

Análise dos polimorfismos da proteína priônica (PRNP) em ovinos crioulos do Rio Grande do Sul

ÉVERTON EILERT RODRIGUES¹

DIEGO HEPP¹

LUÍS ALBERTO OLIVEIRA RIBEIRO²

NORMA CENTENO RODRIGUES³

DANIEL THOMPSEN PASSOS⁴

TANIA DE AZEVEDO WEIMER⁵

RESUMO

Scrapie é uma encefalopatia espongiforme transmissível, de ovinos e caprinos. Polimorfismos no gene da proteína priônica (PRNP) estão associados com a suscetibilidade à scrapie. Este trabalho determinou o polimorfismo do codon 171 do PRNP em duas variedades [Serrana (n=58) e Fronteira (n=51)] de ovinos da raça nativa Crioula. O DNA foi amplificado por PCR; os produtos foram clivados com Bsl I e analisados em gel em poli-acrilamida não-desnaturante a 10,5%. A frequência do alelo de resistência (R) foi de 0,30 na população Serrana e 0,39 na Fronteira. Apesar da alta ocorrência do alelo de suscetibilidade (Q), a população Fronteira apresentou a mais alta frequência, já descrita, do alelo R, em ovinos brasileiros.

Palavras-chave: Ovinos crioulo, scrapie, encefalopatia espongiforme transmissível, polimorfismos no gene PRNP.

¹Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Biotecnologia Veterinária, ULBRA, Canoas.

²Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre.

³Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA.

⁴Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA.

⁵Professora/orientadora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e PPG em Genética e Toxicologia Aplicada e PPG Diagnóstico Genético Molecular. (tania.azevedo@ulbra.br)

ABSTRACT

Scrapie is a sheep and goat transmissible spongiform encephalopathy. Polymorphisms at the prionic protein gene (PRNP) are associated to scrapie susceptibility. This paper analyzed the codon 171 PRNP polymorphism at in two morphological varieties [Serrana (n=58) and Fronteira (n=51)] of Crioula indigenous sheep. Genomic DNA was PCR amplified; PCR products were submitted to Bsl I cleavage and analyzed in 10.5% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The frequency of the resistant allele (R) was of 0.30 in Serrana breed and 0.39 in Fronteira. Although susceptibility allele (Q) had high frequency, Fronteira breed presents the highest frequency of R allele so far described, in Brazilian sheep.

Keywords: Ovinos crioulo, scrapie, encefalopatia espongiforme transmissível, polimorfismos no gene PRNP.

INTRODUÇÃO

Scrapie é uma enfermidade pertencente ao grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) que acomete ovinos e caprinos. É uma doença neurodegenerativa fatal causada por uma proteína infecciosa (prion, PrP^{Sc}), resultante de mudanças conformacionais da proteína priônica (PrP^C). A proteína anormal (PrP^{Sc}) acumula-se no tecido cerebral e sistema linforeticular, causando distúrbios comportamentais, de locomoção, perda de peso, intenso prurido. As EETs também afetam humanos (Kuru e Doença de Creutzfeld-Jakob, CJD, por exemplo), bovinos (BSE: encefalopatia espongiforme bovina, conhecida como “doença da Vaca Louca”) além de outras espécies de mamíferos (COSTA e BORGES, 2000), podendo ocorrer transmissão entre espécies.

Na Europa e no Reino Unido, casos vêm sendo relatados há mais de 200 anos (HUNTER, 2003; CHESEBRO, 2003). Na década de 80 a importância da scrapie aumentou depois que surgiram, no Reino Unido, casos da doença da vaca louca (RIBEIRO e RODRIGUES, 2001). Os sintomas da BSE são semelhantes aos da scrapie, sendo sugerido, por alguns autores, que

a origem da doença, nos bovinos, seria a ingestão, por estes, de ração para ruminantes (farinha de carne e osso) produzida a partir de proteína de ovinos infectados com scrapie (BRUCE et al., 2002; NONO et al., 2003; THURING et al., 2004). Neste mesmo período no Reino Unido, a BSE foi associada a uma nova variante da CJD, em humanos, de manifestação precoce, (vCJD) gerando medo nos consumidores britânicos e enormes prejuízos financeiros.

Desde 1996, o Ministério da Agricultura proibiu, no Brasil, o uso de farinha de carne e osso na alimentação de bovinos (RIBEIRO e RODRIGUES, 2001).

No Brasil, o primeiro caso de scrapie ocorreu em 1978, em uma fêmea Hampshire Down, proveniente do Reino Unido (FERNANDES et al., 1978). Até 2001 mais quatro surtos foram registrados no país, nas regiões do Rio Grande do Sul e Paraná, sendo que a origem dos animais infectados era sempre de ovinos importados e de raças produtoras de carne (RIBEIRO e RODRIGUES, 2001). De 2003 até 2006 ocorreram mais cinco surtos no Brasil no Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. A origem desses animais também era importada

ou com ascendentes importados do Canadá ou Estados Unidos (GUIMARÃES, 2006).

A transmissão da doença depende da predisposição genética dos hospedeiros e da exposição ao prion infeccioso. No momento da parição ou aborto, as ovelhas portadoras do agente podem contaminar o ambiente com o prion infeccioso que está presente nos restos placentários. (PATTISON et al., 1974). Com isso, existe o risco de infecção da prole durante o período compreendido entre o nascimento e o desmame e de outros ovinos e caprinos que consomem alimentos que entraram em contato com as membranas fetais eliminadas pelas fêmeas portadoras. Adicionalmente, ocorre um longo período de sobrevivência da prion no ambiente. Os machos que se contaminam podem adquirir os sintomas, mas não transmitem a doença (GUIMARÃES, 2006).

A forma infecciosa da proteína decorre de modificações conformacionais na estrutura da PrP^C cuja forma normal rica em α -hélice altera-se em maior proporção para β -pregueada, tornando-se insolúvel e resistente à digestão de proteases (HUNTER, 1999) acarretando o acúmulo de PrP^{Sc}, no cérebro e no sistema linfocelular dos animais infectados (HARRIS, 1999; BUJDOSO et al., 2005; PONZ et al., 2005).

Em ovinos o gene que codifica a PrP^C apresenta três importantes polimorfismos, nos códons 136, 154 e 171, que influenciam a alteração conformacional da PrP^C para PrP^{Sc} e estão associados com maior ou menor suscetibilidade à scrapie (GOLDMANN et al., 1990; BOSSERS et al., 1996; BILLINIS et al., 2004).

O códon 171 codifica os aminoácidos Glutamina (Q), Arginina (R), Lisina (K) ou

Histidina (H). Os alelos Q e R estão associados com a suscetibilidade à scrapie. Os animais portadores do alelo 171Q possuem maior suscetibilidade enquanto que os portadores do alelo 171R são mais resistentes à manifestação clínica da doença. Os alelos K e H para o códon 171 apresentam uma frequência muito baixa e têm sido considerados equivalentes ao alelo Q quanto à suscetibilidade (ACUTIS et al., 2004; BILLINIS et al., 2004). Segundo Dawson et al. (1998), o controle da scrapie nos ovinos das raças Down (Hampshire e Suffolk) vem sendo feito, em vários países, com base na análise molecular, através de programas de erradicação dos portadores do alelo Q do códon 171, que é considerado o principal determinante para a suscetibilidade à doença. Já o códon 136 codifica os aminoácidos Valina (V) ou Alanina (A), sendo considerado importante em alguns tipos de scrapie e em determinadas raças de ovinos, como Texel, Shetland, Poll Dorset. O códon 154 codifica os aminoácidos Histidina (H) ou Arginina (R) e não é considerado em programas de erradicação, nos EUA, por ser o códon de menor expressão na determinação da suscetibilidade genética à scrapie (HUNTER et al., 2002).

De acordo com Dawson et al. (1998), genotipando os animais é possível classificá-los quanto ao risco de suscetibilidade. Animais com genótipo QQ são considerados altamente suscetíveis, se expostos ao agente prion alterado, animais QR possuem risco médio de suscetibilidade e animais RR possuem risco mínimo de desenvolver os sintomas da doença.

No Brasil as frequências dos alelos de suscetibilidade à scrapie foram descritas apenas em rebanhos Down, do Rio Grande do Sul (PAS-SOS et al., 2008).

OBJETIVOS

Geral: Verificar as freqüências dos alelos de resistencia à scrapie em ovinos do Rio Grande do Sul, visando reduzir a probabilidade de disseminação da Scrapie nos rebanhos do Brasil.

Específico: Verificar as freqüências dos alelos R e Q do códon 171 do gene PRNP na raça ovina Crioula e compará-las com os resultados já obtidos nas raças Down (Hampshire e Suffolk), do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

População e amostra

Os ovinos Crioulos são animais rústicos, que sobrevivem bem em campos pobres, de pequeno porte e têm na lã, naturalmente colorida, um de seus grandes diferenciais, característica que começa a chamar a atenção do mercado artesanal. Possuem maior resistência a parasitas e maior habilidade materna, resultando em melhor sobrevivência de cordeiro. Apresentam velos ralos, mostrando fibras longas e lisas, em mechas longas e pontiagudas, de cor variando entre branca, marrom e preta, alguns apresentando manchas coloridas sobre fundo branco. A carne é bem aceita por ser magra, macia e com sabor diferenciado. Seu melhoramento por seleção é demorado e difícil, e cruzamento com outra raça é perigoso, pois sua rusticidade pode desaparecer se a raça cruzante for mal escolhida. A ovelha crioula lanada tem desempenhado um importante papel na manutenção do homem no campo, pois se adapta a diferentes condições de clima, solo e vegetação, inclusive em ambientes adversos para a criação de outros ovinos.

Acredita-se que a ovelha Crioula teve origem na Churra, trazida para a América do Sul pelos colonizadores ibéricos. Todavia, é difícil caracterizar os diversos tipos de ovinos “crioulos” existentes em diferentes regiões da América, embora apresentem semelhanças em seus traços gerais. No Brasil, parece ter surgido no século XVII, do cruzamento entre os rebanhos trazidos pelos padres jesuítas e outras raças também importadas. De acordo com a classificação internacional, o rebanho de Ovelha Crioula é considerado como população rara, pois conserva traços dos ovinos primitivos que lhe deram origem. Existem duas variedades morfológicas, Serrana e Fronteira, desconhecendo-se o grau de diferenciação genética entre as mesmas.

Foram obtidas 109 amostras de sangue (59 Serrana e 51 Fronteira), por punção da veia jugular, com anti-coagulante. O material foi mantido sob refrigeração e enviado ao laboratório de Biotecnologia do hospital veterinário ULBRA, para a extração do DNA.

Métodos laboratoriais

O DNA genômico foi isolado a partir de sangue total de acordo com o método de Miller et al. (1988) e o gene PRNP foi amplificado utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos das amplificações foram clivados com a enzima de restrição *Bsl* I para possibilitar a diferenciação dos alelos, e conseqüente identificação dos genótipos. As análises dos produtos de clivagem foram feitas por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 10,5% e corado com nitrato de prata (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Os primers, as condições da PCR e de clivagem são as mesmas descritas por Yuzbasiyan-Gurkan et al. (1999).

RESULTADOS

As frequências genotípicas e alélicas obtidas para o códon 171 do gene do gene PRNP, em ovinos Crioulos estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. As tabelas apresentam também os dados previamente descritos por Passos et al., 2008, para ovinos Down, para efeitos de comparação. Pode-se observar que foram observados 60% de indivíduos QQ na população

serrana e 41%, na fronteira, correspondendo a frequências alélicas de 0,7(Q) e 0,3(R), na população serrana e 0,61(Q) e 0,39 (R), na fronteira.

A frequência do alelo R na amostra Serrana foi similar à descrita para Hampshire Down (Tabela 2), enquanto a da Fronteira foi a mais alta já verificada em ovinos do Rio Grande do Sul e mais alta que a de outras populações mundiais.

Tabela 1 - Frequências genotípicas do códon 171 do gene da PrP

Códon 171	Raça							
	Crioula				Hampshire Down*		Suffolk*	
	Serrana		Fronteira		n	(%)	n	(%)
Genótipo	n	(%)	n	(%)				
QQ	35	(60)	21	(41)	123	(47)	128	(54)
QR	11	(19)	20	(39)	113	(44)	103	(44)
RR	12	(21)	10	(20)	24	(9)	6	(2)
Total	58		51		260		237	

*PASSOS et al.(2008)

Tabela 2: Frequências alélicas do códon 171 do gene da PrP

Códon 171	Raça					
	Crioula		Hampshire Down*		Suffolk*	
	Serrana	Fronteira				
Alelo						
Q	0,70	0,61	0,69		0,76	
R	0,30	0,39	0,31		0,24	

*PASSOS et al.(2008)

DISCUSSÃO

A avaliação dos polimorfismos no gene PRNP tem sido utilizada em diferentes países como forma de controle das encefalopatias espongiformes transmissíveis, visando a diminuição do risco de contaminação de animais e humanos.

Essa é a primeira descrição das frequências do genótipo de PRNP em ovinos da raça Crioula.

Nas duas populações analisadas foi observada uma alta frequência do alelo Q, relacionado à maior suscetibilidade. Estes dados são compatíveis com estudos anteriores (YUZBASIYAN-GURKAN et al., 1999) em

rebanhos que não sofreram seleção para o alelo de resistência à scrapie. É importante salientar que não há relatos da ocorrência de scrapie em ovinos Crioulos; no entanto a alta frequência do alelo de susceptibilidade sugere o risco de contaminação desses rebanhos caso os mesmos venham a ter contato com animais infectados.

Comparando com as outras populações ovinas do Rio Grande do Sul, já investigadas (Tabelas 1 e 2), observa-se que os animais da raça Crioula, da população Fronteira, apresentaram a mais alta frequência do alelo de resistência (R), sugerindo a importância deste rebanho como fonte de resistência à EET.

Considerando que os machos não transmitem o prion infeccioso e sim os alelos de suscetibilidade ou de resistência é importante genotipar e identificar os machos portadores de pelo menos um alelo R. Com isso, é possível utilizar estes animais em cruzamentos dirigidos para aumentar a frequência dos alelos de resistência nos rebanhos ovinos brasileiros, sem que haja o risco de contaminação das fêmeas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos, pretende-se informar aos criadores a importância da genotipagem e identificação de machos portadores de pelo menos um alelo R, pois as análises deste polimorfismo poderão servir aos criadores brasileiros como ferramenta útil na seleção de rebanhos ovinos através da realização de cruzamentos dirigidos. Adotando esta metodologia é possível estabelecer um programa de seleção eficiente e assim, redu-

zir o risco de disseminação da doença, obtendo um rebanho resistente e de maior valor comercial.

REFERÊNCIAS

ACUTIS, P.L. et al. Low frequency of the scrapie resistance associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3165-3172, 2004.

BILLINIS, C. et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 547-554, 2004.

BOSSERS, A. et al. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2669-2673, 1996.

BRUCE, M.E. et al. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 695-704, 2002.

BUJDOSO, R.; BURKE, D.F.; THACKRAY, A.M. Structural differences between allelic variants of the ovine prion protein revealed by molecular dynamics simulations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, p. 840-849, 2005.

CHESEBRO, B. Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. **British Medical Bulletin**, v. 66, p. 1-20, 2003.

COSTA, L.M.C.; BORGES, J.R.J. Encefalopatia

- Espingiforme Bovina (“Doença da Vaca Louca”). **Revista CFMV**, v. 21, p. 8-15, 2000.
- DAWNSON, M. et al. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. **Veterinary Record**, v. 142, p. 623-625, 1998.
- FERNANDES, R.E.; REAL, C.M.; FERNANDES, J.C.T. Scrapie em ovinos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária - UFRGS**, v. 6, p. 139-146, 1978.
- GOLDMANN, W. et al. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 2476-2480, 1990.
- GUIMARÃES, E.B. Scrapie. In: ENCONTRO NACIONAL DO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA RAIVA DOS HERBÍVOROS E OUTRAS ENCEFALOPATIAS – PNCRH, 3., 2006, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2006.
- HARRIS, D.A. Cellular biology of prion diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 429-444, 1999.
- HUNTER, N. Molecular biology and genetics of bovine spongiform encephalopathy. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The genetics of Cattle**. New York: CABI Publishing, 1999.
- HUNTER, N. et al. Transmission of prion diseases by blood transfusion. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2897-2905, 2002.
- HUNTER, N. Scrapie and experimental BSE in sheep. **British Medical Bulletin**, v. 66, 171-183, 2003.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acid Research**, v. 16, p. 1215, 1988.
- NONO, R. et al. Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4127-4133, 2003.
- PATTISON, I.H. et al. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with fetal membranes from scrapie-affected sheep. **British Veterinary Journal**, v. 130, p. 65-67, 1974.
- PASSOS, D.T. et al. PrP polymorphisms in Brazilian sheep. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 130–133, 2008.
- PONZ, R. et al. Scrapie resistance alleles are not associated with lower prolificity in Rasa Aragonesa sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 37-39, 2005.
- RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C. Scrapie. **A Hora Veterinária**, v. 120, p.19-22, 2001.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- THURING, C.M.A. et al. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity and glycoprofile of prion protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 972-980, 2004.

YUZBASIYAN-GURKAN, V. et al.
Development and usefulness of new polymerase
chain reaction-based tests for detection of

different alleles at codons 136 and 171 of the
ovine prion protein gene. **American Journal
of Veterinary Research**, v. 60, p. 884-887, 1999.