



**POLIMORFISMO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA PRIÓNICA (PrP)
RELACIONADO À SUSCEPTIBILIDADE AO SCRAPIE EM OVINOS**

Jennifer Nonato da Silva **Prate**¹; Maria Aparecida Cassiano **Lara**²

Nº 14705

RESUMO – *A paraplexia enzoótica ou scrapie é uma doença do grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis, de caráter neurodegenerativo, progressivo e fatal, que acomete caprinos e ovinos. Sabendo que os polimorfismos do gene PrP nos códons 136, 154 e 171 estão associados a alterações na susceptibilidade a esta doença, o estudo destes polimorfismos pode contribuir para a identificação de indivíduos susceptíveis ao scrapie, permitindo o controle de sua disseminação. O presente estudo teve como objetivo conhecer a variabilidade do gene PrP em ovinos Morada Nova e Santa Inês, criados no Estado de São Paulo. Dos cinco alelos mais comuns detectados para este gene na espécie ovina, quatro (ARR, ARQ, VRQ, AHQ) foram observados no presente estudo. As análises de PCR-RFLP revelaram a presença de oito genótipos na população investigada, sendo ARQ/ARQ o mais frequente nos rebanhos Morada Nova (0,4717) e Santa Inês (0,5625). Os resultados obtidos indicam que a maioria dos animais investigados apresentou risco de desenvolver o scrapie, embora 7,54% dos ovinos Morada Nova sejam homozigotos ARR/ARR, que está associado à resistência a esta doença. As diferenças observadas entre os rebanhos demonstram a necessidade de se ampliar as análises deste gene nestas e em outras raças a fim de permitir identificar genótipos favoráveis para aumentar a resistência dos rebanhos brasileiros. O conhecimento advindo certamente contribuirá para a implantação de um programa de cruzamentos seletivos no Brasil, que pode agregar valor comercial às raças ovinas criadas no país.*

Palavras-chaves: Marcador Molecular, PCR-SSCP, PCR- RFLP, Encefalopatia Espongiforme

¹Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas, SP ; jennifer_prate@outlook.com
²Orientador: Pesquisador Científico, URL – Genética, Instituto de Zootecnia, APTA/ SAA; malara@iz.sp.gov.br



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- *The enzootic paraplegia or sheep scrapie is a disease of Transmissible Spongiform Encephalopathies group, of neurodegenerative, progressive and fatal character, affecting goats and sheeps. Knowing that polymorphisms of the PrP gene at codons 136, 154 and 171 are associated with changes in susceptibility to this disease, the study of these polymorphisms may contribute to the identification of susceptible individuals to scrapie, allowing control of its spread. The present study aimed to assess the variability of the PrP gene in sheep Morada Nova and Santa Inês reared at São Paulo state. Of the five most common alleles found for this gene in sheep, four (ARR, ARQ, VRQ, AHQ) were observed in this study. The analysis of PCR-RFLP revealed the presence of eight genotypes in the studied population, being ARQ/ARQ the most frequent in Morada Nova (0.4717) and Santa Inês (0.5625) herds. The results indicate that the majority of investigated animals showed risk to develop scrapie, although 7.54% of sheep are homozygous ARR/ARR, which is associated with resistance to scrapie. The differences observed between herds demonstrate the need to extend the analysis of this gene in these and other races in order to identify favorable genotypes to increase the strength of the Brazilian herds. The knowledge gained will undoubtedly contribute to the implementation of a selective breeding program in Brazil, that may add commercial value to sheep breeds reared in the country.*

Key-words: Molecular Marker, PCR-SSCP, PCR-RFLP, Spongiform Encephalopathy

1 INTRODUÇÃO

As encefalopatias espongiformes transmissíveis, incluindo o *scrapie* em ovinos, são doenças neurodegenerativas fatais causadas pelo acúmulo de uma isoforma patológica da proteína priônica (PrP) no Sistema Nervoso Central (SNC) e tecido linforreticular. Seu controle é difícil devido ao longo período de incubação e ao conhecimento ainda incompleto das vias de contaminação. O *scrapie* faz parte da lista B da IOE (Organização Mundial da Saúde Animal), sendo considerada de notificação obrigatória (SOTOMAIOR et. al, 2012).

O *scrapie* nos ovinos é considerado uma doença endêmica em vários países da Europa, no Canadá e Estados Unidos, sendo também relatada em diversos países do mundo. Austrália e Nova Zelândia são consideradas livres da doença. No Brasil essa doença é de notificação obrigatória e as medidas sanitárias adotadas em caso de ocorrência de *scrapie* estão baseadas nas legislações vigentes do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>). Estudos genéticos dessa doença têm



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

contribuído para a identificação de genótipos susceptíveis. Alguns variantes do gene PrP têm sido associados ao risco de desenvolvimento do *scrapie*, principalmente os polimorfismos nos códons 136 (alanina, A/ valina, V), 154 (arginina, R/ histidina, H) e 171 (glutamina, Q/ arginina, R/ histidina, H). Combinações destes polimorfismos caracterizam cinco alelos: ARQ, VRQ, AHQ, ARH e ARR, que conferem diferenças quanto ao grau de resistência ao *scrapie* em ovinos (DAWSON et al., 1998).

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos de genotipagem do gene PrP, embora as análises realizadas em algumas raças criadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país tenham revelado a presença de genótipos susceptíveis ao *scrapie* (SOTOMAIOR et al., 2012; ANDRADE et al., 2011).

Considerando que o *scrapie* pode acarretar perdas de produção, contaminação de áreas e, principalmente, interferir no comércio internacional da carne e de seus produtos, a incorporação de um sistema eficaz de controle ao *scrapie*, contribuirá para a produção de animais geneticamente resistentes à doença, agregando valor comercial aos seus produtos.

O presente estudo teve como objetivo conhecer as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene PrP (códon 136, 154 e 171) nos rebanhos Morada Nova e Santa Inês criados no Estado de São Paulo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de pêlo, contendo bulbo capilar, foram coletadas da cauda de ovinos das raças Morada Nova (N=53) e Santa Inês (N=32), de uma mesma propriedade no Estado de São Paulo.

Para a extração de DNA foram testados dois protocolos de DNA empregando-se proteinase-k e fenol-clorofórmio, bem como o *Genomic DNA Purification kit* (Puregene: Gentra Systems - USA).

A quantificação e a avaliação da pureza das amostras de DNA foram realizadas por espectrofotometria, determinando-se a absorvância a 260 e 280nm e, a sua integridade, em gel de agarose a 1%. A relação entre os valores de absorvância 260nm e 280nm, que fornecem as concentrações de ácidos nucleicos e proteína, respectivamente, serviu de referência da qualidade da amostra, cujo grau de pureza (Abs260/280) deve estar entre 1,8 a 2,0. As amostras de DNA foram diluídas em água ultra pura, para uma concentração de 50 ng/μL.

As genotipagens do gene PrP foram realizadas empregando-se as análises de PCR–RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) segundo Lühken et al.(2004), com modificações, e de



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

PCR–SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*).

Para as análises de RFLP, as amostras de DNA foram submetidas a duas reações de PCR para distinguir os alelos, com base no polimorfismo nos códons 136; 154 e 171. Na primeira PCR, o fragmento de 197 pb foi amplificado em volume de 25 μ L, contendo 50 ng de DNA, 0,10 μ M de cada *primer* (F: 5'GTGGCAGGAGCTGCTGCAGCT3' e R1:5'TGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATC3'), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP e 1U de *Taq* DNA polimerase. A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55,8°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão a 72°C por 10 minutos. Na segunda PCR, o fragmento de 196 pb foi amplificado utilizando-se as mesmas condições e protocolo de amplificação, descritos anteriormente, excetuando-se o primer reverso que foi substituído pelo R2:GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATAT e a temperatura de anelamento foi 60°C por 1 minuto. Os produtos da primeira PCR (197 pb) foram digeridos com a enzima de restrição *Bsp*HI, e os da segunda (196 pb) com as enzimas *Bsp*DI e *Bsp*HI, segundo recomendações do fabricante, na concentração final de 2,5 unidades de cada enzima. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e visualizados mediante a coloração com prata, descrita por Sanguinetti et al. (1994).

Para as análises de SSCP, uma alíquota de 2 μ L de cada produto amplificado de 196 pb foi misturada com 18 μ L de solução desnaturante (99% formamida; 0,05% xilenocianol e 0,05% de azul de bromofenol) e, após desnaturação a 95°C, durante 10 minutos, foram rapidamente colocadas no gelo e mantidas refrigeradas até o momento da análise. Cerca de 4 μ L de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 12% (49:1), sem glicerol. A eletroforese foi realizada a 10°C empregando-se 400 V e tampão 0,5X TBE, por 16 horas. Para a visualização dos genótipos, o gel foi submetido à coloração com prata, segundo Sanguinetti et al. (1994).

As frequências alélicas foram estimadas diretamente dos dados de frequência absoluta dos diferentes genótipos, ou seja, pela contagem direta dos genes. Os animais foram classificados quanto ao risco de desenvolver o *scrapie*, segundo os critérios estabelecidos por Dawson et al. (1998), que alocaram os quinze possíveis genótipos em cinco grupos (R1-R5), sendo o R1 o grupo mais resistente e o R5, o mais susceptível ao desenvolvimento do *scrapie*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de bulbo capilar quando submetidas aos protocolos de extração de DNA apresentaram concentrações que variaram de 10 a 415 ng/ μ L e grau de pureza (Abs260/280) entre 1,5 a 2,0, considerados adequados para os testes realizados. As amostras de DNA extraídas com



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

o emprego do *Genomic DNA Purification Kit* (Gentra Systems, USA), no entanto, revelaram maior rendimento e qualidade, por permitir a eliminação de proteínas, presentes em concentrações elevadas nas amostras.

A digestão do fragmento de 197 pb com a enzima *BspHI* e a dupla digestão do fragmento de 196 pb com as enzimas *BspDI* e *BspHI*, resultaram em dois padrões, que juntos definiram os genótipos do gene PrP pela análise dos seus alelos (Tabela 1). Nas amostras analisadas foram detectados quatro dos cinco alelos mais comuns encontrados em ovinos: ARR, ARQ, VRQ e AHQ. A Figura 1 apresenta o padrão de restrição para as enzimas *BspHI* e *BspDI* do gene PrP. As análises de PCR-RFLP revelaram na população investigada oito dos 15 genótipos possíveis.

Nas condições empregadas no presente estudo, as análises de SSCP realizadas em 30% do total das amostras, revelaram quatro padrões de migração, que foram denominados por 1, 2, 3 e 4. O alelo 1 foi caracterizado pela presença de uma banda de migração mais lenta no gel e, o alelo 4, por uma banda de migração mais rápida e, os alelos 2 e 3, pelas bandas de migração intermediárias. A Figura 2 apresenta o padrão de migração dos quatro alelos, relacionados aos alelos ARR, ARQ, VRQ e AHQ bem como os seus respectivos genótipos já detectados pela técnica de PCR-RFLP, que serão confirmados por sequenciamento, visando estabelecer um protocolo mais eficaz para a identificação dos haplótipos do gene PrP.

A análise de SSCP, no entanto, já havia sido realizada por Zhou et al. (2005). Esses autores, estudando ovinos das raças Awassi, Boredale, Corriedale, Finnish Landrace, Merino e Romney, detectaram nove padrões de migração. Cinco destes padrões foram denominados ARR, ARQ, AHQ, ARH e VRQ e, associados aos polimorfismos mais frequentes em ovinos, provavelmente relacionados aos códons 136, 154 e 171. Os demais polimorfismos (ARQ-K176, ARQ-T142, ARQ-T143 e ARQ-F141), localizados nos códons 141, 142, 143 e 176 foram confirmados por sequenciamento. Com base nestes resultados, os autores demonstram que as análises de SSCP representam uma técnica alternativa para a identificação de haplótipos do gene PrP, a partir de um fragmento de 173 pb. Esta técnica empregada no presente estudo, no entanto, não permitiu a detecção de todos os alelos nas amostras Morada Nova e Santa Inês investigadas até o momento, cujo número de animais será ampliado e os resultados confirmados por sequenciamento.

O genótipo ARQ/ARQ foi mais frequente no rebanho Morada Nova (47,17%) e Santa Inês (56,25%), seguido pelo genótipo ARR/ARQ em 24,53% do Morada Nova e 18,74% do Santa Inês (18,74%). Já, o genótipo ARQ/AHQ foi mais frequente no Morada Nova (15,09 %) do que no Santa Inês (3,13%). Os genótipos ARR/ARR e AHQ/AHQ, associados à maior resistência ao *scrapie*

foram detectados apenas no Morada Nova, em frequências de 7,54% e 3,8%, respectivamente. Em oposição, os genótipos VRQ/AHQ, ARQ/VRQ e VRQ/VRQ associados à susceptibilidade ao *scrapie* foram exclusivos do Santa Inês, exceto o VRQ/VRQ, que ocorreu em ambas as raças, cujas frequências genotípicas foram 0, 0 e 1,88% no Morda Nova e, 3,13%, 12,5% e 6,25%, no Santa Inês, respectivamente.

Tabela 1. Tamanhos dos fragmentos obtidos do produto de PCR de 197 e de 196pb, após a clivagem com as enzimas de restrição *Bsp*HI e *Bsp*DI para os cinco alelos do gene PrP

	ALELOS	
	197 pb – <i>Bsp</i> HI	196 pb – <i>Bsp</i> HI e <i>Bsp</i> DI
ARR	197	170 (26)
ARQ	197	196
ARH	172 (25)	196
AHQ	118 e 79	118 e 78
VRQ	131 e 66	130 e 66

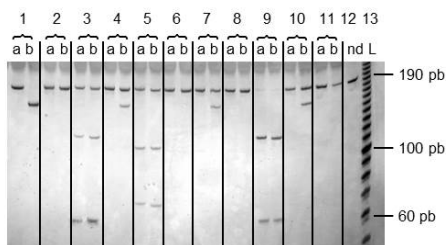


Figura 1. Análise de PCR-RFLP do gene PrP, sendo **a**: padrões de restrições do produto de PCR (197pb) digerido com *Bsp*HI. **b**: padrões de restrições produto de PCR (196pb) digerido com *Bsp*HI e *Bsp*DI. Amostra 1: genótipo ARR/ARR. Amostras 2, 6, 8 e 11: genótipo ARQ/ARQ. Amostra 3: genótipo ARQ/VRQ. Amostra 4, 7 e 10: genótipo ARR/ARQ. Amostra 5: genótipo ARQ/AHQ. Amostra 9: VRQ/VRQ. Amostra 12: DNA não digerido. Amostra 13: Ladder 10pb.

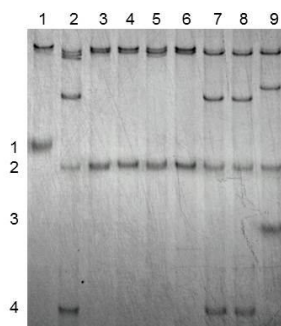


Figura 2: Análise de PCR-SSCP do gene PrP representando quatro padrões de migração (1, 2, 3 e 4), que foram associados aos alelos ARR, ARQ, VRQ e AHQ, respectivamente. Amostra 1: genótipo ARR/ARR. Amostras 2, 7 e 8: ARQ/AHQ. Amostras 3, 4, 5, e 6: ARQ/ARQ. Amostra 9: ARQ/VRQ.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Com relação ao alelo ARR, selecionado na Europa, preferencialmente para aumentar a resistência dos rebanhos ovinos, ocorreu em frequências de 0,1981 e 0,0938 nos rebanhos Morada Nova e Santa Inês, respectivamente. O alelo ARQ foi o mais frequente, ocorrendo em frequências de 0,6698 e 0,7343 no Morada Nova e Santa Inês, respectivamente. Em relação aos alelos VRQ e AHQ, verificou-se que a frequência do VRQ foi maior no Santa Inês (0,1407) que no Morada Nova (0,0189) e, a frequência do AHQ, maior no Morada Nova (0,1132) que no Santa Inês (0,0312).

Muitos estudos realizados em diversos países também demonstraram que o alelo ARQ é o mais frequente, em algumas raças autóctones de Portugal, cujas frequências variaram de 0,52 a 0,91, em raças nativas da Espanha, variando de 0,66 a 0,79 e em raças criadas no Brasil, ocorrendo em frequência média de 0,65 (ANDRADE ET AL., 2011, SOTOMAIOR et al., 2012, SANTOS, 2012), . Considerando que o alelo ARQ é considerado ancestral, as altas frequências estimadas para o Morada Nova e Santa Inês seriam esperadas, principalmente, em rebanhos que ainda não sofreram seleção intensa para os polimorfismos do gene PrP, como é o caso das raças nativas e/ou rebanhos de raças criadas no Brasil.

No presente estudo, 11,39% dos ovinos Morada Nova genotipados foram classificados nos grupos 1 e 2 que, segundo os critérios da *National Scrapie Plan* (NSP) (DAWSON et al., 1998), não apresentam restrição para reprodução. No grupo 3, cujas restrições variam de acordo com o tipo de produção, observa-se que há 39,61% e 21,87% dos ovinos Morada Nova e Santa Inês, respectivamente. Nos grupos 4 e 5, que alocam os animais que devem ser totalmente eliminados, quer por castração ou abate, enquadram-se 49,05% e 78,13% dos ovinos Morada Nova e Santa Inês, respectivamente. Estes resultados indicam que a maioria dos animais investigados apresenta risco de desenvolver o *scrapie*, embora 7,54% dos ovinos Morada Nova sejam homozigotos ARR/ARR, cujo genótipo é associado à resistência ao *scrapie*. As diferenças observadas entre os rebanhos demonstram a necessidade de se ampliar as análises do gene PrP nestas e em outras raças a fim de permitir a identificação de genótipos favoráveis para aumentar a resistência dos rebanhos brasileiros. O conhecimento advindo, certamente contribuirá para a implantação de um programa de cruzamentos seletivos no Brasil e certamente, poderá agregar valor comercial às raças ovinas criadas no país.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a maioria dos animais investigados apresenta risco de desenvolver o *scrapie*, embora 7,54% dos ovinos Morada Nova sejam homozigotos ARR/ARR, cujo genótipo é associado à resistência ao *scrapie*.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

As diferenças observadas entre os rebanhos demonstram a necessidade de se ampliar as análises do gene PrP nestas e em outras raças a fim de permitir a identificação de genótipos favoráveis para aumentar a resistência dos rebanhos brasileiros. O conhecimento advindo certamente contribuirá para a implantação de um programa de cruzamentos seletivos no Brasil e poderá agregar valor comercial às raças ovinas criadas no país.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida, à FAPESP (Processo N. 2013/10973-6) pelo apoio financeiro e aos colegas do Laboratório de Genética, pela colaboração técnica que permitiu a realização desse estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C.P.; ALMEIDA, L.L.; CASTRO, L.A.; LEAL, J.S.; SILVA, S.C.; DRIEMEIER, D. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a scrapie-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.893-898, 2011.

DAWSON, M.; HOINVILLE, L.J.; B.D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. **Veterinary Record**, v.142, p 623-625, 1998.

LÜHKEN, G.; BUSCHANN, A.; GROSCHUP, M.H ERHARDT, G. Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. **Archives of Virology**, v.149, p.1571-1580, 2004

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>>. Acesso em: 24 jun.2014.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS, N.E.; SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.914-921, 1994.

SANTOS, C.R. **Deteção de polimorfismos do gene da proteína prionica no rebanho ovino do estado de São Paulo: métodos e aplicabilidade de seleção para resistência ao scrapie**. 2012, 127f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOTOMAIOR, C.S.; RIBEIRO, F.T.L; OLLHOFF. R.D. Seleção de ovinos geneticamente resistentes ao scrapie. **Revista Biotemas**, v. 25, 237-247, 2012

ZHOU, H.; HICKFORD, J.G.H.; FANG, Q. Technical Note: Determination of alleles of the ovine PRNP gene using PCR-single-strand- conformational polymorphism analysis. **Journal of Animal Science**, v.83, p.745-749, 2005.