

Análise da frequência de alelos de suscetibilidade à scrapie como ferramenta na seleção de rebanhos ovinos

ÉVERTON EILERT RODRIGUES¹
DIEGO HEPP²
LUIS ALBERTO OLIVEIRA RIBEIRO³
NORMA CENTENO RODRIGUES⁴
TANIA DE AZEVEDO WEIMER⁵
DANIEL THOMPSEN PASSOS⁶

RESUMO

Scrapie é uma encefalopatia espongiforme transmissível fatal que acomete ovinos e caprinos. Mutações no códon 171 [Glutamina (Q), Arginina (R), Lisina (K) ou Histidina (H)] do gene da proteína priônica (PrP^C) estão associadas com a suscetibilidade à doença. Os animais de genótipo QQ são considerados altamente suscetíveis, os animais QR possuem risco médio de suscetibilidade e os RR são considerados resistentes à encefalopatia. Verificaram-se as frequências dos alelos R e Q do códon 171 da PrP^C nas raças Suffolk e Hampshire Down do Brasil. Foram avaliadas 497 amostras de ovinos, sendo 260 animais Hampshire Down e 237 animais Suffolk. Em Hampshire Down foram verificados 47% de animais com genótipo QQ, 43% QR e 9% RR. Em Suffolk, 54% dos animais apresentaram genótipo QQ, 43% QR e

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Funcionário do Hospital Veterinário/ULBRA

³ Professor do Curso de Medicina Veterinária/UFRGS

⁴ Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

⁵ Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e do Pós-Graduação em Toxicologia e Farmacologia Aplicada/ULBRA

⁶ Professor - Orientador do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e do Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (danielth@ulbra.tche.br)

2% RR. Os resultados apontam uma alta frequência dos alelos de suscetibilidade, compatível com rebanhos que não sofreram seleção para alelos de resistência à scrapie.

Palavras-chave: scrapie, proteína priônica (PrP^C), encefalopatia espongiforme, ovinos.

ABSTRACT

Scrapie is a fatal transmissible spongiform encephalopathy of sheep and goats. Mutations at codon 171 of the prion protein gene (PrP^C) are associated with susceptibility to the disease. In this paper the frequency of the R and Q alleles of codon 171 of PrP^C in Brazilian sheep of Suffolk and Hampshire Down breeds are presented. A total of 497 samples were assayed, 260 from H. Down and 237 from Suffolk breeds. The results showed that 47% of H. Down sheep were QQ, 43% QR, and 9% RR. In Suffolk sheep 54% were QQ, 43% QR, and 2% RR. The data point out the high frequency of alleles related to scrapie susceptibility, compatible with flocks that have not been selected for resistance to this condition.

Key words: scrapie, prion protein (PrP), spongiform encephalopathy, sheep.

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}). 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 & BORGES, 2000).

Na Europa e no Reino Unido, casos vêm sendo relatados há mais de 200 anos (HUNTER, 2003; CHESEBRO, 2003). No Brasil, o primeiro caso de scrapie ocorreu em 1978 em um ovino Hampshire Down, fêmea, proveniente do Reino Unido (FERNANDES, REAL, & FERNANDES, 1978). Na década de 80, a importância da scrapie aumentou depois que surgiram casos no Reino Uni-

do da doença da vaca louca (RIBEIRO & 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 de produtos contendo proteína animal, de ovinos infectados com scrapie, utilizados no preparo de ração (farinha de carne e osso) para ruminantes (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, 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 & RODRIGUES, 2001).

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 sem-

pre de ovinos importados e de raças produtoras de carne (RIBEIRO & RODRIGUES, 2001). De 2003 até 2006 ocorreram mais cinco surtos no Brasil e as regiões envolvidas foram: 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 (PrP^{Sc}), já que o agente 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. 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 desta forma alterada, no cérebro e no sistema linforeticular dos animais infectados (HARRIS, 1999; BUJDOSO, BURKE & THACKRAY, 2005; PONZ et al., 2005). Adicionalmente ocorre um longo período de sobrevivência da prion no ambiente.

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 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, animais QR possuem risco médio de suscetibilidade e animais RR, se expostos ao agente prion alterado possuem risco mínimo de desenvolver os sintomas da doença.

No Brasil ainda não se conhecem as frequências dos alelos de suscetibilidade à scrapie nos rebanhos ovinos.

O objetivo deste trabalho foi verificar as frequências dos alelos R e Q do códon 171 da proteína priônica (PrP^C) nas raças ovinas Hampshire Down e Suffolk do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 497 amostras de ovinos da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, de ambos os sexos e de diferentes idades, sendo 260 animais da raça Hampshire Down e 237 animais da raça Suffolk. O DNA genômico foi isolado a partir de sangue total de acordo com o método de Miller, Dykes & Polesky (1988) e o gene da PrP^C 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 produ-

tos 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 da PrP^C, estão apresentadas nas Tabela 1 e 2, respectivamente. Na raça Hampshire Down foram verificados 47% de animais com genótipo QQ, 44% QR e 9% RR, correspondendo às frequências alélicas de 0,69 para o alelo Q e 0,31 para R. Em Suffolk, 54% dos animais apresentaram genótipo QQ, 44% QR e 2% RR, sendo as frequências alélicas de 0,76(Q) e 0,24(R).

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

Códon	Hampshire Down		Suffolk	
	n	(%)	n	(%)
QQ	123	(47)	128	(54)
QR	113	(44)	103	(44)
RR	24	(9)	6	(2)
Total	260		237	

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

Alelo	Hampshire Down	Suffolk
Q	0,69	0,76
R	0,31	0,24

DISCUSSÃO

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

Essa é a primeira descrição das frequências do genótipo da PrP^C em ovinos Hampshire Down e Suffolk no Brasil.

Nas populações analisadas foi observada uma alta frequência do alelo Q, relacionado à maior nível de suscetibilidade. Estes dados são compatíveis com estudos anteriores (YUZHANSKIYAN-GURKAN et al., 1999) em rebanhos que não sofreram seleção para o alelo de resistência à scrapie.

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.

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

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pretende-se informar aos criadores a importância da genotipagem e identificação de machos portadores de pelo menos um alelo R. Utilizando estes animais em cruzamentos, é possível diminuir a frequência dos alelos de suscetibilidade à doença, e assim uma possível redução do risco de surgimento de scrapie e também de BSE nos rebanhos ovinos e bovinos brasileiros..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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:**

Sctructure, 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 Espongiforme 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, p.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.

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**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 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.