **prion** (Prusiner, 1998).

O prião humano normal é constituído por 209 resíduos de aminoácidos. É sintetizado a partir de um precursor de 254 aminoácidos. O péptido é clivado tanto na porção N-terminal como no C-terminal, no retículo endoplasmático (Figura 1). Apresenta um péptido sinal (1-22), um domínio hidrofóbico (106-126), 3 α -hélices (compreendidas nos resíduos, 144-154, 173-194 e 200-228) que constituem cerca de 43% da estrutura, 2 folhas- β anti-paralelas (situadas entre os resíduos 128-131 e 161-164) e uma sequência sinal para a âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI). O GPI encontra-se ligado na posição 231 na extremidade C-terminal, permitindo que este se fixe na membrana extracelular. Existe ainda um domínio desenovelado no qual está incluído o domínio de repetição de octapéptido (OR), onde ocorrem repetições de uma sequência de oito resíduos de aminoácidos que têm capacidade de se ligar ao cobre fisiologicamente. Pode ainda ser feita referência a uns resíduos de histidina que se encontram fora desta zona mas que têm também a capacidade de se ligarem ao Cu^{2+} (Acevedo-Morantes e Wille, 2014).

O papel dos metais nas doenças priónicas

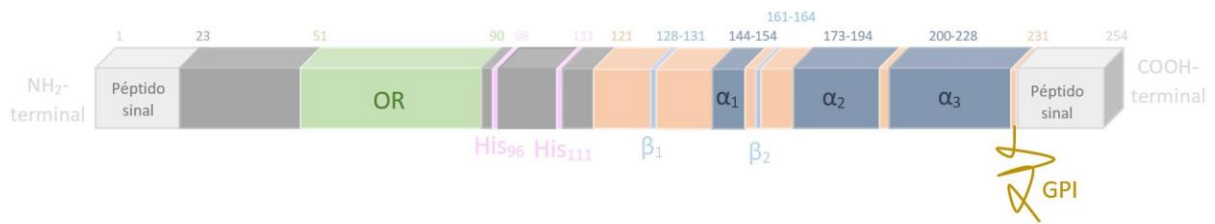


Figura 1. Esquema da proteína prião. **OR**- repetição de octapéptido; **His_{96/111}**- resíduos de Histidina; **β_{1/2}**- folhas beta; **α_{1/2/3}**- folhas alfa (Adaptado de Acevedo-Morantes e Wille, 2014).

Pressupõem-se que as EETs são causadas pela conversão da PrP ubíqua (PrP^C) na forma scrapie (PrP^{Sc}). A PrP^C é um componente normal da membrana das células dos mamíferos. Está presente maioritariamente no sistema nervoso central, no tecido linfático e nas junções neuromusculares. A PrP^C assume um papel importante nos processos neuronais como o ritmo circadiano, neuroproteção e neuroplasticidade.

As doenças priónicas encontram-se associadas à conversão da proteína PrP^C num confórmero insolúvel PrP^{Sc}, estando este último, associado ao desenvolvimento da doença (Figura 2) (Venneti, 2010).

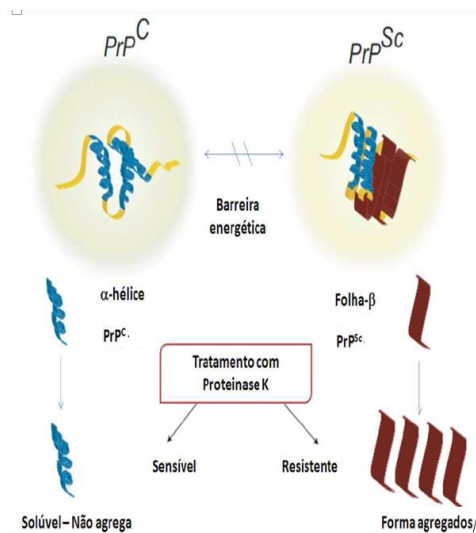


Figura 2. Representação das isoformas normais e patológicas da PrP. A PrP^C é considerada a proteína prião na sua forma nativa. A PrP^{Sc} está relacionada com a patologia (Adaptado de Venneti, 2010).

As perturbações que o prião pode provocar surgem devido ao mau enrolamento das folhas alfa e a um aumento do teor das folhas beta. Desta forma a PrP^{Sc} torna-se desta forma resistente à digestão com proteinase K (PK) e mais propenso à acumulação de

folhas beta no cérebro. Esta agregação dá origem a efeitos tóxicos nos neurónios que posteriormente resultam numa neurodegeneração irreversível. A acumulação lenta e progressiva da PrP^{Sc} no cérebro levanta poucas dúvidas relativamente ao seu papel no desencadeamento da neurodegeneração e da doença (Venneti, 2010).

2.2. Doença de Kuru

A doença de Kuru é considerada uma das doenças priónicas humanas que afetou essencialmente a tribo Fore da Papuásia, Nova Guiné. No entanto, para além da tribo de Fore também outras tribos foram afetadas mas em menor escala, como a tribo de Keiagana, Yate, Kaite entre outras (Figura 3) (Liberski, 2013).

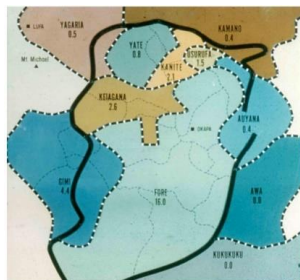


Figura 3. Mapa representativo das tribos afetadas (Adaptado de Liberski, 2013).

Pensa-se que a doença de Kuru apareceu pela primeira vez no século XX na aldeia de Uwami. A doença foi-se espalhando de forma lenta e infecciosa levando sempre à morte. Assim, as infeções por vírus lentos reconhecidas inicialmente em animais tornaram-se um problema real na medicina humana (Liberski, 2013).

“Kuru” na língua de Fore significa tremor. A pesquisa sobre a doença de Kuru iniciou-se em 1957 por D. Carleton Gajdusek e Vincent Zigas. Estes autores iniciaram a sua investigação estabelecendo limites geográficos, localizando quais as aldeias que tinham história de Kuru. Concluíram que das 172 aldeias 155 tiveram casos relatados (Alpers, 2008).

O canibalismo era praticado nesta região como um ritual de luto. O ritual consistia em ingerir partes de um cadáver por um parente próximo, ao longo da cerimónia fúnebre.

Os homens com idade superior a 6-8 anos participavam muito pouco nestes rituais. A doença de Kuru incidia assim essencialmente em mulheres e em crianças de ambos os sexos, afetando apenas 2% dos homens adultos. Estudos epidemiológicos constataram que não ocorre transmissão vertical nesta doença (Collinge et al., 2008).

Durante a progressão da doença ocorre um longo período de flutuação entre o início do seu curso clínico, estabelecimento da doença progressiva e por fim o culminar com a morte. Inicialmente, são manifestados sintomas prodrómicos como dor de cabeça, dores nos membros e articulações. Posteriormente, a principal característica é a ataxia cerebral progressiva, que se traduz na falta de coordenação de movimentos. Desta forma, com a evolução da doença os sintomas prodrómicos tendem a aparecer e a ataxia a aumentar. Aumenta a sensibilidade ao frio com calafrios. Nos exames *post mortem* realizados verificam-se alterações patológicas ao nível do tronco cerebral, cérebro, hipotálamo e córtex. As características fundamentais da doença são a perda e degeneração neuronal acompanhado de vacuolização, hipertrofia e proliferação dos astrócitos e ausência de inflamação (Collinge et al., 2008).

Em meados de 1950, as autoridades australianas proibiram a prática do endocanibalismo. Com esta medida ocorreu uma interrupção abrupta da transmissão da doença de Kuru. Com os pacientes jovens tornando-se progressivamente mais velhos, a doença foi considerada extinta. No entanto, tendo em consideração que o período de incubação da doença tem mais de 50 anos, no futuro poderão aparecer um número limitado de casos. A descoberta da doença de kuru abriu novas janelas para os domínios da medicina humana e foi fundamental para desmistificar a doença de Creutzfeldt-Jakob e a síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bem como a relevância que a encefalopatia espongiiforme bovina teve para a transmissão aos seres humanos. A transmissão da doença de Kuru foi uma das maiores contribuições para as ciências biomédicas do século XX (Liberski, 2013).

2.3. Síndrome Gerstmann Straussler-Scheinker

A síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker pertence ao grupo das EETs, sendo considerada uma doença autossómica dominante associada a mutações pontuais no gene

da proteína prião. É considerada uma doença rara e encontrada em apenas algumas famílias a nível mundial. Esta síndrome manifesta-se essencialmente entre os quarenta e sessenta anos de vida. A doença progride a um ritmo lento mas inexorável ao longo de sete ou mais anos (Pirisinu et al., 2016).

Tal como nas restantes doenças priónicas, ocorre também, uma acumulação da proteína anormal no cérebro. Este facto vai afetar várias capacidades do ser humano, manifestando uma marcha instável, disfunção cognitiva que pode não ser perceptível inicialmente. No desenvolver da doença é notado um aumento da lentidão do pensamento. Desta forma, ocorre um declínio das capacidades cognitivas gerais do indivíduo. Numa fase final manifesta-se uma ataxia incapacitante, onde o doente não consegue alimentar-se devido a uma grave descoordenação na deglutição e ainda dificuldades em comunicar (Mastrianni, 1993).

Apesar da síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker ser considerada uma encefalopatia espongiiforme transmissível, atualmente surgiram algumas dúvidas relativamente a esta classificação devido à falta de transmissão bem sucedida em várias formas da síndrome. Deste modo, a transmissão ineficiente de algumas formas da síndrome levou à possibilidade de esta ser considerada uma proteinopatia não transmissível (Pirisinu et al., 2016).

2.4. Insónia familiar fatal

A Insónia familiar fatal é uma doença priónica neurodegenerativa transmissível, considerada uma doença autossómica dominante. Ocorre então, uma substituição de uma asparagina pelo ácido aspártico no codão 178 do prião. Se no codão 129 estiver uma metionina em vez de uma valina, a doença executa um desenvolvimento mais rápido. O gene responsável foi encontrado em apenas 28 famílias em todo o mundo. Se apenas um dos pais tiver este gene, a probabilidade de transmissão para os filhos será de 50%. No entanto, também pode estar associada a uma causa esporádica em que ocorre o mau enrolamento da proteína e em que o fator desencadeante é desconhecido, sendo neste caso, designada de insónia esporádica fatal (Schenkein e Montagna, 2006).

O papel dos metais nas doenças priónicas

A doença manifesta-se em média cerca dos 50 anos. O intervalo em que ocorre a maioria dos casos é entre os 20 e os 61 anos. A duração normal da doença varia entre os 7 e os 36 meses, tendo uma duração média de 18 meses. Existem estudos que comprovam que o tempo médio de sobrevivência em pacientes com metionina no codão 129 é de aproximadamente 4 a 12 meses, enquanto no caso de existir uma valina o tempo irá aumentar para 15 a 21 meses (Ucfs, 2016).

Ao longo do desenvolvimento da doença existem várias manifestações neurológicas como degeneração talâmica, alterações no cerebelo e córtex cerebral. Verificou-se que à medida que a duração da doença aumenta a magnitude também aumenta. Estão associadas diversas características clínicas como insónias progressivas, alucinações, alguns eventos como taquicardia, hipertensão, hipertermia verificando-se o nível de catecolaminas elevado. Distúrbios de atenção, défice no sistema motor, alterações endócrinas e cognitivas são também fatores presentes quando já estamos perante um quadro de demência, que posteriormente vai levar à morte.

Desta forma, podemos dividir a doença em quatro estados. No primeiro estado, que ocorre ao longo de 4 meses, há manifestação de uma insónia progressiva e problemas psiquiátricos. Na segunda etapa ocorrem alucinações, pânico, sudorese e prolonga-se durante 5 meses. Nos 3 meses seguintes associados ao terceiro estado, a insónia já é total e ocorre perda de peso. Por fim o quarto estado dura cerca de 6 meses e é caracterizado por um quadro de demência, insónia total e morte súbita (Schenkein e Montagna, 2006).

A causa precisa da morte por Insónia familiar fatal não se encontra completamente esclarecida. No entanto, como em todas as doenças priónicas, a degeneração neural a longo prazo pode levar à morte. O sono é um fator extremamente importante, e a sua privação pode também levar à morte. Assim, pensa-se que com uma terapia agressiva para o tratamento sintomático da insónia podemos vir a prolongar o tempo de vida destes pacientes (Schenkein e Montagna, 2006).

2.5. Doença de Creutzfeldt-Jakob

A doença de Creutzfeldt-Jakob etiologicamente pode ser dividida em três formas: a doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica (eDCJ), a doença de Creutzfeldt-Jakob familiar ou genética (fDJC) e a doença de Creutzfeldt-Jakob adquirida, que se encontra subdividida em iatrogénica (iDCJ) e variante (vDCJ). Independente da etiologia, a patogénese está sempre associada à formação e acumulação da PrP^{Sc}.

Podemos presumir, relativamente à etiologia que a eDCJ resulte da conversão espontânea de PrP^C em PrP^{Sc}. No caso da fDJC deve-se a mutações do gene PRPN na linha germinativa. No que diz respeito à DCJ adquirida, a aquisição da PrP^{Sc} faz-se por via iatrogénica ou por ingestão de carne bovina contaminada (Collins et al., 2004).

2.5.1. Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica

A eDCJ foi descrita pela primeira vez em 1920 e é a forma clínica mais frequente correspondendo a 85% do total de casos registados (Chen e Dong, 2016).

A etiologia da eDCJ é desconhecida. No entanto, suspeita-se que seja resultado de uma mutação somática ou de uma conversão estocástica, que converte a PrP^C rica em α -hélice numa proteína amiloidogénica a PrP^{Sc}, que se polimeriza formando depósitos amiloides, contribuindo para o início da doença.

A doença surge igualmente em ambos os sexos, e o pico de início ocorre entre as 60 e os 69 anos. Desde o início dos sintomas até à morte decorrem em média 4 a 5 meses.

Os sintomas clínicos que se manifestam são a demência progressiva, acompanhada por alterações da função visual e cerebelo, mioclonias, disfunções a nível piramidal e extrapiramidal.

A evolução clínica da eDCJ pode ser dividida em 3 estados sequenciais. A primeira etapa tem uma duração de cerca de 9 semanas. Nesta fase, os pacientes experimentam

sintomas neurológicos e psiquiátricos, como tonturas, vertigens, dor de cabeça, depressão ansiedade e nervosismo. No entanto, podem ainda experimentar outros sintomas menos frequentes como, fadiga, perturbações a nível do sono e perda do apetite. A segunda fase, que se prolonga em média durante 10 semanas, é definida pela ocorrência de uma síndrome neurológica com alteração das funções corticais superiores, distúrbios visuais e perdas de equilíbrio. Nesta fase, é de notar que as atividades diárias já se encontram comprometidas. Na terceira e última fase, com uma duração média de 14 semanas, verifica-se mioclonia e demência grave (Wieser et al., 2006).

Em 2001 o Comité de Investigação Japonesa inclui o quarto e quinto estado. O quarto estado define-se como uma redução do movimento e no quinto e último estado manifesta-se o mutismo acinético (Wieser et al., 2006).

2.5.2. Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar

Os casos da fDCJ estão associados a mutações pontuais ou inserção a nível do gene do prião a ser expresso. Mais de 20 mutações têm sido descritas. No entanto, a mais comum é a substituição de um aminoácido no codão 200. Desta forma, todas as mutações que são confirmadas como patogénicas irão contribuir para a destabilização da PrP^C, predispondo à sua agregação molecular (Wieser et al., 2006).

A fDCJ surge um pouco mais cedo do que a eDCJ, uma vez que se manifesta no intervalo dos 50 a 60 anos. No entanto, o tempo de sobrevivência ronda apenas os 6 meses, havendo registos de sobrevivência até 41 meses (Glatzel et al., 2003).

O quadro sintomático é similar ao encontrado na eDCJ, nomeadamente sintomas depressivos, variações de humor, falhas de memória, retração social e perda de interesse. No entanto, estes sintomas vão depender do tipo de mutação envolvida.

Nas primeiras semanas o doente apresenta instabilidade na marcha e falhas na coordenação motora. Mais tarde manifesta-se uma visão turva e até mesmo cegueira, rigidez dos membros e incontinência (Wieser et al., 2006).

2.5.3. Doença de Creutzfeldt-Jakob adquirida

A doença de Creutzfeldt-Jakob adquirida divide-se em duas formas, a iDCJ e vDCJ, tendo as duas em comum o facto de serem adquiridas fisicamente.

A iDCJ é adquirida durante procedimentos médicos e corresponde a uma baixa percentagem de casos. As duas formas mais frequentes de aquisição de iDCJ são os transplantes de tecidos, fluidos e órgãos humanos infetados ou ainda a contaminação por instrumentos cirúrgicos. O primeiro caso do qual há registo foi em 1974 em que um paciente recebeu um transplante de córnea de um dador infetado. Em 1997, a WHO elaborou um relatório onde estavam descritas uma série de recomendações com vista à minimização deste tipo de transmissão.

O período de incubação e manifestações clínicas da iDCJ dependem do tipo de transmissão. O caso em que o período de incubação foi mais curto demorou 1 a 3 anos e o mais longo pode durar até 42 anos.

No caso da vDCJ existe uma ligação zoonótica à BSE. A BSE foi identificada em 1986 em Inglaterra, sendo observada no gado. Pensa-se que a infeção do gado bovino despoletou da alimentação à base de suplementos proteicos constituídos por carne e osso de gado bovino contaminado com PrP^{Sc}. Em 1988, foi proibida a alimentação de ruminantes por estas proteínas. O pico da BSE deu-se em 1992/1993 e a partir daí, os casos diminuíram. Os primeiros casos de vDCJ foram registados em 1996. Pensa-se que todos estiveram expostos à BSE após a ingestão de carne bovina contaminada (Salvador, 2014).

A vDCJ apresenta um período de incubação de 10-16 anos. O início sintomatológico ocorre em média aos 28 anos. No entanto, existem casos registados dos 16 aos 51 anos. A duração média da doença ronda os 14 meses (Salvador, 2014).

Inicialmente, grande parte dos pacientes manifesta sintomas como ansiedade, insónia que normalmente são associados a sintomatologia psiquiátrica. Aos 2 meses aproximadamente, 60% apresenta distúrbios neurológicos. Aos 4 meses, ocorrem

O papel dos metais nas doenças priónicas

distúrbios na marcha, tremor e discurso lento. Por fim aos 6 meses ocorrem movimentos involuntários, ataxia e comprometimento cognitivo. A demência desenvolve-se tardiamente e a morte geralmente ocorre já com o paciente num estado de mutismo acinético (Salvador, 2014).

III. Os metais e as doenças priónicas

O desequilíbrio da homeostasia dos metais no cérebro e o stress oxidativo associado aos metais com atividade redox são um fator desencadeante da neurotoxicidade em diversas doenças neurodegenerativas.

Metais como o cobre, ferro e manganês são metais cruciais e necessários aos processos fisiológicos. Existem vários mecanismos antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, essenciais para combater o stress oxidativo na célula que por vezes é provocado por estes metais. No entanto, se este sistema de proteção for comprometido irão ocorrer danos neurológicos irreversíveis (Figura 4) (Choi, 2007).

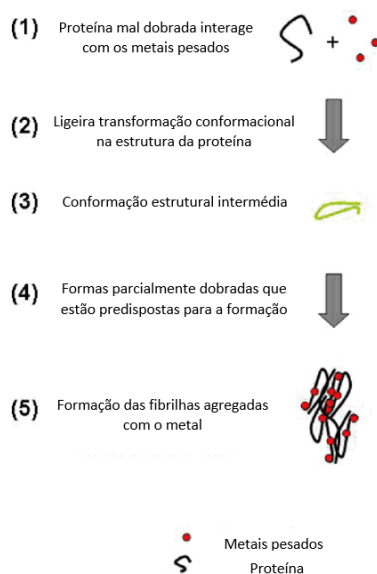


Figura 4. Interação esquemática da proteína com os metais (Adaptado de Choi, 2007).

Neste grupo de doenças ocorre uma reação anormal quando os metais com atividade redox, como o Cu^{2+} ou Fe^{3+} se encontram livres. Ocorrendo a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). A formação destes radicais pode desempenhar um importante papel nas patologias associadas ao sistema nervoso central (SNC). Por sua vez, quando o cobre quebra a sua ligação com a PrP^{C} , vai exercer danos oxidativos no cérebro, e ainda a interação que ocorre entre o manganês e a PrP^{C} vai dar origem à formação de PrP^{Sc} posteriormente à sua agregação em placas (Figura 5) (Brown, 2005).

O papel dos metais nas doenças priónicas

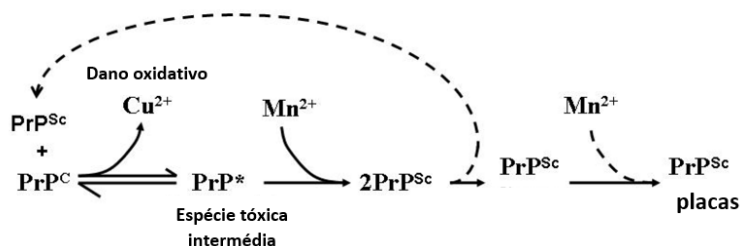


Figura 5. Formação de placas amilóides (Adaptado de Brazier et al., 2014).

O sistema nervoso, encéfalo, medula espinal e nervos periféricos são bastante ricos em metais. Os efeitos biológicos dos metais estão ligados às suas propriedades químicas. Metais de transição como cobre, ferro e manganês catalisam reações redox dentro dos sistemas biológicos. O zinco é um metal nutriente que, em doses elevadas, paradoxalmente, também promove a toxicidade oxidativa.

Atualmente, tem havido um grande interesse no papel de metais de transição no stress oxidativo e nas doenças neurodegenerativas. Desde que há uma associação bem descrita entre a PrP e cobre, têm-se especulado que as interações de metal e stress oxidativo podem, como em outras doenças neurodegenerativas, ser fundamentais para as doenças de príão.

O principal evento em todas as doenças priónicas é a alteração na conformação da PrP^C, constituído maioritariamente por alfa hélices helicoidais, em PrP^{Sc} que é maioritariamente constituído por folhas beta. Os depósitos de PrP^{Sc} no parênquima cerebral são considerados o principal fator de neurotoxicidade.

A PrP^C, tal como outras glicoproteínas, é sintetizado por péptidos sinais N- e C-terminal, e é translocado para o retículo endoplasmático onde ocorre uma co-tradução. O péptido sinal N-terminal é clivado após a translocação breve, enquanto o péptido sinal C-terminal é substituído e ocorre a pré montagem da ancora GPI, numa reação de transaminação. De seguida, as ligações dissulfureto e os glicanos ricos em manose são associados e a proteína atravessa o aparelho de Golgi até à membrana plasmática. A alteração da conformação da PrP^C em PrP resistente à proteinase K (PrP^{Res}) torna-se resistente à degradação pela PK. Na maioria dos casos, o fragmento resistente (C-

terminal) à PK é suficiente para transmitir a infecção e induzir a neurotoxicidade (Brown, 2005).

3.1. Cobre

O cobre é um oligoelemento importante que é necessário às enzimas essenciais. Desempenha papéis cruciais na formação da hemoglobina, no metabolismo de drogas, no metabolismo dos hidratos de carbono, na síntese de catecolaminas, entre outras. O aporte do cobre nos humanos é assegurado através da dieta. No entanto, devido à sua atividade redox, pode também levar à geração de ROS. Portanto, a absorção celular, armazenamento, bem como exportação de cobre tem de ser fortemente regulada, a fim de garantir o fornecimento de cobre suficiente para a síntese de enzimas, mas também para prevenir o stress oxidativo induzido pelo cobre (Scheiber et al., 2014).

No cérebro, o cobre é bastante importante para o seu normal desenvolvimento. Além disso, tanto a deficiência de cobre, como o excesso de cobre, pode afetar seriamente as funções cerebrais. Portanto, este órgão possui amplos mecanismos que regulam o seu metabolismo.

A proteína prião tem sido implicada na proteção contra a apoptose e stress oxidativo, na sinalização transmembranar, bem como na formação das sinapses. Vários estudos sugerem um papel para a PrP na proteção contra a toxicidade induzida pelo cobre e na homeostase celular normal.

A sequência primária da proteína prião contém na sua composição octapeptídeos que se localizam na metade N-terminal. É uma parte altamente conservada da proteína, sendo também referenciada como zona de ligação do cobre à proteína. Em 1992 Pan, e a sua equipa efetuaram um método de purificação do prião a partir do cérebro de um hamster. A técnica tinha por base a cromatografia de afinidade ao metal imobilizado. Desta forma, o cobre encontra-se imobilizado na coluna e as proteínas de ligação de cobre ficaram ligadas à placa. Conseguiram ainda concluir que a proteína prião que não tem a zona N-terminal (ausente por clivagem), não se ligou na coluna.

O papel dos metais nas doenças priónicas

A ligação do cobre à proteína prião pode originar algumas consequências biológicas para o organismo. Ao ocorrer a ligação, a proteína prião pode sequestrar o cobre dentro das células. A ligação do cobre ao prião pode inibir interações anormais da proteína com outras proteínas como o plasminogénio, evitando assim a interação. Assim, a ligação do cobre ao prião demonstra um efeito protetor.

A teoria de que a ligação do cobre ao prião exerce um efeito protetor é corroborada pelo estudo em que células foram cultivadas a partir de murganhos às quais faltava a expressão da proteína prião. Estas células mostraram um aumento da sensibilidade para a toxicidade do cobre e do superóxido. No entanto, quando células do neuroblastoma foram alteradas para expressar níveis altos de prião, apresentaram-se mais resistentes à toxicidade do cobre. Se por sua vez, elas fossem infetadas com o tremor epizoótico, a resistência que estava aumentada era perdida. Ou seja, há uma evidência que sugere que a conversão do PrP^C em PrP^{Sc} provoca uma perda de proteção antioxidante para as células infetadas (Scheiber et al., 2014).

Outro estudo sobre metais e a proteína prião em cérebros de pacientes com DCJ, mostrou que os níveis de cobre se encontraram diminuídos. Para além disso, as proteínas purificadas a partir dos mesmos cérebros infetados encontraram-se ausentes da atividade da SOD, que em cérebros controlo era detetada. A SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio, tornando-se assim importante na defesa antioxidante da maioria das células. Estes resultados mostram que as alterações na defesa antioxidante podem ocorrer durante a doença do prião, diminuindo a proteção das regiões sinápticas do stress oxidativo (Brown, 2002).

As funções de PrP^C como um tampão de cobre, ajudam a manter a integridade dos neurónios no ambiente rico em cobre do sistema nervoso central. As células cultivadas infetadas com PrP^{Sc} são mais suscetíveis ao stress oxidativo e exibem uma redução significativa na capacidade de se ligar cobre apesar de manter os níveis de PrP normais. Além disso, uma perda dessa função resultaria em perturbações neuronais devido à atividade redox não regulada, talvez contribuindo para a morte neuronal nas EET (Millhauser, 2004).

O papel dos metais nas doenças priónicas

As principais conclusões de variados estudos sobre o efeito do cobre no PrP, podem ser resumidas no seguinte quadro (Tabela 2).

Tabela 2. Os efeitos que podem ser provocados pelo cobre (Adaptado de Choi, 2007).

Efeitos provocados Cobre
Indução do gene de PrP
Metabolismo de PrP
Promove a agregação de PrP
Inibe a formação de fibrilhas
Inibem a conversão infecciosa
Formação de PrP resistente à PK
Atividade antioxidante
Estabiliza o PrP

3.2. Ferro

O ferro aumenta no cérebro durante a primeira semana de vida, sofre uma quebra e posteriormente, volta a aumentar drasticamente até à terceira década de vida. O ferro é um dos metais mais importante para a sobrevivência humana. O ferro não se encontra na forma livre nos sistemas fisiológicos, estando sempre ligado a várias proteínas e enzimas. É particularmente importante porque está envolvido em funções biológicas críticas, incluindo a síntese de proteínas e a replicação do ADN.

A homeostasia do ferro no cérebro é vital para o seu normal funcionamento, para a síntese de neurotransmissores, formação de mielina, formação das células dendríticas, para processos enzimáticos necessários para a célula obter energia e ainda produção de ATP na mitocôndria. Se ocorrer uma desregulação, em que há aumento dos níveis de ferro no cérebro, ocorrem fenómenos de stress oxidativo resultantes em danos moleculares, peroxidação lipídica, agregação de proteínas, e morte neuronal. Se por sua vez os níveis de ferro se encontrarem deficientes, ocorre debilidade na síntese de mielina, fragilidade de neurotransmissão e restrições energéticas. Desta forma, pode-se concluir que a não homeostasia do ferro leva a problemas de neurotoxicidade e neurodegeneração.

O papel dos metais nas doenças priónicas

Sob condições normais, a homeostase celular de ferro é mantida por um conjunto de proteínas reguladoras de ferro que respondem a níveis de ferro intracelulares, regulando a sua expressão. Em condições de deficiência de ferro, as proteínas de absorção de ferro, transferrina (Tf) e recetor de transferrina (TfR), estão reguladas positivamente, e a ferritina, proteína de armazenamento de ferro, é regulada negativamente (Singh et al., 2009).

Uma regulação apertada de ferro celular é importante, uma vez que o ferro não é apenas um componente essencial das enzimas e proteínas necessárias para o crescimento neuronal e função ótima, mas também se pode tornar tóxico, devido à sua capacidade de transformação em dois estados de oxidação, o ferro férrico (Fe^{3+}) e o ferro ferroso (Fe^{2+}). Em condições em que a ferritina é incapaz de regular o ferro, pode ocorrer um aumento do ferro iónico, podendo desta forma ocorrer danos oxidativos induzidos por estes iões. Assim, a alteração da homeostase de ferro cerebral em cérebros doentes é suscetível de induzir neurotoxicidade significativa (Singh et al., 2009).

Reações redox que geram radicais livres de oxigénio são catalisadas por metais de transição, tais como ferro, cobre e manganês. O ferro é capaz de converter H_2O_2 no radical HO pela reação de Fenton, e ciclos redox de ferro entre os seus estados de valência Fe^{2+} e Fe^{3+} , podendo levar à formação de uma cascata de radicais livres e danos de tecidos consequente (Figura 6).



Figura 6. Reação de Fenton (Adaptado de Brazier et al., 2014).

A interação de PrP^{C} com ferro é relativamente recente. O significado fisiológico desta associação está a ser estudado mas tudo indica que a PrP^{C} desempenhe um papel funcional na absorção e transporte do ferro celular. Desta forma, sabendo que a conversão da PrP^{C} em PrP^{Sc} é o principal evento de todas as doenças priónicas, e a afinidade do ferro para a PrP^{C} , conclui-se que ao ocorrer esta mudança conformacional a PrP^{Sc} se torne inacessível ao ferro, o que por sua vez vai diminuir os níveis de ferro intracelulares. A alteração do estado do ferro no cérebro aparece cedo no processo da

doença, concomitante com o aparecimento de PrP^{Sc} e não é um resultado de doença em fase terminal.

3.3. Manganês

A PrP influencia a absorção de manganês e protege contra o stress oxidativo e apoptose induzida pelo manganês. Várias correntes sugerem que a sobrecarga de manganês poderia desempenhar um papel em doenças de priões.

O manganês aumenta os níveis intracelulares de PrP e induz o enrolamento incorreto. Altos níveis de manganês são detetados no sistema nervoso central e no sangue de humanos e animais afetados por doenças de priões.

Existem estudos que através da técnica de Amplificação Cíclica de Proteínas Mal Dobradas (PMCA), mostram que o manganês pode ser utilizado na formação da PrP^{Sc} através da PrP^C. Outra investigação que teve como base leveduras incubadas num meio suplementado com manganês verificou produção de PrP^{Res}. Pode ser referido outro estudo feito aos astrócitos de ratos expostos ao manganês por períodos prologados de tempo que também induziram a forma PrP^{Res} (Choi et al., 2006).

In vitro a PrP^C recombinante, quando em contacto com o manganês tem tendência a ligar-se, e quando a proteína é redobrada ocorrendo o aparecimento de PrP^{Res}. Apesar destas formas não representarem patogenicidade, se ocorresse ligação com um metal diferente potencialmente pode ocorrer a alteração da estrutura da PrP^C para PrP^{Sc}. Quando as PrP^C foram dobrados na presença do manganês mantiveram a sua atividade SOD, ou seja, atividade antioxidante semelhante à que exercem quando ligadas ao cobre, no entanto numa menor extensão. Desta forma, a interação do manganês com a proteína prião leva a concluir que este facilita a alteração conformacional do prião para a sua forma infecciosa.

Os efeitos do manganês na PrP têm sido alvo de várias investigações (Tabela 3).

O papel dos metais nas doenças priónicas

Tabela 3. Os efeitos que podem ser provocados pelo manganês (Adaptado de (Choi, 2007).

Efeitos provocados pelo Manganês
Formação de PrP resistente à PK
Promove a agregação do PrP
Promove a formação de fibrilhas

IV. Terapêutica das doenças priónicas

Apesar de já se encontrarem esclarecidos alguns funcionamentos e processos das doenças priónicas, ainda existem alguns mecanismos enigmáticos na patogénese do prião, o que por sua vez, tem dificultado bastante o desenvolvimento de terapêuticas realmente eficazes. No entanto, existem alguns conceitos já definidos, como por exemplo o facto dos priões não necessitarem de ácidos nucleicos nem outros co-fatores para transmitir a doença (Panegyres e Armari, 2013).

Sabe-se que as doenças neurodegenerativas têm pontos em comum. Um deles é a alteração conformacional das proteínas que aparenta ser um mecanismo genérico na patogénese das doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson. A transmissibilidade é um aspeto exclusivo das doenças priónicas (Panegyres e Armari, 2013).

Existem várias propostas de estratégias terapêuticas, principalmente dirigidas à prevenção da conversão de PrP^C a PrP^{Sc}, imunoterapia e agentes quelantes. No esquema seguinte são apresentadas algumas das abordagens terapêuticas (Figura 7).



Figura 7. Possíveis terapêuticas das doenças priónicas (Adaptado de Forloni et al., 2013).

4.1. PrP^{Sc} como alvo da terapêutica

Uma das abordagens a esta terapia é procurar estratégias baseadas na inibição da conversão da PrP^C em PrP^{Sc} e também uma interação direta com a PrP^{Sc}. Um dos métodos base para rastrear drogas anti-prião estuda a ligação entre os agregados de PrP^{Sc} e a sua redução de produção em culturas de células infetadas. Esta associação é corroborada pelo facto já referido anteriormente, que a PrP^{Sc} se encontra associado à manifestação da doença. De seguida, serão abordados alguns compostos que permitem atuar neste alvo (Forloni et al., 2013).

Os poli-aníões como o heteropoli-anião 23 (HPA-23) (Figura 8), sulfato de dextrano 500 (DS 500) (Figura 9), o poli-sulfatode pentosano (PPS) (Figura 10) e a heparina, têm a capacidade de se ligar ao prião e evitar a acumulação do PrP^{Sc}. *In vitro*, têm a capacidade de reduzir permanentemente o teor de PrP^{Sc} em células infetadas. *In vivo*, alguns dos compostos poli-sulfatados quando administrados pouco após a inoculação, retardam o aparecimento da doença. No caso do HPA-23, quando administrado pouco após a infeção, conseguiu prolongar significativamente a sobrevivência dos animais. Desta forma, pensa-se que o HPA-23 interfere na replicação do PrP^{Sc} na fase inicial. No entanto, a toxicidade deste composto tem limitado a sua utilização terapêutica. O DS 500 mostrou-se mais eficiente, no entanto, também tem propriedades tóxicas para o organismo. O poli-anião que se mostrou melhor candidato terapêutico foi o PPS (Forloni et al., 2013).

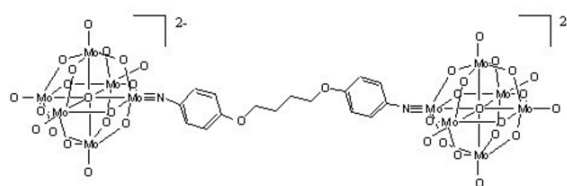


Figura 8. Estrutura do HPA-23 (Adaptado de Içoz, 2008).

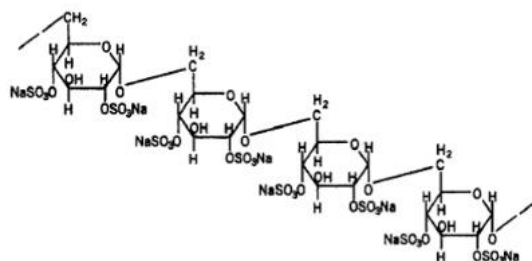


Figura 9. Estrutura do DS 500 (Adaptado de Içoz, 2008).

O papel dos metais nas doenças priônicas

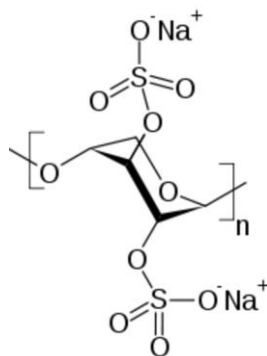


Figura 10. Estrutura do PPS (Adaptado de Minikel, 2012).

O Vermelho de Congo (CR) (Figura 11) é utilizado como indicador dos ácidos minerais livres, apresentando uma coloração vermelha em meio alcalino e azul em meio ácido. O CR tem capacidade de inibir a acumulação de PrP^{Res} e PrP^{Sc}, atrasando ligeiramente o aparecimento dos sintomas. No entanto, mostrou-se um composto altamente tóxico e por isso ao chegou à fase dos ensaios clínicos (Forloni et al., 2013).

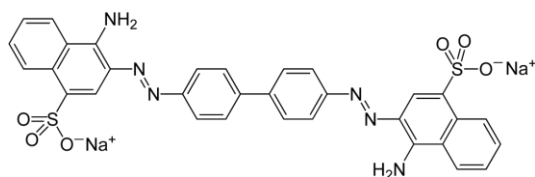


Figura 11. Estrutura do Vermelho de Congo (Adaptado de (Minikel, 2012)).

A Anfotericina B (Figura 12) pode ser considerada outra opção terapêutica. Os medicamentos comercializados com esta substância ativa são Ambisome®, Amphocil®, Fungizone®. É um antibiótico antifúngico produzido pela estirpe *Streptomyces nodosus* MS-8209, tendo propriedades antifúngicas idênticas ao fármaco original mas apresenta maior solubilidade e menor toxicidade. Este fármaco atua por inibição da conversão da PrP^C em PrP^{Sc}, estando provavelmente relacionado com alterações físico-químicas. A anfotericina B é um dos únicos fármacos anti-prião que prolongam a sobrevivência quando administrado em fases posteriores da infecção. No entanto, quando os animais são tratados após o aparecimento de sintomas clínicos nenhum efeito é notado. Quando testado em humanos não mostrou efeitos benéficos, pois não foi possível efetuar um tratamento prolongado devido à toxicidade. O desenvolvimento de novos análogos da

O papel dos metais nas doenças priônicas

anfotericina B melhorou os aspectos toxicológicos, mas estes compostos não chegaram ao estágio clínico (Forloni et al., 2013).

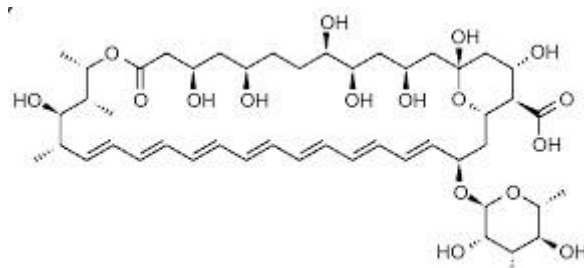


Figura 12. Estrutura da Anfotericina B (Adaptado de (Pubchem, 2015)).

As poliaminas são moléculas de natureza poli-catiônica, que três horas após serem administradas promovem a remoção de PrP^{Sc} dos lisossomas e endossomas. Esta descoberta indica que as poliaminas ramificadas têm capacidade de interromper rapidamente e inibir a formação de uma nova proteína patológica. A toxicidade intrínseca destes compostos inviabiliza a sua utilização terapêutica. No entanto, estudos recentes indicam a quaternização como uma possibilidade eficaz para o desenvolvimento de poliaminas ramificadas não tóxicas com atividade bastante potente. Um exemplo de uma poliamina é a poliamido-amina (PAMAM) (Figura 13) (Forloni et al., 2013).

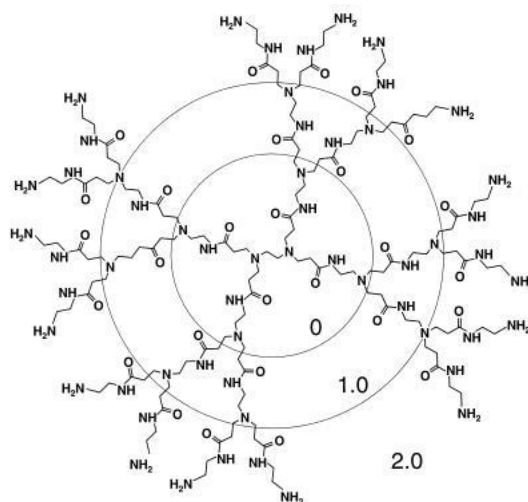


Figura 13. Estrutura da PAMAM (Adaptado de (Supattapone et al., 1999)).

As tetraciclinas (Figura 14) foram os compostos que mostraram maior atividade terapêutica associada também a um perfil de segurança bastante positivo e ainda um

bom índice de passagem da barreira hematoencefálica. As tetraciclina têm a capacidade de se ligarem às fibras amilóides perturbando a sua estrutura e impedindo que se formem mais complexos. Mostraram em culturas de células a sua capacidade de inibição de morte neuronal. Recentemente um efeito curativo das tetraciclina foi demonstrado por tratamento de animais infetados com tremor. Além disso, a atividade anti-amiloidogénica das tetraciclina foi testada em vários modelos de doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, apresentando resultados promissores (Forloni et al., 2013).

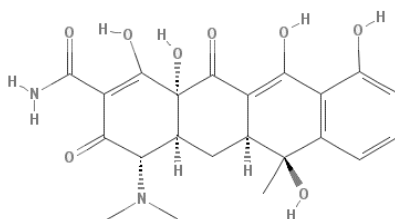


Figura 14. Estrutura da Tetraciclina (Adaptado de (Pubchem, 2011)).

4.2. Oligômeros de PrP como alvo da terapêutica

Os oligômeros de PrP são considerados a forma solúvel mais reduzida de PrP^{Sc}, agregados estes capazes de induzir a neurodegeneração e continuarem a propagação da doença. Assim, a oligomerização tornou-se um alvo para os compostos anti-prião.

A interação direta do Azul de metileno (Figura 15), componente bem conhecido, e o PrP recombinante está a ser testado na doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas. Um estudo *post-mortem* de indivíduos com EET, verificou que continham no cérebro oligômeros de PrP mesmo após serem expostos a uma infusão de poli-sulfato de pentosano. No entanto, houve uma redução do índice de oligômeros comparativamente aos casos em que não tinham sido expostos ao tratamento. Ainda assim não se verificou nenhuma correlação com a eficácia clínica do tratamento (Forloni et al., 2013).

anticorpos para PrP^C diminuem e impedem a transformação em PrP^{Res}. A imunização passiva e ativa estimula os anticorpos a induzir a fagocitose, perturba os agregados peptídicos, mobiliza péptidos solúveis e tóxicos e estimula a imunidade mediada por células. Fragmentos de anticorpos monovalentes permitem evitar a oligomerização da proteína prião, sugerindo que a tolerância pode ser superada através da imunização de PrP fundido com enterotoxinas bacterianas (Panegyres e Armari, 2013).

4.5. Quelantes de metais

Os metais orientados para esta abordagem são o cobre, ferro e manganês. O envolvimento dos metais, particularmente o ferro, o stress oxidativo e a agregação de proteínas tornam a terapia de quelatação teoricamente uma boa opção. Esta teoria tem por base a capacidade dos compostos quelantes sequestrarem os metais com atividade redox, formando assim um complexo de metal não tóxico e de fácil excreção, impedindo que ocorra a atividade/reação de Fenton, evitando possíveis danos secundários (Brazier et al., 2014).

Foram feitos estudos sobre quelantes seletivos destinados a agirem terapêuticamente perante a acumulação de cobre e manganês no cérebro. Resultaram em sobrevivências significativas em animais, mas no entanto, não foram registadas terapias de combinação até à data, o que torna esta opção um pouco volátil. A penicilina (Figura 17), um quelante do cobre, quando testada num rato com doença priónica atingiu aproximadamente um aumento de 10% para o tempo de sobrevivência comparado com ratos controlo. O ácido ciclohexileno-dinitrileno tetracético (CDTA) (Figura 18), quelante do manganês, também se manifestou na mesma proporção que o quelante anterior. Assim, em ambos os estudos, conclui-se que os metais não são removidos nem especificamente nem completamente (Brazier et al., 2014).

O papel dos metais nas doenças priônicas

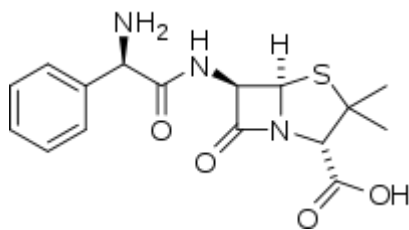


Figura 17. Estrutura da Penicilina (Adaptado de (Pubchem, 2016c)).

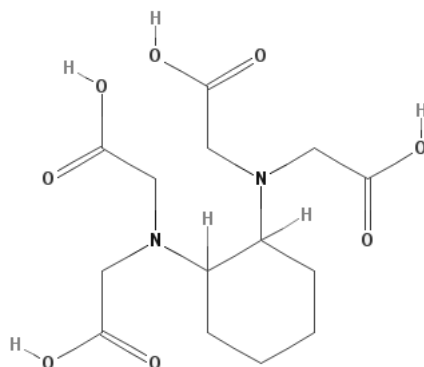


Figura 18. Estrutura do CDTA (Adaptado de (Pubchem, 2016a)).

O clioquinol (CQ), um quelante de cobre/zinco de baixa afinidade, demonstrou um benefício considerável na prevenção da formação de placas. Foi testado como agente terapêutico na atenuação de metais em modelos animais de EET. Registrou-se um aumento de 60% de período de sobrevivência para ratos infetados por priões e tratados por via oral com 7,5mg/kg de CQ em doses diárias, quando comparados com controles não tratados. Desta forma, pensa-se que o CQ é capaz de manter a função normal do cérebro, auxiliando na manutenção do metal, mantendo assim a homeostasia. No entanto, enquanto os efeitos benéficos têm sido observados em ratinhos inoculados por via intraperitoneal, o benefício ainda não foi reportado para os ratinhos tratados com CQ inoculados por via intracerebral (Brazier et al., 2014).

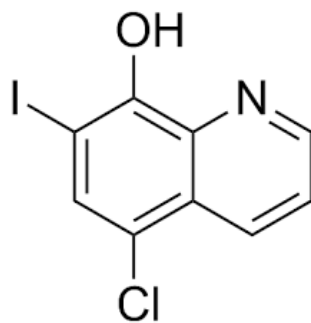


Figura 19. Estrutura do CQ (Adaptado de (Pubchem, 2016b)).

Foram ainda, estudadas outras opções com base na manipulação de cobre e manganês sistémico durante o período de incubação da doença. Quando os ratinhos foram mantidos a uma dieta pobre em cobre apresentavam uma expressão de PrP^C reduzida, reduzindo também o substrato à formação de PrP^{Sc}. No entanto, estes ratinhos atingiam mais cedo a fase terminal da doença. Provavelmente, este fenómeno deve-se ao stress oxidativo que se encontrava aumentado, devido à redução da PrP^C que, por sua vez, ia reduzir a sua atividade antioxidante (Brazier et al., 2014).

Pode-se concluir que existe uma boa perspetiva para este tipo de terapia. No entanto, ainda se encontra numa fase bastante inicial.

V. Conclusão

Ao longo do presente trabalho foram abordados vários aspetos sobre as doenças priónicas. As doenças priónicas são designadas também como encefalopatias espongiiformes transmissíveis. São um conjunto de doenças de cariz neurodegenerativo que podem incidir tanto na espécie humana como na espécie animal. Ocorre degeneração progressiva no sistema nervoso central, manifestando-se com afeção dos sinais motores extrapiramidais. As doenças priónicas em humanos englobam a doença de Creutzfeldt-Jakob, a síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, a Insónia familiar fatal e a doença de Kuru.

Os metais têm desempenhado um papel central no desenvolvimento das doenças priónicas, uma vez que o seu desequilíbrio é um fator desencadeante da neurotoxicidade no sistema nervoso central. Os metais que rebelam atividade redox são o cobre, ferro, e manganês. Foi necessário perceber quais os mecanismos que levam à ocorrência do stress oxidativo. Assim, pode-se concluir que a PrP^C tem um mecanismo antioxidante devido às ligações que estabelece com os metais. No entanto, quando é mal dobrada e se apresenta sob a forma de PrP^{Sc} esta função é perdida.

Até então, muitos estudos foram efetuados para estabelecer uma terapia viável para estas doenças, no entanto até hoje nenhuma molécula se mostrou eficaz. Existiram algumas opções propostas que demonstraram algumas melhorias nos sintomas. No entanto, a sua toxicidade não permitiu o avanço para os ensaios clínicos. A terapia com quelantes de metais revela-se uma opção com potencial, mas no entanto a investigação efetuada ainda se encontra numa fase inicial.

Esta categoria de doenças tem representado um problema para a humanidade, pois os danos da doença são irreversíveis e inevitavelmente levam à morte. Os estudos nesta área continuam a ser efetuados e prevê-se que a terapia com quelantes de metais seja a opção.

VI. Bibliografia

- Acevedo-Morantes, C. Y. e Wille, H. (2014). The structure of human prions: from biology to structural models-considerations and pitfalls. *Viruses*, 6 (10), pp. 3875-92.
- Alpers, M. P. (2008). Review. The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363 (1510), pp. 3707-13.
- Brazier, M. W., Wedd, A. G. e Collins, S. J. (2014). Antioxidant and Metal Chelation-Based Therapies in the Treatment of Prion Disease. *Antioxidants (Basel)*, 3 (2), pp. 288-308.
- Brown, D. R. (2002). Copper and prion diseases. *Biochem Soc Trans*, 30 (4), pp. 742-5.
- Brown, D. R. (2005). Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuropathol*, 43 (4), pp. 229-43.
- Cdc (2015). *Prion Disease* [Em linha]. Disponível em <http://www.cdc.gov/prions/>. [Consultado em 20-02-2016].
- Chen, C. e Dong, X. P. (2016). Epidemiological characteristics of human prion diseases. *Infect Dis Poverty*, 5 (1), pp. 47.
- Choi, C. J. (2007). *Interaction of prion protein with divalent metals: possible role in neuroprotection and neurodegeneration in prion disease model*. Doctor, Iowa State University. Iowa
- Choi, C. J. et al. (2006). Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. *Neurotoxicology*, 27 (5), pp. 777-87.
- Collinge, J. et al. (2008). A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363 (1510), pp. 3725-39.
- Collins, S. J., Lawson, V. A. e Masters, C. L. (2004). Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*, 363 (9402), pp. 51-61.
- Ferreira, W. F. C. (2006). Priões. In: Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. D. (eds.). *Microbiologia*. 1ª ed. Lisboa: Lidel, pp. 377-387
- Forloni, G. et al. (2013). Therapy in prion diseases. *Curr Top Med Chem*, 13 (19), pp. 2465-76.

- Glatzel, M. et al. (2003). Human prion diseases: epidemiology and integrated risk assessment. *The Lancet Neurology*, 2 (12), pp. 757-63.
- Içoz, D. (2008). *Understanding Molecular and Thermodynamic Miscibility of Carbohydrate Biopolymers*. Doctor, University of New Jersey. New Jersey
- Imran, M. e Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virology*, 8, pp. 559.
- Inc., A. L. (2011). *Tacrolimus* [Em linha]. Disponível em http://www.antialabs.com/product.php?id_product=197. [Consultado em 24-07-2016].
- Liberski, P. P. (2013). Kuru: a journey back in time from papua new Guinea to the neanderthals' extinction. *Pathogens*, 2 (3), pp. 472-505.
- Manix, M. et al. (2015). Creutzfeldt-Jakob disease: updated diagnostic criteria, treatment algorithm, and the utility of brain biopsy. *Neurosurg Focus*, 39 (5), pp. E2.
- Martin, D. P. et al. (2011). Infectious prion protein alters manganese transport and neurotoxicity in a cell culture model of prion disease. *Neurotoxicology*, 32 (5), pp. 554-62.
- Mastrianni, J. A. (1993). Genetic Prion Diseases. In: Pagon, R. A. et al. (eds.). *GeneReviews(R)*. Seattle (WA), pp.
- Merck (2015). *Methylene blue* [Em linha]. Disponível em http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Methylene-blue-%28C.I.-52015%29,MDA_CHEM-159270?ReferrerURL=https://www.google.pt/~. [Consultado em 24-08-2016].
- Millhauser, G. L. (2004). Copper binding in the prion protein. *Acc Chem Res*, 37 (2), pp. 79-85.
- Minikel, E. (2012). *The rise and fall of pentosan polysulfate in prion disease* [Em linha]. Disponível em <http://www.cureffi.org/2012/12/13/the-rise-and-fall-of-pentosan-polysulfate-in-prion-disease/>. [Consultado em 23-07-2016].
- Panegyres, P. K. e Armari, E. (2013). Therapies for human prion diseases. *Am J Neurodegener Dis*, 2 (3), pp. 176-86.
- Pirisinu, L. et al. (2016). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Sci Rep*, 6, pp. 20443.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216 (4542), pp. 136-44.

O papel dos metais nas doenças priónicas

- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (23), pp. 13363-83.
- Pubchem (2011). *Tetracycline* [Em linha]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tetracycline#section=Top>. [Consultado em 24-08-2016].
- Pubchem (2015). *Amphotericin B* [Em linha]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/250230391#section=Top>. [Consultado em 22-08-2016].
- Pubchem (2016a). *482-54-2* [Em linha]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cdta#section=Top>. [Consultado em 25-09-2016].
- Pubchem (2016b). *Clioquinol* [Em linha]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/clioquinol#section=Top>. [Consultado em 20-09-2016].
- Pubchem (2016c). *Penicillin* [Em linha]. Disponível em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/penicillin_g#section=Top. [Consultado em 20-09-2016].
- Salvador, M. (2014). *Doença de Creutzfeldt-Jakob. A propósito de um caso clínico*. Mestrado, Universidade da Beira Interior. Covilhã
- Scheiber, I. F., Mercer, J. F. e Dringen, R. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol*, 116, pp. 33-57.
- Schenkein, J. e Montagna, P. (2006). Self management of fatal familial insomnia. Part 1: what is FFI? *MedGenMed*, 8 (3), pp. 65.
- Sigurdsson, E. M. et al. (2003). Copper chelation delays the onset of prion disease. *J Biol Chem*, 278 (47), pp. 46199-202.
- Singh, A. et al. (2009). Abnormal brain iron homeostasis in human and animal prion disorders. *PLoS Pathog*, 5 (3), pp. e1000336.
- Supattapone, S. et al. (1999). Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (25), pp. 14529-34.
- Ucfs (2016). *Types of Prion Disease* [Em linha]. Disponível em <http://memory.ucsf.edu/cjd/overview/types>. [Consultado em 13-04-2016].
- Venneti, S. (2010). Prion diseases. *Clin Lab Med*, 30 (1), pp. 293-309.
- Wadsworth, J. D. e Collinge, J. (2011). Molecular pathology of human prion disease. *Acta Neuropathol*, 121 (1), pp. 69-77.

O papel dos metais nas doenças priónicas

Wieser, H. G., Schindler, K. e Zumsteg, D. (2006). EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neurophysiol*, 117 (5), pp. 935-51.