

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MAPEAMENTO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO  
GENE *prnp* ASSOCIADA À  
RESISTÊNCIA/SUSCETIBILIDADE À *SCRAPIE* EM  
OVINOS**

**GENETIC VARIABILITY OF THE PRNP GENE  
ASSOCIATED WITH RESISTANCE/SUSCEPTIBILITY  
TO SCRAPIE IN SHEEP**

**Cristiane Camargo Sanches**

**CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
FEVEREIRO – 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MAPEAMENTO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO  
GENE *prnp* ASSOCIADA À  
RESISTÊNCIA/SUSCETIBILIDADE À *SCRAPIE* EM  
OVINOS**

**GENETIC VARIABILITY OF THE PRNP GENE  
ASSOCIATED WITH RESISTANCE/SUSCEPTIBILITY  
TO SCRAPIE IN SHEEP**

**Cristiane Camargo Sanches**

**Orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira  
Soares**

**Co-orientadora: Phd. Grácia Maria  
Soares Rosinha**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de  
Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal. Área de  
concentração: Saúde Animal.

**CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
FEVEREIRO – 2009**

## Cristiane Camargo Sanches

“Mapeamento da variabilidade genética do gene *prnp* associado à resistência/suscetibilidade à *Scrapie* em ovinos”

“Genetic variability of the *prnp* gene associated with resistance/susceptibility to scrapie in sheep”

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Animal

APROVADA: 27/03/2009

  
Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares  
Orientador

  
Dra. Carina Elisei de Oliveira

  
Dr. Gelson Luiz Dias Feijó

## SUMÁRIO

Sumário .....	IV
Lista de Figuras .....	V
Lista de Tabelas .....	VI
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Breve Histórico .....	5
2.2 A Proteína Celular .....	6
2.3 Doenças Priônicas .....	9
2.4 <i>Scrapie</i> .....	9
2.4.1 Origem Genética.....	10
2.4.2 Origem Infecciosa .....	13
2.4.3 Origem Esporádica.....	14
2.5 O Agente.....	15
2.6 Patogênese .....	18
2.7 Diagnóstico e Tratamento.....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
4. ARTIGO.....	34
ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS CÓDONS 136, 154 E 171 DO GENE <i>prnp</i> EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E TEXEL .....	34
Resumo .....	34
ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF <i>PRNP</i> GENE IN SANTA INÊS AND TEXEL SHEEP .....	35
Abstract .....	35
Introdução .....	36
Materiais e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	38
Conclusão .....	40
Referência Bibliográficas.....	42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura conformacional da proteína priônica normal (GABUST et al., 2005)... 7
- Figura 2.** Modelos tridimensionais da proteína PrP. O modelo da esquerda representa PrP<sup>c</sup> recombinante de hamster. O modelo da direita representa o modelo monomérico alterado de PrP<sup>S<sup>c</sup></sup> de hamster (COHEN, 2008)..... 16
- Figura 3.** Representação esquemática das possíveis formas de passagem através do epitélio intestinal e posterior invasão do sistema nervoso COHEN, 2008)..... 19

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Tabela 1.** Casos de *scrapie* ocorridos em ovinos no Brasil – período 1978 a 2006. .... 6

**Tabela 2.** Classificação dos 15 genótipos do gene *prnp* e seus respectivos grupos de risco, segundo Plano Nacional de combate à *scrapie* estabelecido pela Grã Bretanha em 2001 (DAWSON et al., 2008)..... 12

### ARTIGO

**Tabela 1.** Frequências genotípicas e alélicas relativas aos SNPs encontrados nos códons 136, 154 e 171 do gene *prnp* das raças Santa Inês e Texel... ..... 39

O importante é estar pronto para, a qualquer momento,  
sacrificar o que somos pelo que podemos vir a ser.

Charles Du Bois

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, João B. L. Sanches e Sandra R. C. Sanches que sempre me encorajaram a dar este grande passo. Sempre agindo com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação, sempre estando ao meu lado, me apoiando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, minha fortaleza, fonte de ternura e afeto.



## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Engenheiro de Computação e Professor, Marcelo Christiano da França Júnior que sempre me apoiou, auxiliou, esteve presente em todas as etapas desta jornada e demonstrou seu carinho e amor. Marcelo, obrigada por fazer parte da minha vida, por ser um homem íntegro e um grande companheiro.

## AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, por toda sua dedicação e exigência, seu constante incentivo e empenho, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Por sua paciência e acima de tudo competência e participação com discussões, correções, revisões e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

Ao Dr. Cleber Oliveira Soares, pela oportunidade de ser sua orientada e pelas diversas oportunidades, dentre elas, a de ter acesso à um projeto tão importante, o qual originou este trabalho. Obrigada por seu suporte, preocupação e atenção. Sua competência profissional muito me incentivou para que tivesse certeza do caminho que estou percorrendo.

À Dra Carina Elisei, que me auxiliou nos primeiros passos dentro da Biologia Molecular e sempre me acompanhou com seus ensinamentos profissionais e experiência, ao longo do tempo se tornou uma grande amiga que contribuiu de forma inestimável para minha formação profissional

Ao grande amigo Cleber Eduardo, que participou ativamente na realização deste trabalho e esteve ao meu lado nos momentos de dificuldade e alegria, contribuindo sempre com sua inteligência, dinamismo e bom humor.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de corte, equipe exemplo de companheirismo e união, obrigada pela oportunidade de convivência e por saber que posso contar com todos vocês.

Às minhas amadas irmãs, Mônica (in Memoriam) e especialmente Simone, minha grande amiga que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando e me dando força, meu porto seguro

.

## RESUMO

A *scrapie* é uma neuropatologia degenerativa que acomete ovinos e caprinos e faz parte das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs), doenças consideradas fatais causadas pela acúmulo da proteína infecciosa prion (PrP<sup>Sc</sup>). Esta proteína possui conformação alterada provavelmente por mutações no gene *prnp*, mutações que, em ovinos, modificam a tradução dos códons 136, 154 e 171 e têm sido relacionadas com suscetibilidade/resistência à *scrapie*. O objetivo deste estudo foi analisar o polimorfismo dos códons 136, 154 e 171 do gene *prnp* associados à resistência/suscetibilidade à *scrapie* em ovinos das raças Santa Inês e Texel das regiões de Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Foi extraído DNA genômico de sangue de 17 amostras dos animais Santa Inês e 12 animais da raça Texel e as regiões alvo foram amplificadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com oligonucleotídeos específicos para as regiões alvo do gene *prnp*. Os produtos amplificados foram seqüenciados para determinação dos genótipos. O alelo ARQ foi freqüente em 82,35% dos animais da raça Santa Inês e 52,78% dos animais da raça Texel, seguidos de frequências de 36,36% e 33,33% do genótipo ARQ/ARQ, respectivamente. O genótipo ARQ/VRQ foi frequente em 9,09% dos animais Santa Inês e 5,56% em Texel. A maioria dos animais foram incluídos no grupo R3 de risco relativo à *scrapie*, apontando para baixa resistência à doença.

**Palavras-chave:** *Scrapie* – polimorfismo – genotipagem – prion - ovino.

## ABSTRACT

*Scrapie* is a degenerative and neuropathology disease that affects nervous system in sheep and goats, It is one of the several transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) diseases considered fatal caused by the accumulation of infectious prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). This protein has altered conformation probably by mutations in the PRNP gene, mutations in sheep, modify the translation of codons 136, 154 and 171 and have been associated with susceptibility / resistance *scrapie*. The aim of this study was to analyze the polymorphism of codons 136, 154 and 171 of the PRNP gene associated with resistance/susceptibility to *scrapie* in Santa Inês sheep and Texel sheep breeds raised in the states of Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul DNA genomic was purification llood samples from 17 animals Santa Ines and 12 animals of the Texel and the target regions were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers specific for regions target gene PRNP. The amplified products were sequenced to determine the genotypes. The ARQ allele was detected in 82.35% and 52.78% of the Santa Inês and Texel sheep, respectively. The frequencies of the ARQ/ARQ genotype were 36.36% and 33.33%, respectively. The ARQ/VRQ genotype was found in 9.09% and 5.56% of the Santa Inês and Texel sheep, respectively. The majority of sheep was classified in the R3 risk group, indicating low resistance to *scrapie*.

**Key words:** *scrapie* – polymorphism – prion – sheep

# 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne ovina está estimada em aproximadamente 8,4 milhões de toneladas, sendo Austrália e Europa os principais produtores, detendo cerca de 40% deste total. Com um efetivo ovino representado por aproximadamente 13,85 milhões de cabeças, o Brasil tem aumentado gradativamente a sua produção de carne ovina ao longo dos últimos anos, apresentando uma projeção para 2008 da ordem de 123 mil toneladas, segundo estimativas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2008).

O Estado de Mato Grosso do Sul detém o segundo maior rebanho ovino do Brasil e o primeiro do Centro-Oeste com 620 mil cabeças registradas até novembro de 2005, com perspectivas de atingir cerca de cinco milhões de cabeças até o ano de 2010 (SEBRAE, 2007).

Em busca da melhora da produtividade dos rebanhos, alguns sistemas utilizados com este objetivo podem trazer consigo o surgimento de doenças que, até então, não constituíam em prejuízo sanitário ou econômico. Programas intensivos de melhoramento genético, principalmente os que visam a precocidade e aumento da massa muscular em ovinos podem estar associados às altas taxas de prevalência de várias doenças, entre elas, a *scrapie* (LEANES, 2008).

A *scrapie*, enfermidade que faz parte do grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) teve seu primeiro relato por volta de 1730 na Europa e apresenta atualmente, grave problema de cunho econômico.

Em ovinos, vários estudos indicam a associação de determinados genótipos à suscetibilidade à *scrapie*. Existem mutações bem conhecidas no gene *prnp*, que modificam a tradução dos códons 136 (Alanina/Valina), 154 (Histidina/Arginina) e 171 (Glutamina/Arginina/Histidina/Lisina) e, que estão associadas à ocorrência da doença (VACCARI et al., 2004).

O conhecimento da frequência de alelos que conferem resistência e suscetibilidade à *scrapie* contribui de forma acelerada para a identificação de animais geneticamente resistentes, o que pode auxiliar em programas de melhoramento genético, que através de direcionamento de acasalamentos, poderão aumentar a frequência de alelos favoráveis à erradicação da doença (MORENO et al., 2006).

A ocorrência de casos de *scrapie* no Brasil, em particular no Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, seja na forma natural da doença ou pela importação de ovinos, requer conhecimentos do gene *prnp* em raças aqui criadas, a fim de monitorar a seleção de animais resistentes para serem utilizados em programas de melhoramento genético.

Sendo a *scrapie* uma doença de grande preocupação internacional, se faz necessária a caracterização do gene *prnp* envolvendo a alteração dos códons 136, 154 e 171 nos animais que compõem o plantel ovino nacional e que estão envolvidos na segregação das alterações do gene, visando o desenvolvimento de estratégias para prevenir a ocorrência e a disseminação da doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Breve Histórico

De acordo com levantamentos epidemiológicos descritos na literatura, a primeira referência às Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) ou doenças priônicas ocorreu por volta do ano de 1730, quando foram detectados casos de Tremor Enzoótico dos Ovinos (*Scrapie*) em alguns países do Reino Unido (MACGOWAN, 1922) e Alemanha (LEOPOLDT; NUTEZLICHE, 1959).

Nas décadas de 1950 e 1960, o surto de uma doença neurodegenerativa até então desconhecida, foi relatada em integrantes da tribo Fore da Nova Guiné, onde mais tarde foi descoberto que a causa mais provável era a prática de canibalismo ritual. Este canibalismo foi apontado como o mecanismo de transmissão de *prions*, na doença que ficou conhecida como Kuru (GAJDUSEK; ZIGAS, 1957).

Neste mesmo período, estudos em chimpanzés demonstraram como ocorre a forma de transmissão do agente através de inoculação intracerebral. A partir daí, outras três enfermidades que acometem humanos como a doença de Creutzfeldt-Jakob familiar (fCDJ), Gerstmann Staussler-Scheinker Síndrome (GSS), Insônia Fatal Familiar e uma de bovinos, a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), passaram a ser relatadas de forma mais detalhada (KÜBLER et al., 2003).

A disseminação da doença fora da Europa foi relacionada à exportação de animais infectados, sendo considerada a principal causa na ocorrência do primeiro caso nos EUA em 1947 e na Austrália e Nova Zelândia em 1952 (LEANES, 2008).

A doença foi introduzida no Brasil pela importação de ovinos Hampshire Down de rebanhos ingleses (Fernandes et al., 1978).

O primeiro caso foi identificado em 1978 no RS (FERNANDES et al., 1978), seguindo-se de um segundo episódio em 1985 no Paraná (RIBEIRO, 1993). Diante dos fatos, o governo brasileiro proibiu a importação de animais do Reino Unido, mas manteve abertas as fronteiras para a introdução de ovinos de outros países, EUA e Canadá em particular, onde a doença é endêmica. Segundo Ojeda e Oliveira (1998) de 1991 a 1996 foram importados 2267 ovinos, a maioria dos USA.

Os dados da Tabela 1 revelam que a doença ocorre em rebanhos onde foram importados animais de países da América do Norte. O governo brasileiro não permite mais a importação de ovinos em pé desses países, mas, mesmo assim, novos casos têm sido diagnosticados. Provavelmente em virtude da herança genética dos animais anteriormente introduzidos no Brasil.

<b>Ano</b>	<b>Raça</b>	<b>Procedência</b>	<b>Estado</b>
1978	Hampshire Down	Reino Unido	RS
1985	Wiltshire Horn	Reino Unido	PR
1995	Suffolk	USA	RS
1997	Suffolk	USA	PR
2001	Hampshire Down	Canadá	PR
2003	Hampshire Down	Brasil	PR
2006	Hampshire Down	Brasil	MS
2006	Suffolk	Brasil	RS

Adaptado de Ribeiro e Rodrigues (2001).

**Tabela 1.** Casos de *scrapie* ocorridos em ovinos no Brasil – período 1978 a 2006.

Atualmente, a *scrapie* é encontrada em diversos países do mundo e junto com a EEB compõem o quadro de enfermidades priônicas de maior repercussão mundial, em particular, por constituírem um grupo de doenças que acarretam grandes perdas econômicas além de apresentarem grande risco à saúde humana (WOOLHOUSE et al., 2004).

## 2.2 A Proteína Celular

A proteína celular priônica (PrP<sup>C</sup>) foi primeiro detectada em experimentos realizados na tentativa de identificar o ácido nucléico exógeno do agente responsável pelas doenças neurodegenerativas, as EETs (PRUSINER, 1998).

O termo *prion* ou partícula proteínácea infecciosa foi criado por Stanley Prusiner em 1982 para enfatizar o papel crucial desta proteína nas EETs (PRUSINER, 1982). Esta partícula é constituída por 256 aminoácidos e é altamente conservada em vertebrados (GABUST et al., 2005).



Em ovinos, o gene *prnp* que codifica para a proteína priônica, está localizado no cromossomo 13 e possui uma região de aproximadamente 31 kb constituída por dois exons curtos não-codificantes, e um exon que contém a ORF (*open reading frame*) constituída por 236 códon (LEE et al., 1998).

A proteína priônica normal ou Proteína *prion* Celular (PrP<sup>C</sup>) (Figura 1) é considerada uma glicoproteína, constantemente produzida no retículo endoplasmático, processada no complexo de Golgi e então transportada para a superfície celular do tecido cerebral, quando por possuir uma meia vida curta, devido a processos de endocitose, é rapidamente metabolizada, sofrendo degradação proteolítica (MOSER et al., 1996).



**Figura 1.** Estrutura conformacional da proteína priônica normal (GABUST et al., 2005).

A abundância da *prion* celular no cérebro sugere funções importantes tais como neurotransmissão, ativação do sistema imune celular, metabolização do cobre (Cu), atividade antioxidante e apoptose (MAZZONI et al., 2005). A partir de estudos com camundongos, foi constatado que animais deficientes em PrP<sup>C</sup> apresentavam uma redução de dez vezes na fração microsomal de cobre para o cérebro, com redução também na atividade da Cu-Zinco (Zn) superóxido dismutase, levando a uma maior sensibilidade à toxidez por Cu e ao estresse oxidativo (HOPE, 2000).

Células em que a expressão do gene *prnp* havia sido anulada, por nocaute genético, se mostraram mais sensíveis ao estresse oxidativo do que aquelas em que ocorria a expressão normal. A partir destas observações, Wong et al. (1999) afirmaram que a isoforma PrP<sup>C</sup> ligada ao Cu tem um papel importante na proteção celular aos danos causados por radicais livres.

Goldgaber (1997), determinou que a atividade cerebral da proteína *prion* estava diretamente ligada à proteína “*stress inducible protein 1*” (STI-1), que quando juntas formavam um complexo de aproximadamente 543 aminoácidos, o qual funcionaria como um interruptor, bloqueando ou liberando o funcionamento da *prion*. Posteriormente, o complexo formado pela *prion* celular e a STI-1 mostrou-se essencial tanto para o amadurecimento e a formação dos prolongamentos dos neurônios, como para protegê-los da morte celular programada, a apoptose (BRENTANI, 1997).

Atualmente, está comprovado que a proteína priônica é também responsável por modular a resposta do sistema imunológico às inflamações, ora aumentando, ora reduzindo a atividade das células de defesa, estimulando a ação dos neutrófilos, as células de defesa mais abundantes no organismo. Experimentos com camundongos geneticamente alterados para não produzir a *prion* celular, demonstraram que esses animais apresentam um número menor de neutrófilos, além de se apresentarem mais lentos do que os roedores normais (ZOMOSA-SIGNORET et al., 2008).

O metabolismo detalhado da atividade cerebral da *prion* celular ainda não está totalmente esclarecido, porém, é conhecido que a proteína se encontra ancorada em regiões mais espessas da superfície celular, por uma longa molécula de açúcar e lipídios em forma de barbante por onde a *prion* pode deslizar para áreas mais delgadas da membrana dos neurônios. Neste momento, esta é transportada no interior de vesículas contendo ácidos, onde se conecta a outras proteínas e envia comandos para o núcleo ou outras regiões. Este deslocamento não ocorre ao acaso, pois a *prion* celular só se move na superfície dos neurônios depois que proteínas específicas se acoplam a ela, ativando-a. (ZOMOSA-SIGNORET et al., 2008).

Como um receptor, a *prion* saudável conduz outras proteínas para o interior dos neurônios. Uma vez no interior da célula, o complexo formado pela *prion* e sua proteína ativadora, envia sinais químicos que ordenam a emissão de prolongamentos ou a produção de compostos que protegem o neurônio da morte. Sem essa penetração no interior da célula,

a comunicação mediada pela *prion* celular fica incompleta (ZOMOSA-SIGNORET et al., 2008)

### 2.3 Doenças Priônicas

As doenças priônicas são patologias neurodegenerativas fatais e incuráveis que ocorrem no Sistema Nervoso Central (SNC) e linfático e que podem se apresentar como desordens genéticas, infecciosas ou esporádicas a partir da modificação conformacional da proteína PrP<sup>C</sup> (PRUSINER, 1998; WOOLHOUSE et al., 2001).

Dentre as EETs em animais estão a *scrapie* em pequenos ruminantes, a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), que também é conhecida popularmente como Doença da Vaca Louca, a doença emaciante crônica dos cervídeos e alces (CWD), a Encefalopatia Transmissível das Martas (ETM), a Encefalopatia Espongiforme Felina (EEF), além das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis encontradas em ungulados não domésticos, criados em cativeiro e avestruzes (SIMMONS, 2008). Em seres humanos são conhecidas a kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (fDCJ) e a variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ), doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker e a insônia fatal familiar (NOINVILLE et al., 2008).

### 2.4 Scrapie

*Scrapie* é uma desordem neurodegenerativa enzoótica fatal que afeta ovinos domésticos (*Ovis aries*) e selvagens, como o muflon (*Ovis musimon*), e caprinos (*Capra hircus*). Pelo fato da doença possuir evolução lenta, ocorre principalmente em ovinos em idade reprodutiva (WOOD et al., 1992).

A *scrapie* é também chamada de *tremblante* (tremedeira) na França, *traberkrankheit* (doença do trotar) na Alemanha, ou ainda *rida* (doença do tremor ou ataxia) na Islândia (CUILLE; CHELLE, 1936).

Existem duas formas de manifestações clínicas da doença: a forma pruriginosa e a forma nervosa, de acordo com a predominância de sinais sensitivos ou motores. Dentre os

principais sintomas, destacam-se prurido, hiperexcitabilidade, ranger de dentes, incoordenação motora e morte. A evolução da doença é demorada, podendo ser observada caquexia, paralisia, movimento excessivo ou estresse ao manejo (VICARIVENTO et al., 2008).

A *scrapie* deve receber atenção especial de pesquisadores e órgãos do governo, responsáveis pela sanidade animal e humana, pois mesmo não sendo conhecida por infectar diretamente os seres humanos, no entanto, baseado em dados experimentais é altamente provável que a *scrapie* possa ser transmitida aos bovinos, que por sua vez podem potencialmente infectar seres humanos (BÉRINGUE et al., 2008).

#### 2.4.1 Origem Genética

A origem genética da *scrapie* em ovinos e em outros representantes da ordem Artiodactyla, está comprovadamente relacionada a polimorfismos do gene *prnp*. Casos clínicos de tremor epizoótico nos ovinos e caprinos foram registrados ao longo de várias décadas em quase todas as regiões do mundo, onde a resistência/suscetibilidade genética à doença foi baseada nos genótipos que constituíam o gene *prnp* (DETWEILER, 2003).

Existe uma estreita associação entre existência de alterações polimórficas no gene responsável pela codificação de aminoácidos essenciais que constituem a proteína priônica e a suscetibilidade ao tremor epizoótico ovino, sendo que polimorfismos nos três códons (136, 154 e 171) estiveram presentes em animais positivos e foram associados a diferentes focos da *scrapie* em ovinos (LUHKEN et al., 2007).

Os códons 136 (Alanina, A), 154 (Arginina, R) e 171 (Arginina, R) foram identificados como os mais importantes na suscetibilidade à *scrapie* (SWEENEY; HANRAHAN, 2008), por estarem diretamente relacionados ao poder de conversão de moléculas PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup> (proteína alterada, responsável pelo desenvolvimento da doença). Esta característica pode ser explicada pelo fato de que os diferentes polimorfismos estão localizados na área de interação entre PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>, ou seja, na área de reconhecimento entre as moléculas (BOSSERS et al., 2000).

O gene *prnp* ovino foi mapeado pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), e após análises detalhadas destas porções em particular de alguns ovinos, uma

alteração polimórfica foi localizada na porção 15 do braço curto do cromossomo 13 (13q15) (IANNUZZI et al., 1998). Seu seqüenciamento, a partir de ovinos Suffolk suscetíveis à *scrapie*, mostrou que o gene é descontínuo, possuindo três exons intercalados (LEE et al., 1998). A janela aberta de leitura do gene *prnp* de ovinos, que codifica a proteína celular, está localizada completamente no exon III, sem interrupção de introns (GLOCKSHUBER, 1998; GOLDMANN, 2008; LIEMANN). Da mesma forma que em ovinos, o gene *prnp* de outros mamíferos possui um ou dois exons não codificantes, além daquele que codifica a proteína *prion* celular (LEE et al., 1998).

O gene *prnp* não apresenta TATA *box*, ao invés, mostra uma seqüência rica em GC (BASLER et al. 1986; DODELET; CASHMAN, 1998) e até o momento, dos 256 códons que compõem o gene *prnp*, 39 foram considerados polimórficos, porém, no caso de ovinos, os alelos polimórficos considerados de particular importância por estarem relacionados a casos de *scrapie*, são os que se referem aos códons 136 (alteração do aminoácido Alanina para Valina), 154 (alteração do aminoácido Arginina para Histidina), e 171 (alteração do aminoácido Glutamina para Arginina, Glutamina para Histidina ou Glutamina para Lisina) (GOLDMANN, 2008; SWEENEY 2008). Estes polimorfismos combinados formam cinco alelos (ARQ, VRQ, AHQ, ARR, ARH) que podem ser organizados em 15 genótipos, (Tabela 1).

Baseado nos 15 diferentes genótipos, uma forma de classificação contendo grupos de risco foi desenvolvido na Grã Bretanha, por meio do Plano Nacional de Controle e Erradicação da *scrapie* (PNS) (DEFRA, 2003). Esta classificação foi criada para auxiliar os programas de melhoramento genético e outros planos similares foram desenvolvidos nos Estados Unidos e por membros da União Européia (DAWSON et al., 1998; DETWREILER et al., 2003).

Genótipo	Classificação do PNS	Risco associado à <i>scrapie</i>
ARR/ARR	R1	Muito baixo
ARR/AHQ	R2	Baixo
ARR/ARH		
ARR/ARQ		
AHQ/AHQ	R3	Moderado, especialmente
AHQ/ARH		em ARQ/ARQ
AHQ/ARQ		

ARH/ARH		
ARH/ARQ		
ARQ/ARQ		
ARR/VRQ	R4	Moderado
VRQ/AHQ	R5	Alto, especialmente
VRQ/ARH		em VRQ/ARQ e VRQ/VRQ
VRQ/ARQ		
VRQ/VRQ		

**Tabela 2.** Classificação dos 15 genótipos do gene *prnp* e seus respectivos grupos de risco, segundo Plano Nacional de combate à *scrapie* estabelecido pela Grã Bretanha em 2001 (DAWSON et al., 2008).

O grupo de risco R5 está relacionado com animais que apresentam maior risco de desenvolver a doença (BOSSER et al., 1996; BAYLIS et al., 2004a). No Reino Unido, e em muitos outros focos registrados, tais como França, Irlanda e Noruega os animais que apresentaram os genótipos VRQ/VRQ foram incluídos neste grupo (HERMANN et al., 2002; O'DOHERTY et al., 2002; TRANULIS et al., 1999).

O risco do grupo R5 é tão elevado que, por muito tempo, a *scrapie* foi considerada uma doença estritamente genética. Porém, vários estudos têm demonstrado de modo conclusivo que ovinos com o genótipo VRQ/VRQ podem sobreviver até a velhice quando mantidos em ambientes livres da doença (HUNTER et al., 1997). Os outros três genótipos incluídos no grupo R5 são VRQ/ARQ, VRQ/ARH e VRQ/AHQ (HOFFMANN et al., 2007).

Considerando que as estimativas de risco de desenvolvimento da *scrapie* relacionado ao genótipo homozigoto VRQ/VRQ são semelhantes nos genótipos VRQ/ARQ, VRQ/ARH, o risco de desenvolvimento da doença na presença do genótipo VRQ/AHQ é surpreendentemente baixo. Isto sugere que o alelo AHQ tem um efeito claro de resistência quando comparado à resistência conferida pelo alelo ARQ combinado ao alelo VRQ (BOSSERS et al., 1996).

O genótipo incluso no grupo R4 é constituído por animais que apresentam menores riscos de serem afetados pela *scrapie* em relação aos classificados no grupo R5, mas que o risco disseminado aos seus descendentes ainda é significativo, sobretudo porque a prole gerada e que se enquadra no grupo R5 pode ser produzida a partir de reprodutores que são enquadrados no grupo R4. O genótipo ARR/VRQ representa esse grupo (DAWSON et al., 2008).

A presença do alelo ARH indica uma redução significativa da suscetibilidade, onde animais e descendentes que apresentam este genótipo, acompanhados de alelos que conferem suscetibilidade, estão inclusos no grupo R3. Os seis genótipos que constituem este grupo incluem ARQ/ARQ, bem como o genótipo incomum, ARH/ARH (DAWSON et al., 2008).

Em comparação aos grupos R4 e R5, o grupo R3 é representado por genótipos que conferem aos animais uma redução de risco de cerca de três vezes (resistência parcial) em desenvolver a doença, neste estão incluídos animais com os genótipos ARQ/AHQ (BILLINIS et al., 2004; DAWSON et al., 2008).

O grupo R2 é constituído por animais que apresentam os genótipos ARR/AHQ, ARR/ARH e ARR/ARQ, sendo considerados resistentes, porém, ocasionalmente seus descendentes podem desenvolver a doença e apresentar genótipos que estão incluídos em grupos de classificação de risco mais elevado (BOSSERS et al., 1996; DAWSON et al., 2008).

Animais que constituem o grupo R1, apresentam o genótipo ARR/ARR e são considerados como resistentes à *scrapie* (HOUSTON et al., 2007).

#### **2.4.2 Origem Infecciosa**

A origem infecciosa da doença está diretamente ligada ao modo como ocorre a transmissão. Usualmente ovinos e caprinos contraem o agente infeccioso quando mastigam ou ingerem placenta e/ou fluídos contaminados. Além da ingestão oral, outras possíveis rotas de infecção podem ocorrer por escarificação e por via conjuntival. Entretanto, nenhuma forma infectiva foi encontrada nas fezes, urina, leite, colostro ou saliva por teste de inoculação em ratos. A transmissão materna foi sugerida como possível meio de disseminação do agente (McGOWAN et al., 1922; BÉRINGUE, 2008), entretanto, foi observado que o embrião/feto não pode ser exposto a *scrapie* no útero, porque estão separados fisicamente do alantóide e corioalantóide (PrP<sup>Sc</sup> positivos) pelo âmnio (PrP<sup>Sc</sup> negativo) (TUO et al., 2001). Trabalhos realizados na Alemanha por POST et al. (1999) também sugeriram que as doenças priônicas podem ser transmitidas pelas moscas em

diferentes estágios de desenvolvimento, mesmo após a morte do inseto, o que pode ser relevante na transmissão da *scrapie* e EEB.

O fenômeno de transmissão de *prions* de uma espécie para outra foi denominado barreira interespecífica (LIEMANN; GLOCKSHUBER, 1998). De acordo com Prusiner et al. (1990), entre indivíduos da mesma espécie ocorre a transmissão de *prions* homólogas, onde a seqüência das duas isoformas (PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>) é semelhante. Diferentes espécies expressam formas da PrP<sup>C</sup> levemente distintas, diferindo em parte na quantidade de aminoácido presente na seqüência de cada espécie, por exemplo: a PrP<sup>C</sup> originária de ratos difere da PrP<sup>C</sup> provenientes de Hamster por 16 aminoácidos, logo, a inoculação da PrP<sup>Sc</sup> provenientes de Hamster em ratos dificilmente irá desencadear a doença.

Entretanto, a diferença na seqüência de aminoácidos entre ovinos e bovinos é de 7 aminoácidos, portanto a transmissão entre as duas espécies não é difícil. A proteína PrP<sup>C</sup> humana difere da de bovinos por mais de 30 aminoácidos, o que torna extremamente difícil a transmissão de EEB para o homem, mas não impossível (OWEN, 1998).

A transmissão de *prions* heterólogos entre espécies requer a troca de seqüências entre doador e hospedeiro, já que estas se apresentam diferentes (SCOTT et al., 1997). A diferença na seqüência da proteína *prion* se dá através da linhagem e possivelmente através da interação do PrP<sup>C</sup> com um fator (ou fatores) desconhecido(s) do hospedeiro, denominado proteína X (LIEMANN; GLOCKSHUBER, 1998). Segundo Wilesmith et al. (1991), a grande semelhança de seqüências entre as proteínas *prions* dos biungulados parece ter facilitado a transmissão destas de ovinos para bovinos.

### 2.4.3 Origem Esporádica

Além das formas genéticas (ou herdáveis) e infecciosas, a *scrapie* pode se manifestar no animal sem que ele tenha predisposição genética ou tenha ingerido a proteína. Essa forma de manifestação da doença denomina-se esporádica (BROWN et al. 2000).

Uma explicação adequada para esta forma da origem da doença seria comparar o agente (*prions*) aos retrovírus, onde uma cópia de RNA converte-se em uma cópia



transcrita de DNA complementar. Porém, este modelo de transmissão vertical do estado infeccioso, ocorre por integração de uma cópia de DNA cromossômico (provírus ou vírions) em células da linhagem germinal, com subsequente expressão destes provírus em células somáticas, culminando no desenvolvimento da doença infecciosa (WATTS et al., 2007).

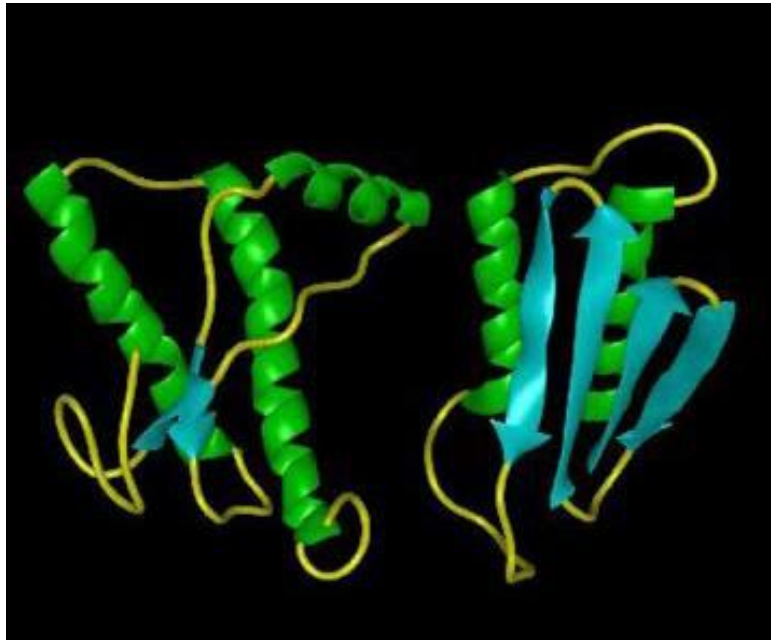
No entanto, um genoma funcional proviral só pode se desenvolver a partir de um precursor. Assim os provírus não possuem origem espontânea, e os retrovírus não podem ser reclassificados no grupo de doenças de origem esporádica. Em contrapartida, a epidemiologia esporádica pode ser definida como uma particularidade das doenças priônicas, classificando-as como doenças transmissíveis originárias de uma proteína alterada (WATTS et al., 2007).

## 2.5 O Agente

De acordo com a "Hipótese da Proteína", a *prion* infecciosa consiste em uma proteína *prion* anormal, PrP<sup>Sc</sup> (PRUSINER, 1982). Esta é uma isoforma protéica modificada da proteína celular normal, a PrP<sup>C</sup>, que é abundantemente expressa em células de mamíferos (PRUSINER, 1998)

A PrP<sup>C</sup> produzida no hospedeiro é uma proteína em que predomina a conformação -hélice. Medições por espectroscopia de dicroísmo circular da PrP<sup>C</sup> mostram 38% de conformação  $\alpha$ -hélice, 14% de estruturas  $\beta$ -folheadas, 27% de giros e 22% em espiral ao acaso. Sua conversão para PrP<sup>Sc</sup> implica no aumento de estruturas  $\beta$ -folheadas para 38%, redução das  $\alpha$ -hélice para 19% e os 43% restantes tornam-se espirais aleatórios (SAFAR, 1996), podendo ser observadas as duas isoformas na Figura 2. Ambas são covalentemente idênticas, não sendo identificadas até agora diferenças químicas. Esta transição de estrutura secundária e terciária é acompanhada por profundas mudanças em suas propriedades, como insolubilidade em detergentes não desnaturantes, propensão a agregar-se (formação de amilóides), resistência parcial à proteólise (PRUSINER *et al.*, 1996), interação anormal de membrana, termorresistência (SAFAR, 1996), meia vida, na qual a PrP<sup>C</sup> tem duração de seis horas, enquanto a PrP<sup>Sc</sup>, pode durar anos (BOSSERS, 1999). Segundo CAUGHEY e

colaboradores, (1998), há modificações da PrP<sup>Sc</sup> também quanto à conformação, estado polimérico e/ou associações ligantes.



**Figura 2.** Modelos tridimensionais da proteína PrP. O modelo da esquerda representa PrP<sup>C</sup> recombinante de hamster. O modelo da direita representa o modelo monomérico alterado de PrP<sup>Sc</sup> de hamster (COHEN, 2008).

A conversão da proteína da forma normal para a forma anormal ou alterada é um processo fundamental para a transmissão e patogênese da doença. A alteração ocorre após a síntese de PrP<sup>C</sup> no retículo endoplasmático. A proteína recém sintetizada transita por meio do complexo de Golgi para a superfície da célula onde se ligará a uma âncora de glicofosfatidilinositol. Próxima à superfície celular, a PrP<sup>C</sup> é metabolizada ou convertida em PrP<sup>Sc</sup>. A molécula recém formada volta à célula por domínios membrano-caveolares (CLD) localizados na superfície desta, resultando em invaginações da membrana plasmática. Tais estruturas são ricas em proteínas ligadoras de colesterol e glicofosfolipídeos, sendo insolúveis em detergentes (ZOMOSA-SIGNORET et al., 2008).

Esta conversão consiste num ciclo de replicação simples (Figura 3), onde a PrP<sup>Sc</sup> se encontra em equilíbrio como um segundo estado, chamada de PrP\*, visto como um estado intermediário que intervém na formação da PrP<sup>Sc</sup>, quer por meio de um encontro com PrP<sup>Sc</sup> ou de um encontro com outra molécula de PrP\* (COHEN; PRUSINER, 1999).

Em circunstâncias normais a PrP<sup>C</sup> domina o equilíbrio conformacional, mas nas doenças infecciosas, a PrP<sup>Sc</sup> é fornecida a partir do exterior e pode ligar-se a PrP\* para originar um heteromultímero (PrP<sup>Sc</sup>/PrP\*), que pode ser convertido depois num homomultímero de PrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>Sc</sup>). Neste evento, um fator auxiliar intervém diretamente nesta conversão, chamada de proteína X; esta liga-se à PrP<sup>Sc</sup> e após a conversão do PrP\* em PrP<sup>Sc</sup> é liberada e reciclada, juntando-se a outro novo complexo heteromultimérico (TELLING et al., 1995; KANEKO et al., 1997; ZOMOSA-SIGNORET et al., 2008).

O complexo heteromultímero pode-se dissociar originando a formação de dois moldes capazes de novas replicações, originando-se, assim, o crescimento exponencial de PrP<sup>Sc</sup> (CORREIA; CORREIA, 2001).

Na forma infecciosa, a *prion* exógena (PrP<sup>Sc</sup>), inicia a sua replicação ao ligar-se a um complexo constituído pela proteína X, no momento em que esta condiciona o enrolamento da proteína priônica celular normal (PrP<sup>C</sup>) à qual se encontra ligada, e que por influência da PrP<sup>Sc</sup>, passa a ter uma conformação em início de modificação a qual denomina-se PrP\*, que com a continuação da sua biossíntese, passa a PrP<sup>Sc</sup> endógeno. Desta forma, a PrP<sup>Sc</sup> exógena, molda, ajudada pela proteína X, a PrP\* convertendo-a em PrP<sup>Sc</sup> endógena (CORREIA; CORREIA, 2001).

Na forma hereditária, a concentração de PrP\*, conformação intermediária, aumenta quer devido ao efeito desestabilizador da mutação sobre a estrutura da PrP<sup>C</sup>, quer por aumento de estabilidade da PrP<sup>C</sup> ou do dímero ou multímero de PrP\*. A presença do complexo PrP\*/PrP\* pode dar origem a PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>Sc</sup> e iniciar um ciclo de replicação. Nas doenças priônicas hereditárias, e talvez nas doenças priônicas espontâneas que ocorrem devido a uma mutação celular somática, a proteína PrP<sup>C</sup> mutada pode ligar-se à proteína X e dar origem ao complexo PrP\*/Proteína X/PrP\*/Proteína X, a partir do qual poderá originar a PrP<sup>Sc</sup> endógena na ausência de uma PrP<sup>Sc</sup> exógena que funcione como molde. Este papel seria adquirido pela proteína PrP<sup>C</sup> mutada. Após esta formação inicial da PrP<sup>Sc</sup> endógena, a replicação priônica seguiria o curso de crescimento exponencial (CORREIA; CORREIA, 2001).

Na forma esporádica existe um acontecimento molecular que é a formação do complexo PrP\*/PrP\* ou ocorre uma mutação celular somática. Nas formas espontâneas das doenças priônicas, a formação rara do complexo PrP\*/Proteína X/PrP\*/Proteína X poderá

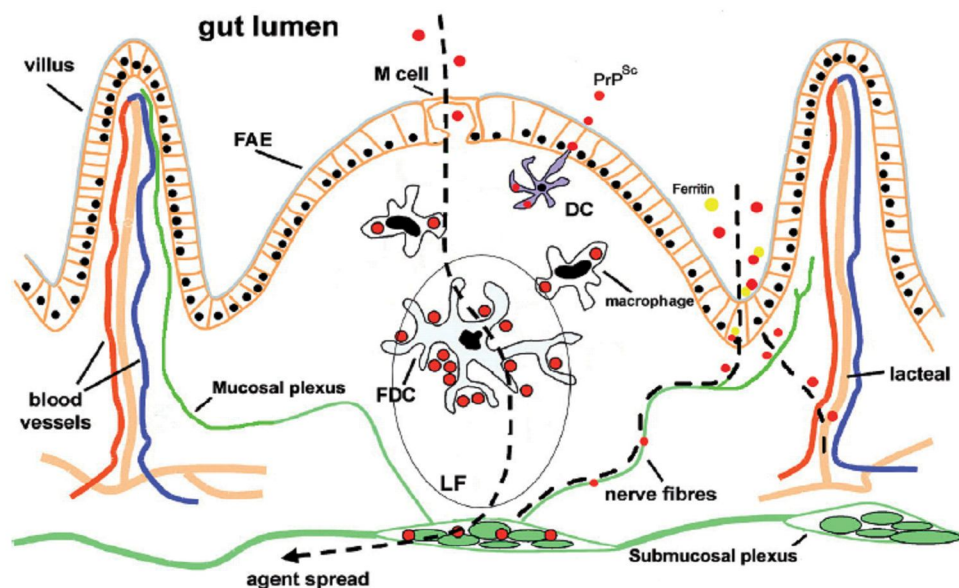
originar a formação de PrP<sup>Sc</sup> endógena, que depois seguirá um ciclo replicativo (CORREIA; CORREIA, 2001).

## 2.6 Patogênese

A infecção de ovinos pelo agente ocorre por via oral, embora escarificações na pele e mucosas/conjuntiva danificadas são consideradas como vias alternativas de infecção (MOHAN, 2004). O agente infeccioso da *scrapie* está presente no ambiente de pastoreio e em pastagens, sendo ingeridos durante o pastoreio nestes locais contaminados (DICKINSON, 1976). No caso de bovinos, na EEB, a infecção ocorre através da alimentação a partir de concentrados contendo farinha de carne e ossos derivados de bovinos infectados pela doença (WILESMITH, 1991).

A forma como o agente atravessa a barreira da mucosa após ser ingerido ainda é obscura, porém são postuladas três formas possíveis de ocorrer (Figura 4). A primeira é a forma mediada pelas células M, um tipo de célula presente nos folículos do epitélio que constitui o intestino delgado e amígdala, especializada no transporte de macromoléculas e partículas por todo o segmento do epitélio (HEPPNER, 2001). Estas células M podem ser utilizadas por agentes patogênicos para atravessar a barreira das mucosas e ganhar acesso aos tecidos subjacentes (NEUTRA et al., 1996).

Após a ingestão, é possível absorção pela células-M ou células dendríticas a PrP<sup>Sc</sup> é transportada para os folículos linfóides (LF) e placas de Peyer subjacentes aos folículos associados ao epitélio. Dentro dos folículos linfóides, a PrP<sup>Sc</sup> acumula-se nas células dendríticas foliculares e logo é absorvida por macrófagos. Esse acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> pode facilitar a infecção através do plexo submucoso do sistema nervoso. Alternativamente, PrP<sup>Sc</sup> é carregada através da formação de um complexo com a ferritina. Depois que o epitélio é atravessado, a mucosa do plexo submucoso é infectada, podendo ser carregado através de fibras nervosas até o tecido cerebral (COHEN, 2008).



**Figura 3.** Representação esquemática das possíveis formas de passagem através do epitélio intestinal e posterior invasão do sistema nervoso (COHEN, 2008).

No entanto, o transporte da *prion* em todo o epitélio intestinal poderia ocorrer independente da célula M-transporte. Enzimas digestivas podem quebrar as moléculas infecciosas em moléculas menores, inclusive o núcleo da proteína resistente à proteinase K. Esses pequenos fragmentos, em seguida, podem formar complexos com outras proteínas como a ferritina. Um terceiro percurso provável acontece através de captação direta pelas células dendríticas, que podem percorrer as estreitas junções que separam as células epiteliais em busca de antígenos (MISHRA et al., 2004).

Depois de atravessar a barreira das mucosas, a forma PrP<sup>Sc</sup> acumula-se no tubo digestivo, nos tecidos associados aos nódulos linfóide da amígdala e placas de peyer (VAN KEULEN et al., 2002). Esse acúmulo inicial no sistema digestivo favorece fortemente a hipótese de transporte do agente através das células M, já que, antígenos envolvidos pelas células M são ativamente carregados às células dendríticas e macrófagos. A primeira evidência imunohistoquímica da presença da PrP<sup>Sc</sup> nos tecidos linfóides associados ao tubo digestivo (GALT), consiste no acúmulo intracelular de fragmentos da proteína no plasmalema de macrófagos e em folículos linfóides das células B (JEFFREY, 2007).

A replicação da *prion* GALT era até bem pouco tempo considerada crucial no mecanismo de neuroinvasão, porém quando a doença é reproduzida em modelos

experimentais, a função das células dendríticas no mecanismo é prejudicada (MABBOTT, 2000). No entanto, a ausência deste mecanismo de replicação não impede totalmente a neuroinvasão. Por exemplo, em ovinos que possuem em seu gene *prnp* genótipos com os alelos VRQ e ARR (tanto os que transportam o alelo VRQ, associado a alta suscetibilidade à *scrapie* como o alelo ARR, associado à alta resistência à *scrapie*), há pouco ou nenhum envolvimento deste mecanismo na replicação do agente (VAN KEULEN et al., 1996). No entanto, estes animais podem desenvolver a *scrapie* normalmente, embora a uma idade mais avançada. Em bovinos, a replicação do agente da EEB através dos tecidos linfóides é mínima ou ausente (BOSSERS, 1996).

Após o primeiro contato com a mucosa, o agente priônico é drenado através da linfa para os linfonodos mais próximos, isto significa que no caso das amígdalas o agente é drenado para os linfonodos retrofaríngeos e no caso das placas de peyer para os linfonodos mesentéricos (VAN KEULEN et al., 2002). Nesta fase, a PrP<sup>Sc</sup> pode ser detectada imunohistoquimicamente, indicando um transporte através de drenagem linfática a partir dos GALT. Além disso, as PrP<sup>Sc</sup> podem ser vistas ao se acumularem nos folículos das células dendríticas e nos folículos linfóides e córtex dos gânglios linfáticos dos linfonodos associados ao GALT.

Surpreendentemente, a PrP<sup>Sc</sup> não tem sido descrita em células nos seios medulares, embora as *prions* sejam mais difundidas fora dos tecidos linfóides do GALT. Ainda não se sabe como ocorre a propagação das *prions* através de sangue e linfa, acredita-se que aconteça através de um transporte ativo celular ou através de um estado livre, possivelmente ligado a algum componente da linfa ou plasma sanguíneo.

A possibilidade do agente infeccioso responsável pela *scrapie* estar presente no sangue, tem sido desde muito tempo, fonte de vários debates. Muitos estudos têm falhado em demonstrar sua ocorrência na corrente sanguínea ou em frações de sangue (HERRMANN et al., 2002), mas, com o auxílio de técnicas mais sensíveis, a PrP<sup>Sc</sup> tem sido detectada no sangue de ovinos provenientes de surtos (JACKMAN et al., 2006). Além disso, a transfusão sanguínea entre ovinos (forma utilizada em bioensaios) têm mostrado que a doença pode ser transmitida a partir de um doador positivo para um receptor suscetível livre da doença.

O sistema nervoso entérico é o primeiro tecido neural que entra em contato com a *prion*. Este tecido é constituído por duas grandes redes onde se localizam os corpos

neurônais (FURNESS; COSTA, 1987). O agente infeccioso pode tanto entrar em contato direto com as fibras nervosas do plexo submucoso como serem transportados através das placas de peyer. Porém, como visto anteriormente, esta forma de neuroinvasão não é requisito único para o desenvolvimento da enfermidade. Em estudos com ovinos infectados naturalmente com a *prion* infecciosa, o duodeno e o íleo foram identificados como potenciais sítios de invasão (VAN KEULEN et al., 2000).

Após o primeiro contato com o sistema nervoso entérico, o agente ascende até a medula espinhal (medula oblonga, óxex e segmentos torácicos) e a partir destes locais, a infecção se desenvolve tanto de forma ascendente como descendente, envolvendo todo o neuro-eixo (HOFFMANN et al., 2007).

Com o estabelecimento da doença, indivíduos infectados apresentam neurodegeneração com apresentação de áreas contendo vacuolização cerebral, degeneração neuronal, astrogliose e morte, o que confere ao tecido aspecto esponjoso além de acúmulo de placas amilóides constituída pela PrP<sup>C</sup> alterada. Estas mudanças podem ser observadas utilizando-se procedimentos histológicos padrão, e os depósitos da PrP<sup>Sc</sup> podem ser visualizados após tratamento prévio com ácido fórmico (HARITANI et al., 1994).

No caso da *scrapie*, a doença acomete principalmente ovinos em idade mais avançada, cerca de dois a quatro anos de idade, apresentando períodos de incubação variáveis, podendo ser influenciada por isolados distintos ou linhagens de *prions* que podem ser reconhecidas tanto por produzirem períodos de incubação diferentes como por causar diferenças nas características de padrões neuropatológicas em ratos após inoculação experimental. Acredita-se que existam em média 30 linhagens diferentes de *prions* associadas à *scrapie* (JACKSON; COLLINGE, 2000). Alguns trabalhos mostram que além da linhagem, o genótipo do hospedeiro também influencia o período de incubação (GOLDMANN et al., 1990).

Em ovinos afetados naturalmente por *scrapie*, foi constatada a ocorrência de hipercorticismo, quadro em que o animal apresenta altos níveis de cortisol no sangue. As conseqüências patogênicas do hipercorticismo no desenvolvimento de processos neurodegenerativos são alvo de discussões entre pesquisadores (PICARD-HAGEN et al., 2000).

## 2.7 Diagnóstico e Tratamento

Não existe tratamento eficaz para a enfermidade. Experimentalmente o uso de fatores de crescimento tem diminuído a perda neuronal, porém sem melhora significativa das lesões causadas aos neurônios (VICARIVENTO, 2008).

Nos casos de suspeita de *scrapie*, o diagnóstico diferencial é muito importante na determinação da doença. Considera-se como suspeita clínica fundamentada de *scrapie* aquela que persiste após investigação clínica, epidemiológica e diferencial para outras doenças, tais como sarna e outros ectoparasitos, cenurose, raiva, pseudo-raiva, pneumonia ovina progressiva (*maedivisna*), listeriose encefálica, polioencefalomalacia, toxemia da prenhez, fotossensibilização, hipomagnesemia, intoxicação por substâncias químicas ou por plantas, entre outras (MAPA, 2009).

Um dos principais obstáculos no combate às doenças priônicas é o seu diagnóstico, sendo esta dificuldade evidenciada pela semelhança entre a PrP<sup>Sc</sup> e a PrP<sup>C</sup>. Por esse motivo, o maior desafio para a ciência das EETs é o desenvolvimento de métodos de diagnóstico *ante-mortem* (O'ROURKE et al., 2000).

O primeiro método utilizado para confirmar o diagnóstico de uma EET foi o exame neuropatológico de tecidos do cérebro de animais ou humanos, sendo este ainda considerado como o método padrão (WHO, 1998). Neste método o tecido é coletado, preservado em formalina, seccionado, corado e então examinado em microscópio óptico, no qual são observadas as anormalidades patológicas no exame histológico. Este procedimento é geralmente complementado com revelação imunohistoquímica do tecido, a qual usa um anticorpo anti-PrP<sup>Sc</sup>, marcado com uma enzima, que se ligará a PrP<sup>Sc</sup>. A microscopia eletrônica pode também ser utilizada para detectar, em tecidos frescos *post-mortem*, fibrilas associadas a *scrapie* (as PrP<sup>Sc</sup> aparecem como estruturas em forma de bastonetes denominadas SAFs – *scrapie associated fibrils*) (KOO et al., 2000).

Visando o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico *ante-mortem*, diversos anticorpos têm sido testados para detecção do agente infeccioso (O'ROURKE et al., 2000) entre eles o MAB F89/160.15, que pode reagir com o PrP<sup>Sc</sup> em bovinos, ovinos e outros animais, sendo ainda capaz de reconhecer a *prion* em tecidos fixados em formalina e autoclavados. De forma semelhante, o anticorpo F99/97.6.1, pode ser utilizado como diagnóstico em animais vivos antes de desenvolver a sintomatologia (O'ROURKE et al.



2000). O teste ELISA também foi utilizado para detecção da PrP<sup>Sc</sup> em bovinos, porém é necessário esse que a amostra seja submetida a tratamento com calor e tiocianato de guanidina, provavelmente porque tal substância foi capaz de tornar acessíveis sítios antigênicos escondidos (MEYER et al., 1999).

A partir do ano de 2003, a Comissão Europeia (CE) aprovou cinco testes padrão de seleção comercial para uso na detecção direta e rápida da PrP<sup>Sc</sup> (EC, 2003), entre eles o *Western blot*, onde a PrP<sup>Sc</sup> purificada de material cerebral, é detectada por meio do anticorpo monoclonal 6H4 derivado de camundongo; o teste *Enfer* que envolve a extração rápida das proteínas, acoplada à técnica ELISA, onde a PrP<sup>Sc</sup> é detectada por meio de anticorpos policlonais e um anticorpo secundário conjugado à peroxidase (KÜBLER et al., 2003); o teste de LIA (Prionics-Check Luminescence Immunoassay) que detecta a presença da proteína por meio de dois anticorpos monoclonais e os testes de CEA -Bio-Rad e o InPro aCDI (InPro Automated Conformationally Dependent Immunoassay).

A principal limitação dos cinco testes apresentados é que eles não permitem a detecção da PrP<sup>Sc</sup> no estágio inicial da doença. Conseqüentemente, estes testes aprovados pela CE são suficientemente sensíveis para a detecção da doença somente em animais clinicamente doentes ou em animais aparentemente saudáveis que estão próximos a apresentar os primeiros sinais clínicos da doença.

Até o momento não existe terapia efetiva contra as doenças priônicas. Entretanto, diversos grupos têm procurado desenvolver formas e substâncias capazes de interromper ou reverter a produção de PrP<sup>Sc</sup> causadora da doença (PERRIER et al. 2000; SOTO et al. 2000). Mallucci et al. (2003) conseguiram parar a conversão da proteína saudável para a mutante em cobaias geneticamente modificadas. As cobaias recuperaram-se e viveram tanto quanto animais não infectados, a despeito da contínua presença da *prion* anormal no cérebro dos mesmos. O processo de conversão, e não o acúmulo da proteína, parece ser a chave da doença, levando à suspeita de que a substituição da proteína normal pela mutante pode produzir um tóxico (pelo produto), uma forma intermediária, ou pode esgotar um fator que seja crucial para a sobrevivência das células cerebrais.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA SEBRAE DE NOTÍCIAS. **J. Notic.** Disponível em <http://asn.interjornal.com.br> Acesso em 31 jan. 2007.

BASLER, K. *et al.* *Scrapie* and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, Cambridge, v. 46, n. 3, p. 417-428, 1986.

BAYLIS M., CHIHOTA C., STEVENSON E., GOLDMANN W., SMITH A., SIVAM K., Risk of *scrapie* in British sheep of different prion protein genotype. **Journal. of General Virology.**, v. 85, p. 2735–2740, 2004a.

BAYLIS M.,GOLDMANNW. The genetics of *scrapie* in sheep and goats. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, p.385–396, 2004b.

BÉRINGUE, V., VILOTTE , J., Laude, H. Prion agent diversity and species barrier. **Veterinary Research.**, v. 39, p. 47, 2008.

BILLINIS C., PSYCHAS V., LEONTIDES L., SPYROU V., ARGYROUDIS S., VLEMMAS I., ET AL. Prion protein gene polymorphisms in healthy and *scrapie*-affected sheep in Greece, **Journal. of General.**, v. 85, p. 547–554, 2004.

BOSSERS A., SCHREUDER B.E.C., MUILEMAN I.H., BELT P.B.G.M., SMITSM.A. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural *scrapie*. **Journal. of General** v. 77, p.2669–2673, 1996.

BOSSERS, A. Prion diseases: Susceptibility and transmissibility. *In vivo* and *in vitro* studies with sheep *scrapie*, **Thesis** (Doctorship), 1999

BOSSERS, A.; de VRIES, R.; SMITS, M.A. Susceptibility of sheep for *scrapie* as assessed by *in vitro* conversion of nine naturally occurring variants of PrP. **Journal. of General . Virology**, February, p.1407-1414, 2000.

BROWN, D.R. *et al.* Consequence of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. **The EMBO Journal**, Oxford, v.19, n.6, p.1180-1186, 2000.

CAUGHEY, B.; RAYMOND, G.J.; BESSEN, R.A. Strain-dependent difference in B-sheet conformations of abnormal *prion* protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.48, p.32230-32235, 1998.

COHEN, F. E. & PRUSINER, S. B. Structural studies of prion proteins, **Prion Biology and diseases**. v. 5, p. 191-228, 1999.

COHEN, F.E. The Cohen Group. Disponível em: <<http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/research/>>. Acesso em 12/11/2008.

CORREIA, J., H., R., D., CORREIA, A., A., D. Initiation and replication of prion pathogenic synthesis in transmissible spongiform encephalopathy. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, v. 96, p. 105-112, 2001.

CUILLE, J.; CHELLE, P.L. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? **Critical Reviews Academy Science**. v.203, p.1552-1554, 1936.

DAWSON, M., Progress and limits of PrP gene selection policy. **Veterinary Research**. V. 39, p.25, 2008.

DAWSON. M., HOINVILLE L.J., HOSIE B.D., HUNTER N. Guidance on the use of *PrP* genotyping as an aid to the control of clinical *scrapie*, **Veterinary Records**, v. 23, p. 623–625, 1998.

DEFRA National *Scrapie* Plan for Great Britain. Department for Food, Environment and Rural Affairs, 2003. Disponível em: <<http://www.defra.gov.uk/corporate/regulat/forms/Ahealth/nsp/nsp1.pdf>> Acesso em 10 FEV. 2009.

DETWEILER L.A., BAYLIS M., The epidemiology of *scrapie*. **Review of. International. Epizooties**, v. 22, p.121–143, 2003.

DICKINSON A.G. *Scrapie* in sheep and goats, Slow virus diseases of animals and man. North **Holland Publishing Company**. Amsterdam, the Netherlands, p. 209–241, 1976. In: Kimberlin R.H. (Ed.).

DODELET, V.C.; CASHMAN, N.R. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. **Blood**, Washington, v.91, n.4, p. 1556-1561, 1998.

EC (European Commission). Opinion of the Scientific Steering Committee on the Field Trial **Evaluation of Two New Rapid BSE Post Mortem Tests**. Brussels, Belgium: Health and Consumer Protection Directorate-General, EC, 2003.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <http://apps.fao.org/lim500/nphwrap.pl?Production.Livestock.Stocks&Domain>, 2002. Acesso em 23.dez.2003

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.

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

FURNESS J.B., COSTA M. The enteric nervous system, Churchill Livingstone. Edinburgh, UK, 1987.

GABUST, C. *et al.* The prion protein has RNA binding characteristic of nucleocapsid protein NCp7 of HIV-**Chemistry**, v.276, n.22, p.19301-19309, jun., 2005.

GAJDUSEK DC, ZIGAS V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population, **New England Journal Medicine**, v. 257, p. 974-978, 1957

GOLDGABER D., GOLDFARB L.G. BROWN P., ASHER D. M., BROWN W. T., LIN S., TEENER J.W., FEINSTONE S. M., RUBENTEINS R., KASCSAK R. J., BOELLAARD J. W., AND GAJDUSEK D. C. Mutation in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Strussler-Scheinker's syndrome, **Experimental Neurology**. v. 106, p. 204-206, 1989.

GOLDMANN, W. et al. Two alleles of a neural protein gene linked to *scrapie* in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.87, p.2476-2480, 1990.

GOLDMANN, W. PrP gene and its association with spongiform encephalopathies. **British Medical Bulletin**. Oxford, v.4, p.839-859, 1993.

GOLDMANN, W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. **Veterinary Research**. v.39, p.30, 2008.

HARITANI, M., SPENCER YI, WELLS GA. Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. **Acta Neuropathology**, Berlin, v. 87, p.86–90, 1994.

HEPPNER F.L., CHRIST A.D., KLEIN M.A., PRINZ M., FRIED M., KRAEHENBUHL J.P., AGUZZI A. Transepithelial prion transport by M cells. **Nature Medicine**, v. 7, p. 976–977, 2001.

HERRMANN L.M., BASZLER T.V., KNOWLES D.P., CHEEVERS W.P. PrP(Sc) is not detected in peripheral blood leukocytes of *scrapie*-infected sheep: determining the limit of sensitivity by immunohistochemistry. **Clin. Diagnostic Laboratory. Immunology**, v. 9, p. 499–502, 2002.

HOFFMANN C., ZIEGLER U., BUSCHMANN A., WEBER A., KUPFER L., OELSCHLEGEL A., HAMMERSCHMIDT B., GROSCHUP M.H. Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy, **Journal. of General Virology.**, v. 88, p. 1048–1055, 2007.

HOPE, J., MULTHAUP, G., REEKIE, L. J. D., KIMBERLIN', R. H., BEYREUTHER', K. Molecular pathology of *scrapie*-associated fibril protein (PrP) in mouse brain affected by the ME7 strain of *scrapie*, **Europe Journal Biochemic**, v. 172, p. 171-177, 1988.

HOUSTON F., GOLDMANN W., CHONG A., JEFFREY M., GONZÁLEZ L., FOSTER J., et al. Prion diseases: BSE in sheep bred. **Veterinary Research.**, v. 39, p.32, 2007.

HUNTER N., CAIRNS D., FOSTER J.D., SMITH G., GOLDMANN W., DONNELLY K., Is *scrapie* solely a genetic disease? **Nature**, v. 386, p.:137, 1997.

HUNTER, N. Prion diseases and the central dogma of molecular biology. **Trends in Microbiology**, London, v.7, n.7, p.265-266, 1999.

IANNUZZI L. GP *et al.* Comparative FISH-mapping of the *prion* protein gene (*PRNP*) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. **Cytogenetic Cell Genetic**, v.81, n.3-4, p.202-204, 1998.

JACKMAN R., EVEREST D.J., SCHMERR M.J., KHAWAJA M., KEEP P., DOCHERTY J. Evaluation of a preclinical blood test for *scrapie* in sheep using immunocapillary electrophoresis. **Journal AOAC International** v.89, p.720–727, 2006.

JACKSON, G.S.; COLLINGE, J. Prion disease-the propagation of infectious protein topologies. **Microbes and Infection**, Seattle, v.2, p. 1445-1449, 2000.

JEFFREY M., GONZALEZ L. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. **Neuropathology. Applied Neurobiology**, v. 33, p.373–394, 2007.

KANEKO K., ZULIANELLO L., SCOTT M., COOPER C.M., WALLACE A.C. *et al.* Evidence for protein X binding a discontinuous epitope on the cellular prion protein during *scrapie* prion propagation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 94:p. 10069-74, 1997a.

KANEKO, K. *et al.* COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the *scrapie* isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. New York, v.94, p.2333-2338, 1997b.

KÜBLE E. OESCH, B. J RAEBER, A. Prionics AG, **Switzerland British Medical Bulletin**, v. 66, p. 267-279, 2003

LAPLANCHE, J.L. *et al.* PrP polymorphisms associated with natural *scrapie* discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. **Genomics**, San Diego, v.15, p.30-37, 1993.

LEANES, L.F. *Scrapie* - anotaciones utiles. Disponível em: <[www.iicasaninet.net/pub/sanani/pdf/scrapie.pdf](http://www.iicasaninet.net/pub/sanani/pdf/scrapie.pdf)>, Acesso em 15/11/2008.

LEE, I.Y. *et al.* Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genomic Research**, v.8, p.1022-1037, 1998.

LEOPOLDT, J. **Nützliche, auf die Erfahrung gegrünete Einleitung zu der Lanwirtschaft**. Berlin: Glogau, 1759. p.344-360.

LIEMANN, S. & GLOCKSHUBER, R. Breakthroughs and views, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, p. 187-193, 1998.

LIEMANN, S., GLOCKSHUBER, R. Breakthroughs and views. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. San Diego, v.250, p.187-193, 1998.

LUHKEN, G., BUSCHMANN, A., BRANDT, H., EIDEN, M., GROSCHUP, M., ERHARDT, G. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical *scrapie* cases. **Veterinary Research**. v. 38 p. 65–80, 2007.

MABBOTT N.A., MACKAY F., MINNS F., BRUCE M.E. Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of *scrapie*. **Nature. Medicine**, v. 6 p. 719–720, 2000.

MACGOWAN D.J., DELANTY N., PETITO F., EDGAR M., MASTRIANNI J., DEARMOND S. J. Isolated myoclonic alien hand as the sole presentation of pathologically established Creutzfeldt-Jakob disease: a report of two patients, **Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry**, v. 63, p. 404-407,

MALLUCCI, G. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis, **Science**, v. 302, p. 871 – 874, 2003.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimentos. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/primeira\\_pagina/extranet.htm](http://extranet.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet.htm)> Acesso em 15/02/2009.

MARTINS, V., GRANER, E., ABREU, J. G., DE SOUZA, S. J, MERCADANTE, A. F., VEIGA, S., ZANATA, M. S., NETO, M. V., BRENTANI, R. R. Complementary hydrophobicity identifies a cellular prion protein receptor, **Nature Medicine**, v. 3, p. 1376 – 1382, 1997.

MAZZONI I.E., LEDEBUR H.C. JR, PARAMITHIOTIS E., CASHMAN N. Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein, **Biochemical. Cell Biology**. v. 83, p. 644–653, 2005.

McGOWAN, J.P. *Scrapie* in sheep. *Scottish Journal Agricultural*. v.5, p.365-375, 1922.  
MEYER, R. K.; OESCH, B.; FATZER, R.. Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP<sup>Sc</sup> by treatment with heat and guanidine thiocyanate, **Journal of Virology**. p. 9386-9392, 1999.

MISHRA R.S., BASU S., GU Y., LUO X., ZOU W. Q., MISHRA R., LI R., CHEN S. G., GAMBETTI P., FUJIOKA H., SINGH N.. Protease-resistant human prion protein and

ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. **Journal Neuroscience**, v. 24, p. 11280–11290, 2004.

MOHAN J., BROWN K.L., FARQUHAR C.F., BRUCE M.E., MABBOTT N.A., *Scrapie* transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues. **Journal of Dermatology. Science.**, v. 35, p. 101–111, 2004.

MORENO, R.C. LANTIER, F. LANTIER, I. SARRADIN, P. ELSSEN, J.. Detection of New Quantitative trait loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice, **Genetics**, v. 165, p. 2085-2091, 2006.

NEUTRA M.R., PRINGAULT E., KRAEHENBUHL J.P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. **Annual Review of Immunology**. 14:275–300, 1996.

NOINVILLE, S., CHICH, J., REZAEI, H. Misfolding of the prion protein: Linking biophysical and biological approaches. **Veterinary Research**, v.39, p.48, 2008.

O'DOHERTY E., HEALY A., AHERNE M., HANRAHAN J.P., WEAVERS E., DOHERTY M., et al., Prion protein (*PrP*) gene polymorphisms associated with natural *scrapie* cases and their flock-mates in Ireland. **Veterinary Research**, v. 73, p. 243–250, 2002.

O'ROURKE, K. I.; BASZLER, T. V.; BESSER, T. E.. Preclinical diagnosis of *scrapie* by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue, **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 3254-3259, 2000.

OJEDA, D. B.; OLIVEIRA, N. M. *Serviço de Avaliação Genética de Reprodutores Ovinos (SAGRO): Resultados de 1998*. Bagé, Embrapa Pecuária Sul, 31p., 1998.

OWEN, F. Prions. **Biological Sciences**, v.10 (5), p. 38-40, 1998.

PARK, SANG-KOO<sup>1,2</sup>; CHOI, SEUNG-III<sup>1</sup>; JIN, JAE-KWANG<sup>1</sup>; CHOI, EUN-KYOUNG<sup>1</sup>; KIM, JAE-III<sup>1</sup>; CARP, RICHARD I.3; KIM, YONG-SUN, Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K *scrapie* agent, **Neurology Report**, v. 11, p. 1677-1682, 2000.



PERRIER, V.; WALLACE, A. C.; KANEKO, K. Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design, **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 97, p. 6073-6078, 2000.

PICARD-HAGEN, N. et al. Naturally occurring *scrapie* is associated with a lower CBG [cortisol binding globulin] binding capacity in ewes. **Journal of Endocrinology**, v.165, n.2, p.527-532, 2000.

POST, K.; RIESNER, D.; WALLDORF, V. et al. Fly larvae and pupae as vectors for *scrapie*. **The Lancet**, v. 354, p. 9194, 1969-1970, 1999.

PRUSINER S.B., Prions, **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p.13363–13383, 1998.

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M.; FOSTER, K. M. et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in *scrapie* prion replication. **Cell**, v. 63, p. 673-686, 1990.

PRUSINER, S.B. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases, **Trends in Biochemical**, v.21, p.482-487, 1996.

PRUSINER, S.B. Prion diseases and the BSE crisis. **Science**, Washington, v.278, p.245-251, 1997.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.95, p.13363-13383, 1998a.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.95, p.13363-13383, 1998b.

RIBEIRO, L. A. O. Risco da introdução de doenças exóticas pela importação de ovinos, **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico – UFPEL**, n.13, p.39-44, 1993.

SAFAR, J. Spectroscopic conformational studies of prion protein isoforms and the mechanism of transformation, **Seminars in Virology**, v.7, p.207-214, 1996.

SCOTT, M.R.; SAFAR, G.; TELLING, O. et al. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 94, p. 14279-14284, 1997.

SOTO, C.; KASCSAK, R. J.; SABORIO, G. P. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic  $\beta$ -sheet breaker peptides, **The Lancet**, p. 355, 2000.

SPIROPOULOS, S., ANTHONY, S., BELLWORTHY, S., J., TONGUE, S., C. Approaches to investigating transmission of spongiform encephalopathies in domestic animals using BSE as an example. **Veterinary Research**. v. 39, p. 39:34, 2008.

SWEENEY, T., HANRAHAN, J., P. The evidence of associations between prion protein. **Veterinary Research**. v.39, p.28, 2008.

TELLING G.C., SCOTT M., MASTRIANNI J., GABIZON R., TORCHIA M. *et al.* Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. **Cell**, v. 83, p. 79-90, 1995.

TRANULIS M.A., OSLAND A., BRATBERG B., ULVAND M.J., Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural *scrapie* and healthy controls in Norway. **Journal of General Virology**.) v. 80, p.1073–1077, 1999.

TUO W., ZHUANG, D., KNOWLES, D., CHEEVERS, P. W., SY, MAN-SUN, O'ROURKE K. PrP-C and PrP-Sc at the fetal-maternal interface, **Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 074,

TUO, W. PrPc and PrPsc at the fetal-maternal interface. **The Journal of Biological Chemistry**, Michigan, v.276, n.21, p.18229-18234, mai., 2001.

VACCARI, G.; CONTE, M.; MORELLI, L.; DI GUARDO, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U. Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep. **Molecular Cell Probes**, 18:33-37, 2004.

VAN KEULEN L.J.M., SCHREUDER B.E., VROMANS M.E., LANGEVELD J.P., SMITS M.A. Pathogenesis of natural *scrapie* in sheep. **Archive. Virology**, 16, v. 57–71, 2000.

VAN KEULEN L.J.M., SCHREUDER B.E.C., MELOEN R.H., MOOIJ-HARKES G., VROMANS M. E.W., Langeveld J.P.M. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural *scrapie*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p.1228–1231, 1996.

VAN KEULEN L.J.M., VROMANS M.E.W., VANZIJDERVERELD F.G. Early and late pathogenesis of natural *scrapie* infection in sheep, **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 110, p. 23–32, 2002.

VICARIVENTO, N. B., PUZZI, M B. *SCRAPIE*, **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 10, p. 1679-7353, 2008

WATTS,, J.C., DRISALDI, B., NG, V., YANG,, J., STROME, B., HORNE, P., SY, M.-S., YOONG, L., YOUNG, R., MASTRANGELO, P., BERGERON, C., FRASER, P.E., CARLSON, G.A., MOUNT,, H.T.J.,SCHMITT-ULMS, G., AND WESTAWAY, D. The CNS glycoprotein Shadoo has PrPC–like protective properties and displays reduced levels in prion infections”, **EMBOJournal**, v.26(17), p. 4038-50, 2007.

WHO (World Health Organization). Global Surveillance, Diagnosis and Therapy of Human Transmissible Spongiform Encephalopathies, **Report of a WHO Consultation**, Geneva, WHO, 1998.

WILESMITH, J. M.; RYAN, J. B. M. AND ATKINSON, M. J. Bovine spongiform encephalopathy – Epidemiologic studies on the origin. **Veterinary Record.**, v. 128, p. 199-203, 1991.

WONG, B. S.; WANG, H.; BROWN, D. R.. Selective oxidation of methionine residues in prion proteins, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 259, p. 352-355, 1999.

WOOD, J.; LUND, L.J.; DONE, S.H. The natural occurrence of *scrapie* in moufflon. **Veterinary Record**, London, v.130, p.25-27. 1992.

WOOLHOUSE, M.E.J. A centuries-long epidemic of *scrapie* in British sheep, **Trends in Microbiology**, v.9, p.67-70, 2004.

ZOMOSA-SIGNORE, ARNAUD , J., V., FONTES , ALVAREZ-MARTINEZ, M., LIAUTARD , J. P. Physiological role of the cellular prion protein, **Veterinary Research**. v. 39, p.09, 2008

#### 4. ARTIGO

Artigo Submetido À Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

### ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS CÓDONS 136, 154 E 171 DO GENE *prnp* EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E TEXEL

#### Resumo

Modificações na tradução dos códons 136, 154 e 171 do gene *prnp* em ovinos têm sido relacionadas à suscetibilidade/resistência à *scrapie*. O objetivo deste estudo foi analisar estes polimorfismos em ovinos das raças Santa Inês e Texel.

O alelo ARQ foi freqüente em 82,35% dos animais da raça Santa Inês e 52,78% dos animais da raça Texel, seguidos de frequências de 36,36% e 33,33% do genótipo ARQ/ARQ, respectivamente. O genótipo ARQ/VRQ foi frequente em 9,09% dos animais Santa Inês e 5,56% em Texel. A maioria dos animais foram incluídos no grupo R3 de risco relativo à *scrapie*, apontando para baixa resistência à doença.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *scrapie* – polimorfismo –*príon* - ovino.

## ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF *PRNP* GENE IN SANTA INÊS AND TEXEL SHEEP

### Abstract

Modifications in the translation of codons 136, 154 and 171 of the *PRNP* gene in sheep has been reported to either susceptibility or resistance to *scrapie*. The aim of the present study was to analyze this polymorphism in the Santa Inês and Texel breeds of sheep.

The ARQ allele was detected in 82.35% and 52.78% of the Santa Inês and Texel sheep, respectively. The frequencies of the ARQ/ARQ genotype were 36.36% and 33.33%, respectively. The ARQ/VRQ genotype was found in 9.09% and 5.56% of the Santa Inês and Texel sheep, respectively. The majority of sheep was classified in the R3 risk group, indicating low resistance to *scrapie*.

**Key words:** *scrapie* – polymorphism – *prion* – sheep

## Introdução

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) constituem um tema de grande importância atualmente, devido ao surgimento da variante da Doença de Creutzfeld-Jacob (vDCJ). Hoje há evidências suficientes de que ela é causada pelo agente da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) e a transmissão desta doença dos bovinos aos humanos ocorre por meio da infecção pelo agente da EEB na alimentação (WILL 2006).

A primeira EET descoberta foi a *scrapie*, uma doença de caprinos e ovinos que foi reconhecida há mais de 250 anos na Europa (SMITH & BRADLEY 2003).

Os primeiros casos da EEB ocorreram em vacas leiteiras suplementadas com proteínas de origem animal, contaminadas com o agente da *scrapie*, em 1985 (WELLS et al. 1987).

A *scrapie* é uma enfermidade que acomete ovinos e caprinos e que faz parte do grupo das doenças priônicas denominadas como Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) (Aguzzi & Heppner 2000).

As doenças priônicas são caracterizadas pelo acúmulo indiscriminado da proteína priônica infecciosa (PrP<sup>Sc</sup>), forma mutada da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>). Estas mutações são causadas por alteração no sítio de codificação da *prion*, transformando sua conformação estrutural inicialmente primária em estrutura terciária, forma protease-resistente de difícil metabolização (Prusiner 1991, Telling et al. 1996).

Em ovinos, vários estudos indicam a associação de determinados genótipos à suscetibilidade à *scrapie*. Mutações no gene *prnp*, que modificam a tradução dos códons 136 (Alanina/Valina), 154 (Histidina/Arginina) e 171 (Glutamina, Arginina, Histidina), estão associadas à ocorrência da doença (Hunter 1997, Vaccari et al. 2004). Com base neste conhecimento, os genótipos constituídos por estes alelos foram classificados em grupos de risco atribuído à *scrapie* (R1 para o genótipo menos suscetível a R5 para o genótipo mais suscetível) (Dawson et al. 1998), esta classificação fundamentou o Plano Nacional de Erradicação da *scrapie* criado em 2001 pela Comissão da União Européia com o objetivo de reduzir a frequência dos alelos associados a suscetibilidade em rebanhos ovinos (Dawson et al. 2008).

No Brasil, o primeiro caso de *scrapie* foi registrado no Rio Grande do Sul em 1978, em animais Hampshire Down importados do Reino Unido (Fernandes et al. 1978). Até o momento, no país, apenas animais das raças Hampshire Down, Suffolk e Wiltshire Horn apresentaram a doença (Ribeiro et al. 2007).

A partir de então, há a necessidade de uma melhor compreensão das causas da doença, mecanismos de funcionamento do agente, transmissão, e principalmente métodos precoces de diagnóstico e identificação de animais que geneticamente suscetíveis.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuirão para identificar as frequências alélica/genotípicas do gene *prnp* em ovinos das raças Santa Inês e Texel, e possíveis associações à resistência/suscetibilidade destes animais à *scrapie*.

## **Materiais e Métodos**

Foram utilizadas 22 amostras de sangue de animais da raça Santa Inês provenientes do Estado de Mato Grosso do Sul e 18 amostras de sangue de animais da raça Texel provenientes do Estado do Rio Grande do Sul. Foi realizada a extração de DNA genômico com o uso do kit DNA Easy (Invitrogen®) e a qualidade e concentração do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro (GeneQuant, Amersham Pharmacia®, EUA) e em gel de agarose 0,8%(Invitrogen®).

A região alvo do gene *prnp* foi amplificada por PCR utilizando de 40 a 60 ng de DNA por reação de 50 µl contendo Tampão 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de dNTPs, 5 pmol de cada primer e uma unidade de Taq DNA polimerase Invitrogen®, utilizando os primers específicos forward 5' – CACATGGTGGTGGAGGCTGG – 3' e reverso 5' – 5' ATT TGC TCC ACC ACT CGC TCC – 3', desenhados a partir do acesso no. M31313 do *GeneBank* localizado no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A amplificação foi realizada consistindo em 94°C durante 3 minutos para desnaturação inicial e 30 ciclos consistindo em 94°C durante 30s para desnaturação, 64°C por 45° para anelamento dos *primers*, 72° C durante 30s para extensão, além de 72°C durante 10 minutos para extensão final.

As amplificações foram visualizadas em géis de agarose da Invitrogen® com concentração de 0,8% e posteriormente foram purificados através do Kit Quiaex II da

Quiagen®. O seqüenciamento das amostras foi realizado utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* Applied Biosystems®. Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-cacatgggtggaggctgg-3' e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* Applied Biosystems® em um volume final de 10 µL.

As seqüências foram submetidas a anotação funcional utilizando-se o programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para alinhamento com o acesso M31313, confirmação da presença dos códons de interesse e homologias. A qualidade dos eletroferogramas foi avaliada com auxílio do software BioEdit®v.7.0.5.

Frequências de alelos e genótipos dos códons 136, 154 e 171 do gene *prnp* foram estimadas e comparadas entre as duas raças através do teste do qui-quadrado, sendo consideradas diferenças significativas quando  $p < 0,01$ .

Possíveis desvios entre as duas populações foram avaliados através do Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## Resultados e Discussão

Foram encontrados 5 alelos e 7 diferentes genótipos nos 40 animais que tiveram os códons 136, 154 e 171 investigados (Tabela 1), oito genótipos não foram encontrados: ARR/ARR, ARR/AHQ, AHQ/AHQ, AHQ/ARH, ARR/VRQ, VRQ/AHQ, VRQ/ARH e VRQ/VRQ. As duas raças estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg com a população mundial.

Nas duas raças avaliadas foi observada a presença de alelos/genótipos relacionados à suscetibilidade à *scrapie*, dentre eles, o alelo ARQ foi o mais frequente (82,35% para santa Inês e 52,78% para texel).



**Tabela 1.** Frequências genotípicas e alélicas relativas aos SNPs encontrados nos códons 136, 154 e 171 do gene prnp das raças Santa Inês e Texel.

Raças	Santa Inês		Texel		Total	
	n <sup>b</sup>	%	n	%	n	%
<b>Alelos</b>						
ARQ	28	82,35	19	52,78	47	58,75
ARR	7	20,59	6	16,67	13	16,25
VRQ	2	5,88	1	2,78	3	3,75
ARH	5	14,71	10	27,78	15	18,75
AHQ	2	5,88	0	0,00	2	2,5
Total	44	100,00	36	100,00	80	100
<b>Genótipos/Grupos de Risco<sup>a</sup></b>						
ARR/ARQ (R2)	6	27,27	2	11,11	8	20
ARH/ARR (R2)	1	4,55	4	22,22	5	12,5
ARQ/ARQ (R3)	8	36,36	6	33,33	14	35
ARH/ARQ (R3)	2	9,09	4	22,22	6	15
ARHARH (R3)	1	4,55	1	5,56	2	5
ARQ/AHQ (R3)	2	9,09	0	0,00	2	5
ARQ/VRQ (R5)	2	9,09	1	5,56	3	7,5
Total	22	100,00	18	100,00	40	100

<sup>a</sup>R1 para o genótipo mais resistente – R5 para o genótipo mais suscetível

<sup>b</sup>Número de alelos/animais

Segundo Dawson (2003) animais com o genótipo ARQ/ARQ apresentam pouca resistência à *scrapie*. A frequência do genótipo ARQ/ARQ foi de 36,36% nos animais da raça Santa Inês. Em trabalhos realizados com ovinos desta raça no Brasil, frequências próximas foram observadas por De Lima et al. (2007) (37,9%, n=29) e Sotomaior et al. (2008) (43%, n=28).

Na raça Texel o genótipo ARQ/ARQ foi observado em 33,33% dos animais, frequências maiores que as encontradas por Baylis et al (2002) (24,9%) em 233 animais da mesma raça, provenientes de surto de *scrapie*, e menores que as relatadas por Sotomaior et al. (2008) que observou 44% de 16 animais texel portando este genótipo.

Ambas as raças apresentaram frequências altas do alelo ARQ e do genótipo ARQ/ARQ, evidenciando a baixa resistência à *scrapie* destes animais, que devem ser utilizados cautelosamente como reprodutores e estão incluídos no grupo de risco R3.

O genótipo ARR/ARQ foi mais frequente em ovinos Santa Inês (27,27%) do que em ovinos Texel (11,11%). Animais que apresentam o genótipo ARR/ARQ são considerados geneticamente resistentes, porém necessitam de controle quando utilizados como reprodutores, estes animais são classificados no grupo R2 (Dawson et al. 2008).

Frequências de 22,22% dos genótipos ARH/ARQ e ARH/ARR foram observadas nos animais da raça Texel, valores superiores aos relatados por Baylis et al. (2002) (20,6%) em animais texel e por Mesquita et al. (2009) (10,5%) em 19 cabras da raça Mondegueira.

A presença do alelo VRQ está associada à alta suscetibilidade dos animais a desenvolver a doença, potencializado quando presente no genótipo homozigoto do animal (VRQ/VRQ) (Goldmann 2008) ou quando associado ao alelo ARQ, animais que possuem os genótipos VRQ/VRQ e ARQ/VRQ estão enquadrados no grupo R5 e não devem ser utilizados como reprodutores (Dawson et al. 2003).

O alelo VRQ foi observado em 5,88% dos ovinos Santa Inês, e o genótipo VRQ/ARQ em 9,09% dos animais. Em ovinos Texel estas frequências foram menores, o alelo foi observado em 2,78% dos animais e o genótipo em 5,56%. Em outros trabalhos, frequências alélicas menores para animais da raça Santa Inês foram encontradas por Luhken et al (2007) (5,5%) e De Lima et al. (2007) (1,7%).

Nenhum animal apresentou o genótipo homozigoto VRQ, genótipo encontrado por Baylis et al. (2004) em ovinos positivos da raça Texel (0,4%). Porém, independente das frequências, os animais analisados possuem genótipos considerados altamente suscetíveis à doença (VRQ/ARQ), portanto, não devem ser incluídos em programas de melhoramento genético ou ser utilizados na reprodução.

A partir dos resultados obtidos e frequências alélicas e genotípicas detalhadas, através do teste do qui quadrado ( $p < 0,001$ ), não houve diferença significativa em relação às frequências alélicas ( $X^2=5,05$ ) e genotípicas ( $X^2=6,75$ ) entre as duas raças. Animais de ambas as raças, apresentaram frequências altas principalmente do alelo ARQ e seu genótipo homozigoto, sendo que, 59,09% animais da raça Santa Inês e 61,11% animais da raça Texel, estão incluídos no grupo R3 de risco relativo à *scrapie*, apresentando baixa resistência à doença.

## Conclusão

Apesar destes animais possuírem genótipos que conferem pouca resistência à *scrapie*, desde 1978 no Brasil, relatos da doença ocorreram em animais das raças

Hampshire Down, Suffolk e Wiltshire Horn, não acometendo ovinos Santa Inês ou Texel. Entretanto, o conhecimento do genótipo destes animais torna-se essencial, para o controle da utilização destes na reprodução, já que, cada vez mais, o cruzamento interracial é realizado com a intenção de promover o melhoramento da eficiência produtiva.

### **Agradecimentos**

Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros pelo fornecimento das amostras de sangue dos ovinos da raça Texel.

FINEP e Fundect – Apoio financeiro.

## Referência Bibliográfica

Aguzzi A, Heppner FL 2000. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ* 7:889-902.

Baylis M, Goldmann W, Houston F, Cairns D, Chong A, Ross A, Smith A, Hunter N, Mclean RA 2002. *Scrapie* epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *J Gen Virol.* 83: 2907-2914.

Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical *scrapie*. *Scrapie* Information Group. *Vet. Rec.* 142:623-5.

Dawson M, Warner R, Nolan A, McKeown B, Thomson J 2003. “Complex” PrP genotypes identified by the National *Scrapie* Plan. *Vet. Rec.* 152: 754-755.

Dawson M, Moore RC, Bishop SC 2008. Progress and limits of PrP gene selection policy. *Vet. Res.* 39:25.

De Lima, ACB, Bossers A, Souza CEA, Oliveira SMP, Oliveira DM 2007. Genotypes in a pedigree flock of Santa Inês sheep. *Vet. Rec.* 160:336-337.

Fernandes RE, Real CM, Fernandes JCT 1978. *Scrapie* em ovinos no Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS* 6:139-146.

Goldmann, W 2008. PrP genetics in ruminant Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Vet. Res.* 39:30.

Hunter, N 1997. PrP genetics in sheep and the implications for *scrapie* and BSE. *Trends Microbiol.* 5:331-334.

Luhken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Gropschup HM, Erhardt G 2007. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical *scrapie* cases. *Vet. Res.* 38:65-80.

Mesquita P, Batista M, Marques MR, Santos IC, Pimenta J, Silva PM, Carolino I, Santos Silva F, Oliveira Sousa MC, Gama IT, Fontes CM, Horta AE, Prates JA, Pereira RM.. Prion-like Doppel gene polymorphisms and *scrapie* susceptibility in portuguese sheep breeds. *Animal Genetics* [Serial on the internet]. 2009 Sep [cited 2010 april 10]; Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/123192553/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.

Prusiner SB 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515–22.

Ribeiro OAL, Passos TD, Rodrigues CN, Weimer, AT 2007. *Scrapie* (paraplexia enzoótica) em ovinos no Brasil. *Veterinária em Foco* 4:203-209.

Sotomaior CS, Sotomaior VS, Madeira HMF, Thomaz-Soccol V 2008. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the state of Parana, Brazil. *Animal Genetics* 39:659:661.

Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi, E, Gambetti P, Prusiner BS 1996. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274:2079–82.

Vaccari GC, Morelli M, Di Guardo L, G Petraroli, Agrimi RU 2004. Primer extensión assay for prion protein genotype determination in sheep. *Mol Cell Probes* 18: 33-37.