BIBLIOTECA

20.250

INSTITUTO DE QUÍMICA
RUA LAMARCA, 109 - SÃO PAULO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

4/1/11
n.p.d.

silva OK

1287138

25777

CARACTERIZAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DESENCADEADAS PELAS
INTERAÇÕES PrPc-p66 E PrPc-LAMININA E SUA RELEVÂNCIA NOS
PROCESSOS DE MORTE CELULAR PROGRAMADA E CONSOLIDAÇÃO DA
MEMÓRIA

ADRIANA REGINA DE OLIVEIRA FREITAS

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO RENZO BRENTANI

SÃO PAULO

06 de junho de 2002

9245

C

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005060

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Freitas, Adriana Regina de Oliveira
F866c Caracterização das vias de sinalização desencadeadas pelas
interações PrPc-p66 e PrPc-Laminina e sua relevância nos processos
de morte celular programada e consolidação da memória / Adriana
Regina de Oliveira Freitas. -- São Paulo, 2002.
131p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Brentani, Ricardo Renzo

I. Prioncelular : Bioquímica 2. Apoptose : Patologia
3. Neuroquímica : Fisiologia humana I. T. II. Brentani,
Ricardo Renzo, orientador.

574.19245 CDD

***"Caracterização das Vias de Sinalização
Desencadeadas pelas Interações PrPc-p66 e PrPc-
Laminina e sua Relevância nos Processos de Morte
Celular Programada e Consolidação da Memória"***

**ADRIANA REGINA DE OLIVEIRA
FREITAS**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Doutor em Química –
Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. RICARDO RENZO BRENTANI
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. GLÁUCIA MENDES SOUZA
IQ – USP

Profa. Dra. ANA MARIA MOURA DA SILVA
Instituto Butantan

Prof. Dr. JOÃO GUSTAVO PESSINI AMARANTE MENDES
ICB – USP

Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO KRIEGER
FM – USP

SÃO PAULO
06 DE JUNHO 2002.

Dedicatória

*Aos meus pais, Frederico e Maria Helena, e à minha irmã Andréa, por
todo amor que nos une.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo R. Brentani, pela orientação e oportunidades concedidas que foram essenciais para a minha formação.

À Dra. Vilma R. Martins, pela orientação atenciosa diária, pelo estímulo a novos desafios e acima de tudo, pela amizade.

Aos Drs. Rafael Linden e Luciana B. Chiarini, pela colaboração intensa, pelos ensinamentos e discussões (até debaixo d'água!!) que foram fundamentais para a minha formação científica.

Ao Dr. Ivan Izquierdo pelo exemplo de cientista e pessoa que é para mim.

À Adriana Coitinho, pelos experimentos de memória que realizamos juntas, pela amizade e inúmeros momentos divertidos.

Aos amigos Adriana Mercadante e Edgard Graner que carinhosamente me acolheram quando cheguei no Instituto Ludwig.

Às minhas queridas Kil e Rosa, pela amizade, pelos almoços e por todas as risadas que demos juntas.

Aos meus também queridos amigos do laboratório: Silvio Zanata, Ricardinho, Orestes, Fatima, Mari, Angelita, Gláucia, Michele e Wanda.

À todos do Instituto Ludwig, pela disponibilidade e auxílio em todos os momentos.

Ao meu “queridão” Marcelo, por toda a amizade, apoio e amor.

Aos amigos de longos anos, Áurea, Andréa, Adriana, Roberta, Roberto e Henrique (e Raquel), pelo companheirismo e dedicação.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
ABREVIACÕES	3
PREFÁCIO	4
INTRODUÇÃO	7
1. PRIONS	7
1.1 A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP _c) – ESTRUTURA E FUNÇÃO	11
1.2 O MECANISMO DE PROPAGAÇÃO DOS PRIONS	14
1.3 O VÍRUS SCRAPIE	17
1.4 OS LIGANTES DE PrP _c	18
1.5 A INTERAÇÃO PrP _c -p66	19
1.6 A INTERAÇÃO PrP _c -LAMININA	23
2. MORTE CELULAR	25
2.1 APOPTOSE	26
2.2 A MORTE CELULAR NA RETINA	28
2.2.1 ORGANIZAÇÃO DA RETINA DE RATO	28
2.2.2 MORTE CELULAR PROGRAMADA NA RETINA	29
2.2.3 O MODELO DE EXPLANTES	30
3. MEMÓRIA	32
3.1 FUNÇÃO E DURAÇÃO DAS MEMÓRIAS	33
3.2 A CONSTRUÇÃO DA MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO	34
3.3 A MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO	36
OBJETIVOS	39
MATERIAIS E MÉTODOS	40
1. ANIMAIS	40
2. PEPTÍDEOS E ANTICORPOS	40
3. DISSECÇÃO E TRATAMENTO DAS RETINAS	42

4. PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS E DETECÇÃO DE MORTE CELULAR	43
5. IMUNOHISTOQUÍMICA E WESTERN BLOT	44
6. BIOTINILAÇÃO DA PROTEÍNA SÉRICA BOVINA CONJUGADA AO PEPTÍDEO PrR	45
7. ENSAIO DE LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO PrR A PrPc	46
8. ENSAIO DE COMPETIÇÃO	46
9. DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE cAMP	47
10. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE PROTEÍNA CINASE A	48
11. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE P42/44 MAPK	49
12. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS (E57 e F35)	49
13. REAÇÃO DE PCR PARA DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DE ANIMAIS	50
14. CULTURA PRIMÁRIA DE HIPOCAMPO DE ROEDORES	50
15. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE PROTEÍNA CINASE C (PKC)	51
16. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CREB	52
17. TESTE DE ESQUIVA INIBITÓRIA (STEP-DOWN INHIBITORY AVOIDANCE TASK)	53
18. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO DE RATO	54
19. ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
RESULTADOS	56
A INTERAÇÃO PrPc-p66 E MORTE CELULAR PROGRAMADA	56
A INTERAÇÃO PrPc-LAMININA E OS MECANISMOS DE PLASTICIDADE NEURONAL E CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	77
DISCUSSÃO	94
CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
CURRICULUM VITAE	129
ANEXOS	131

RESUMO

PrPc é uma glicoproteína de 35 KDa, bastante conservada entre as espécies e essencial no processo de transmissão e patogênese de várias doenças neurodegenerativas como a encefalopatia espongiforme bovina e a doença de Creutzfeldt-Jacob (PRUSINER, 1991). Embora sua função fisiológica ainda seja desconhecida, sabe-se que a patogênese das doenças priônicas requer a sua expressão e é freqüentemente acompanhada do acúmulo no cérebro de uma isoforma anormal de PrPc, designada PrPsc (GABIZON e cols., 1997).

Interessado nos possíveis papéis fisiológicos da proteína PrPc, nosso grupo tem se dedicado a estudar as interações que PrPc realiza com outras moléculas. Identificamos e caracterizamos duas interações nas quais PrPc está envolvido: com uma proteína ligante de 66 KDa, recém-identificada como sendo a proteína STI1 (ZANATA e cols., 2002) e com a principal proteína não colagênica da matriz extracelular, a laminina (GRANER e cols., 2000). No presente trabalho, procuramos investigar as vias de sinalização deflagradas por cada uma dessas interações, como também o seu papel nos mecanismos de morte celular programada e memória.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a interação PrPc-p66 desencadeia uma resposta neuroprotetora na camada neuroblástica da retina de roedores em desenvolvimento via cAMP/PKA. Além disso, verificamos que a interação PrPc-laminina desempenha um importante papel na formação da memória de curta duração através da ativação da via cAMP-PKA-MAPK, e na memória de longa duração ativando somente a via cAMP/PKA.

ABSTRACT

PrPc is an extremely conserved 35 KDa glycoprotein which seems to be essential during the transmission and pathogenesis of several neurodegenerative diseases like bovine spongiform encephalopathy or Creutzfeldt-Jacob disease (PRUSINER, 1991). Although the physiological function of this protein remains unclear, it is well established that prion diseases require PrPc expression and are often characterized by deposition of an abnormal PrPc isoform, named PrPsc (GABIZON et. al., 1997).

Interested in the normal function of PrPc, our group has been dedicated to study the interactions that PrPc could entertain with other molecules. We have identified and characterized two interactions in which PrPc is involved: with a 66 KDa ligand protein, recently identified as the STI1 protein (ZANATA et. al., 2002) and with laminin (GRANER et. al., 2000). In this work, we have investigated the signalling pathways triggered by these interactions, as well as their relevance in programmed cell death and memory formation mechanisms.

We show in this work that PrPc-p66 interaction transduces neuroprotective signals through a cAMP/PKA-dependent pathway in the neuroblastic layer of rodents' retina. Moreover, we demonstrated that PrPc-laminin interaction has an important role for short-term memory formation through the activation of cAMP-PKA-MAPK pathways and for long-term memory with the activation of the cAMP/PKA pathway only.

ABREVIATÖES

BME – meio basal de Eagle
cAMP – adenosina monofosfato cíclico
CO – monóxido de carbono
Da – Dalton
DNA – ácido desoxirribonucleico
EPR – epitélio pigmentado da retina
GCL – camada de células ganglionares
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
HEPES – ácido N₂-hidroxietilpiperazina N'₂
INL – camada nuclear interna
IPL – camada plexiforme interna
MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno
NBL – camada neuroblástica
NO – óxido nítrico
OPD – o-fenilenediamina
PC 12 – linhagem de células de feocromocitoma de rato
PCR – reação de polimerase em cadeia
PKA – proteína cinase dependente de cAMP
PLC – fosfolipase C
PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto
Pn – dia pós-natal
PrPc – proteína prion celular
PrPsc – proteína prion *scrapie*
RNA – ácido ribonucléico

PREFÁCIO

Um dos temas mais polêmicos e vibrantes dentro do meio científico atual refere-se ao estudo de prions, não só por causa da participação dessas partículas em doenças neurodegenerativas, mas principalmente pelo fato dessas partículas apresentarem um mecanismo de replicação diferente daqueles postulados pelo “dogma central da biologia molecular”.

A terminologia prion (oriunda de “*proteinaceous infectious particle*”) foi designada em 1982 por Stanley B. Prusiner para definir o agente infeccioso de algumas doenças neurodegenerativas que se manifestam tanto no homem como em animais. Esse agente infeccioso (também denominado PrP^{sc}, ou prion *scrapie*) corresponde a uma isoforma anormal da proteína prion celular (PrP^c) (PRUSINER e cols., 1991b; PRUSINER, 1998), cuja função biológica ainda é objeto de estudo de vários grupos. Porém, uma das questões que mais intrigam os cientistas é como explicar o mecanismo de transmissão dessas doenças. A teoria mais aceita é que PrP^{sc} seja sintetizado através de modificações pós-traducionais que ocorreriam na isoforma celular normal (PrP^c), provavelmente em compartimentos citoplasmáticos denominados endossomos (BORCHELT e cols., 1992). A total falta de evidências que apoiariam a existência de ácidos nucléicos associados a essas partículas (MEYER e cols., 1990) e os estudos de espectroscopia que mostraram diferenças nas estruturas secundárias entre as duas formas da proteína prion (PAN e cols., 1993) sustentam, cada vez mais, a idéia de que esse processo

infeccioso se dá por mudanças conformacionais exclusivamente protéicas.

O maior interesse do nosso grupo é tentar elucidar os possíveis papéis fisiológicos da proteína PrPc. A estratégia usada para isso, consistiu em identificar e caracterizar as possíveis interações de PrPc com outras proteínas. Assim, nos últimos anos, nosso grupo identificou duas moléculas ligantes de PrPc: uma proteína por ora denominada p66 e laminina, a principal proteína não colagênica da matriz extracelular. Este trabalho mostrará os resultados dos estudos dessas interações, PrPc-p66 e PrPc-laminina, tendo como foco principal a sinalização química envolvida nessas interações como também, a relevância delas dentro dos processos de morte celular programada e memória.

É importante ressaltar que parte dos resultados que serão apresentados nessa tese de doutorado foram obtidos por pessoas que pertencem a outros grupos de pesquisa que mantêm uma estreita colaboração com o nosso grupo de trabalho. Assim, na primeira parte dessa tese apresentaremos os resultados referentes à interação PrPc-p66 e o papel dessa interação nos mecanismos de morte celular programada. Esse trabalho foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Rafael Linden (UFRJ) e os dados gerados em seu laboratório pela Dra. Luciana B. Chiarini serão aqui mostrados e discutidos para facilitar o entendimento dos experimentos de sinalização. Da mesma forma, na segunda parte trataremos dos resultados referentes a interação PrPc-laminina na consolidação da memória. Esse trabalho é resultado de uma colaboração com o grupo do Prof. Dr. Ivan Izquierdo (UFRGS) e os resultados dos testes de

esquiva inibitória realizados por Adriana Coitinho, e os Drs. Rafael Roesler e Roger Walz serão incluídos com o objetivo de mostrar na sua totalidade o trabalho desenvolvido pelos grupos em conjunto.

Assim, para um melhor entendimento desse trabalho será feita uma revisão acerca de vários tópicos relevantes sobre a proteína que é o objeto do nosso estudo, PrPc.

INTRODUÇÃO

1. Prions

As doenças causadas por prions que afetam tanto o homem como animais são denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e a insônia familiar fatal (FFI) são exemplos dessas encefalopatias espongiformes que acometem os seres humanos. Em animais os exemplos mais conhecidos são o *scrapie* em ovelhas e a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), popularmente conhecida como doença da vaca louca. O sintoma primário das desordens humanas é a demência, normalmente acompanhada por disfunções motoras, como a ataxia cerebelar. Esses sintomas geralmente aparecem por volta dos 60 anos de idade e podem se manifestar durante meses ou anos, até a morte do paciente. Em termos neuropatológicos, essas desordens são caracterizadas pela morte neuronal e astrogliose e, algumas vezes, por degeneração espongiforme do cérebro, além de deposição de placas amilóides. De uma maneira geral, as doenças priônicas apresentam uma incidência mundial de aproximadamente 1 caso por milhão por ano.

Durante muito tempo acreditou-se que essas doenças eram causadas pela infecção lenta de algum tipo de vírus ou viróides. No início, os estudos de infecção por *scrapie* eram realizados através da inoculação de cabras e ovelhas. Porém, o tempo necessário para a obtenção de qualquer resultado referente à infectividade era muito

longo. Em 1975, com a identificação de um inóculo capaz de produzir *scrapie* em hamster em 70 dias (MARSH e KIMBERLIN, 1975; KIMBERLIN e WALKER, 1977) e com a substituição dos ensaios de titulação pelos ensaios baseados no tempo de incubação (PRUSINER e cols., 1980; PRUSINER e cols., 1982b), os estudos sobre a infecção por *scrapie* foram significativamente acelerados. Com essa nova metodologia foi possível reduzir o número de animais usados e o tempo de análise destes, ou seja, os experimentos onde era necessário infectar 60 camundongos e esperar cerca de 1 ano foram substituídos por ensaios onde eram necessários apenas 4 hamsters e 60-70 dias. Além disso, essa nova metodologia permitiu desenvolver novos protocolos mais efetivos para a purificação de frações enriquecidas do agente infeccioso *scrapie* e, conseqüentemente, para a caracterização bioquímica do mesmo.

Prusiner e colaboradores, no início da década de 80, a partir de um protocolo de purificação baseado em centrifugação diferencial e sedimentação em gradiente descontínuo de sacarose, extrações com detergentes, proteólise limitada, precipitação com sulfato de amônio e separação por eletroforese, obtiveram uma fração extremamente enriquecida pelo agente infeccioso (PRUSINER, 1982). O material purificado mostrou-se fortemente insolúvel, com características típicas de amilóide (coloração pelo vermelho Congo e birrefringência sob microscopia de luz polarizada). Em microscopia eletrônica de transmissão, o agente infeccioso purificado apresentou-se como pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e forma irregulares (10 a 20 nm de diâmetro por 100-200 nm de comprimento). Com esse mesmo protocolo de purificação foi possível extrair o

mesmo tipo de material (do ponto de vista bioquímico e microscópico) de cérebro de pacientes portadores de CJD (PRUSINER e cols., 1982; PRUSINER e cols., 1983).

A inativação da infecção por este material purificado através de agentes que modificam proteínas (proteases, SDS, fenol) e resistência do mesmo a agentes modificadores de ácidos nucleicos (nucleases e radiação UV) sugeriram que a composição da partícula infecciosa envolvida com o *scrapie* e outras doenças relacionadas fosse essencialmente protéica o que levou Stanley B. Prusiner propor que o agente infeccioso fosse chamado de prion. De fato, até hoje a linha que defende que prion seja uma proteína mantém-se muito mais forte do que qualquer outra, pois todas as tentativas para detectar material genético associado às partículas infecciosas falharam (PRUSINER, 1998).

O seqüenciamento dos resíduos da extremidade amino-terminal da proteína presente nas partículas infecciosas permitiu a síntese de peptídeos, os quais foram usados na imunização de coelhos (BARRY e cols., 1986). O soro obtido desses animais reconheceu uma proteína de 33-35 KDa, em extratos de cérebros de animais normais e infectados. O fato do anticorpo contra a partícula infecciosa reconhecer uma proteína em cérebros de animais não infectados indicava que uma proteína homóloga à infecciosa era expressa em condições normais. Entretanto, a proteína enriquecida nas partículas infecciosas apresentou um peso molecular ligeiramente inferior ao da proteína reconhecida pelos anticorpos (27-30 KDa). Denominada PrP27-30, descobriu-se mais tarde que essa forma era o resultado do tratamento da proteína de 33-35 KDa com proteases durante o

processo de purificação. A remoção por proteólise parcial dos primeiros 67 resíduos da porção amino-terminal da proteína extraída de cérebros de animais infectados por *scrapie* ou de pacientes com CJD ou GSS, reduz seu peso molecular de 33-35 KDa para 27-30 KDa (OESCH e cols., 1985). Gabizon e cols., em 1988, demonstraram que essa resistência à degradação por proteases não é uma consequência da formação das placas amilóide, mas sim uma característica intrínseca da proteína infecciosa.

A partir desses resultados e da clonagem do gene que codifica a proteína prion celular foi possível sustentar a idéia de que a proteína presente nos agregados insolúveis nos cérebros de animais ou pacientes infectados é formada a partir de uma proteína precursora expressa normalmente nas células. A isoforma infecciosa foi denominada de “proteína prion scrapie” ou PrPsc e a isoforma celular normal foi denominada de proteína prion celular ou PrPc. A digestão proteolítica de PrPsc resulta na forma PrP27-30, mencionada há pouco.

Apesar de PrPc e PrPsc apresentarem a mesma estrutura primária (TURK e cols., 1988), suas propriedades bioquímicas são bem distintas. Enquanto o PrPc é solúvel e susceptível à ação de proteases, sua forma anormal, PrPsc apresenta-se muito insolúvel e resistente à ação proteolítica (MEYER e cols., 1986). Essas propriedades do PrPsc favorecem a formação de agregados insolúveis que se depositam lenta e progressivamente em várias regiões do sistema nervoso, causando a morte celular. Estudos de espectroscopia foram capazes de revelar as estruturas secundárias dessas duas isoformas. Verificou-se que enquanto PrPc apresenta um

perfil rico em estruturas em alfa-hélices, PrP^{sc} apresenta um predomínio de estruturas beta-pregueadas (PAN e cols., 1993).

1.1 A proteína prion celular (PrP^c) – estrutura e função

PrP^c é uma proteína extremamente conservada entre as diferentes espécies. Ela possui cerca de 250 aminoácidos, dos quais os primeiros 22 resíduos da extremidade amino-terminal constituem o peptídeo sinal e os 23 últimos resíduos hidrofóbicos da região carboxi-terminal, ambos clivados pós traducionalmente após o encaminhamento da proteína para a membrana para a adição da âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Depois de traduzida, a proteína PrP^c sofre uma série de modificações pós-traducionais como: adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso (códon 181 e 197 de PrP^c de hamster), formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214 (PRUSINER, 1991).

Através de estudos de modelagem molecular foi possível prever a presença de 4 estruturas em alfa-hélice (H1, H2, H3 e H4) no PrP^c (GASSET e cols., 1992; HUANG e cols., 1994). Além disso, foi demonstrado que íons Cu^{2+} ligam-se ao PrP^c na região amino-terminal através de 4 histidinas contidas em 5 ou 6 regiões repetidas de oito aminoácidos cada estabilizando sua estrutura e induzindo a formação de uma alfa-hélice (MIURA e cols., 1996; HOMSHAW e cols., 1995; BROWN e cols., 1997).

A proteína PrPc é constitutivamente expressa na superfície de vários tipos celulares, sobretudo em neurônios. Apesar dessa ampla distribuição nos tecidos e de também ser bastante conservada evolutivamente entre diferentes espécies, a função biológica dessa proteína ainda está em questão. Na tentativa de identificar essa função, alguns grupos geraram animais nocautes para o gene que codifica a proteína PrPc. O primeiro grupo a descrever a construção de um animal nocaute para PrPc foi o grupo de Charles Weissmann, em 1992, e nenhuma alteração significativa foi encontrada nesses animais. Eles se desenvolveram normalmente sem apresentar nenhum fenótipo patológico (BÜLLER e cols., 1992). Dois anos depois, o grupo de Collinge descreveu que estes camundongos nocautes para o gene de PrPc apresentavam a transmissão sináptica alterada, sugerindo assim a possibilidade da proteína PrPc possuir um papel importante na sinapse de células nervosas. Apesar da polêmica criada quando Lledo e colaboradores em 1996 publicaram um trabalho contradizendo o achado do grupo de Collinge, as pesquisas em torno dessa hipótese continuaram e em 1998 foram publicados trabalhos como o de Nicole Salès e colaboradores mostrando que a proteína PrPc é abundantemente expressa em regiões do cérebro, como hipocampo e córtex, responsáveis por funções de plasticidade. Outro ponto importante do trabalho de Salès e colaboradores é que a distribuição de PrPc no hipocampo é semelhante em diferentes espécies como hamsters e primatas, o que reforçaria ainda mais a idéia que a proteína PrPc possui uma função sináptica importante.

Testes comportamentais realizados pelo nosso grupo em colaboração com o grupo de Ivan Izquierdo (UFRGS) revelaram que

os animais nocautes apresentam maior sensibilidade a drogas indutoras de distúrbios epiléticos (WALZ e cols., 1999) e que possuem atividade locomotora alterada (ROESLER e cols., 1999).

De qualquer forma, é um consenso entre todos os grupos que realizaram estudos com animais nocautes para PrPc que esses animais são viáveis e apresentam uma sobrevida igual a qualquer camundongo. Porém, um trabalho publicado em 1998 por Shmerling e colaboradores mostrou alguns resultados bastante interessantes. Esse grupo gerou vários animais com deleções em diferentes regiões do gene de PrPc. Ficou constatado que os animais que apresentavam deleções nas regiões 32-93 ou 32-106 desenvolvem-se normalmente. Entretanto, os animais que tiveram a região 32-121 ou 32-134 deletada apresentaram sinais de ataxia e morreram num período de 4 a 9 meses para o caso dos animais com a deleção 32-121 e de 2 a 3 meses para a deleção 32-134. A re-introdução de uma ou mais cópias do gene de PrPc reverte o quadro de doença nesses animais. Os autores sugerem que nesses animais a proteína truncada compete com outras moléculas do tipo PrPc por um ligante em comum. Contudo, esses resultados podem sugerir também que os domínios deletados da proteína PrPc que levam a problemas neurológicos possam ser essenciais para a função normal de PrPc. Uma vez que todos os animais descritos nesse trabalho possuem a região ligante de cobre deletada é possível imaginar que a região correspondente aos resíduos 106-134 da proteína prion celular está associada à resistência a neurodegeneração.

Ultimamente, a capacidade de a proteína PrPc ligar íons Cu^{2+} e possuir atividade semelhante a superóxido dismutase (SOD) (revisado

por BROWN, 2001) têm gerado muitos trabalhos tentando associar PrPc à homeostase de cobre e também na regulação antioxidante associada a SOD. De fato, em animais nocautes a quantidade de cobre presente em preparações de membrana de cérebro é de 10 a 15 vezes menor quando comparada a animais normais (BROWN e cols., 1997). Além disso, animais transgênicos com expressão aumentada de PrPc têm maior resistência ao estresse oxidativo enquanto que os animais nocautes são mais sensíveis a esse tipo de estresse (BROWN, 2001).

Sem dúvida, há muito ainda o que fazer até se chegar na completa caracterização da função biológica da proteína PrPc.

1.2 O mecanismo de propagação dos prions

Em 1989, Stanley Prusiner propôs que, quando o prion era introduzido em células normais, ele seria capaz de converter as moléculas de PrPc em PrPsc através da formação de dímeros. Segundo esse autor, a ligação do PrPsc ao PrPc do hospedeiro poderia impor uma mudança de conformação nesse último, transformando-o em outra molécula de PrPsc. Assim, de acordo com esse modelo, a infecção é produtiva porque novas moléculas de PrPsc são exponencialmente geradas a partir do PrPc. As propriedades bioquímicas de PrPsc permitem o acúmulo deste em agregados insolúveis, os quais provavelmente levam à morte neuronal (PRUSINER, 1989). A principal evidência da participação de PrPc no processo infeccioso surgiu quando Büeller e colaboradores, em 1992,

produziram o primeiro camundongo nocaute para PrPc. Esse animal foi completamente resistente à infecção por prion e essa resistência pode ser revertida com a re-introdução do gene de PrPc.

Como as moléculas de prion não apresentam sempre o mesmo comportamento, podendo variar no tempo de incubação necessário para produzir doença e também na distribuição das lesões e deposições de amilóides em regiões específicas do cérebro, definiu-se o termo “cepas de prions” para justificar essa variedade comportamental da mesma proteína. A hipótese conformacional postulou então que cada “cepa” está associada a uma diferente conformação de PrPsc e cada uma delas pode converter PrPc a uma conformação semelhante a sua (AGUZZI e WEISSMANN, 1997).

O mecanismo de conversão de PrPc a PrPsc nas doenças hereditárias pode ser sustentado com a construção de camundongos transgênicos que expressavam a mutação P101L (substituição de uma prolina por leucina na posição 101), correspondente à mutação no códon 102 do PrPc humano, encontrada em pacientes portadores de GSS (HSIAO e cols., 1994). Esses animais desenvolveram alterações neurológicas espontaneamente e apresentaram vacuolização do hipocampo e do neocortex, além de deposição de material amilóide, principalmente no cerebelo. Esses resultados indicaram que mutações específicas no gene codificador para PrPc poderiam tornar essa proteína mais susceptível a mudanças conformacionais, apoiando assim a hipótese de que alterações exclusivamente protéicas seriam responsáveis pelas doenças.

Alguns trabalhos também se preocuparam em determinar a região específica do PrPc envolvida na sua transformação em PrPsc.

A deleção de regiões específicas de PrPc que continham uma estrutura secundária definida, com exceção dos domínios correspondentes aos resíduos 23-88 e 141-176, impediu a formação de PrPsc em células de neuroblastoma de culturas infectadas (ROGERS e cols., 1991; FISCHER e cols., 1996; MURAMOTO e cols., 1996). É interessante notar que todas as mutações conhecidas envolvidas nas doenças causadas por prions ocorrem adjacentes ou exatamente nas regiões de estrutura secundárias prováveis (HUANG e cols., 1994; ZHANG e cols., 1995; RIEK e cols., 1996).

Usando anticorpos monoclonais específicos para determinadas regiões do PrPc foi possível localizar o domínio composto pelos resíduos 90-112 como sendo o principal sítio envolvido na mudança conformacional de PrPc para PrPsc (PERETZ e cols., 1997). Num outro trabalho que também utilizava anticorpos monoclonais foi demonstrado que o anticorpo contra o domínio específico 219-232 inibia a ligação do PrPsc ao PrPc e portanto impedia a formação de novas moléculas resistentes a proteases em sistemas livres de células (*cell-free system*). Segundo os autores desse trabalho, esse bloqueio de ligação pelo anticorpo ocorreu devido a um impedimento estérico e o sítio real de ligação entre as duas isoformas deve estar próximo a essa região (HORIUCH e CAUGHEY, 1999).

Além disso, há autores que defendem que a conversão de PrPc a PrPsc está associada a ambientes redutores e a baixa glicosilação. Ma e Lindquist (1999) expressaram PrPc de camundongo no citoplasma de levedura e demonstraram que essas moléculas adquiriram propriedades semelhantes à de PrPsc, como resistência a proteases e insolubilidade em detergentes. Os mesmos autores

mostraram também que células de neuroblastoma em cultura exposta a condições redutoras e de glicosilação inibida formavam PrPc com características semelhantes ao PrPsc. Os resultados desse trabalho sugerem um modelo capaz de explicar as doenças causadas por prions, principalmente as esporádicas. Esse modelo propõe que em determinados momentos e compartimentos das células o balanço das taxas de glicosilação e de oxidação/redução poderiam favorecer a mudança de PrPc em PrPsc. Como um desequilíbrio desses fatores na célula é raro, a formação de PrPsc espontaneamente seria um evento difícil, o que explicaria a baixa frequência das doenças esporádicas e também o seu aparecimento mais tardio.

Apesar de todas essas evidências a favor da hipótese de que a infecção por prions se dá exclusivamente por modificações conformacionais protéicas ainda há grupos que defendem a existência de um vírus responsável pela transmissão das doenças.

1.3 O “vírus” *scrapie*

Quando a associação entre as mutações no gene de PrPc e as várias doenças familiares foi estabelecida, aqueles que acreditavam na existência de um vírus *scrapie* defenderam essa hipótese propondo que o PrPc seria um receptor de “vírus” *scrapie* e que quando mutado seria capaz de se ligar mais fortemente a essas partículas virais. Essa mesma teoria foi usada para explicar os resultados de infecção de animais transgênicos, que superexpressavam PrPc e desenvolviam doença mais rápido que os animais selvagens e também os resultados obtidos com os camundongos nocautes para o gene PrP, resistentes a

infecção (revisado por PRUSINER, 1998). Assim, quanto maior era a quantidade de PrPc na célula, mais rápida era a disseminação dos vírus, já que eles encontravam maior quantidade do seu receptor. Por outro lado, os animais que não expressam PrPc não sofriam infecção pois não apresentavam o receptor necessário para tal. Contudo ainda não foram encontradas partículas virais nas preparações purificadas de PrPsc. Alguns autores acreditam que elas existem mas que ainda não foi possível detectá-las (MANUELIDIS e cols., 1995).

1.4 Os ligantes de PrPc

A identificação de ligantes de PrPc é extremamente importante pois a caracterização dessas interações pode auxiliar no melhor entendimento das doenças causadas por prions e também poderá ajudar no esclarecimento do papel fisiológico de PrPc. Duas características estruturais da proteína PrPc, a presença de uma hélice anfipática próxima ao centro da molécula (que em outras proteínas significa uma região de interação proteína-proteína) e a presença da âncora de GPI, que pode transmitir sinais, são fatores que permitiriam a interação de PrPc com outras proteínas.

De fato, várias moléculas já foram descritas na literatura por se associarem *in vitro* com PrPc. Dentre elas podemos citar: heparina, as chaperoninas HSP60 e BiP, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), apolipoproteína-1 e o receptor de 37/67 KDa de laminina (revisado por MARTINS e cols., 2001). Além dessas, foram descritas também as interações de PrPc com distroglicanas (KESHET e cols., 2000) e

algumas N-CAM's (*neural cell adhesion molecules*) (SCHMITT-ULMS e cols., 2001). Entretanto, não foi associada qualquer relevância biológica para essas interações até o momento.

Nosso grupo tem trabalhado arduamente para identificar possíveis interações de PrPc com outras proteínas. A primeira interação a ser caracterizada foi com uma proteína de membrana de 66 KDa (MARTINS e cols., 1997). Além disso, foi identificada também pelo nosso grupo a interação de PrPc com laminina, uma proteína da matriz extracelular (MERCADANTE, 2000; GRANER e cols., 2000a,b).

1.5 A interação PrPc-p66

Entre os diferentes domínios da proteína PrPsc que apresentam a conformação de folha β pregueada, existe um peptídeo compreendendo os resíduos 106-126 da proteína prion humana (PrP 106-126) que reproduz em cultura de células os efeitos patológicos da proteína infecciosa (FORLONI e cols., 1993). A região neurotóxica do prion humano (resíduos 106-126) corresponde, na molécula de galinha, à região crítica para sua internalização (resíduos 117-135). Além disso, é também a região mais conservada entre as espécies (GASSET e cols., 1992). Desta forma, esta região seria uma forte candidata para ser um sítio de ligação a uma proteína receptora. A presença de uma proteína receptora/ligante de PrPc que seja responsável pela sua internalização, por possível transdução de sinal e ainda, pela internalização celular do agente PrPsc e que participe na infecção celular tem sido bastante discutida. Assim, através da teoria

da hidropaticidade complementar dos aminoácidos (BRENTANI 1988, 1990), a qual defende que peptídeos codificados por fitas complementares de DNA são capazes de interagir entre si (PAN e cols., 1993, MEYER e cols., 1990), nosso grupo deduziu um peptídeo complementar (HVATKAPHHGPCRSSA) à região neurotóxica do PrPc, que se mostrava candidato a ser o sítio de ligação de PrPc na proteína ligante e portanto compreenderia um domínio da mesma. O soro obtido de animais imunizados com esse peptídeo reconheceu uma proteína de 66 kDa, presente na membrana de neurônios, a qual era capaz de se ligar ao PrPc tanto *in vitro* como *in vivo*. A partir desses resultados, o grupo sugeriu que essa proteína caracterizada poderia apresentar-se como provável receptor/ligante para PrPc (MARTINS e cols., 1997).

Recentemente, nosso laboratório conseguiu desvendar a identidade da proteína de 66 KDa ligante de PrPc, utilizando-se um esquema de separação analítica de proteínas resultante da combinação de focalização isoeletrica (separação de proteínas por ponto isoeletrico) e SDS-PAGE (eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida), onde foram separadas proteínas de extrato de cérebro de camundongo. Uma vez separadas, as proteínas do gel bidimensional foram transferidas e imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose, onde foi realizado um ensaio de “western-blot” com soro anti-peptídeo PrR (peptídeo hipotético deduzido através da teoria da hidropaticidade complementar), que identificou, como era esperado, uma proteína de 66 KDa (ZANATA e cols., 2002). Seu isolamento e seqüenciamento mostrou homologia de 96% com uma proteína denominada STI1 (*stress inducible protein 1*). A partir desse dado, foi

caracterizada a interação entre PrPc e STI1 através de ensaios onde a proteína PrPc foi imobilizada em poços de placas de Elisa e incubada com concentrações crescentes de STI1 marcada com ^{125}I . A constante de dissociação encontrada foi igual a $0,8 \times 10^{-7} \text{ M}$ (ZANATA e cols., 2002).

Na literatura constam poucas informações a respeito da STI1 que também recebeu a denominação de extendina por estar relacionada à formação de pseudopódios em células M27 de carcinoma de pulmão de camundongo (BLATCH e cols., 1995). A proteína humana homóloga é chamada de “*transformation-sensitive human protein*”, por ter sido inicialmente identificada em células transformadas pelo vírus SV-40, o que levou os autores a sugerir que essa proteína possa ter um importante papel na proliferação e regulação gênica (HONORÉ e cols., 1992). Além disso, tanto a proteína humana como a de camundongos possuem homologia com a proteína de choque térmico de levedura (BLATCH e cols., 1995; HONORÉ e cols., 1992; GROSS e cols., 1996).

A análise conformacional da proteína STI1 humana revelou duas regiões interessantes ao nosso estudo. A primeira delas, representada por um peptídeo de sequência ELGNDAVKKKDFDTAL, denominado peptídeo 1 de STI1, presente no exon 5 do gene da STI1 humana, apresenta o mesmo perfil de hidropaticidade que o peptídeo PrR. Por outro lado, um segundo peptídeo de sequência ELCEKAIEVGRENRED, situado no exon 6 da proteína da STI1 humana, denominado peptídeo 2 de STI-1, apresenta um perfil de hidropaticidade que é parcialmente semelhante ao peptídeo teórico

(esquema 1). Esses dados indicaram que um desses domínios poderia ser o sítio de ligação de PrPc na molécula de STI1.

Na primeira parte deste trabalho mostraremos em detalhes nossos resultados envolvendo a sinalização deflagrada pela interação PrPc-p66, usando para isso tanto o peptídeo teórico quanto os peptídeos da proteína real.

Esquema 1: Perfis de hidropaticidade complementar do peptídeo teórico (PrR), do peptídeo 1 da proteína STI1 (STI1 pep1) e do peptídeo 2 da STI1 (STI1 pep2). Como é possível notar, o peptídeo 1 apresenta um perfil de hidropaticidade quase identico ao peptídeo PrR enquanto que o peptídeo 2 apresenta identidade parcial com o mesmo.

1.6 A interação PrPc-laminina

Resultados importantes obtidos em nosso laboratório indicaram que a proteína PrPc interage também com a molécula de laminina, uma proteína heterotrimérica de 800 kDa que é um dos constituintes mais importantes da matriz extracelular. Essa interação apresenta alta especificidade, com um Kd igual a $3,5 \times 10^{-8}$ M. A região responsável pela interação a PrPc está mapeada na cadeia γ_1 da laminina, mais precisamente o peptídeo RNIAEIIKDI (GRANER e cols., 2000a,b).

A laminina é uma molécula vital nos processos de adesão e diferenciação celulares, e particularmente na neuritogênese (BECK e cols., 1990). Esta função da molécula é determinada por domínios específicos, entre eles o peptídeo da cadeia γ_1 .

Vários trabalhos na literatura descrevem que no sistema nervoso central, a molécula de laminina aparece como mediadora de eventos como a diferenciação neuronal, caracterizada pela formação e extensão de neuritos (TOMASELLI e REICHARDT, 1988). Na tentativa de avaliar a função da interação PrPc-laminina nosso grupo verificou, através de experimentos de neuritogênese, que o bloqueio da proteína PrPc na superfície celular, através do uso de anticorpo específico anti-PrPc inibe a adesão à laminina e o processo de expansão de neuritos, tanto em células PC 12 como em células de cultura primária de hipocampus de ratos e camundongos (GRANER e cols., 2000). Além disso, foi verificado que quando os neurônios hipocámpais de animais nocautes são plaqueados sobre laminina eles formam menos neuritos que as células dos camundongos normais, além de serem incapazes de estender neuritos sobre o peptídeo γ_1 .

Assim, a partir de cada uma dessas interações, o próximo passo foi caracterizar os sinais químicos deflagrados por essas interações, além de avaliar os possíveis papéis biológicos associados a elas. Como esse trabalho constituiu-se de duas frentes experimentais distintas, falaremos em detalhes da realização de cada uma delas separadamente.

2. Morte Celular

A morte celular é um fenômeno extremamente importante durante o desenvolvimento normal tanto de vertebrados como de invertebrados. O interesse geral por esta área concentra-se em responder questões do tipo: qual o papel da morte celular durante o desenvolvimento? Quais são os sinais que induzem ou que modulam este evento? Quais são os mecanismos pelos quais as células são destruídas?

Em 1972, Kerr e colaboradores mostraram que as células podem morrer por pelo menos duas formas distintas: a primeira seria uma forma rápida e violenta, denominada necrose e caracterizada por inchaço citoplasmático, destruição de organelas e ruptura da membrana plasmática, ocasionando o extravasamento do conteúdo celular e a iniciação de respostas inflamatórias. O outro tipo de morte celular foi chamado apoptose, no qual as células apresentavam diminuição de volume, dissociação das células vizinhas, além de permanecerem com as suas organelas relativamente intactas e apresentarem uma extensa condensação e fragmentação do DNA, expondo moléculas de superfície que sinalizam para a sua pronta fagocitose (KERR e cols., 1972; WYLLIE e cols., 1981).

Durante muito tempo, todos os eventos de morte celular foram classificados dentro dessa dicotomia. Esse tipo de classificação contribuiu imensamente para o aumento do interesse sobre a morte celular programada. No entanto, a simplificação e a esquematização generalizada que se seguiu após esta primeira caracterização incorrem no risco de negligenciar exceções. Atualmente existem

evidências crescentes de formas de morte celular que não se ajustam a esta classificação simplista (revisado por BURSCH, 2001).

Segundo a classificação atualmente aceita, existem 3 tipos de morte celular identificadas: o tipo 1, denominado apoptose; o tipo 2, denominado degeneração autofágica e o tipo 3 (degradação vesicular não-lisossomal), que por sua vez possui duas subdivisões: o tipo 3A, denominado desintegração lisossomal e o tipo 3B ou degeneração do tipo citoplasmática. Além destes, existe ainda a necrose, que não é considerada como um tipo de morte celular programada e sim accidental (GESKE e GERSHENSON, 2001). Como esse trabalho se restringiu somente a morte celular por apoptose, serão comentados a seguir maiores detalhes desse evento celular em especial.

2.1 Apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular essencial para a remoção de células danificadas durante o desenvolvimento como também para a manutenção da homeostase do organismo (JACOBSON e cols., 1997). Além disso, a incidência imprópria de apoptose está claramente associada a vários processos patológicos, como nas doenças neurodegenerativas, trauma neuronal e câncer (VASILAKOS e SHIVERS, 1996).

A morte celular por apoptose apresenta uma série de características morfológicas próprias que podem ser observadas por microscopia óptica, o que inclui a condensação do núcleo e do citoplasma. No núcleo, grandes porções de cromatina condensada se

agregam até que ele se torne picnótico. A membrana celular apresenta convoluções e através deste processo porções de citoplasma serão englobadas podendo, inclusive, ocorrer um destacamento desta porção do restante da célula, formando assim os corpos apoptóticos (revisado por RICH e cols., 1999; YUAN e YANKEN, 2000).

A apoptose pode ser disparada por diversos estímulos, desde estresse intracelular até sinalização extracelular ou mediada por receptores. Contudo, as evidências apontam para uma maquinaria de execução intracelular comum e bastante conservada ao longo da escala evolutiva incluindo várias enzimas que se encontram distribuídas em diferentes compartimentos celulares. Em mamíferos, a apoptose é regulada pela família Bcl-2 de proteínas, pela proteína adaptadora Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) e pela família de cisteína-proteases denominadas caspases (revisado por HENGARTNER, 2000).

Vários trabalhos da literatura descrevem que nas doenças priônicas há mecanismos de morte celular por apoptose em diferentes áreas do sistema nervoso, incluindo a retina, onde se observa uma intensa degeneração de fotorreceptores (BUYUKMIHCI e cols., 1987a; BUYUKMIHCI e cols., 1987b; KRETZSCHMAR e cols., 1997). Além disso, foi demonstrado também que no cerebelo de camundongos nocautes ocorre uma alta incidência de morte celular (SAKAGUCHI e cols., 1996; BROWN e cols., 1997) e que esses mesmos camundongos são mais sensíveis a espécies reativas de oxigênio (BROWN e cols., 1997), indicando assim que a proteína PrPc pode ter algum papel na sobrevivência neuronal.

2.2 A morte celular na retina

2.2.1 Organização da retina de rato

A retina de ratos adultos é formada por 3 camadas nucleares separadas por duas camadas plexiformes. Ela é constituída por vários tipos de células neuronais, como por exemplo células ganglionares, amácrinas, bipolares, horizontais e fotorreceptores além de células gliais como as células de Muller e microglia.

Em ratos neonatos, a retina em desenvolvimento é formada por dois estratos de corpos celulares e uma camada plexiforme que compreende os contatos sinápticos entre estas camadas. A camada ganglionar é formada por células ganglionares cujos axônios se projetam para vários alvos sub-corticais, principalmente para as camadas superiores do colículo superior (LINDEN e PERRY, 1983). O estrato externo é composto pela camada nuclear interna, onde se localizam as células amácrinas, e por uma camada neuroblástica, constituída principalmente por células proliferantes, neurônios pós-mitóticos indiferenciados e células em migração que darão origem às várias populações que formarão a retina de animais adultos. A camada neuroblástica é separada da camada plexiforme interna por algumas fileiras de células amácrinas relativamente diferenciadas, formando a porção interna da camada nuclear interna. Esta estrutura combina em cortes transversais individuais da retina neonatal todas as fases do desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, incluindo desde proliferação até estágios relativamente adiantados de diferenciação, como também um conjunto de tipos celulares distintos do ponto de vista estrutural e funcional. Essas duas características

fazem da retina de ratos neonatos um modelo geral do sistema nervoso central em desenvolvimento (esquema 2).

Esquema 2: Esquema geral da retina de rato neonato. A retina distribui-se em duas camadas de corpos celulares e uma camada plexiforme. GCL: camada ganglionar; IPL: camada plexiforme interna; INL: camada nuclear interna; NBL: camada neuroblástica; RPE: epitélio pigmentado da retina.

2.2.2 Morte celular programada na retina

Na retina de ratos, a morte celular programada é freqüentemente relacionada ao desenvolvimento e ocorre principalmente no período pós-natal. No dia do nascimento (P0), a camada de células ganglionares já está formada, compreendendo as células ganglionares

cujos axônios formam o nervo óptico e se projetam para os alvos visuais superiores. Ao mesmo tempo, a camada nuclear interna incipiente e as outras camadas presentes nesta idade se encontram relativamente indiferenciadas e em proliferação e são referidas em conjunto como a camada neuroblástica. O período de degeneração natural das células da camada ganglionar inicia-se no período embrionário e avança até as duas primeiras semanas pós-natal (PERRY e cols., 1983). A camada nuclear interna sofre degeneração durante a primeira semana pós-natal e a camada nuclear externa tem seu período de maior incidência de morte celular programada durante a segunda semana pós-natal (HORSBURGH e SEFTON, 1987).

2.2.3 O modelo de explantes

O modelo utilizado (REHEN e cols. 1996) para verificar o papel da interação PrPc-p66 na sobrevivência neuronal foi o modelo de explantes de retinas (REHEN e cols., 1996, 1999). As vantagens da utilização desse modelo consistem principalmente na localização anatômica privilegiada da retina no que diz respeito à sua dissecação e a lesão provocada pela remoção da mesma, pois ela fica restrita apenas a transecção do nervo óptico que lesa somente os axônios das células ganglionares. Com exceção das projeções retinofugais, todas as outras conexões intercelulares e a estrutura geral do tecido são preservadas. Assim, o modelo de explantes reúne características que o aproximam da retina na situação *in vivo*, pois as células não estão dissociadas e sim mantidas dentro da estrutura tecidual. A preservação da estrutura do tecido aliada à facilidade de manipulação

farmacológica faz desse modelo em especial adequado e eficiente na identificação de vias de sinalização inter- e intracelulares.

Assim, o objetivo da primeira parte deste trabalho é mostrar os resultados do nosso estudo da interação PrPc-p66. Serão discutidos os resultados da sinalização deflagrada a partir dessa interação e a relevância dessas vias de sinalização para o efeito neuroprotetor de PrPc. Dessa maneira, serão mostrados primeiramente os resultados obtidos usando o peptídeo derivado da teoria da hidropaticidade complementar, para num segundo momento serem apresentados os resultados obtidos com os peptídeos 1 e 2 da proteína ligante de PrPc, STI1.

3. Memória

Considerando-se o conteúdo que revelam, há basicamente dois grandes tipos de memórias: as declarativas ou explícitas, que são aquelas que os humanos podem relatar e reconhecer como memórias, e as memórias de procedimento ou implícitas, que muitos denominam também como hábitos, e que são adquiridos e evocados de maneira mais ou menos automática. A lembrança de um texto, de um fato, de um evento, do rosto de alguém querido são memórias declarativas. A memória de como se faz para caminhar, nadar ou para reconhecer, por exemplo, que nas listas telefônicas as iniciais costumam estar à direita, são memórias implícitas (IZQUIERDO, 1999).

Na memória declarativa participam várias regiões corticais (pré-frontal, entorrinal, parietal entre outras) e, fundamentalmente, o hipocampo, uma região cortical filogeneticamente antiga localizada no lobo temporal. As memórias implícitas ou hábitos envolvem, em diversos casos, algumas dessas áreas, mas dependem principalmente de circuitos subcorticais (núcleo caudato e pallidum) ou cerebelares.

Denomina-se amnésia (falta ou falha da memória), em geral, a perda da memória declarativa. Porém, nas amnésias mais graves ocorre também algum grau de perda de memória de procedimentos. Uma porção importante da população acima dos 50 anos padece de alguma forma de demência, nome que designa quadros clínicos progressivos de deterioração das funções mentais em geral. A mais comum das demências é a doença de Alzheimer, na qual predomina o déficit de memória. Porém, outras doenças como Parkinson, lesões vasculares do cérebro e a doença de Creutzfeldt-Jacob, entre outras,

também causam quadros demenciais que uma vez instalados, apresentam tratamentos apenas paliativos.

3.1 Função e duração das memórias

Do ponto de vista da função, há um tipo de memória que é crucial tanto no momento da aquisição como no momento da evocação de toda e qualquer memória, declarativa ou não: a memória de trabalho. Operacionalmente, ela mantém a informação “viva” durante segundos ou poucos minutos enquanto ela está sendo percebida ou processada. Essa forma de memória é sustentada pela atividade elétrica de neurônios do córtex pré-frontal (área do lobo frontal anterior ao córtex motor). Esses neurônios interagem uns com os outros através do córtex entorrinal, inclusive do hipocampo e do córtex e do córtex entorrinal, durante a percepção, aquisição ou evocação. Através dessas interações é determinado, por exemplo se uma dada informação é nova e convém guardá-la, ou se já existe e deve ser evocada. A atividade desses neurônios é regulada por vias dopaminérgicas tanto no córtex pré-frontal como no hipocampo e no córtex entorrinal (IZQUIERDO, 1999; KANDEL e cols., 2000).

A memória de trabalho dura alguns segundos e não deixa traços: depende exclusivamente da atividade neuronal. As memórias que deixam traços denominam-se “memória de curta duração” e “memória de longa duração”. A memória de longa duração é aquela que permanece por muitas horas, dias ou anos. Não se forma instantaneamente; o processo de formação ou consolidação dessa memória requer uma seqüência de etapas moleculares que duram

várias horas, durante as quais é suscetível a numerosas influências (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). A memória de curta duração é o processo ou conjunto de processos que mantém a memória “funcionando” durante o tempo em que a de longa duração não adquiriu sua forma definitiva.

3.2 A formação da memória de longa duração

O hipocampo é a estrutura central da formação das memórias declarativas. Dentro do hipocampo, a região-chave é a sua porção mais medial, denominada subárea CA1. Essa região não funciona isoladamente; ela é parte de um circuito que envolve o neocórtex temporal vizinho (córtex entorrinal), e mais duas subáreas hipocampais: o giro denteado e a subárea CA3. CA1 projeta-se, por sua vez, basicamente ao córtex entorrinal, formando assim um circuito funcionalmente ativo. O córtex entorrinal comunica-se com vários núcleos da amígdala e do septum (regulam a função hipocampal), com o córtex pré-frontal anterolateral (que é essencial para a memória de trabalho), com o córtex parietal associativo e com a maior parte do córtex sensorial. Assim, CA1 está interligado a todas as regiões do cérebro que registram qualquer tipo de experiência.

A seqüência de processos bioquímicos em CA1 necessária para a formação de memórias declarativas envolve processos próprios das sinapses excitatórias do sistema nervoso central, cuja imensa maioria utiliza ácido glutâmico como neurotransmissor. De maneira geral, o ácido glutâmico liga-se a seus receptores (METAB, AMPA e NMDA) ativando guanilil ciclase que, por sua vez, passa a produzir o guanilil

ciclase cíclico (cGMP), que atua ativando a proteína cinase G (PKG). PKG interage com as enzimas que produzem NO e CO. Esses gases estimulam fortemente a ação do ácido glutâmico tanto em nível pré-sináptico (agindo na célula que liberou esse neurotransmissor) como em nível pós-sináptico (agindo na célula que liga o neurotransmissor).

Além dessa cascata de reações, a ligação do ácido glutâmico a seu receptor na membrana também é capaz de ativar outra proteína – a proteína cinase C (PKC). Essa também tem o papel de favorecer a transmissão glutamatérgica mantendo-a por pelo menos 30 minutos após o estímulo. A ligação do ácido glutâmico a seu receptor (NMDA) promove aumento de íons Ca^{2+} intracelular que por sua vez ativa a proteína cinase dependente de cálcio (CaMKII), que atua diretamente sobre um receptor específico do ácido glutâmico (AMPA), cuja ação se estende por mais 3 horas (IZQUIERDO, 1999).

Entretanto, para que o estímulo recebido seja fixado para constituir uma memória de longa duração, é necessário que proteínas envolvidas na adesão celular “sedimentem” as sinapses recém-estimuladas. Para isso, o ácido glutâmico ativa a adenilil ciclase, enzima que produz cAMP, que por sua vez ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA). A PKA é capaz de ativar as proteínas nucleares CREB que regulam a transcrição gênica de diversas proteínas, entre elas proteínas de adesão celular. A chegada de proteínas de adesão àquela sinapse causa alterações morfológicas 5 a 7 horas após a aquisição (BERNABEU e cols., 1997; IZQUIERDO, 1999; KANDEL e cols., 2000;).

É interessante mencionar que o estado de alerta, o estresse e a ansiedade – estados regulados por hormônios corticosteróides e

adrenalina – podem modular o processo de formação da memória de longa duração, já que esses hormônios atuam diretamente na atividade de proteínas cinases (G e C especificamente). O excesso desses hormônios pode desfavorecer os processos hipocampais de formação da memória bem como a sua evocação. Já as vias vinculadas ao afeto (dopaminérgicas), emoções (noradrenérgicas) e estado de ânimo (serotoninérgicas) alteram a cadeia de eventos associados às proteínas CREB e à proteína cinase A (IZQUIERDO, 1999).

Nos últimos anos um grande número de trabalhos vem mostrando que além da participação da via cAMP/PKA/CREB, a via de Ras/MAPK/CREB também possui uma importante participação na consolidação da memória de longa duração (CAMMAROTA e cols., 2000; VIANNA e cols., 2000; SWEATT, 2001).

3.3 A memória de curta duração

Durante anos houve dúvidas se o(s) sistema(s) de memória de curta duração, que mantém a função mnemônica em operação enquanto CA1 e suas conexões vão formando cada memória de longa duração, são independentes dessa última ou se são apenas uma etapa da mesma. Ou seja, seriam as memórias de curta e longa duração etapas de um mesmo fenômeno ou são eventos paralelos e vinculados entre si? A solução dessa questão que foi primeiramente formulada em 1890 pelo psicólogo e filósofo norte-americano William James (1842-1910), dependia da possibilidade de se realizar um experimento onde fosse possível obter a consolidação da memória de

longa duração na ausência da memória de curta duração, para a mesma experiência no mesmo animal.

Quando avanços no conhecimento da bioquímica da memória em CA1 foram atingidos e o desenvolvimento de drogas que atuam como inibidores específicos se tornaram disponíveis, foi possível compreender que a memória de curta duração abrange processos independentes e paralelos aos da formação da memória de longa duração, porém vinculados a ela. Utilizando inibidores específicos das enzimas-chaves das vias de sinalização, Izquierdo e colaboradores (1998) demonstraram que quando determinadas drogas são infundidas em CA1, no córtex entorrinal ou em outras regiões do córtex, cancelam completamente a memória de curta duração sem afetar a de longa duração, no mesmo animal, e para a mesma experiência.

Mesmo tendo sido demonstrado tratar-se de fenômenos independentes, muitos dos sistemas de neurotransmissores e das cascatas de transdução de sinal assumem considerável destaque na formação dos dois tipos de memórias. Entretanto, no que diz respeito a sinalização, parece que a participação das vias cAMP/PKA/MAPK/CREB ocorre em momentos bastante específicos. Por exemplo, a enzima PKA apresenta dois picos de atividade para a formação da memória de curta duração: entre 0 e 90 minutos depois do treino realizado no experimento de esquiva inibitória. Até o momento acredita-se que esses picos de atividade não levam a fosforilação de CREB. Porém, na consolidação da memória de longa duração, os picos de atividade concentram-se em 0 e depois novamente em 180 minutos após o treino. CREB é ativado por PKA

em dois momentos distintos: o primeiro imediatamente após a ativação de PKA e o outro cerca de 3-6 horas após o treino. Por fim, MAPK também é ativado em momentos específicos para a formação da memória de curta ou longa duração. Essa enzima é ativada imediatamente após o treino (para formar a memória de curta duração) e em 3-6 horas após o treino (memória de longa duração) (VIANNA e cols., 2000).

Sabe-se que existe uma estreita correlação entre a formação da memória e a plasticidade neuronal (KANDEL e cols., 2000). Nossos dados anteriores mostraram que a interação PrPc-laminina induzia a formação e extensão de neuritos em linhagens PC 12 e em cultura primária de hipocampo de roedores. Assim, na segunda parte desse trabalho serão discutidos os resultados da sinalização desencadeada por essa interação primeiramente *in vitro* utilizando modelo de cultura primária de hipocampo de roedores. Além disso, procuramos correlacionar a importância da interação PrPc-laminina *in vivo* nos processos de formação das memórias de curta e longa duração e correlaciona-las com a sinalização por ela deflagrada.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- (1) Identificar as vias de sinalização deflagradas a partir da interação PrPc-p66;
- (2) Estudar a relevância das vias de sinalização desencadeada por esta interação para o processo de morte celular programada usando o modelo de retina de roedores neonatos;
- (3) Identificar as vias de sinalização deflagradas a partir da interação PrPc-laminina;
- (4) Verificar a relevância dos sinais gerados pela interação PrPc-laminina no processo de consolidação da memória.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Para alguns dos ensaios de neuroproteção foram usados ratos do tipo Lister criados no biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os testes de esquiva inibitória foram feitos utilizando-se ratos Wistar, machos, criados no biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os ensaios de sinalização foram feitos utilizando-se camundongos do tipo selvagem e PrP0/0 (BÜLLER e cols., 1992) que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Charles Weissmann (Imperial College of London). Esses camundongos correspondem a uma linhagem híbrida do cruzamento de animais C57BL6/J e 129SV e possuem carga genética similar. Os camundongos transgênicos denominados E57 (expressam a proteína PrPc deletada da região 32-121) e F35 (expressam a proteína PrPc deletada da região 32-134) (SCHMERLING e cols., 1998) foram gentilmente doados pelo Dr. Jochen Herms da Universidade de Göttingen, Alemanha.

2. Peptídeos e anticorpos

Os peptídeos utilizados nesse trabalho foram:

- peptídeo complementar (PrR) de sequência HVATKAPHHGPCRSSA, deduzido a partir da fita complementar da região correspondente aos aminoácidos 114 a 129 de prion

humano e que mimetiza a proteína ligante de PrPc caracterizada pelo nosso grupo;

- peptídeo complementar scrambled (SCRA) de sequência KSRGHVHCHAPAPATS;
- peptídeo neurotóxico (NTX) de sequência KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG;
- peptídeo 1 da proteína STI1 (STI1 pep1) de sequência ELGNDVKKKDFDTAL;
- peptídeo 2 da proteína STI1 (STI1 pep2) de sequência ELCEKAIEVGRENRED.
- peptídeo da cadeia γ 1 da laminina (γ 1) de sequência RNIAEIIKDI.
- peptídeo scrambled da cadeia γ 1 da laminina (scra γ 1) de sequência IRADIEIKIN.

Todos esses peptídeos foram quimicamente sintetizados e o grau de pureza analisado por HPLC pela empresa Neosystem de Strasbourg, França.

Os anticorpos utilizados nesse estudo foram:

- anticorpo policlonal produzido em coelho contra o peptídeo neurotóxico humano (α -NTX, aa 106-126), com o respectivo soro pré-imune, foram produzidos pela empresa Neosystem, França e purificados pelo método da proteína A Sepharose (SIGMA) (SAMBROOK e cols., 1989);
- anticorpo policlonal produzido em coelho contra a proteína de fusão GST-PrPc (α -GST-PrPc) e seu controle contra a porção GST (α -GST) foram produzidos no Instituto Ludwig e purificados

pelo método da proteína A Sepharose (SIGMA) (SAMBROOK e cols., 1989);

- anticorpo policlonal produzido em camundongo PrP0/0 contra a proteína His₆PrPc (α -PrPc) e seu respectivo pré-imune foram também produzidos no Instituto Ludwig e purificados pelo método da proteína A Sepharose (SIGMA) (SAMBROOK e cols., 1989).

3. Dissecção e tratamento das retinas

Os animais recém-nascidos, com 2-3 dias são sacrificados por decapitação e seus olhos são rapidamente removidos. As retinas são dissecadas em meio de cultura BME (*basal medium of Eagle*, GIBCO BRL). Nos ensaios de neuroproteção, após a dissecção, as retinas são cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 1 mm² e mantidas em meio BME acrescido de 5% de soro fetal bovino (GIBCO BRL), glutamina 2mM (SIGMA) e gentamicina 0.1 mg/ml (GIBCO BRL). Os fragmentos são então incubados a 37°C em atmosfera de ar com 5% de CO₂, em agitação orbital a 80-90 rpm pelo período de 24 horas. Como indutor da morte celular utiliza-se o inibidor de síntese protéica anisomicina 1µg/ml (SIGMA).

Nos ensaios de sinalização, as retinas são incubadas em meio de cultura contendo solução de peptídeo ou anticorpo na concentração apropriada. Após a realização de experimentos de curva dose-resposta e dose-tempo, estabeleceu-se que 80µM de peptídeo complementar, peptídeo complementar *scrambled* e peptídeo

neurotóxico durante 10 minutos a 37°C seriam as melhores condições para a realização do ensaio. Por outro lado, os experimentos correspondentes ao tratamento com os peptídeos 1 e 2 da proteína STI1 foram utilizadas as mesmas condições exceto pela concentração de peptídeo utilizada que dessa vez foi igual a 8 μ M. Após o período de incubação, as retinas são lavadas uma vez com PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4) e os extratos preparados de acordo com cada ensaio. Utiliza-se em média quatro retinas por tratamento.

Nos ensaios de neuroproteção onde foram utilizados inibidores das vias de sinalização o mesmo procedimento descrito anteriormente, com exceção de que os explantes foram tratados com anisomicina e PrR na presença de 100 μ M de Rp-cAMP (inibidor de PKA), 100 μ M de Sp-cAMP (ativador de PKA) ou 30 μ M de PD98059 (inibidor de MEK).

4. Procedimentos histológicos e detecção da morte celular

Nos ensaios de neuroproteção após o período de 24 horas de incubação das drogas, os explantes são então fixados por imersão em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, pH 7,2, por pelo menos 40 minutos, seguido de imersão em solução de sacarose 20%. Os explantes são orientados em uma câmara de alumínio com meio de inclusão OCT e auxílio de uma lupa. A câmara contendo os explantes orientados é então colocado sobre gelo seco e, após o congelamento,

são cortados em um criostato de forma a se obter cortes transversais de 10 μ m.

A detecção de núcleos picnóticos indicativos de apoptose à microscopia óptica é feita corando-se o material com uma anilina básica (vermelho neutro). Para a confirmação de apoptose utiliza-se a técnica de marcação *in situ* da clivagem de DNA (TUNEL) (REHEN e cols., 1996; VARELLA e cols., 1997). A quantificação é feita contando pelo menos três explantes de retina em cada grupo experimental, utilizando microscopia convencional ou de fluorescência. Na camada de células ganglionares de um corte de explante, as células apoptóticas são quantificadas e este valor é convertido na porcentagem em relação ao total de células presentes na camada de células ganglionares da mesma secção. Na camada neuroblástica, três campos distintos são quantificados por corte de explante e o resultado é expresso em número de células apoptóticas por determinada área da camada neuroblástica.

5. Imunohistoquímica e *western blot*

Secções foram incubadas tanto com anticorpo monoclonal 6H4 que reconhece o domínio que compreende os aminoácidos 144-152 de PrPc humano (PRIONICS) quanto com o anticorpo policlonal N10 (cedido pelo Dr. Stanley B. Prusiner, Universidade da Califórnia). Como controle do experimento, foram processadas em paralelo, secções sem o anticorpo primário. A revelação foi feita com auxílio do kit HRP-ABC (VECTOR) e diaminobenzidina como cromogênio.

No ensaio de *western blot*, as retinas de camundongos do tipo selvagem e nocaute foram dissecadas como descrito anteriormente e os extratos foram preparados pela lise direta em tampão Laemli. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. As proteínas imobilizadas na membrana foram então incubadas com anticorpo anti-PrPc (produzido em camundongo, 1:500, LEE e cols., 2001) durante 16 horas a 4°C, lavadas 3 vezes com TBST (40 mM Tris pH 7,4, 120 mM NaCl e 0,05% Tween 20). A seguir, prosseguiu-se o ensaio com auxílio de anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e reação quimioluminescente (AMERSHAM PHARMACIA). Como controle da quantidade de proteína aplicada fez-se um *western blot* usando anticorpo anti-actina (SIGMA, 1:200).

6. Biotinilação da proteína albumina sérica bovina (BSA) conjugada ao peptídeo PrR

A uma solução de BSA-peptídeo PrR (1mg/ml) foram adicionados cerca de 0,30 mg de biotina. Deixou-se incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Passado esse período, a solução foi diluída para volume final de 2,5 ml em tampão PBS 1x, pH 8,0 para em seguida ser passada numa coluna Sephadex G25 (Amersham-Pharmacia). A eluição da proteína BSA-peptídeo PrR biotinilado foi feita com PBS 1x, pH 8,0. Foram coletadas diversas frações eluídas da colunas e a concentração de proteína total de cada fração determinada por dosagem colorimétrica. A partir da relação entre o número de mols de peptídeo PrR e de BSA fornecido pela Neosystem

quando feita a síntese do peptídeo complementar conjugado a BSA calculou-se a concentração de peptídeo PrR-BSA biotinilado em cada fração obtida.

7. Ensaio de ligação do peptídeo PrR com PrPc

Nesse ensaio adsorveu-se 0,25 µg da proteína 6His-PrPc (e também 0,25 µg da proteína 6His-PrPc Δ 105-128) em poços de placa de ELISA, *overnight* a 4°C. Após lavar duas vezes com PBS 1x, pH 7,4 deixou-se bloquear com solução de gelatina 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Nova lavagem com PBS 1x, pH 7,4 foi sucedida pela adição de quantidades crescentes de peptídeo PrR-BSA biotinilado, como também de apenas BSA biotinilado como controle, durante 90min a temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, lavou-se 2x com PBS 1x, pH 7,4 para então dar início a uma nova incubação com avidina-peroxidase (SIGMA) 1:1000, por 1 hora a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após lavagem dos poços revelou-se o ensaio com solução de OPD. O bloqueio foi feito com solução de H₂SO₄ (2mol/l). A leitura da absorbância foi medida em leitor de ELISA em 490 nm.

8. Ensaio de competição

Estabeleceu-se que o ponto da curva de ligação correspondente a adição de 125 ng de peptídeo PrR-BSA biotinilado permaneceria

constante para competir com 2,5 e 10 vezes essa quantidade de peptídeo neurotóxico, 50, 250, 500 e 600 vezes essa quantidade de peptídeo PrR-BSA não biotinilado e finalmente 50, 250 e 500 vezes o peptídeo PrR scrambled. Assim, repetiu-se as etapas de adsorção de 6His-PrPc na placa e bloqueio com gelatina 1%. Após essa etapa incubaram-se por 90 min, a temperatura ambiente, os competidores acima descritos. Terminado esse período, adicionou-se em cada poço, 125 ng de peptídeo PrR-BSA biotinilado, deixando por mais 90min. Ao fim desse período, lavou-se duas vezes com PBS 1x, pH 7,4 para prosseguir com as etapas de incubação com avidina-peroxidase, revelação com OPD/H₂SO₄ e leitura da absorbância exatamente como descrito no item anterior.

9. Dosagem da concentração de cAMP

Após a dissecação e tratamento, os tecidos retinianos foram lisados com ácido tricloroacético 5%. O sobrenadante foi extraído três vezes com éter acidificado com HCl 0,1 N para então secar a fase aquosa. O resíduo foi ressuspensionado em 50 µl de tampão Tris-EDTA, pH 7,5. As concentrações de cAMP foram avaliadas por radioensaio usando o kit DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) que utiliza o princípio da competição pela proteína ligadora para medir cAMP.

O ensaio consiste na incubação da proteína ligadora de cAMP e [³H] cAMP de concentrações constantes enquanto são adicionadas quantidades crescentes e conhecidas de cAMP não marcado ou

volumes conhecidos de extratos celulares depois do tratamento acima descrito. Isto resulta num aumento do deslocamento de [^3H] cAMP por cAMP não marcado. As contagens da porcentagem de ligação proteína-cAMP são obtidas como uma função da concentração de cAMP não marcado, produzindo uma curva de calibração na qual foram lidas as amostras provenientes do tratamento das células.

10. Análise da atividade de proteína cinase dependente de cAMP (PKA)

Realizados com kit da GIBCO BRL, o substrato específico de PKA consiste de um heptapeptídeo Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly, freqüentemente denominado Kemptide. Para promover a inibição de PKA utiliza-se o peptídeo de sequência X-Arg-Arg-X-Ala-X, conhecido como PKI. Esses dois peptídeos são a base desse kit.

Assim, após o tratamento com os peptídeos, os tecidos retinianos ou as células hipocâmpais foram lavados com PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7,4) e lisados com tampão de extração (5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,5). Após homogeneização, detritos celulares foram removidos por centrifugação durante 2 minutos. Nesse instante, o extrato foi submetido a 4 diferentes condições de ensaio: sem inibidor, sem cAMP; com inibidor, sem cAMP; sem inibidor, com cAMP e com inibidor, com cAMP. Adicionou-se então a mistura de substrato de PKA com [γ - ^{32}P]ATP a cada tubo e a incorporação de ^{32}P proveniente de [γ - ^{32}P]ATP ao substrato é medida em cintilador β .

11. Análise da atividade de p44/42 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)

Após o tratamento de 10 minutos com 80 μ M de peptídeo PrR (para os ensaios de retina) ou após 48 horas de plaqueamento das células hipocâmpais, determinou-se a atividade de p44/42 MAP cinase através de kit específico (New England Biolabs). O ensaio utilizando esse kit consiste da imunoprecipitação de p44/42 MAPK ativos a partir de extratos celulares, utilizando para isso anticorpo anti-fosfo-p44/42 MAPK. Após essa etapa, procede-se o ensaio da cinase *in vitro* usando a proteína Elk-1 como substrato. A fosforilação de Elk-1 é detectada num ensaio de “western-blot” utilizando anticorpo anti-fosfo-Elk-1 (Ser383).

12. Extração de DNA genômico de animais transgênicos (E57 e F35)

Parte do córtex cerebral dos camundongos com 2-3 dias foi transferido para tubo eppendorff contendo 500 μ l de tampão de lise (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS 0,2%, NaCl 200 mM e proteinase K 100 μ g/ml) onde permanecem *overnight* a 55°C sob agitação. Após esse período de digestão do material, centrifuga-se por 10 minutos a temperatura ambiente para a remoção de material insolúvel. O sobrenadante é então misturado a um volume de isopropanol até a precipitação total do DNA, que é então lavado em

etanol 70%. A dissolução do DNA é feita em água bidestilada autoclavada (LAIRD e cols., 1991).

13. Reação de PCR para determinação do genótipo dos animais

Para a determinação do genótipo da ninhada resultante do cruzamento dos animais tg+ PrP+/- com PrP0/0 foram utilizados dois pares de “primers”. A reação com o primeiro par de seqüências 5' CCT GGG ACT CCT TCT GGT ACC GGG TGA CGC 3' e 5' CAA CCG AGC TGA AGT ATT CTG CCT 3' (denominados MUT-217 e PE2+, respectivamente). O resultado da reação com esses iniciadores indicam quais são os animais que possuem o transgene. O segundo par de iniciadores apresentam a seqüência 5' GGA ACA AGC CCA GCA AAC CAC TGG GGA GCG CCA TGA GC 3' e 5' GCC CCC CAC TAC TGG TTT GCT GGG CTT GTT C 3' (denominados p23 e p119, respectivamente). Esses iniciadores amplificam a região que codifica os aminoácidos 23-119. Assim, espera-se que somente os animais que contenham pelo menos uma cópia do gene PrP tenham reação positiva.

14. Cultura primária de hipocampo de ratos e camundongos.

Para a obtenção das células de hipocampo, procede-se a dissecação do tecido em embriões de camundongos (com 15-16 dias) ou ratos (com 17-18 dias) em meio HBSS (Hanks Balanced Salt

Solution, Gibco), à temperatura ambiente. Após a remoção das meninges, o tecido é picado em pedaços de aproximadamente 1-2 mm, para então triturar-se os pedaços de tecido com auxílio de pipeta pasteur até obter uma suspensão homogênea. A suspensão é diluída para atingir uma densidade, em meio de cultura, de 1×10^5 células/ml. Nesse momento, as células encontram-se prontas para serem plaqueadas em placas de 6 poços, previamente sensibilizadas com poli-L-lisina (5 μ g/ml), poli-L-lisina mais laminina (5 μ g/ml) ou ainda poli-L-lisina mais peptídeo $\gamma 1$ acoplado a BSA (1,5 μ g/ml).

15. Análise da atividade da proteína cinase C (PKC)

Os ensaios foram feitos utilizando-se o kit da GIBCO BRL, cujo princípio baseia-se na fosforilação e inibição específica de um peptídeo sintético da proteína básica de mielina (MBP) por PKC. Assim, após o plaqueamento, as células são lavadas com PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7,4) e lisadas com tampão de extração (20mM Tris, pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,5% Triton[®] X-100, 25 μ g/ml de aprotinina e 25 μ g/ml de leupeptina). Após homogenização, incuba-se em gelo por 30 minutos. A remoção de material precipitado é feita por centrifugação durante 2 minutos.

O passo seguinte é o da purificação do extrato celular contendo a proteína cinase C. Colunas de DEAE celulose (Whatman DE52) são primeiramente lavadas com 1-2 ml de tampão de lavagem (20mM Tris, pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA). O extrato celular é então adicionado à coluna que é lavada com 5 ml de tampão de lavagem

para então ser eluída com 5 ml de tampão de eluição (20mM Tris, pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM β -mercaptoetanol, 0,2 M NaCl).

O eluato é então submentido a duas condições de ensaio: uma com a presença de inibidor de PKC e outra na ausência deste. Adiciona-se a mistura de substrato de PKC com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a cada tubo e a incorporação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ao substrato é medida em cintilador β .

16. Análise da atividade de CREB

As amostras previamente preparadas (ver item 18) são lisadas com 100 μl de tampão de amostra (Tris-HCl 240 mM, pH 6,8, SDS 0,8%, β -mercaptoetanol 200 mM, glicerol 40%) e sonicadas em gelo durante 10 segundos. Cada amostra, nesse momento é aquecida a 95-100°C por 5 minutos e submetida à corrida eletroforética em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose.

O resultado foi analisado por “western-blot” utilizando anticorpo específico anti-CREB (Cell Signaling Technology, diluição 1:1000). Após o *stripping* da membrana, um novo “western-blot” foi realizado utilizando anticorpo específico anti-fosfoCREB (Cell Signaling Technology, diluição 1:1000). As bandas correspondentes a cada um dos tratamentos são densitometradas e a atividade de CREB é determinada pela relação entre CREB total e CREB fosforilada.

17. Teste de esquiva inibitória (*step-down inhibitory avoidance task*)

Nesse teste foram utilizados ratos Wistar machos (2-3 meses de idade, peso 180-210 g). Primeiramente, esses animais são submetidos a uma cirurgia para implantação bilateral de cânulas (peso aproximado 30 g e diâmetro de 1 mm) nas regiões CA1 do hipocampo nas coordenadas A 4,3 mm, L 4,0 mm, V 3,4 mm do Atlas de Paxinos e Watson.

O teste de esquiva inibitória efetivamente começa quando os animais são colocados na plataforma (2,5 cm de altura por 8,0 cm de largura) de uma caixa de acrílico contendo as dimensões de 50 X 25 X 25 cm. O chão desta caixa consiste de uma grade de barras de aço paralelas. O tempo que cada animal demora para descer da plataforma foi medido com a ajuda de um cronômetro automático. Nas sessões de treino, assim que o animal descia da plataforma para a grade, ele recebia um choque em suas patas de 0,5 mA, por 2 segundos.

Imediatamente após o treino, os ratos receberam 5 μ l bilateralmente através das cânulas implantadas, soluções de salina, anti-GST-PrPc (1,8 μ g/ μ l), anti-GST (1,8 μ g/ μ l), anti-laminina (0,12 μ g/ μ l), peptídeo gama 1 (0,08 μ g/ μ l), peptídeo gama 1 scrambled (0,08 μ g/ μ l), anti-GST-PrPc (3,6 μ g/ μ l) juntamente com peptídeo gama 1 (0,16 μ g/ μ l) ou anti-GST-PrPc (3,6 μ g/ μ l) juntamente com o peptídeo gama 1 scrambled (0,16 μ g/ μ l). Após 90 minutos da infusão das soluções os animais são submetidos ao teste para avaliar a memória

de curta duração. Assim, os mesmos animais são recolocados na plataforma da caixa de acrílico e o tempo que eles levam para descer até a grade é novamente medido. Após 24 horas da infusão das soluções repete-se o mesmo procedimento para a avaliação da memória de longa duração. Na fase de teste os animais não levam mais o choque.

Como controle, depois do experimento, os animais foram infundidos com 4% de azul de metileno em salina, sacrificados e seus cérebros processados para histologia (BERNABEU e cols., 1997; IZQUIERDO e cols., 1997) para verificação da localização da cânula. Somente os animais com a cânula situada corretamente na área pretendida (88 ratos de um total de 96) é que foram incluídos na análise estatística dos resultados.

Para os ensaios de sinalização um grupo de 70 animais foram sacrificados imediatamente ou 2 horas depois das infusões das soluções ministradas no período pós-treino.

18. Preparação das amostras de hipocampo de rato

Após serem sacrificados, os cérebros são imediatamente removidos e os hipocampus dissecados e homogenizados em tampão apropriado (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, 15 µg/ml de leupeptina, 50 mM NaF e 1 mM de ortovanadato de sódio) gelado.

As amostras foram então submetidas aos ensaios de dosagem enzimática conforme descritos nos itens acima.

19. Análise estatística

Os resultados de sinalização foram todos submetidos à análise estatística utilizando teste t de média única. Foram considerados um mínimo de 5 experimentos independentes para essa análise com $p < 0,05$.

A análise estatística dos ensaios de neuroproteção foi feita através da análise de variância seguido pelo teste de Duncan de séries múltiplas com o auxílio do software SPSSPC.

Nos ensaios de esquiva inibitória são mostradas as variações de latências de cada grupo de animais testados. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste Mann-Whitney U.

RESULTADOS

A interação PrPc-p66 e morte celular programada

Como um dos principais objetivos desse trabalho era caracterizar a relevância da interação PrPc-p66 nos mecanismos de morte celular programada, o primeiro passo seria verificar a expressão da proteína PrPc em retina de roedores recém-nascidos. Assim, a figura 1 mostra a imunohistoquímica de um corte de explante de retina de rato neonato. Já na figura 2 temos o *western blot* de extrato de retina de camundongos do tipo selvagem e PrP0/0 reagido com anticorpo anti-PrPc.

Figura 1: imunohistoquímica de seções transversais retina de rato na presença (A) ou ausência (B) de anticorpo monoclonal anti-PrPc. Os pontos mais escuros que aparecem na parte inferior das duas figuras correspondem ao epitélio pigmentado da retina contendo melanina. (*Experimento realizado por L.B. Chiarini*)

Figura 2: *Western blot* de extrato de retinas de camundongos do tipo selvagem e nocaute para PrP. Vemos que o anticorpo anti-PrPc reconhece uma banda na altura de 30-33 KDa correspondente a PrPc endógeno. O painel inferior corresponde ao *western blot* realizado com anticorpo anti-actina para servir de controle da quantidade de proteína presente em cada canaleta.

Podemos observar através das figuras 1 e 2 que a proteína PrPc é abundantemente expressa na retina tanto de rato quanto de camundongo do tipo selvagem em desenvolvimento.

Sabendo então da alta expressão de PrPc na retina de roedores neonatos, procuramos avaliar o efeito da interação PrPc-p66 na morte celular programada. Como de início, antes da caracterização da proteína STI1 como sendo a proteína de 66 KDa previamente identificada pelo nosso grupo (MARTINS e cols., 1997), dispúnhamos somente do peptídeo teórico (aqui referido sempre como PrR), era necessário demonstrar que esse peptídeo teórico era capaz de ligar a proteína PrPc. Para isso, foram realizados ensaios de ligação e competição utilizando a proteína His₆PrPc produzida em nosso laboratório adsorvida numa placa de ELISA e o PrR marcado com biotina para demonstrar essa interação.

Figura 3: Curva de ligação de PrPc e PrR. BSA-PrR ou BSA biotinilados foram incubados com His₆PrPc (-♦-) ou His₆PrPcΔ105-128 (-X-). A curva não-específica (-□-) foi subtraída da curva total (-♦-) originando a curva específica (-●-).

Figura 4: Ensaio de competição. Os resultados estão expressos em porcentagem de absorbância dos valores correspondentes a ligação PrPc-PrR específica. Os valores mostrados no eixo da abscissa correspondem ao número de vezes em relação à massa de His₆PrPc (125 ng) que foram adicionados cada um dos peptídeos não biotinilados. Foram realizados 3 experimentos independentes e considerados como estatisticamente diferente do controle os grupos que apresentaram $p < 0,05$ no teste T de média única.

Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4 mostram claramente a interação direta da proteína PrPc com o peptídeo teórico

PrR. A curva de ligação mostrada na figura 3 foi realizada mantendo a proteína PrPc adsorvida em poços de placa de ELISA em quantidade constante. O peptídeo PrR conjugado a BSA biotinilado foi adicionado em quantidades crescentes até atingir a saturação, gerando a curva total. O controle do ensaio foi feito utilizando apenas BSA biotinilado, o que gerou a curva inespecífica. Assim, da subtração das duas curvas obteve-se a curva específica. Fizemos também uma curva semelhante adsorvendo a proteína 6His-PrP Δ 105-128 na placa. A figura 3 mostra apenas um ponto dessa curva, em que 125 ng de peptídeo PrR-BSA biotinilado é adicionado e vemos que, na ausência do domínio onde predizemos, pela teoria da hidropaticidade complementar, que ocorreria a ligação do peptídeo complementar ao PrPc, não há ligação. Na figura 4 temos o ensaio de competição de peptídeos não biotinilados com o peptídeo PrR-BSA biotinilado. Dessa forma, mantendo constante o ponto 125ng de peptídeo PrR-BSA biotinilado adicionamos ao sistema um excesso de peptídeos não biotinilados em relação a esse valor. Assim, vemos que a ligação PrPc-PrR é inibida em cerca de 50% e 80% quando adicionamos, respectivamente 2.5 e 10 vezes do peptídeo neurotóxico. Entretanto, quando adicionamos 50, 250, 500 e 600 vezes a quantidade de peptídeo PrR-BSA não biotinilado em relação ao biotinilado, vemos que a inibição da ligação ocorre mais gradualmente indo desde a não inibição (50 vezes), 40% de inibição (250 vezes), 60% de inibição (500 vezes) até 90% (600 vezes). Finalmente, a adição de 50, 250 ou 500 vezes de peptídeo PrR *scrambled* (ou peptídeo com os mesmos aminoácidos originais mas com a seqüência trocada) não inibe a ligação de PrPc ao peptídeo PrR. Esses dados então evidenciam que PrPc interage

especificamente com o peptídeo teórico (PrR) através do domínio 106-126.

Para avaliar o possível envolvimento da interação PrPc-p66 com mecanismos de apoptose utilizou-se o modelo de explantes de retina de roedores neonatos. Assim, como já havia sido demonstrado anteriormente (REHEN e cols., 1996; REHEN e cols., 1999) anisomicina, um inibidor de síntese protéica é capaz de bloquear a morte de células ganglionares cujos axônios se mostram danificados após a dissecação e preparo dos explantes. Porém, ao mesmo tempo, anisomicina induz a morte celular por apoptose nas células pós-mitóticas da camada neuroblástica. Dessa maneira, nosso modelo de estudo consiste em incubar os explantes de retinas em desenvolvimento com anisomicina e, paralelamente incubar anisomicina e o peptídeo PrR, de modo a observar que tipo de efeito a interação PrPc-p66 pode acarretar no processo de morte celular.

As figuras 5 e 6 mostram os resultados desses experimentos realizados em retinas de ratos e camundongos, respectivamente. É interessante ressaltar que como o peptídeo não apresentou efeito na camada de células ganglionares da retina de rato (figura 5), foram omitidos os dados referentes à essa camada em retina de camundongos já que os mesmos resultados foram obtidos.

Figura 5: Efeito do peptídeo PrR sobre a morte celular nas camadas da retina de rato neonato. Os tratamentos correspondem a ANI: anisomicina 1 μ g/ml, PrR: 80 μ M, SCRA: peptídeo PrR *scrambled*: 80 μ M e FORSK: forskolina 10 μ M. * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao tratamento apenas com anisomicina (*Experimento realizado por L.B. Chiarini*).

Figura 6: Efeito do peptídeo PrR na camada neuroblástica de retinas de camundongos do tipo selvagem ou PrP^{0/0}. Os tratamentos correspondem as mesmas condições a que foram submetidas as retinas de rato mostradas na figura anterior. * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao tratamento apenas com anisomicina (*Experimento realizado por L.B. Chiarini*).

A partir desses resultados verificamos que o peptídeo teórico apresenta um efeito neuroprotetor da apoptose induzida por

anisomicina na camada neuroblástica, tanto de rato como de camundongo do tipo selvagem. O efeito observado é da ordem de 50% e dependente da presença da proteína PrPc, pois em camundongos onde essa proteína não é expressa (PrP 0/0) o peptídeo PrR não apresenta qualquer efeito. Além disso, vemos na figura 5 que o peptídeo PrR *scrambled* não é capaz de resgatar as células da morte induzida, mostrando que a seqüência predita pela teoria da hidropaticidade complementar que deu origem ao peptídeo teórico (PrR) é especificamente capaz de ligar PrPc e desencadear sinais neuroprotetores. Como controles foram testados os peptídeos na ausência de anisomicina para verificar se eles por si só apresentavam efeito na morte celular, o que como é possível observar, não ocorre. Além disso, foi feito também um controle positivo com forskolina. Esse controle é importante porque como demonstrado anteriormente (VARELLA e cols., 1997), essa droga consegue reverter o quadro apoptótico induzido por anisomicina através da ativação da enzima adenilato ciclase e conseqüente produção de cAMP.

Uma vez demonstrado o efeito neuroprotetor do peptídeo PrR, o próximo passo era determinar os sinais químicos desencadeados pela interação PrPc-PrR que dariam suporte mecânico ao efeito encontrado. Assim, nossa primeira tentativa foi avaliar se o tratamento das células da retina com PrR deflagraria sinais via cAMP/PKA. Essa opção baseou-se no fato de que resultados anteriormente descritos mostravam que cAMP era capaz de reverter a morte celular induzida por anisomicina na camada neuroblástica (VARELLA e cols., 1997). Assim, as figuras 7 e 8 representam os resultados relativos as

dosagens da concentração cAMP e atividade da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) em retinas de camundongos neonatos.

Figura 7: Resposta de cAMP ao tratamento de retinas de camundongos ao peptídeo PrR (80 μ M) ou ao controle positivo forskolina (10 μ M). Cada barra representa a média de 5 experimentos independentes e * representa os tratamentos que mostraram ser estatisticamente diferente do grupo controle (animais PrP^{+/+}) sem tratamento, $p < 0,05$ e ** significa estatisticamente diferente dos grupos controle dos animais PrP^{0/0}.

Figura 8: Variação da atividade de PKA em resposta ao tratamento de drogas (80 μ M de peptídeo PrR, 50 μ M 6-Cl-PB, 10 μ M Forskolina) em retinas de camundongos neonatos do tipo selvagem e nocaute. Os valores apresentados no eixo das ordenadas correspondem ao número de vezes que o aumento foi observado em relação ao grupo controle dos animais selvagens. Cada barra representa a média de 5 experimentos independentes e * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao grupo de animais PrP^{+/+} sem tratamento ($p < 0,05$). ** significa estatisticamente diferente dos grupos controle dos animais PrP^{0/0}.

Verificamos também o envolvimento da via das MAPKs no nosso modelo, através da análise das enzimas p44 e p42 MAPK. O resultado encontra-se representado na figura 9.

Figura 9: *Western blot* realizado com anticorpo anti-fosfo-Elk-1 como indicativo da atividade de p44/42 MAPK em retinas de camundongos. Essa é uma figura ilustrativa de 3 experimentos independentes que mostraram resultados semelhantes. A quantificação desses experimentos por densitometria fornece, em valores relativos, $PrP^{c+/+}$ sem tratamento: 1, $PrP^{c+/+}$ tratado com 80 μ M de PrR: $2,5 \pm 0,3$, $PrP^{c0/0}$ sem tratamento: $2,7 \pm 0,2$ e $PrP^{c0/0}$ tratado com 80 μ M de PrR: $2,8 \pm 0,1$.

Esse conjunto de experimentos traz um número de informações extremamente interessantes. Como é possível observar nas figuras 7, 8 e 9, a interação PrPc-PrR é capaz de desencadear sinais de forma a ativar tanto a via cAMP/PKA quanto a via das MAPK, uma vez que somente nas retinas de animais que expressam a proteína PrPc essa ativação é observada. O aumento da atividade da proteína quinase A induzida por PrR está num patamar próximo do aumento induzido pelo agonista dopaminérgico D1, 6-Cl-PB, o que é consistente com a presença funcional de receptores do tipo D1 na retina de roedores em desenvolvimento (SHEARMAN e cols., 1997). O fato das retinas nocautes não responderem ao estímulo do peptídeo PrR não significa que esses animais são insensíveis a estímulos nessas vias de

transdução de sinal. Como podemos observar nas figuras 7 e 8, a droga ativadora da enzima adenilato ciclase, forskolina, promove nos animais nocautes um aumento tanto na concentração de cAMP quanto na atividade de PKA, nos mesmos níveis encontrados nos animais do tipo selvagem.

Um outro resultado que foi para nós extremamente interessante refere-se aos índices basais apresentados pelos animais nocautes de cada um dos efetores estudados. O basal dos animais nocautes é sempre maior que dos animais normais, o que pode indicar que mecanismos compensatórios desencadeados pela ausência da proteína podem estar presentes nesses animais (BÜELLER e cols., 1992).

Uma vez estabelecido que a interação PrPc-PrR é capaz de deflagrar sinais via cAMP/PKA e MAPK resolvemos verificar se o efeito neuroprotetor do peptídeo PrR está relacionado a uma dessas vias ou a ambas. Para isso foram utilizados inibidores específicos tanto da via de cAMP/PKA como da p44/42 MAPK. Os resultados estão representados na figura 10.

Figura 10: Efeito de inibidores específicos das vias cAMP/PKA e MAPK em retinas de ratos neonatos. Rp-cAMP e Sp-cAMP são, respectivamente, um inibidor e um ativador de PKA. PD098059 é um inibidor da enzima MAPKK, ativadora de MAPK. * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao tratamento apenas com anisomicina (*Experimento realizado por L.B. Chiarini*)

A reversão do efeito neuroprotetor do peptídeo PrR é completamente abolida quando retinas de ratos são submetidas ao tratamento com anisomicina, PrR e 100 μ M de Rp-cAMP, um inibidor competitivo de PKA. Por outro lado, o estereoisômero Sp-cAMP, um ativador da proteína quinase A, utilizado na mesma concentração, potencializa o bloqueio da morte celular induzida por anisomicina, apresentando o mesmo efeito da forskolina (figura 6). Quando apenas são adicionados ao meio Rp-cAMP ou Sp-cAMP estes não apresentam qualquer efeito. Contudo, o inibidor da enzima MAPKK,

que ativa MAPK por fosforilação, potencializa o efeito protetor do peptídeo PrR. Além disso, esse inibidor por si só apresenta um efeito protetor da ação da anisomicina indicando assim que a ativação de MAPK na retina em desenvolvimento tem um caráter pró-apoptótico.

O conjunto de dados mostrados nas figuras 7 a 10 mostra que a interação PrPc-PrR desencadeia sinais via cAMP/PKA e MAPK. Entretanto, o efeito protetor da apoptose induzida por anisomicina é devido a via cAMP/PKA e não a MAPK, uma vez que essa via se mostrou pró-apoptótica.

Por fim, procuramos corroborar o papel da interação PrPc-PrR no mecanismo de morte celular programada com o auxílio de diversos anticorpos. As figuras 11 e 12 a seguir mostram o efeito de anticorpos contra PrPc sobre a morte celular induzida em retinas de ratos e camundongos.

Figura 11: Efeito de anticorpos anti-PrPc sobre a morte celular em retina de ratos. * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao tratamento apenas com anisomicina e ** significa que há diferença estatística em relação ao grupo tratado com anisomicina e α -PrPc (*Experimento realizado por L.B. Chiarini*).

Figura 12: Efeito do anticorpo anti-PrPc policlonal em retinas de camundongos. * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao tratamento apenas com anisomicina (*Experimento realizado por L.B. Chiarini*)

Na figura 11 fica claro que os anticorpos anti-GST-PrPc e o anti-neurotóxico bloqueiam o efeito protetor de PrR, muito provavelmente porque competem com o mesmo pelo mesmo sítio de ligação ou simplesmente por impedimento estérico. Entretanto, um terceiro anticorpo, policlonal produzido em camundongo nocaute, anti-PrPc inibe por si só 50% da morte celular induzida por anisomicina tanto em rato (figura 11) como em camundongos normais como é possível observar na figura 12. Nessa mesma figura, vemos que o efeito neuroprotetor desse anticorpo não aparece nos animais nocautes, corroborando assim, a idéia de que o efeito protetor depende da presença da proteína PrPc. Porém, como explicar os resultados de dois anticorpos atuarem como antagonistas e um outro como agonista? Na tentativa de elucidar essa questão, procuramos avaliar

as variações nas concentrações de cAMP após o tratamento dos explantes de retinas com esses anticorpos.

Figura 13: Efeito de vários anticorpos na concentração intracelular de cAMP. O ensaio representa uma média de 4 experimentos independentes e * representa valores significativamente diferentes do controle que corresponde ao grupo sem tratamento, $p < 0,05$.

Como é possível perceber, os anticorpos antagonistas anti-GST-PrP^c e anti-neurotóxico (α -NTX) não apresentam qualquer efeito sobre a concentração de cAMP. Todavia, o anticorpo anti-PrP^c policlonal produzido em camundongo nocaute, que apresentou um comportamento agonista foi capaz de aumentar a concentração de cAMP apenas nas retinas de camundongos do tipo selvagem, enquanto que nas retinas nocautes nenhum efeito foi observado.

Assim, o efeito agonista do anticorpo anti-PrPc está correlacionado com a sua habilidade de induzir aumento de cAMP intracelular.

Quando a proteína STI1 foi identificada como a p66 mimetizada pelo peptídeo PrR o desafio foi encontrar o domínio da molécula que se liga a PrPc. Para isso utilizou-se o programa HYDROPAT (JACHIERI e cols., manuscrito em preparação; ZANATA e cols., 2002) que considera a semelhança no perfil de hidropaticidade do conjunto de aminoácidos presentes em uma proteína quando comparada a outra seqüência polipeptídica (no caso, a seqüência do peptídeo PrR). O programa revelou dois domínios que tinham o perfil hidropático total ou parcialmente semelhante ao peptídeo PrR. Quando ensaios de ligação *in vitro* mostraram que a constante de dissociação no equilíbrio (Kd) da interação PrPc-STI1 é da ordem de $0.8 \times 10^{-7} \text{M}$ foi possível identificar que o peptídeo 1, cujo perfil de hidropaticidade é totalmente semelhante ao peptídeo teórico, é o real sítio de ligação a PrPc, compreendendo os aminoácidos 230-245. Esses resultados são explicados pela teoria da hidropaticidade complementar que prevê que os peptídeos teórico e real devem possuir o mesmo perfil hidropático e não necessariamente a mesma seqüência de aminoácidos (BRENTANI, 1988, 1990; BRENTANI e cols., 1988).

Dessa forma, com a disponibilidade da proteína de fusão His₆STI1 e dos peptídeos 1 (cujo perfil de hidropaticidade é totalmente semelhante ao peptídeo PrR) e 2 (parcialmente semelhante ao peptídeo teórico PrR) da proteína em nosso laboratório verificamos que resultados semelhantes àqueles gerados com o peptídeo teórico eram obtidos com a proteína real. Assim, primeiramente, a figura 14

mostra o resultado do ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti-STI1 em extrato de retinas de camundongos do tipo selvagem e nocautes, mostrando a presença dessa proteína na retina dos camundongos.

Figura 14: *Western blot* de extrato de retinas de camundongos do tipo selvagem e nocaute. Vemos que o anticorpo anti-STI1 reconhece uma banda na altura de 66 KDa correspondente a proteína STI1 endógena.

Confirmando assim a presença da proteína STI1 na retina o próximo passo seria avaliar através de ensaios de neuroproteção se a interação PrPc-STI1 reproduz os mesmos efeitos observados com o peptídeo PrR. Assim, a figura 15 mostra o ensaio de neuroproteção usando o peptídeo 1 da proteína STI1. As figuras 16 e 17 referem-se as dosagens da concentração de cAMP e da atividade de PKA em retinas de camundongos.

Figura 15: Efeito de 8 μ M de peptídeo 1 da proteína STI1 na morte celular induzida por anisomicina em retinas de camundongos P2. * significa estatisticamente diferente do grupo controle tratado apenas com anisomicina. (Experimento realizado por L.B. Chiarini)

Figura 16: Efeito de 8 μ M do peptídeo 1 da proteína STI1 na concentração intracelular de cAMP em retinas de camundongos neonatos. * significa estatisticamente diferente do grupo controle sem tratamento, $p < 0,05$ e ** significa estatisticamente diferente dos grupos controle dos animais *PrP0/0*.

Figura 17: Efeito de 8 μ M dos peptídeos 1 e 2 da proteína STI-1 na atividade de PKA em retinas de camundongos neonatos. * representa valores significativamente diferentes do controle correspondente ao grupo sem tratamento, $p < 0,05$.

O conjunto de dados das figuras 15, 16 e 17 mostram que o peptídeo 1 da proteína STI1 (8 μ M) apresenta com uma concentração 10 vezes menor que o peptídeo PrR (80 μ M) o mesmo tipo de efeito, ou seja, o peptídeo 1 protege as células da camada neuroblástica da morte induzida por anisomicina e deflagra sinais via cAMP/PKA. Além disso, no caso da figura 17, que mostra o efeito tanto do peptídeo 1 como do peptídeo 2, vemos que o peptídeo 1 induz uma resposta a concentração de PKA bem superior ao peptídeo 2 da proteína STI1. O efeito induzido pelo peptídeo 1 é similar ao efeito da forskolina.

Por fim, achamos interessante observar que tipo de efeito teríamos ao tratar retinas de camundongos que expressam uma

proteína PrPc cujo sítio de ligação com a proteína STI1 foi parcialmente ou totalmente deletado. Esta abordagem poderia nos ajudar a demonstrar a importância dessa interação na função neuroprotetora de PrPc. A linhagem de camundongos denominada E57 expressa a proteína cujo domínio 32-121 foi deletado enquanto que a linhagem F35 apresenta a deleção na região dos aminoácidos 32-134. Conforme mostrado por Shmerling e colaboradores (1998), os animais que expressam apenas a proteína truncada apresentam sinais de ataxia e acabam por morrer num período que vai de 4 a 9 meses. Portanto, para manter esses animais no biotério é preciso que eles expressem pelo menos uma cópia do gene da proteína PrPc. Os animais que são interessantes ao nosso estudo (que expressam somente a proteína truncada), são obtidos a partir do cruzamento dos animais heterozigotos (que possuem uma cópia do gene da proteína normal e uma da proteína truncada) com animais nocautes. É claro que desse cruzamento podem nascer camundongos com diferentes genótipos e por isso, ao mesmo tempo em que as retinas são dissecadas, coleta-se uma parte do cortex para extração de DNA e genotipagem de cada animal através de reação de PCR. Somente após esse procedimento é que se dá continuidade ao experimento de dosagem de cAMP. Um esquema mostrando a avaliação da presença dos transgenes de PrPc deletados e de PrPc endógeno está mostrado na figura 18. Os resultados do tratamento das retinas dos animais transgênicos com o peptídeo 1 da proteína STI1 estão apresentados na figura 19.

A-)

Mapa do gene que codifica a proteína PrPc

Mapas das regiões dos éxons 2/3 da proteína PrPc e das formas truncadas de PrPc

B-)

C-)

Figura 18: (A) Desenho esquemático das deleções realizadas no gene que codifica PrPc. (B) Gel representativo da prévia seleção dos camundongos a serem utilizados no experimento. Aqui foi utilizado o par de primers MUT 217 e PE2+ para a reação de detecção dos animais que possuem a proteína truncada. (C) Idem a (B) com a exceção de que nesse experimento foi utilizado o par de primers p23 e p119 para a detecção dos animais heterozigotos que expressam PrPc normal. Como o nosso interesse era apenas nos animais que expressam a proteína truncada, todos os animais que tiveram a reação de PCR negativa para esse par de primers e positiva para o par do item (B) é que foram escolhidos para a realização do ensaio mostrado na figura 19.

Figura 19: Efeito do peptídeo 1 da proteína STI1 na concentração de cAMP intracelular de retinas de camundongos neonatos. Análise da concentração de cAMP em camundongos do tipo selvagem, nocaute e transgênicos E57 (Δ 32-121) e F35 (Δ 32-134).

Resultados referentes aos animais selvagens e nocautes foram repetidos para melhor visualização do efeito do peptídeo 1 em cada linhagem. * significa estatisticamente diferente do grupo controle de animais selvagens que não foram tratados, $p < 0,05$.

Através da figura 19 podemos observar que os animais transgênicos, assim como os nocautes não respondem ao estímulo com o peptídeo STI1. Na verdade, os animais E57 apresentam um pequeno aumento de concentração de cAMP de 40%, mas esse aumento não representa uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Em outras palavras, podemos dizer que a região compreendida entre os aminoácidos 106-126 da proteína PrPc é essencial para a interação com a proteína STI1 e para a transmissão de sinais neuroprotetores.

A interação PrPc-laminina e os mecanismos de plasticidade neuronal e consolidação da memória

A segunda parte deste trabalho consistiu em verificar as vias de sinalização desencadeadas pela interação PrPc-laminina e que pudessem estar envolvidas com os fenômenos de plasticidade neuronal e consolidação da memória. As proteínas PrPc e laminina são abundantemente expressas na região do hipocampo (TARABOULOS e cols., 1992; CHEN e STRICKLAND, 1997; HAGG e cols., 1997) uma das mais importantes regiões para a formação da memória (KANDEL e cols., 2000). Além disso, nosso grupo demonstrou que a interação PrPc-laminina media o processo de diferenciação e extensão de neuritos tanto em células PC 12 quanto em cultura primária de hipocampo de roedores (GRANER e cols., 2000) indicando assim que essa interação pode estar envolvida em processos de plasticidade neuronal. Entretanto, para a completa caracterização da função biológica da interação PrPc-laminina era necessário identificar as vias de sinalização envolvidas nesse fenômeno. Para esclarecer a sinalização química envolvida nessa interação, utilizou-se tanto o modelo *in vitro* de cultura primária de hipocampo de ratos e camundongos quanto o modelo *in vivo* dos testes de esquiva inibitória onde foi avaliado tanto o efeito comportamental quanto bioquímico dos anticorpos e peptídeos específicos utilizados nos experimentos. Assim, as figuras 20 a 22 mostram as dosagens bioquímicas dos efetores de diferentes vias de transdução de sinal em células de cultura primária cultivadas em

placas sensibilizadas com poli-lisina, laminina ou peptídeo gama 1 (domínio da interação de PrPc na laminina).

A-)

B-)

Figura 20: Variação da concentração de cAMP em neurônios hipocámpais de rato (A) e camundongos do tipo selvagem e nocaute (B), plaqueadas sobre poli-lisina (PLL), laminina (PLL+LN) ou peptídeo gama 1 (PLL+ γ 1). Células plaqueadas sobre poli-lisina foram tratadas com forskolina (FORSK) como controle positivo. O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. * significa estatisticamente diferente do grupo controle de células que foram plaqueadas sobre poli-lisina e ** representa diferença estatística em relação aos grupos controles dos animais PrP^{0/0} plaqueados sobre poli-lisina (teste T de média única, $p < 0,05$).

Figura 21: Variação da atividade de proteína cinase dependente de cAMP em células do hipocampo de ratos (A) e camundongos do tipo selvagem ou nocaute (B), plaqueadas sobre poli-lisina (PLL), laminina (PLL+LN) e peptídeo gama 1 (PLL+ γ 1). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. * significa estatisticamente diferente do grupo controle de células que foram plaqueadas sobre poli-lisina ** representa diferença estatística em relação aos grupos controles dos animais PrP0/0 plaqueados sobre poli-lisina (teste T de média única, $p < 0,05$).

Figura 22: Variação da atividade de p42/44 MAPK de células do hipocampo de camundongos do tipo selvagem e nocautes, plaqueadas sobre poli-lisina (PLL), laminina (PLL+LN) e peptídeo gama 1 (PLL+ γ 1). Figura representativa de 3 ensaios independentes com resultados semelhantes.

Os dados mostrados nas figuras 20 a 22 mostram que a interação PrPc-laminina é capaz de ativar *in vitro* a via cAMP/PKA mas não a via das MAPK em células de cultura primária de hipocampo de embriões de roedores. Vemos que tanto em rato como em camundongos do tipo selvagem, o plaqueamento das células sobre laminina ou sobre o peptídeo gama 1 leva a um aumento da concentração de cAMP e da atividade de PKA. Porém, p42/44 MAPK não é ativado pelo plaqueamento das células de hipocampo de camundongos do tipo selvagem sobre laminina ou peptídeo gama 1 como acontece com cAMP/PKA. As células de cultura primária de neurônios hipocampais de camundongos nocautes também apresentam um índice basal maior que os camundongos selvagens. Porém, não se observa qualquer variação na concentração de cAMP ou na atividade de PKA ou ainda de MAPK quando essas células são plaqueadas sobre laminina ou peptídeo gama 1.

Foi avaliado também a atividade da proteína cinase C em células de hipocampo de embriões de rato plaqueadas sobre poli-lisina, laminina e peptídeo gama 1. O resultado desse conjunto de experimentos encontra-se representado na figura 23.

Figura 23: Variação da atividade de proteína cinase C em células hipocâmpicas de rato plaqueadas sobre poli-lisina (PLL), laminina (PLL+LN) e peptídeo gama 1 (PLL+γ1). Nesse caso éster de forbol foi usado como controle positivo. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes. * significa estatisticamente diferente do grupo controle de células que foram plaqueadas sobre poli-lisina (teste T de média única, $p < 0,05$).

É possível observar que as células plaqueadas sobre laminina e peptídeo gama 1 apresentam atividade de PKC maior do que as células plaqueadas sobre poli-lisina, semelhante ao observado nas figuras 20 a 22. Esses dados sugerem fortemente que a sinalização é mediada por PrPc, uma vez que ele é o único ligante do peptídeo γ1 descrito na literatura (GRANER e cols., 2000). Entretanto, como o experimento não foi realizado em células de camundongos nocautes não podemos afirmar diretamente que esse efeito é devido a interação PrPc-laminina.

Para avaliar melhor o papel dessas vias de transdução de sinal caracterizadas *in vitro* agora na consolidação da memória *in vivo*, utilizou-se o experimento de esquiva inibitória. As figuras 24 e 25 mostram os resultados do efeito de anticorpos e peptídeos específicos na formação da memória de curta e longa duração, respectivamente.

Figura 24: Efeito de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG anti-GST-PrPc (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-GST-PrPc e de um peptídeo com os mesmos resíduos do peptídeo $\gamma 1$, porém dispostos em outra ordem (*scrambled* - *scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc, sobre a consolidação da memória de curta duração. Os valores representam a mediana no tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esquiva inibitória. * significativamente diferente do grupo que recebeu IgG purificada do anticorpo anti-GST (teste de Mann-Whitney U, $p < 0,05$). As barras indicam o mínimo e o máximo dos tempos de latência para cada grupo de animais. As barras brancas indicam o tempo de latência de cada grupo na fase de treino, enquanto que as barras em cinza mostram a latência dos animais na fase de teste (90 minutos pós-treino). (Experimento realizado por A. Coitinho)

Figura 25: Efeito de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG anti-GST-PrPc (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-GST-PrPc e de um peptídeo com os mesmos resíduos do peptídeo $\gamma 1$, porém dispostos em outra ordem (*scrambled* - *scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-GST-PrPc sobre a consolidação da memória de longa duração. Os valores representam a mediana no tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória. * significativamente diferente do grupo que recebeu IgG purificada do anticorpo anti-GST (teste de Mann-Whitney U, $p < 0,05$). As barras indicam o mínimo e o máximo dos tempos de latência para cada grupo de animais. As barras brancas indicam o tempo de latência de cada grupo na fase de treino, enquanto que as barras hachuradas mostram a latência dos animais na fase de teste (24 horas pós-treino). (*Experimento realizado por R. Roesler e R. Walz*).

Como é possível perceber, as infusões intrahipocampais de anticorpos anti-GST-PrPc e anti-laminina na área CA1 do hipocampo de ratos, imediatamente após o treino, e testados 90 minutos (figura 23) ou 24 horas (figura 24) depois, promoveram diminuição no tempo de retenção, ou seja, os tratamentos foram amnésicos quando comparados aos animais que receberam salina ou anti-GST. Além disso, foi interessante observar que infusão do peptídeo da cadeia

gama 1, sítio de ligação de PrPc na molécula de laminina não alterou o tempo de retenção dos ratos na plataforma (figuras 24 e 25). Contudo, quando esse peptídeo foi co-infundido com anticorpo anti-PrPc, o efeito amnésico promovido por esse anticorpo pode ser revertido. É importante ressaltar que um outro peptídeo contendo os mesmos aminoácidos do peptídeo gama 1 numa seqüência diferente (peptídeo gama 1 *scrambled*) não foi capaz de causar o mesmo efeito. Além disso, a co-infusão do anticorpo anti-GST-PrPc com o peptídeo *scrambled* levou os animais a apresentarem os mesmos sinais de amnésia que o grupo que recebeu a infusão de anti-GST-PrPc, tornando evidente a relação da interação PrPc-laminina com a consolidação da memória de curta e também de longa duração.

Na tentativa de identificar as vias de transdução de sinal desencadeadas pela interação PrPc-laminina no processo de consolidação da memória, avaliamos a participação de algumas enzimas-chave no nosso modelo de estudo. Assim as figuras 26 e 27 mostram a atividade de PKA frente aos reagentes utilizados previamente nos ensaios de memória.

Figura 26: Efeito de infusões intrahipocampus bilaterais de IgG anti-PrPc ($1,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) ($0,08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc e de um peptídeo *scrambled* $\gamma 1$ (*scra* $\gamma 1$) sozinho ($0,08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc na atividade da proteína quinase A. As infusões foram dadas imediatamente após o treino e os animais foram sacrificados logo em seguida. * significativamente diferente do grupo controle que recebeu IgG purificada de anticorpo anti-GST (teste T de média única, $p < 0,05$).

Figura 27: Efeito de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG anti-PrPc (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc e de um peptídeo *scrambled* $\gamma 1$ (*scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc na atividade da proteína cinase A. As infusões foram dadas imediatamente após o treino e os animais foram sacrificados 2 horas depois. * significativamente diferente do grupo controle que recebeu IgG purificada de anticorpo anti-GST (teste T de média única, $p < 0,05$).

Como podemos observar, a infusão de anticorpos anti-GST-PrPc e anti-laminina que provocavam um efeito amnésico nos animais testados (figuras 24 e 25), também induz uma significativa diminuição da atividade da proteína cinase dependente de cAMP tanto 0 (figura 26) como 2 horas (figura 27) pós-treino. Por outro lado, a infusão simultânea de anticorpo anti-GST-PrPc e peptídeo gama 1 reverte o quadro amnésico da infusão do anticorpo sozinho (figuras 24 e 25), e mantém inalterada a atividade da PKA em 0 ou 2 horas pós-treino. Contudo, a co-infusão de anti-GST-PrPc e peptídeo gama 1 *scrambled* também leva à uma diminuição significativa da atividade de PKA em 0

e 2 horas pós-treino. Esses dados sugerem fortemente que a interação PrPc-laminina leva a ativação dessa enzima para a consolidação tanto da memória de curta quanto na de longa duração.

Na próxima etapa, procurou-se avaliar o envolvimento da interação PrPc-laminina sobre a atividade de p44/42 MAPK e CREB na formação da memória de curta e longa duração a partir. As figuras 28 e 29 mostram a atividade de p44/42 MAPK na memória de curta e longa duração enquanto que as figuras 30 e 31 mostram os resultados relativos a atividade de CREB para os mesmos eventos.

Figura 28: Efeito de infusões intrahipocampus bilaterais de IgG anti-PrPc (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc e de um peptídeo *scrambled* $\gamma 1$ (*scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc na atividade de p42/44 MAPK. As infusões foram dadas imediatamente após o treino e os animais foram sacrificados logo em seguida. * significativamente diferente do grupo controle que recebeu IgG purificada de anticorpo anti-GST (teste T de média única, $p < 0,05$).

Figura 29: Efeito de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG anti-PrPc (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) , do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc e de um peptídeo *scrambled* $\gamma 1$ (*scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc na atividade de p42/44 MAPK. As infusões foram dadas imediatamente após o treino e os animais foram sacrificados 2 horas depois. Cada grupo foi comparado ao controle que corresponde ao grupo que recebeu IgG purificada de anticorpo anti-GST (teste T de média única, $p < 0,05$).

Figura 30: Efeito de infusões intrahipocampus bilaterais de IgG anti-PrPc (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc e de um peptídeo *scrambled* $\gamma 1$ (*scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc na atividade de CREB. As infusões foram dadas imediatamente após o treino e os animais foram sacrificados logo em seguida. Cada grupo foi comparado ao controle que corresponde ao grupo que recebeu IgG purificada de anticorpo anti-GST (teste T de média única, $p < 0,05$).

Figura 31: Efeito de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG anti-PrPc (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), do peptídeo derivado da cadeia gama 1 da laminina (RNIAEIIKDI) (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc e de um peptídeo *scrambled* $\gamma 1$ (*scra* $\gamma 1$) sozinho (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc na atividade de CREB. As infusões foram dadas imediatamente após o treino e os animais foram sacrificados 2 horas depois. Cada grupo foi comparado ao controle que corresponde ao grupo que recebeu IgG purificada de anticorpo anti-GST (teste T de média única, $p < 0,05$).

Como é possível perceber apesar das semelhanças encontradas nos testes comportamentais, profundas diferenças foram observadas entre os dois “tipos de memória” no que se refere a sinalização. Na figura 28 observamos que a atividade de p42/44 MAPK apresenta os mesmos resultados encontrados nos testes de esquiva inibitória e de atividade de PKA. Ou seja, a infusão de anti-GST-PrPc e anti-laminina diminuem a atividade de MAPK assim como a co-infusão de anti-GST-PrPc e peptídeo gama 1 *scrambled*. Já a co-infusão de anti-GST-PrPc

e peptídeo gama 1 mantém a atividade da enzima inalterada, assim como a infusão de peptídeo gama 1. Contudo, quando o mesmo ensaio foi realizado com as amostras correspondentes ao tempo 2 horas pós-treino, nenhuma alteração na atividade da enzima foi observada. O mesmo pode-se dizer das figuras 30 e 31 correspondentes a dosagem da atividade de CREB.

Assim, nossos resultados sugerem que a interação PrPc-laminina desencadeia sinais via cAMP/PKA/MAPK para a consolidação da memória de curta duração enquanto que para a consolidação da memória de longa duração apenas a via cAMP/PKA parece envolvida.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a interação de PrPc com a proteína de 66 KDa desencadeia uma resposta neuroprotetora na camada neuroblástica da retina de roedores em desenvolvimento. Fica claro que essa resposta depende da presença de PrPc endógeno na superfície das células da retina uma vez que, em animais nocautes para a proteína PrPc, essa resposta neuroprotetora não é observada. Foi demonstrado também que a interação PrPc-p66 ativa as vias de sinalização de cAMP/PKA e MAPK, porém, o efeito neuroprotetor é mediado pela ativação da via da proteína quinase dependente de cAMP. Além disso, foi demonstrado também que anticorpos contra a proteína PrPc que induzem aumento na concentração de cAMP também promovem resposta neuroprotetora dependente de PrPc.

Ao ser constatado o efeito neuroprotetor da interação PrPc-p66 surgiu a questão: o efeito protetor é devido a interação direta do peptídeo PrR com PrPc ou PrR estaria simplesmente desligando a proteína PrPc do seu ligante endógeno? Responder essa questão era fundamental para entender a função de PrPc pois se o efeito observado fosse devido ao desligamento da ligação PrPc-p66 da célula poderia significar que PrPc é uma proteína pró-apoptótica. Para resolver essa questão, foram realizados alguns experimentos com o peptídeo neurotóxico (aa 106-126), que é similar a sequência de aminoácidos 105-125 tanto de rato quanto de camundongos, e que induz morte celular em cultura primária de neurônios. Os experimentos

realizados indicaram que o peptídeo neurotóxico (NTX) é capaz de deslocar a ligação entre o peptídeo PrR e a proteína PrPc (figura 4). Além disso, a incubação de explantes de retinas com o peptídeo NTX não bloqueia a morte celular induzida por anisomicina; mas, por outro lado, quando o peptídeo NTX é pré-incubado com PrR o efeito neuroprotetor deixa de ser observado (CHIARINI e cols., 2002). Há um trabalho recente que descreve que em células SH-SY5Y derivadas de neuroblastoma humano, esse peptídeo promove morte celular por apoptose ativando a proteína p38 MAPK (THELLUNG e cols., 2002). Esse conjunto de dados então mostra que a hipótese da interação de PrPc com PrR levar a proteção contra a morte celular é a mais plausível.

Foi demonstrado que tanto a via cAMP/PKA quanto a via da MAPK são ativadas pelo tratamento das retinas de camundongos do tipo selvagem com PrR, enquanto que nenhum efeito é observado nas retinas nocautes. Há trabalhos na literatura que relatam que cAMP é o mensageiro responsável pela proteção das células da camada neuroblástica contra a degeneração (REHEN e cols., 1996; VARELLA e cols., 1997; VARELLA e cols., 1999; SILVEIRA e cols., 2002). Esse dado é totalmente consistente com os resultados apresentados nesse trabalho. Além disso, dados não publicados do grupo do Dr. Rafael Linden mostram que o peptídeo PrR também protege da degeneração, as células da camada de fotorreceptores das retinas de roedores idosos, o que pode sugerir que a função neuroprotetora da proteína PrPc possa ser mantida durante diferentes estágios da vida de um organismo. O que torna o resultado do peptídeo PrR ativar as vias cAMP/PKA e MAPK mais interessante é justamente o fato de que

enquanto a primeira está associada a proteção contra apoptose a segunda via se mostrou pró-apoptótica. Esse resultado pode então explicar o porquê do efeito neuroprotetor de PrR ser limitado a 50%. Pode-se imaginar que o balanço entre essas duas vias de sinalização anti- e pró-apoptótica seja o motivo pelo qual nem o peptídeo teórico PrR nem o peptídeo real da proteína ligante de PrPc, STI1 consigam resgatar 100% das células da morte induzida por anisomicina. Esse resultado sugere que a proteína PrPc pode atuar como um receptor trófico que após o estímulo ocasionado pela ligação com a proteína de 66 KDa levaria a sobrevivência celular através da via cAMP/PKA. O efeito neuroprotetor de anticorpos contra PrPc que são capazes de induzir a produção de cAMP suporta tanto a idéia de que PrPc seja uma molécula sinalizadora como a via da proteína cinase dependente de cAMP ser a via de transdução de sinal deflagrada por PrPc.

Como explicar o fato de que uma molécula ancorada na superfície externa da membrana por GPI possa levar a ativação da enzima adenilato ciclase, que é normalmente regulada pela família de proteínas G que estão associadas com a superfície interna da membrana? Várias proteínas ancoradas por GPI são capazes de transmitir sinais para proliferação, secreção de citocinas e apoptose em leucócitos e linhagens de células linfóides (revisado por HOREJSI e cols., 1998). Além disso, há evidências de que proteínas ancoradas por GPI podem transduzir sinais ao citoplasma que resultem na fosforilação de proteínas com resíduos de tirosinas (LISANTI e cols., 1994), na mobilização de Ca^{2+} intracelular e em alguns casos na produção de fosfcinosídeos e diacilglicerol. Entretanto, não há nada descrito que relacione a ativação da via cAMP/PKA por proteínas

ancoradas por GPI. Contudo, alguns autores viram proteínas G associadas a proteínas ancoradas por GPI em microdomínios da membrana caracterizados por terem baixa densidade e serem insolúveis em detergentes devido à presença de moléculas de colesterol e lipídios (SOLOMON e cols., 1996, 1998; LISANTI e cols., 1999; OH e cols., 2001). De fato, a proteína PrPc já foi encontrada nesses domínios, denominados *rafts* (KESHET e cols., 2000). Além disso, dados não publicados do nosso laboratório indicaram que a proteína STI1 também está presente nos *rafts*, sugerindo que essas duas proteínas co-localizam nessa região da membrana e que por isso poderiam deflagrar o sinais de ativação da proteína G nesse compartimento.

Em 2000, Mouillet-Richard e colaboradores, publicaram um trabalho onde através de *cross-linking* com anticorpo anti-PrPc eles observaram a ativação de uma proteína tirosina quinase chamada Fyn em uma linhagem de células neuroectodermais. Porém, esse resultado foi apenas observado quando as células eram submetidas a um processo de diferenciação e era restrito a neuritos. Apesar desse estudo indicar a candidatura de PrPc como molécula sinalizadora, ele não mostra nenhuma função fisiológica relacionada à ativação de Fyn. Já em 2001, Bounhar e colaboradores mostraram ser possível prevenir a morte celular induzida pela super expressão da proteína Bax através da super expressão de PrPc em cultura primária de neurônios humanos. Contudo, esse efeito parece estar estritamente relacionado aos domínios amino-terminais de uma forma transmembrânica de PrPc que é muito rara de encontrar na membrana.

Linhagens imortalizadas de células do hipocampo de animais nocautes se mostraram muito mais sensíveis a apoptose induzida pela ausência de soro no meio de cultura que aquelas de animais do tipo selvagem. Ao mesmo tempo, tanto a expressão de PrPc quanto a de Bcl-2 protegem essas células da apoptose (KUWAHARA e cols., 1999). Esses dados também são consistentes com a idéia de que a proteína PrPc tenha uma função protetora. Todavia, se PrPc transmite sinais neuroprotetores, então por que os camundongos nocautes para PrP não apresentam morte neuronal espontânea? Uma possibilidade seria imaginar que a ausência da proteína PrPc desde os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário levaria o sistema a desenvolver mecanismos compensatórios nas vias de sinalização que regulam os mecanismos de morte celular. Talvez essa hipótese possa ser também enfatizada pelo fato dos animais nocautes apresentarem atividades basais tanto da via cAMP/PKA quanto MAPK constitutivamente maiores que os animais selvagens (figuras 7 a 9). Por outro lado, um estudo recente mostrou que a deleção de PrPc em camundongos adultos (*conditional knockout*) não leva a degeneração (MALLUCI e cols., 2002), o que poderia ser considerado uma evidência contra a idéia de PrPc mediar neuroproteção (pelo menos no que diz respeito as doenças priônicas). No entanto, os autores não fizeram nenhum experimento de forma a verificar eventuais alterações nas vias de transdução de sinal (como cAMP/PKA e MAPK).

Nos últimos anos, muito se tem discutido a respeito das doenças priônicas serem resultado de um ganho de função neurotóxica da proteína PrPc ou então da perda da função normal da proteína. A primeira hipótese está fortemente apoiada nos trabalhos que

observaram duas construções de animais PrP^{0/0} distintas sendo que em ambos os casos os animais não demonstraram qualquer anormalidade anatômica, de desenvolvimento ou comportamental (BÜELER e cols., 1992; MANSON e cols., 1994). Entretanto, esses trabalhos não excluem a possibilidade de que a perda da função normal de PrP^c em virtude da sua conversão para PrP^{sc} possa contribuir para o processo infeccioso, apesar de ser improvável que esse seja o único mecanismo patogênico. De fato, nossos resultados indicam fortemente que PrP^c é uma proteína protetora da morte celular e a perda dessa função devido a mecanismos ainda não bem esclarecidos, teria como consequência a morte neuronal observada nos casos de doença.

A identificação da proteína de 66 KDa como sendo a proteína STI1 foi um grande avanço para o entendimento da função biológica da proteína PrP^c. Além disso, ela veio confirmar nossos dados com o peptídeo teórico PrR. Os ensaios de neuroproteção realizados com a proteína recombinante His₆STI1 (ZANATA e cols., 2002) e com o peptídeo 1 da proteína STI1 (figura 14) confirmaram os resultados obtidos com PrR a partir de concentrações bem menores (32 vezes menor para o caso da His₆STI1 e 100 vezes menor para o peptídeo 1). É importante ressaltar que o efeito protetor observado com o tratamento das retinas de roedores em desenvolvimento é totalmente dependente da expressão de PrP^c uma vez que ele não foi observado em retinas de camundongos nocautes. Da mesma forma, a sinalização desencadeada pela interação PrP^c-STI1 é via cAMP/PKA (figuras 15 e 16) como observado anteriormente com o peptídeo PrR. A via de p44/42 MAPK não foi verificada, mas pelo fato de tanto a proteína

quanto o peptídeo 1 da STI1 resgataram 50% das células da morte induzida por apoptose é razoável supor que a interação PrPc-STI-1 possa ativar essa via de sinalização.

Quando Shmerling e colaboradores (1998) descreveram a construção de animais transgênicos que expressavam a proteína PrPc com deleções na região amino-terminal e que essa forma truncada da proteína levava os animais a desenvolverem ataxia e degeneração das células de Purkinje, os autores justificaram o aparecimento dos sinais clínicos da doença propondo que PrPc desencadearia sinais para sobrevivência associando-se a uma proteína ligante. A forma truncada que apresenta a deleção da região em que PrPc liga-se a proteína STI1 corresponde justamente a região que, quando deletada, leva os animais a ficarem doentes. Nossos dados de sinalização mostram (figura 15) que ao contrário do observado nos animais selvagens, o tratamento das retinas com o peptídeo 1 da STI1 não induz aumento da concentração de cAMP, mostrando que na ausência do sítio de ligação o sinal para o efeito neuroprotetor não é transduzido. O fato dos animais E57 e F35 terem o nível basal de cAMP igual aos animais selvagens pode ser interpretado como mais uma evidência a favor da hipótese do mecanismo compensatório, já que sendo a proteína expressa (mesmo sendo numa forma truncada) o mecanismo compensatório que permite que os nocautes se desenvolvam normalmente não estaria ativado levando assim os camundongos transgênicos a morte. Porém, não podemos deixar de mencionar que esse experimento é passível de críticas uma vez que não tivemos acesso ao controle mais adequado que seria as retinas dos camundongos transgênicos que apresentam a deleção da região

dos aminoácidos 32 a 93 por ser essa a região descrita por ligar ions Cu^{2+} . Esse controle seria importante porque muitos trabalhos na literatura descrevem que a proteína PrPc teria como função participar da homeostase de cobre. Como esses camundongos expressam a proteína com o domínio de ligação a STI1 seria interessante demonstrar que nesses camundongos o peptídeo 1 teria o mesmo efeito que ele tem nos animais selvagens. Isso talvez explicasse o fato dos transgênicos deletados apenas na região de ligação a cobre desenvolverem-se normalmente, confirmando definitivamente, a nossa hipótese de que a região 114-129 onde liga-se a proteína STI1 seja o domínio responsável pela função neuroprotetora da proteína PrPc.

A partir do momento em que nosso grupo caracterizou a ligação entre a proteína PrPc e laminina surgiu a questão: qual seria o significado biológico dessa interação?

A laminina está envolvida em diversas atividades biológicas como adesão, migração e espalhamento celulares (KLEINMAN, 1987). Além disso, a molécula da laminina participa de processos relacionados ao sistema nervoso central, como no crescimento de neuritos, no direcionamento do cone de crescimento e na formação de sinapses (VENSTRON e REICHARDT, 1993; LUCKENBILL-EDDS, 1997). Em 1997, Chen e Strickland demonstraram que a degradação de laminina via ativador de plasminogênio/plasmina promovia a morte de neurônios hipocâmpais. Esses resultados indicam um possível papel da laminina na sobrevivência e manutenção de neurônios. Foi demonstrado que proteínas da matriz extracelular são fatores importantes para a sobrevivência de vários tipos celulares. Quando

células epiteliais ou neuronais são impedidas de interagir com a matriz, elas tornam-se completamente inviáveis (TALHOUK e cols., 1992). A perda dessas células pode determinar a formação de cavidades ou dar espaço para a acomodação de outros tipos de células durante fases precoces do desenvolvimento embrionário. Talvez, a interação entre PrPc e laminina poderia estar envolvida na manutenção dessas células.

Em Graner e colaboradores (2000), nosso grupo demonstrou que anticorpos anti-PrPc inibem significativamente o crescimento de neuritos induzidos por laminina tanto em células PC 12 como em células de cultura primária de neurônios hipocampais de ratos e camundongos. Desta forma demonstrou-se que a interação PrPc-laminina está envolvida no mecanismo de neuritogênese. O mapeamento do sítio de ligação da laminina a PrPc, através de ensaios de competição com peptídeos de funções bem estabelecidas correspondentes a determinadas regiões da laminina apontou o peptídeo RNIAEIIKDI, presente na região C-terminal da cadeia $\gamma 1$ da laminina (MERCADANTE, 2000). Esse peptídeo corresponde ao domínio responsável pelo estímulo tanto da adesão quanto do crescimento de neuritos em neurônios de cerebelo em cultura primária (LIESE e cols., 1989). De fato, o tratamento de neurônios em cultura primária de hipocampo de rato com anticorpos anti-PrPc inibiu cerca de 50% da indução de neuritos quando essas células foram plaqueadas sobre laminina. O efeito inibitório desse mesmo anticorpo aumentou para 80% quando as células foram plaqueadas sobre o peptídeo $\gamma 1$, indicando que a neuritogênese mediada por PrPc acontece quando a proteína se liga a esse domínio específico da

laminina. Esses dados foram confirmados em neurônios hipocampais de camundongos selvagens. Entretanto, verificou-se que em cultura primária de neurônios do hipocampo de animais nocautes para PrPc o crescimento de neuritos sobre laminina, em relação aos selvagens era bem menor e a indução desses prolongamentos não foi inibida pelo tratamento com anti-PrPc. Além disso, os neurônios provenientes de animais nocautes foram incapazes de estender neuritos quando plaqueados sobre o peptídeo gama1 (GRANER e cols., 2000). Assim, esses dados sustentam definitivamente a idéia de que a interação PrPc-laminina apresenta uma função biológica relacionada a plasticidade neuronal. Porém, a sinalização química envolvida nesse evento celular, deflagrada pela interação entre as duas proteínas, ainda não estava esclarecida. Na literatura, vários trabalhos tentam relacionar a formação e extensão de neuritos com cascatas de sinalização envolvendo tanto a via cAMP/PKA (SONG e cols., 1997; VOGT e cols., 2001), como a via MAPK (VOGT e cols., 2001; SON e cols., 2001; BOGLARI e SZEBERENYI, 2001) e também PKC (GOODMAN, 1996; SEGAL e GREENBERG, 1996) entre outras vias de transdução de sinal. Porém, a complexa maquinaria das cascatas de transdução de sinal responsáveis pela diferenciação neuronal ainda está longe de ser totalmente elucidada. Schwab e colaboradores (1993) comentam em seu artigo que apesar do crescimento de neuritos promovidos por moléculas da matriz extracelular (como laminina e fibronectina) ser aparentemente um processo dependente de PKC, alguns autores não conseguiram obter medidas diretas da atividade da enzima durante o processo de neuritogênese. Em Vogt e colaboradores (2001), os autores demonstraram que as vias

cAMP/PKA e MAPK atuam de forma independente durante o início da neuritogênese de células de cultura primária de neurônios para depois passarem a atuar em conjunto durante os estágios mais tardios do desenvolvimento. Contudo, Boglari e Szeberenyi (2001) utilizando a linhagem de células PC 12, observaram que a formação de neuritos ocorria de maneira independente da via MAPK.

Apesar das controvérsias nossos resultados de sinalização no modelo de apoptose foi um estímulo para o estudo das vias cAMP/PKA e MAPK também no modelo de neuritogênese. Assim, nossos resultados indicam que a interação PrPc-laminina ativa a via cAMP/PKA no modelo de cultura primária de hipocampo de embriões de ratos e camundongos enquanto que a via da MAPK não se mostra alterada. Além disso, mostramos também um experimento mostrando a aparente ativação da proteína quinase C pela cultura de células do hipocampo de ratos sobre laminina ou peptídeo gama 1. Mas, como já comentado anteriormente, não é possível afirmar que essa ativação seja devido a interação PrPc-laminina por não ter sido feito o experimento com camundongos nocautes. Entretanto, dados do nosso grupo indicam que quando células de hipocampo de camundongos selvagem são estimulados com peptídeo gama 1 elas respondem a esse estímulo com liberação de íons Ca^{2+} oriundos dos depósitos intracelulares enquanto que as células de camundongos nocautes não apresentam resposta a esse mesmo estímulo (LEE e cols., dados não publicados). Como a ativação da via fosfolipase C ($\text{PLC}\gamma$) leva a aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação de PKC podemos especular que esses dois resultados isolados possam realmente dizer que a

interação PrPc-laminina ativa a via da PLC γ . Porém, novos experimentos seriam necessários para a confirmação dessa hipótese.

A confirmação *in vitro* de que a interação PrPc-laminina estaria relacionada com plasticidade neuronal foi um incentivo para que testássemos *in vivo* o papel dessa interação. De fato, observamos que quando ratos são submetidos ao teste de esquiva inibitória após terem recebido infusões de anticorpos anti-PrPc ou anti-laminina permanecem menos tempo na plataforma do que os ratos do grupo controle, que receberam salina ou anticorpo anti-GST. Esse resultado é válido tanto para o teste de consolidação da memória de curta duração quanto a de longa duração (figuras 24 e 25, respectivamente). Porém, ele apenas sugere que PrPc e laminina participam do processo de consolidação da memória; ele não permite concluir que esse mecanismo seja decorrente da associação entre essas duas moléculas. Quando o peptídeo da cadeia gama 1 foi infundido no hipocampo dos ratos não se observou nenhuma alteração no desempenho dos animais frente ao teste de esquiva inibitória. Contudo, a co-infusão desse peptídeo com o anticorpo anti-PrPc reverteu o efeito amnésico desse último, indicando assim que a manutenção da ligação entre PrPc e o sítio específico da cadeia gama1 da laminina é importante para o estabelecimento da memória. Assim, como o peptídeo gama1 não promoveu nenhum efeito, podemos admitir que ele não foi capaz de deslocar a interação PrPc-laminina no hipocampo de ratos, nem transduzir sinal para a consolidação da memória. De fato, vemos que tanto nos experimentos de memória de curta duração quanto nos de longa duração, o peptídeo em questão não altera a atividade das enzimas estudadas.

Quanto a sinalização envolvida nos dois processos, obtivemos resultados realmente interessantes, pois apesar das infusões dos anticorpos e peptídeos específicos terem levado a resultados semelhantes nas memórias de curta e longa duração, as dosagens enzimáticas revelaram diferenças gritantes entre os dois tipos de memória. Assim, os resultados das figuras de 26 a 31 indicam que a interação PrPc-laminina ativa a via cAMP/PKA e MAPK para a consolidação da memória de curta duração enquanto que para a consolidação da memória de longa duração a única via que aparece ativada é a via de cAMP/PKA. Foi observado também que CREB parece não ser ativado por essa interação.

Classicamente foi descrito que a memória é consolidada utilizando vias de sinalização que envolvem cAMP-PKA-MAPK-CREB. Sabe-se por exemplo que PKA atua na consolidação dos dois tipos de memória em tempos diferentes. Na memória de curta duração, a atividade da PKA aparece entre 0 e 90 minutos após o treino, enquanto que na memória de longa duração os picos de atividade dessa enzima aparecem em 0 e 180 minutos após o treino, sendo que nesse intervalo nenhum pico de atividade é observado. De fato, nossos resultados estão de acordo com esse modelo de ativação da enzima PKA mas eles divergem da literatura quando olhamos para CREB e MAPK. Vianna e colaboradores (2000) descrevem que para a formação da memória de longa duração, a PKA atua fosforilando o fator de transcrição nuclear CREB1 duas vezes: a primeira fosforilação ocorre imediatamente e a segunda ocorre 3-6 horas depois do treino. Contudo, apesar de termos observado o envolvimento da PKA nos tempos referidos, não percebemos alteração em CREB.

O papel da MAPK na formação da memória é ainda mais complexo que o papel exercido pela via cAMP/PKA uma vez que ela relaciona-se com outras vias de sinalização como a via de PKC, CaMKII e PKA (LISMAN e FALLON, 1999). Além disso, todas essas vias atuam de alguma forma na formação da memória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Talvez, a interação PrPc-laminina deflagre uma cascata de sinalização diferente daquela conhecida pela literatura o que, de certa forma, explicaria também os resultados encontrados com MAPK, onde o efeito dessa enzima aparece somente na consolidação da memória de curta duração.

Por fim, é claro que há ainda muito o que ser feito para a completa identificação das vias de sinalização deflagradas pelas interações de PrPc com seus ligantes. O fato da proteína PrPc estar envolvida com uma grande variedade de eventos celulares como proteção a stress oxidativo, diferenciação, plasticidade neuronal, sinalização e sobrevivência neuronal devido a suas interações com cobre, laminina e STI1 permite especular sobre a existência de um complexo multiprotéico. Esse complexo, a princípio formado por PrPc, laminina, STI1 e até outras proteínas não identificadas até o momento, poderiam modular as respostas fisiológicas identificadas. Resta saber se esse complexo realmente existe e quais moléculas fazem parte dele. É possível também que não exista uma integração entre todas essas interações e que PrPc apresente funções diferentes que dependam do tipo de associação que ele realiza.

De qualquer forma, o melhor conhecimento dessas interações poderá ajudar a desvendar o(s) papel(éis) fisiológico(s) de PrPc e

também poderá trazer informações úteis no desenvolvimento de compostos terapêuticos para o tratamento das doenças causadas por prions.

CONCLUSÕES

- 1-) A interação PrPc-p66 desencadeia resposta neuroprotetora na camada neuroblástica da retina de roedores em desenvolvimento.
- 2-) A interação PrPc-p66 ativa as vias de cAMP/PKA e MAPK, porém, o efeito neuroprotetor é mediado pela ativação da via da proteína cinase dependente de cAMP.
- 3-) Anticorpos contra PrPc que induzem aumento de cAMP também promovem resposta neuroprotetora dependente de PrPc.
- 4-) A interação PrPc-laminina ativa a via de cAMP/PKA, mas não a via MAPK em cultura primária de hipocampo de roedores.
- 5-) A interação PrPc-laminina está envolvida nos mecanismos de consolidação das memórias de curta e longa duração.
- 6-) Os sinais deflagrados pela interação PrPc-laminina para a formação da memória de curta duração envolve as vias cAMP/PKA e MAPK, enquanto que para a consolidação da memória de longa duração, apenas a via cAMP/PKA é requerida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUZZI, A. e WEISSMANN, C. Prions research: the next frontiers. *Nature* 389: 795-798, 1997.

BARRY, R.A. e PRUSINER, S.B. Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. *J. Infect. Dis.* 154: 518- 521, 1986.

BECK, K., HUNTER, I. e ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4: 148-160, 1990.

BERNABEU, R., BEVILACQUA, L., ARDENGHI, P., BROMBERG, E., SCHIMITZ, P., BIANCHIN, M., IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7041-7046, 1997.

BLATCH, G.L., LASSLE, M., ZETTER, B.R. e KUNDRA, V. Nucleotide isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene* 194: 277-282, 1995.

BORCHELDT, D.R., TARABOULOS, A. e PRUSINER, S.B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 16188- 16199, 1992.

BOUNHAR, Y., ZHANG, Y., GOODYER, C.G. e LeBLANC, A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276(42): 39145-39149, 2001.

BRENTANI, R.R. Biological implications of complementary hydropathy of amino acids. *J. Theor. Biol.* 135: 495-499, 1988.

BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy and the evolution of interacting polypeptides. *J. Mol. Evol.* 31: 239-243, 1990.

BRENTANI, R.R., RIBEIRO, S.F., POTOENJAK, P., PASQUALINI, R., LOPES, J.D. e NAKAIE, C.R. Characterization of the cellular receptor for fibronectin through a hydrophatic complementary approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 364-367, 1988.

BROWN, D.R. Prion and prejudice: normal protein and synapse review. *Trends. Neurosci.* 24: 85, 2001.

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

BROWN, D.R., WONG, B-S., HAFIZ, F., CLIVE, C., HASWELL, S.J. e JONES, I.M. Normal prion protein has an activity like that superoxide dismutase. *Biochem. J.* 344: 1-5, 1999.

BUCK, C.A. e HORWITZ, A.F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu Rev Cell Biol.* 3: 179-205, 1987.

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

BURSCH, W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8(6):569-581, 2001.

BUYUKMIHCI, N.C., GOEHRING-HARMON, F. e MARSH, R.F. Photoreceptor degeneration during infection with various strains of the scrapie agent in hamsters. *Exp. Neurol.* 97: 201-206, 1987^a.

BUYUKMIHCI, N.C., GOEHRING-HARMON, F. e MARSH, R.F. Photoreceptor degeneration in experimental transmissible mink encephalopathy of hamsters. *Exp. Neurol.* 96: 727-731, 1987b.

CAMMAROTA, M., BEVILAQUA, L.R.M., ARDENGHI, P., PARATCHA, G., de STEIN, M.L., IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and ELK-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Mol. Brain Res.* 76: 36-46, 2000.

CHEN, Z. e STRICKLAND, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91: 917-925, 1997.

CHESEBRO, B., RACE, R., WEHRLY, K., NISHIO, J., BLOOM, M., LECHNER, D., BERGSTROM, S., ROBBINS, K., MAYER, L. e KEITH, J.M. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie infected and uninfected brain. *Nature* 315: 331-333, 1985.

CHIARINI, L.B., FREITAS, A.R.O., ZANATA, S.M., MARTINS, V.R., BRENTANI, R.R., LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *The EMBO J.* (no prelo), 2002.

COLLINGE, J., WHITTINGTON, M.A., SIDLE, K.C.L., SMITH, C.J., PALMER, M.S., CLARKE, A.R. e JEFFREYS, J.G.R. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297, 1994.

EDENHOFER, F., RIEGER, R., FAMULOK, M., WENDLER, W., WEISS, S. e WINNACKER, E-L. Prion protein PrP^c interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70: 4724-4728, 1996.

FISCHER, M., RÜLICHE, T., RAEBER, A., SAILER, A., MOSER, M., OESCH, B., BRANDNER, S., AGUZZI, A. e WEISSMANN, C. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 15: 1255-1264, 1996.

FORLONI, G., ANGERETTI, N., CHIESA, R., MONZANI, E., SALMONA, M., BUGIANI, O. e TAGLIAVINI, F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-546, 1993.

GABIZON, R., McKINLEY, M.P., GROTH, D.F., KENAGA, L. e PRUSINER, S.B. Properties of scrapie prion protein in liposomes. *J. Biol. Chem.* 263: 4950-4955, 1988.

GASSET, M., BALDWIN, M.A., LOYD, D.H., GABRIEL, J-M., HOLTZMAN, D.M., COHEN, F., FLETTERICK, R. e PRUSINER, S.B. Predicted α -helical regions of the prion protein when synthesized as peptide form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10940-10944, 1992.

GESKE, F.J. e GERSCHENSON, L.E. The biology of apoptosis. *Hum Pathol.* 32(10):1029-1038, 2001.

GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., FORLENZA, O.V., CABRAL, A.L.B., VEIGA, S.S., JULIANO, M.H., ROESLER, R., WALZ, R., MINETTI, A., IZQUIERDO, I., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain Res.* 76: 85-92, 2000a.

GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., MARTINS, V.R., JAY, D.G. e BRENTANI, R.R. Laminin-induced PC 12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Letters* 482: 257-260, 2000b.

GROSS, M., HESSEFORT, S., OLIN, A. e REDDY, G. Extensive sequencing of tryptic peptides of a rabbit reticulocyte 66-kDa protein that promotes recycling of Hsp 70. Homology To stress-related proteins. *J Biol Chem.* 271(28):16842-16849, 1996.

HAGG, T., PORTERA-CAILLIAU, C., JUCKER, M., e ENGVALL, E. Laminins of the adult mammalian CNS; laminin alpha-2 (merosin M) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res.* 764: 17-27, 1997.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000.

HERMS, J., TINGS, T., GALL, S., MADLUNG, A., GIESE, A., SIEBERT, H., SCHÜRMANN, P., WINDL, O., BROSE, N. e KRETZSCHMAR, H. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 19: 8866-8875, 1999.

HONORÉ, B., LEFFERS, M., RASMUSSEN, H.H., VANDEKERCKHOVE, J. e CELLIS, J.E. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. *J. Biol. Chem.* 267: 8485-8491, 1992.

HOREJSI, V., CEBECAUER, M., CERNY, J., BRDICKA, T., ANGELISOVA, P. e DRBAL, K. Signal transduction in leucocytes via

GPI-anchored proteins: na experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function? *Immunol. Lett.* 63: 63-73, 1998.

HORIUCH, M. e CAUGHEY, M. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* 18: 3193-3203, 1999.

HORSBURGH, G.M. e SEFTON, A.J. Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat. *J Comp Neurol.* 263(4):553-566, 1987.

HSIAO, K.K., GROTH, D., SCOTT, M., YANG, S-L, SERBAN, H., RAPP, D., FOSTER, D., TORCHIA, M., DEARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9126-9130, 1994.

HUANG, Z., GABRIEL, J-M., BALDWIN, M.A., FLETTERICK, R.J., PRUSINER, S.B. e COHEN, F.E. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7139-7143, 1994.

IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., MELLO e SOUZA, T., SOUSA, M.M., IZQUIERDO, L.A. e MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types. *Nature* 393: 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I. Os labirintos da memória. *Ciência Hoje* 25: 38-43, 1999.

IZQUIERDO, I., QUILLFELDT, J.A., ZANATTA, M.S., QUEVEDO, J., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P.K. e MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9: 786-793, 1997.

JACOBSON, M.D., WAIL, M. e RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354, 1997.

JONES, D. e VARELA-NIETO, I. The role of glycosyl-phosphatidilinositol in signal transduction. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 313-326, 1998.

KANDELL, E.R., SCHWATZ, J.H. e JESSELL, T.M. Principles of Neuroscience, cap. 62, 4a ed., McGraw-Hill, 2000.

KANEKO, K., VEY, M., SCOTT, M., PILKUHN, S., COHEN, F.E., BALDWIN, M.A. e PRUSINER, S.B. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2333-2338, 1997.

KERR, J.F.R., HARMON, B. e SEARLE, J. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972.

KESHET, G.I., BAR-PELED, O., YAFFE, D., NUDEL, U. e GABIZON, R. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J. Neurochem.* 75(5): 1889-1897, 2000.

KIMBERLIN, R. e WALKER, C. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J. Gen. Virol.* 34: 295-304, 1977.

KRETZSCHMAR, H.A., GIESE, A., BROWN, D.R., HERMS, J., KELLER, B., SCHMIDT, B. e GROSCHUP, M. Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl.* 50:191-210, 1997.

KUWAHARA, C., TAKEUCHI, A.M., NISHIMURA, T., HARAGUCHI, K., KUBOSAKI, A., MATSUMOTO, Y., SAEKI, K., YOKOYAMA, T., ITOHARA, S., ONODERA, T. Prion prevents neuronal cell line death. *Nature* 400: 226-227, 1999.

LAIRD, P.W., ZIJDERVELD, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M.A., JAENISCH, R., BERNIS, A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19(15): 4293, 1991.

LEE, K.S., MARTINS, V.R., ZANATA, S.M., BRENTANI, R.R., PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent prion protein and N-

terminal deletion mutants in living cells. *J. Neurochem.* 79(1): 79-87, 2001.

LINDEN, R. e PERRY, V.H. Retrograde and anterograde-transneuronal degeneration in the parabigeminal nucleus following tectal lesions in developing rats. *J Comp Neurol.* 218(3):270-281, 1983.

LISANTI, M.P., SARGIACOMO, M. e SCHERER, P.E. Purification of caveolae-derived membrane microdomains containing lipid-anchored signaling molecules, such as GPI-anchored proteins, H-Ras, Src-family tyrosine kinases, eNOS, and G-protein alpha, beta and gamma subunits. *Methods Mol. Biol.* 116: 51-60, 1999.

LLEDO, P.M., TREMBLAY, P. DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B. e NICOLL, R.A. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6): 2403- 2407, 1996.

MA, J. e LINDQUIST, S. De novo generation of a PrPsc-like conformation in living cells. *Nat. Cell Biol.* 1: 358-361, 1999.

MALLUCI, G.R., RATTÉ, S., ASANTE, E.A., LINEHAN, J., GOWLAND, I., JEFFERYS, J.G.R. e COLLINGE, J. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 21: 202-210, 2002.

MANSON, J., CLARKE, A.R., HOOPER, M.L., AITCHISON, L., McCONNELL, I. e HOPE, J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8: 121-127, 1994.

MANUELIDIS, L., SKLAVIADIS, T., AKOWITZ, A. e FRITCH, W. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jacob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5124-5128, 1995.

MARSH, R.F. e KIMBERLIN, R.H. Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 131: 104-110, 1975.

MARTINS, V.R., GRANER, E., GARCIA-ABREU, J., MERCADANTE, A.F., VEIGA, S.S., ZANATA, S.M., MOURA-NETO, V. e BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.* 3: 1376-1382, 1997.

MARTINS, V.R., MERCADANTE, A.F., CABRAL, A.L.B., FREITAS, A.R.O. e CASTRO, R.M. Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(5): 585-595, 2001.

MARTINS, V.R., LINDEN, R., PRADO, M.A.M., WALZ, R., SAKAMOTO, A., IZQUIERDO, I. e BRENTANI, R.R. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Letters* 512: 25-28, 2002.

McGAUGH, J.L. Memory – a century of consolidation. *Science* 287: 248-251, 2000.

MERCADANTE, A.F. Caracterização e implicações fisiológicas das interações da proteína prion celular com o seu receptor de 60-66 KDa e com a laminina. Tese de doutoramento. Instituto de Química. Universidade de São Paulo.

MEYER, N., ROSENBAUM, V., SCHMIDT, B., GILLES, K., MIRENDA, C., GROTH, D., PRUSINER, S.B. e RIESNER, D. Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 72: 37-49, 1990.

MEYER, R.K., McKINLEY, M.P., BOWMAN, K.A., BRAUNFELD, M.B., BARRY, R.A. e PRUSINER, S.B. Separation and properties of cellular and scapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2310-2314, 1986.

MIURA, T., HORI-I, A. e TAKEUCHI, H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* 396: 248-252, 1996.

MOUILLET-RICHARD, S., ERMONVAL, M., CHEBASSIER, C., LAPLANCHE, J.L., LEHMANN, S., LAUNAY, J.M. e KELLERMANN, O. Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928, 2000.

MURAMOTO, T., SCOTT, M., COHEN, F. e PRUSINER, S.B. Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15457-15462, 1996.

OESCH, B., WESTAWAY, D., WALCHLI, M., McKINLEY, M.P., KENT, S.B.H., AEBERSOLD, R., BARRY, R.A., TEMPST, P., TEPLow, D.B., HOOD, L.E., PRUSINER, S.B. e WEISSMANN, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.

OH, P. e SCHINITZER, J.E. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol. Biol. Cell* 12: 685-698, 2001.

PAN, K-M., BALDWIN, M., NGUYEN, J., GASSET, M., SERBAN, A., GROTH, D., MEHLHORN, I., HUANG, Z., FLETTERICK, R.J. e COHEN, F.E. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966, 1993.

PERETZ, D., WILLIAMSON, R.A., MATSUNAGA, Y., SERBAN, H., PINILLA, C., BASTIDAS, R., ROZENSHTEYN, R., JAMES, T.L., HOUGHTEN, R.A. e COHEN, F.E. A conformational transition at the N terminus of the prion features in formation of the scrapie isoform. *J. Mol. Biol.* 273: 614-622, 1997.

PERRY, V.H., HENDERSON, Z. e LINDEN, R. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol.* 219(3):356-368, 1983.

PRUSINER, S.B. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522, 1991.

PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982.

PRUSINER, S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13363-13393, 1998.

PRUSINER, S.B. Scapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 345-374, 1989.

PRUSINER, S.B., BOLTON, D.C., GROTH, D.F., BOWMAN, K.A., COCHRAN, S.P. e McKINLEY, M.P. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21: 6942-6950, 1982a.

PRUSINER, S.B., COCHRAN, S.P., GROTH, D.F., DOWNEY, D.E., BOWMAN, K.A. e MARTINEZ, H.M. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* 11: 353-358, 1982b.

PRUSINER, S.B., GROTH, D.F., COCHRAN, S.P., MASIARZ, F.R., McKINLEY, M.P. e MARTINEZ, H.M. Molecular properties, partial

purification and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 19: 4883-4891, 1980.

PRUSINER, S.B., MCKINLEY, M.P., BOWMAN, K.A., BOLTON, D.C., BENDHEIN, P.E., GROTH, D.F. e GLENER, G.G. Scrapie prions aggregates to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349-358, 1983.

REHEN, S.K., DINIZ, D.M., MADEIRA, L.F., BRITO, L.R.G. e LINDEN, R. Selective sensitivity of early postmitotic cells to apoptosis induced by inhibition of protein synthesis. *Eur. J. Neurosci.* 11: 349-356, 1999.

REHEN, S.K., VARELLA, M.H., FREITAS, F.G., MORAES, M.O. e LINDEN, R. Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cAMP on apoptosis in the developing retina. *Development.* 122: 1439-1448, 1996.

RICH, T., WATSON, C.J. e WYLLIE, A. Apoptosis: the germs of death. *Nature Cell Biol.* 1: E69-E71, 1999.

RIEK, R., HORNEMANN, S., WIDER, G., BILLETER, M., GLOCKSHUBER, R. e WÜTHRICH, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature* 382:180-182, 1996.

ROESLER, R., WALZ, R., QUEVEDO, J., de-PARIS, F., ZANATA, S.M., GRANER, E., IZQUIERDO, I., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety but increased

locomotor activity in mice devoid of PrPc. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71: 349-353, 1999.

ROGERS, M., TARABOULOS, A., SCOTT, M., BORCHELT, D., SERBAN, D., GYURIS, T. e PRUSINER, S.B. Modification and expression of prion protein in cultured cells, p. 457-469, in *Prion diseases of human and animals*, 1^a ed. Ellis Horwood, New York, 1992.

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

SALÈS, N., RODOLFO, K., HASSIG, R., FAUCHEUX, B., DI GIAMBERARDINO, L., MOYA, K.L. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci.* 10(7):2464-2471, 1998.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Capítulo 12, pag. 12.13, 2^a. edição, 1989.

SCHMITT-ULMS, G., LEGNAME, G., BALDWIN, M.A., BALL, H.L., BRANDON, N., BOSQUE, P.J., CROSSIN, K.L., EDELMAN, G.M., DEARMOND, S.J., COHEN, F.E. e PRUSINER, S.B. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* 314: 1209-1225, 2001.

SHEARMAN, L.P., ZEITZER, J. e WEAVER, D.R. Widespread expression of functional D1-dopamine receptors in fetal rat brain. *Dev. Brain Res.* 102: 105-115, 1997.

SHMERLING, D., HEGYI, I., FISCHER, M., BLÄTTLER, T., BRANDNER, S., GÖTZ, J., RÜLICHE, T., FLECHSIG, E., COZZIO, A., VON MERING, C., HANGARTNER, C., AGUZZI, A. e WEISSMANN, C. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93: 203-214, 1998.

SILVEIRA, M.S., COSTA, M.R., BOZZA, M. e LINDEN, R. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. (no prelo), 2002.

SWEATT, J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76: 1-10, 2001.

TARABOULOS, A., RAEHER, A.J., BORCHELT, D.R., SERBAN, D. e PRUSINER, S.B., Synthesis and trafficking of prion proteins in culture cells. *Mol. Biol. Cell* 3: 851-863, 1992.

THELLUNG, S., VILLA, V., CORSARO, A., ARENA, S., MILLO, E., DAMONTE, G., BENATTI, U., TAGLIAVINI, F., FLORIO, T. e SCHETTINI, G. p38 MAP Kinase mediates the cell death induced by

PrP106-126 in the SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurobiol. Dis.* 9(1): 69-81, 2002.

TOMASELLI, K.J. e REICHARDT, L.F. Peripheral motoneuron interactions with laminin and schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function. *J. Neurosci. Res.* 21: 275-285, 1988.

TURK, E., TELOW, D.B., HOOD, L.E. e PRUSINER, S.B. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.* 176: 21-30, 1988.

VARELLA, M.H., CORREA, D.F., CAMPOS, C.B.L., CHIARINI, L.B. e LINDEN, R. Protein kinases selectively modulate apoptosis in the developing retina in vitro. *Neurochem. Int.* 31: 217-227, 1997.

VARELLA, M.H., De MELLO, F.G. e LINDEN, R. Evidence for an anti-apoptotic role of dopamine in developing retinal tissue. *J. Neurochem.* 73: 485-492, 1999.

VASILAKOS, J. e SHIVERS, B. Watch for ICE in neurodegeneration. *Mol Psychiatry.* 1(1):72-6, 1996.

VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., WALZ, R., MEDINA, J.H. e IZQUIERDO, I. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An. Acad. Bras. Ci.* 72(3): 353-364, 2000.

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

WYLLIE, A.H., BEATTIE, G.J. e HARGREAVES, A.D. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 13(4):681-692, 1981.

YUAN, J. e YANKER, B.A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809, 2000.

ZANATA, S.V., LOPES, M.H., MERCADANTE, A.F., HAJJ, G., FREITAS, A.R.O., CHIARINI, L.B., CABRAL, A.L.B., NOMIZO, R., LEE, K.S., JULIANO, M.A., JACHIERI, S.G., BURLINGAME, A., HUANG, L., LINDEN, R., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R. The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. *The EMBO J* (no prelo), 2002.

ZHANG, H., KANEKO, K., NGUYEN, J.T., LIVSHITS, T.L., BALDWIN, M.A., COHEN, F.E., JAMES, T.L. e PRUSINER, S.B. Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. *J. Mol. Biol.* 250: 514-526, 1995.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO