

# POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP<sup>C</sup>) E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO LINFÓIDE EM OVINOS

## POLYMORPHISM OF CELLULAR PRION PROTEIN (PrP<sup>C</sup>) AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF LYMPHOID TISSUE OF SHEEP

Fernanda Trentini Lopes RIBEIRO<sup>1\*</sup>; Helen Caroline RAKSA<sup>1</sup>; Adriane Holtz TIRABASSI<sup>1</sup>; Laire Schidowski FERREIRA<sup>2</sup>; Juliano LEAL<sup>3</sup>; David DRIEMEIER<sup>3</sup>; Cristina Santos SOTOMAIOR<sup>1</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, São José dos Pinhais, PR, Brasil; 2. Escola de Saúde e Biociências – PUCPR, São José dos Pinhais, PR, Brasil; 3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bolsista CNPq. [cristina.sotomaior@pucpr.br](mailto:cristina.sotomaior@pucpr.br)

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo do gene da proteína prion celular (PRPN) de ovinos introduzidos numa propriedade onde ocorreu um surto de *scrapie*, e relacionar com a suscetibilidade à doença por meio da análise da presença da proteína prion celular alterada (PrP<sup>Sc</sup>), utilizando imunohistoquímica (IHQ) de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal. Foram avaliados 42 ovinos, mestiços Texel. Eram fêmeas entre um e oito anos de idade, sendo que sete (16,67%) ovelhas foram introduzidas adultas na propriedade em 2006. As demais, 83,33%, eram nascidas na fazenda. A genotipagem do PRPN foi feita pela análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição - RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”). O genótipo ARQ/ARQ foi o mais freqüente, encontrado em 73,81% dos animais, seguido do genótipo ARR/ARQ, com 16,67% e do ARQ/VRQ, com 9,52%. Os alelos ARH e AHQ não foram encontrados nestes animais. O resultado da IHQ foi negativo em todas as amostras. Não foi possível, portanto, estabelecer uma relação entre genótipo e maior susceptibilidade ao *scrapie*, devido à ausência de PrP<sup>Sc</sup> nas amostras examinadas. No Brasil, há poucos dados de genotipagem do gene da proteína prion celular (PRNP) em ovinos e, até o momento, nenhum tipo de controle baseado em cruzamentos direcionados foi implementado.

**PALAVRAS - CHAVES:** *Ovis aries*. *Scrapie*. Genotipagem. RFLP. Biópsia retal. Encefalopatias.

## INTRODUÇÃO

*Scrapie* é uma doença neurodegenerativa, que faz parte das encefalopatias espongiformes transmissíveis (ETTs), e tem como principal característica o acúmulo da isoforma patológica (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) no Sistema Nervoso Central (SNC) e tecido linforreticular do hospedeiro (baço, tonsilas e linfonodos) (PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999).

Polimorfismos no gene da proteína prion celular (PRNP) estão associados a diferenças de suscetibilidade ao *scrapie* (GOLDMANN et al., 1990; HUNTER et al., 1997a,b; DAWSON et al., 1998). A suscetibilidade do genótipo ARR/ARR aos agentes causadores do *scrapie* clássico é extremamente baixa, porém não mais considerada nula desde os primeiros casos comprovados de animais ARR/ARR infectados (GROSCHUP et al., 2007). Por outro lado, o alelo VRQ é considerado como altamente susceptível (HUNTER et al., 1997a; ACÍN et al., 2004). Os demais polimorfismos apresentam níveis variados de suscetibilidade, e também deve ser considerado que rebanhos de diferentes raças de ovinos podem vir a apresentar diferenças na suscetibilidade e/ou resistência ao

prion (DAWSON et al., 1998; ACÍN et al., 2004; VACCARI et al., 2009).

Em muitos países, há programas de melhoramento genético com o objetivo de controlar o aparecimento clínico da doença, selecionando os animais considerados mais resistentes. Em geral, busca-se aumentar a freqüência do alelo ARR e diminuir a do alelo VRQ (RODEN et al., 2006). Estes programas têm conseguido resultados relevantes na diminuição de animais clinicamente afetados (DOESCHL-WILSON et al., 2009; ORTIZ-PELAEZ; BIANCHINI, 2011).

O diagnóstico do *scrapie* pode ser presumido pelos sinais clínicos característicos (COCKCROFT; CLARK, 2006), porém a confirmação somente é possível por meio da detecção da PrP<sup>Sc</sup> pelas técnicas de imunoblotting e imunohistoquímica (PRUSINER et al., 2004; GAVIER-WIDÉN et al., 2005). A PrP<sup>Sc</sup> somente é encontrada nas doenças priônicas e, assim, a sua presença em ovinos e caprinos é diagnóstico da infecção priônica, mesmo na ausência de sinais clínicos (BRASIL, 2008).

Na maioria dos ovinos infectados, a PrP<sup>Sc</sup> acumula-se nos tecidos do sistema linforreticular, sugerindo que ela pode ser detectada em amostras

de biópsia (ANDRÉOLETTI et al., 2000). A biópsia da terceira pálpebra foi o primeiro passo para um possível diagnóstico pré-clínico, não invasivo, em ovinos (O'ROURKE et al., 1998a). Mais recentemente, tem sido testada a técnica de diagnóstico pré-clínico em amostras da mucosa retal, por meio de provas imunohistoquímicas (IHQ) da presença de PrP<sup>Sc</sup> no tecido linfóide associado à mucosa reto-anal (GONZÁLEZ et al. 2005; ESPENES et al., 2006).

No Brasil, o primeiro relato de *scrapie* foi pela importação de ovinos Hampshire Down de rebanhos ingleses (FERNANDES et al., 1978). Desde então, há casos reportados na literatura (RIBEIRO, 1996; DRIEMEIER, 1998; RIBEIRO et al., 2007) e notificados na Organização Mundial da Saúde Animal - OIE ([www.oie.int](http://www.oie.int)).

O caso ocorrido em 2003 em animais do Setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental Gralha Azul (FEGA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) é considerado o primeiro caso autóctone do Brasil (POHL DE SOUZA et al., 2005). Todo o rebanho envolvido neste surto foi abatido em 2006, com 12,7% de animais com IHQ positiva para a PrP<sup>Sc</sup> (SOTOMAIOR, 2007). Quatro meses depois, foram introduzidas 10 ovelhas adultas no mesmo Setor de Ovinocultura. Segundo Dawson et al. (1998), o prion é difícil de ser inativado e, portanto, a prolongada persistência do agente no ambiente deve ser considerado fator importante na epidemiologia.

O objetivo do presente trabalho foi realizar a genotipagem do gene PRNP dos ovinos do atual rebanho da PUCPR, assim como obter amostras de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal para análise imunohistoquímica e posterior correlação com os genótipos encontrados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Os animais do presente estudo pertencem ao rebanho de ovinos do Setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental Gralha Azul (FEGA) da Pontifícia Universidade Federal do Paraná (PUCPR). O rebanho é composto por 42 ovelhas, mestiças da raça Texel, com cruzamentos de reprodutores Ile de France, Dorper e Suffolk. São fêmeas entre um e oito anos de idade, sendo que 83,33% são nascidas na Fazenda da PUC e sete ovelhas (16,67%) são do rebanho introduzido no Setor de ovinocultura em 2006 e, portanto, não nascidas na propriedade. Estes animais introduzidos em 2006 eram provenientes de rebanho sem nenhuma notificação ou sinal clínico de *scrapie*. O

manejo foi realizado da mesma forma que nos anos anteriores, usando as mesmas instalações e pastos.

### Genotipagem do gene da proteína prion celular

A genotipagem do PRPN dos 42 ovinos do rebanho foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, câmpus São José dos Pinhais e no NIMA- Laboratório de Investigação Molecular Avançada, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, câmpus Curitiba. A técnica utilizada foi a análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição - RFLP ("*Restriction Fragment Length Polymorphism*"), segundo Lühken et al. (2004).

Para extração e a purificação do DNA genômico, a partir de amostras congeladas de sangue total, utilizou-se o protocolo de Nonidet Modificado. O DNA de cada amostra foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop®, através dos valores de absorbância em 260 e 280nm.

As amostras de DNA foram submetidas a duas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). Em ambas as PCR, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) diretos foram iguais, denominados iniciadores 1 e 2 (5'-TGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCT-3'), variando os iniciadores reversos. O produto da primeira PCR foi produzido pelo iniciador reverso modificado 3 (5'-TGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATC-3') e o produto da segunda PCR, pelo iniciador reverso modificado 4 (5'-GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATAT-3') (LÜKHEN et al. 2004). A região amplificada corresponde a do nucleotídeo 342 até a do nucleotídeo 539 (iniciadores 1 e 3) e 538 (iniciadores 2 e 4) do gene PRNP, gerando produtos de, respectivamente, 197 e 196 pares de bases (pb).

Para a amplificação de cada um dos fragmentos de DNA foi realizada uma reação de 30 µl (tampão 1x; cloreto de magnésio 1,5 mM; deoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP) 0,2 mM; oligonucleotídeos iniciadores direto/reverso 10 pmol; taq polimerase 0,6 U; DNA – concentração variável).

A reação de amplificação no termociclador iniciou com uma desnaturação inicial a 94 °C durante 1,5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação, com desnaturação a 94°C por 20 segundos, hibridação a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, e uma extensão final durante 5 minutos a 72°C. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética a 100V, em gel de agarose na concentração de 1,5%. O gel foi corado com

brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos. A observação do gel foi feita sob luz ultravioleta.

Os produtos da amplificação foram submetidos à clivagem pelas enzimas de restrição (ER) *BspDI* e *BspHI*. No produto de 197 pb, cria-se um sítio de restrição artificial para ER *BspHI* quando há histidina na posição 171. Para o produto de 196 pb, é criado um sítio de restrição artificial para ER *BspDI* quando há uma arginina na posição 171. Em ambos os fragmentos, os códons para valina na posição 136 e para histidina na posição 154 são sítios de restrição para a enzima *BspHI*.

O produto de amplificação da primeira PCR (iniciadores 1 e 3) foi clivado somente com a ER *BspHI* (tampão 1x; *BspHI* 2,5 U; produto da PCR – concentração variável). O produto de amplificação da segunda PCR (iniciadores 2 e 4) foi submetido à digestão com as duas enzimas (tampão 1x; *BspHI* 2,5 U; *BspDI* 2,5 U; produto da PCR – concentração variável).

As amostras, após a digestão, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em concentração de 2,5%, e a 35V, durante 6 horas. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 20 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado para a análise dos genótipos.

A análise do tamanho dos fragmentos encontrados em cada uma das PCR-RFLP permite identificar os 15 diferentes genótipos do gene da PrP normalmente encontrados em ovinos (LÜKHEN et al. 2004). As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas pela contagem direta dos alelos e genótipos.

### Biópsia retal e imunohistoquímica

Todos os 42 ovinos do rebanho da PUCPR genotipados tiveram amostras de tecido linfóide colhidos a partir de biópsias retais para a posterior detecção da PrP<sup>Sc</sup>, segundo as técnicas de González et al. (2005) e Espenes et al. (2006).

Para a realização do procedimento, foi realizada a contenção física de cada animal, mantendo-o em estação. Em seguida, foi realizada a anestesia local, utilizando pomada de xilocaína 2%. Para a localização dos folículos linfóides, presentes

entre as pregas da mucosa 2 a 3 cm anterior à linha reto anal (ALEKSANDERSEN et al., 1991; SEDGMEN et al., 2002), foi utilizado um espéculo especial, de uso individual e previamente lubrificado, para abrir a cavidade retal, facilitando o acesso para melhor obtenção das amostras. A amostra foi colhida utilizando pinça hemostática e tesoura reta fina especiais. Os fragmentos colhidos foram conservados em formol 10% e, em seguida, processados e fixados em lâmina para análise microscópica do material.

Essas lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e submetidas à leitura histopatológica para a identificação da presença ou não de folículos linfóide nas amostras de mucosa retal. Uma vez identificada a presença de folículos linfóide, foram preparadas outras lâminas para a avaliação IHQ da presença da PrP<sup>Sc</sup>.

Todo o material foi processado para a análise IHQ conforme descrito por O'Rourke et al. (2002), utilizando o anticorpo monoclonal F89/160.1.5 (O'ROURKE et al., 1998b). Também foram utilizadas amostras positiva e negativa de tecido linfóide como controles da técnica.

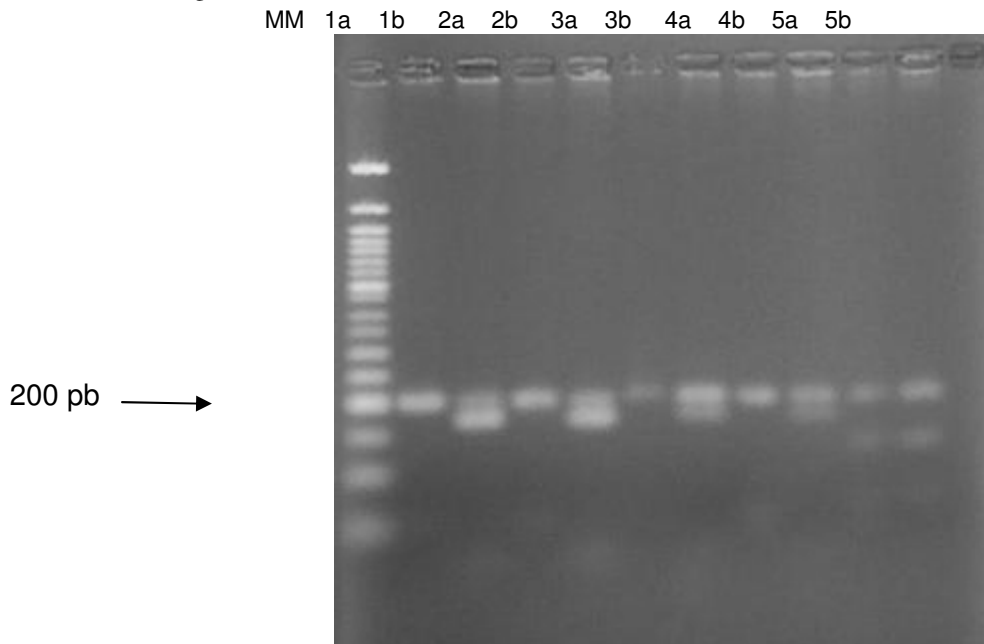
### RESULTADOS

Nas 42 análises de RFLP, dos 15 genótipos normalmente encontrados em ovinos, foram observados somente os genótipos ARQ/ARQ, ARR/ARQ e ARQ/VRQ (Figura 1).

O genótipo ARQ/ARQ foi o mais freqüente, seguido do ARR/ARQ e ARQ/VRQ (Tabela 1). A freqüência do alelo ARQ foi de 0,869, seguido pelo alelo ARR, com 0,083 e VRQ com 0,0477. Os alelos ARH e AHQ não foram encontrados.

Nas amostras de biópsias retais, a leitura das lâminas coradas com HE indicou que todas estavam adequadas para a análise IHQ, pois continham pelo menos três folículos linfóides (Figura 2).

O resultado das análises imunohistoquímicas (IHQ) demonstrou que todos os ovinos pesquisados foram negativos. Como não houve animais positivos para a presença da PrP<sup>Sc</sup>, não foi possível estabelecer uma relação estatística entre genótipo de presença do prion.

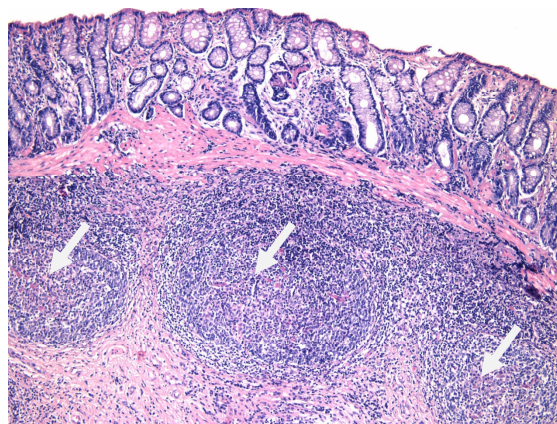


**Figura 1.** Análise de 5 amostras, com dois genótipos (ARR/ARQ – amostras 1 a 4 – e ARQ/VRQ – amostra 5) do gene PRNP de ovinos, identificados pela técnica de PCR-RFLP, em gel de agarose a 2,5%.

Legenda: MM – marcador de massa molecular (50 pb DNA Ladder – Invitrogen); 1 a 5: amostras 1 a 4 com genótipo ARR/ARQ e 5 com genótipo ARQ/VRQ encontrados e identificados pela análise das duas reações (a e b) de clivagem por enzimas de restrição, em eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídeo; a) Fragmento de PCR de 197 pb digerido pela enzima *BspHI*; b) Fragmento de PCR de 196 pb digerido pelas enzimas *BspHI* e *BspDI*.

**Tabela 1.** Freqüência genotípica e distribuição (n) dos genótipos do gene PRNP dos 42 ovinos genotipados pelo método de PCR-RFLP

Genótipos	n	Freqüência genotípica	%
ARQ/ARQ	31	0,7381	73,81
ARR/ARQ	7	0,1667	16,67
ARQ/VRQ	4	0,0952	9,52
Total	42	1	100,0



**Figura 2.** Imagem histopatológica de vários folículos linfóides (indicados pelas setas) localizados na mucosa retal de um ovino  
Lâmina corada com Hematoxilina - Eosina, em aumento de 100x.

## DISCUSSÃO

No Brasil, a *Scrapie* deixou de ser considerada doença exótica desde o surto ocorrido no rebanho de ovinos da Fazenda Gralha Azul da PUCPR em 2003. Desde então, vários casos foram notificados à OIE ou publicados em revistas científicas (RIBEIRO et al., 2007). Pode-se considerar *scrapie* como uma doença emergente no Brasil (PASSOS et al., 2008). Devido à importância das EETs na comercialização de produtos de origem animal, a vigilância sanitária e as formas de controle devem ser rigorosas.

O Setor de Ovinocultura da PUCPR permaneceu sem animais desde o abate de todos os animais em abril de 2006 até agosto quando, com autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram introduzidas no setor 10 ovelhas mestiças da raça Texel. Dos 119 ovinos abatidos em abril de 2006, 15 animais (12,7%) eram positivos na IHQ para a presença de PrP<sup>Sc</sup>, apresentando reação para um ou mais tecidos analisados (SOTOMAIOR, 2007).

Pesquisas demonstram que uma vez o ambiente contaminado, existe uma forte interação do prion com o solo, permanecendo por pelo menos três anos infectivo (LEITA et al., 2006; JOHNSON et al., 2006). Há casos relatados de mais tempo de contaminação ambiental, como o descrito por Georgsson et al. (2006), ocorrido na Islândia em 1978 que, após o sacrifício de todos os rebanhos acometidos por *scrapie*, desinfecção das propriedades e reintrodução, após 2 a 3 anos, de cordeiros de áreas livres, a doença reapareceu em 33 fazendas, com casos diagnosticados 14 a 21 anos após o abate. Mesmo não sendo possível descartar totalmente a entrada do agente, aparentemente o reaparecimento da doença foi devido à contaminação ambiental.

Os animais introduzidos em 2006 e posteriormente os descendentes destes animais (nascidos em 2007, 2008, 2009 e 2010), tiveram acesso às mesmas instalações e pastos dos animais abatidos em 2006 e positivos para a PrP<sup>Sc</sup>. Não foi realizado nenhum tipo de desinfecção específica quando da introdução dos animais. Os partos ocorreram, na maioria das vezes, com os animais confinados em baias com cama; porém houve casos de partos ocorrendo nos pastos.

Todas as amostras provenientes do rebanho testado foram negativas à prova de IHQ de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal; porém, isto não deve ser interpretado como um resultado definitivo. Primeiro, porque se sabe que detecção de PrP<sup>Sc</sup> no tecido linfóide é possível quando a doença

se encontra aproximadamente na metade do período de incubação. Ou seja, resultados negativos não garantem que os animais estejam livres da infecção do prion (GONZÁLEZ et al., 2008b). A vantagem desta técnica é que os mesmos animais podem ser avaliados várias vezes (GONZÁLEZ et al., 2008a,b), permitindo o acompanhamento do rebanho.

Neste trabalho, durante as biópsias, não foram observados efeitos adversos; o sangramento foi mínimo e ocasional, e qualquer desconforto pós-procedimento era imperceptível (o animal continuava se comportando normalmente), corroborando os dados descritos por González et al. (2005). Porém, Espenes et al. (2006) não aconselham colher mais de duas amostras por animal de cada vez, devido a eventual ocorrência de hemorragia leve.

Quanto à quantidade de folículos linfóides, foi possível a obtenção de mais de três folículos em todas as amostras. Segundo Espenes et al. (2006), o reto alberga grande quantidade de folículos linfóides, os quais estão presentes entre as pregas da mucosa. Leal (2009) encontrou 29 amostras consideradas insuficientes entre 379 enviadas para análise, considerando como número suficiente a presença de três folículos, da mesma forma que neste trabalho. Porém, segundo Gavier-Widén et al. (2005) o número mínimo para a realização da imunohistoquímica seria quatro a seis.

Apesar de não ter sido possível estabelecer uma relação entre susceptibilidade à infecção pela PrP<sup>Sc</sup> e o polimorfismo do gene PRNP, pela ausência de animais positivos no rebanho avaliado, a genotipagem do rebanho pode explicar em parte este resultado negativo. Sabe-se que alguns genótipos considerados menos susceptíveis ao agente, mesmo em um estágio clínico mais avançado da doença, podem não apresentar acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> no tecido linfóides (VAN KEULEN et al., 1996; ANDRÉOLETTI et al., 2000; MONLEON et al., 2005). É o caso do genótipo ARR/ARQ, encontrados em 16,67% dos animais no rebanho avaliado. Neste caso, somente a observação em longo prazo e uma análise IHQ de tecido nervoso após a morte dos animais poderia confirmar a presença do prion. Portanto, a vantagem da IHQ de tecidos linfóides poder detectar casos em fase pré-clínica do *scrapie* antes da PrP<sup>Sc</sup> ser detectada no SNC, não é válida para todos os genótipos. Ainda que esta possa ser uma limitação deste diagnóstico *in vivo*, a possibilidade de diagnóstico precoce trazida pela IHQ de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal é um importante avanço no controle da doença. Ressalta-se que qualquer

resultado positivo à prova de imunohistoquímica (IHQ) de amostras linfóides torna o animal positivo para *scrapie*, conforme a Instrução Normativa nº 15 de 2008 (BRASIL, 2008) do MAPA.

Quanto à genotipagem para avaliar os polimorfismos do gene PRNP, optou-se pela técnica de PCR-RFLP como uma alternativa por não se tratar de larga escala. A técnica de PCR-RFLP utilizada neste trabalho também possibilita diferenciar os cinco alelos comumente encontrados, além de dois alelos raros (AHR e VRR) descritos em raças como Suffolk e Texel (KUTZER et al., 2002; LÜHKEN et al., 2004). A vantagem da PCR-RFLP proposta é permitir a distinção entre todos os genótipos possíveis a partir da identificação dos sete alelos. Além de ser eficiente, este método somente necessita de duas reações de PCR, seguida da clivagem pelas enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose. Usando esta metodologia, porém, outros polimorfismos localizados em outros códons, associados ou não ao *scrapie*, poderiam passar despercebidos (LÜHKEN et al., 2004).

Apesar dos muitos polimorfismos identificados no gene PRNP, para a forma clássica do *scrapie*, considera-se que os códons 136, 154 e 171 são os únicos relacionados à maior resistência ou susceptibilidade ao agente, com cinco alelos normalmente encontrados nos ovinos: ARR, ARQ, VRQ, AHQ, ARH (BELT et al., 1995; DAWSON et al., 1998).

Na análise do presente trabalho, foram encontrados os genótipos ARQ/ARQ, ARR/ARQ e ARQ/VRQ, sendo o primeiro o mais freqüente. Sotomaior et al. (2008) também encontraram como os genótipos mais freqüentes em ovinos no Estado do Paraná, os genótipos ARQ/ARQ e ARR/ARQ. Kutzer et al. (2002) analisando 1108 ovinos de 33 raças encontraram como genótipos comuns a todas as raças os genótipos ARQ/ARQ; ARR/ARQ e ARR/ARR.

O alelo ARQ foi o mais freqüente nos animais avaliados. Muitos trabalhos, com diferentes raças e em diferentes países, também demonstram que o alelo ARQ é o mais freqüente, como Molina et al. (2006), raça Merino, Espanha; Lan et al. (2006), raças nativas, China; Sipos et al. (2002), raças nativas, Áustria; Acín et al. (2004), raças nativas, Espanha; e Gama et al. (2006), raças nativas, Portugal. Como este alelo é considerado o ancestral, estes dados seriam esperados, principalmente em raças nativas, podendo indicar que, nestes rebanhos, não houve uma seleção intensa para novos polimorfismos do gene PRNP.

Ainda há poucos dados de genotipagem para *scrapie* no Brasil (LIMA et al., 2007; PACHECO et

al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2008; PASSOS et al., 2008; ANDRADE et al., 2011; IANELLA et al., 2011). Apesar de alguns deles incluírem dados de raças brasileiras como a Santa Inês (LIMA et al., 2007; IANELLA et al., 2011) e Morada Nova (PACHECO et al., 2007; IANELLA et al., 2011), somente Sotomaior et al. (2008) apresentam dados de animais mestiços, como o que ocorre neste trabalho. Nos dados de Sotomaior et al. (2008), os mestiços apresentaram, juntamente com a raça Santa Inês, a maior variabilidade genética entre os animais avaliados, com presença de quatro dos cinco alelos (ARR – 0,44; ARQ – 0,51; VRQ – 0,04; e AHQ – 0,01) e os genótipos mais freqüentes foram o ARR/ARQ, em 43% do rebanho, seguido pelo ARQ/ARQ em 25% e o ARR/ARR em 21%; os genótipos ARR/VRQ, ARQ/VRQ e ARQ/AHQ aparecem, cada um, em menos de 5% das amostras. Esta variabilidade foi menor no presente trabalho, sendo encontrados somente os alelos ARQ, ARR e VRQ. O menor número de amostras e o fato de se trabalhar com um único rebanho (alto grau de parentesco) poderiam explicar esta menor variabilidade.

Trabalhos demonstram a relação genótipo e resistência/susceptibilidade ao agente; porém, muitos dados evidenciam as diferenças que há entre raças e rebanhos, deixando claro que os critérios para a seleção não necessariamente podem e devem ser aplicados igualmente para ovinos de diferentes raças, rebanhos ou países (LÜHKEN et al., 2004; ACÍN et al., 2004). Para as raças nativas brasileiras e para animais oriundos de cruzamentos de diferentes raças, somente após a constatação de rebanhos infectados e associando-se a presença ou não da PrP<sup>Sc</sup> a determinados genótipos, poder-se-ia afirmar que um genótipo é mais resistente ou susceptível à infecção por prion. Sotomaior (2007) encontrou resultados diferentes quanto à susceptibilidade (expressa pelos resultados positivos da presença da PrP<sup>Sc</sup> em amostras de tecido linfóide) dos animais mestiços portadores de alelo ARR.

No Brasil, atualmente, não existe qualquer proposta de programas de controle genético para *scrapie*. O que existe é somente a Instrução Normativa nº 15 de 2008 (BRASIL, 2008), que trata dos “Procedimentos para a atuação em caso de suspeita ou ocorrência de paraplexia enzoótica dos ovinos (*scrapie*)”. Esta instrução normativa determina as ações em caso de suspeita e confirmação de diagnóstico positivo para *scrapie*.

Caso se proponham estratégias de controle baseadas na relação entre o polimorfismo do gene PRNP e a resistência/susceptibilidade ao *scrapie*, é necessário saber a estrutura populacional e o grau de

variabilidade existente nas diferentes raças, realizando a genotipagem da população, ou parte representativa dela (IANELLA et al., 2011). Conhecer a relação genótipo-resistência/susceptibilidade, por meio de estudos que possam analisar a presença da PrP<sup>Sc</sup> nos diferentes genótipos, também é essencial para se começar qualquer programa de controle

(SOTOMAIOR, 2007).

O presente trabalho, portanto, contribui com dados de genotipagem do gene PRNP de propriedade onde já houve casos de *scrapie*. Não foi possível correlacionar os genótipos encontrados com a presença da PrP<sup>Sc</sup>, uma vez que todas as IHQ de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal dos animais avaliados foram negativas.

---

**ABSTRACT:** The aim of this work was to study the polymorphism of the prion protein gene (PRNP) of a sheep flock raised in a farm where a scrapie outbreak had occurred, and to relate to disease susceptibility of possible animals infected with altered prion protein (PrP<sup>Sc</sup>), by immunohistochemical analysis of recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue (RAMALT). Forty two sheep, crossbred with Texel, Ile de France, Dorper and Suffolk were used. Females were between one and eight years old, and seven (16.67%) were adult ewes when they entered the flock in 2006. The rest, 83.33% were born in the farm. The PRNP genotyping was performed by RFLP ("restriction fragment length polymorphism") analysis. The most frequent genotype was ARQ/ARQ, found in 73.81% of the animals, followed by ARR/ARQ, with 16.67% and ARQ/VRQ, with 9.52%. The ARH and AHQ alleles were not found. All RAMALT samples were negative in immunohistochemical analysis. It was not possible to establish a relation between PRNP polymorphisms and susceptibility to scrapie, due to the lack of positive samples to PrP<sup>Sc</sup>. In Brazil, there is little available PRNP genotyping data of sheep and, so far, no type of controlled breeding scheme for scrapie has been implemented.

**KEYWORDS:** *Ovis arie*. Scrapie. Genotyping. RFLP. Rectal biopsy. Encephalopathies.

---

## REFERÊNCIAS

- ACÍN, C.; MARTÍN-BURRIEL, I.; GOLDMANN, W.; LYAHYAI, J.; MONZÓN, M.; BOLEA, R.; SMITH, A.; RODELLAR, C.; BADIOLA, J. J.; ZARAGOZA, P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 2103-2110, 2004.
- ALEKSANDERSEN, M.; NICANDER, L.; LANDSVERK, T. Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid in the large intestine of sheep. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 15, p. 413-422, 1991.
- ANDRADE, C. P.; ALMEIDA, L. L.; CASTRO, L. A.; LEAL, J. S.; SILVA, S. C.; DRIEMEIER, D. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a scrapie-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 10, p. 893-898, 2011.
- ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; KEULEN, L. van; SCHELCHER, F.; ELSEN, J.M.; LANTIER, F. Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 3115-3126, 2000.
- BELT, P. B. G. M.; MUILEMAN, I. H.; SCHREUDER, B. E. C.; BOS-DE-RUIJTER, J.; GIELKENS, A. L. J.; SMITS, M. A. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 509-517, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 15, de 02 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, 2008.
- COCKCROFT, P. D.; CLARK, A. M. The Shetland Islands scrapie monitoring and control programme: analysis of the clinical data collected from 772 scrapie suspects 1985-1997. **Research in Veterinary Science**, London, v. 80, p. 33-44, 2006.
- 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 Record**, London, v. 142, p. 623-625, 1998.

DRIEMEIER, D. Scrapie. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MÉNDEZ, M.C. (Eds.). **Doenças em Ruminantes e Equinos**, first ed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1998. p. 305–311.

DOESCHL-WILSON, A.; SAWALHA, R.; GUBBINS, S.; VILLANUEVA, B. Implications of Conflicting Associations of the Prion Protein (PrP) Gene with Scrapie Susceptibility and Fitness on the Persistence of Scrapie. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 11, e7970, 2009.

ESPENES, A.; PRESS, C. McL.; LANDSVERK, T.; TRANULIS, M.A.; ALEKSANDERSEN, M.; GUNNES, G.; BENESTAD, S.L.; FUGLESTVEIT, R.; ULVUND, M.J. Detection of PrP<sup>Sc</sup> in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, p. 115-125, 2006.

FERNANDES, R.E.; REAL, C.M.; FERNANDES, J.C.T. "Scrapie" em ovinos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 6, p. 139-143, 1978.

GAMA, L.T.; CAROLINO, M.I.; SANTOS-SILVA, M.F.; PIMENTA, J.A.; COSTA, M.S. Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 99, p. 175-184, 2006.

GAVIER-WIDÉN, D., STACK, M.J., BARON T., BALACHANDRAN, A., SIMMONS, M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 17, p. 509-527, 2005.

GEORGSSON, G.; SIGURDARSON, S.; BROWN, P. Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 3737 – 3740, 2006.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; FOSTER, J. D.; SALBAUM, J. M.; BEUREYTHYER, K.; HOPE, J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 2476-2480, 1990.

GONZÁLEZ, L.; JEFFREY, M.; SISÓ, S.; MARTIN, S.; BELLWORTHY, S.J.; STACK, M.J.; CHAPLIN, M.J.; DAVIS, L.; DAGLEISH, M.; REID, H. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. **Veterinary Pathology**, Basel, v.156, p. 846-847, 2005.

GONZÁLEZ L.; DAGLEISH, M.P.; MARTIN, S.; DEXTER G.; STEELE P.; FINLAYSON J.; JEFFREY M. Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by immunohistochemical examination of rectal biopsies. **Veterinary Record**, London, v. 162, p. 397-403, 2008a.

GONZÁLEZ, L.; HORTON, R.; RAMSAY, D.; TOOMIK, R.; LEATHERS, V.; TONELLI, Q.; DAGLEISH, M.P.; JEFFREY, M.; TERRY, L. Adaptation and evaluation of a rapid test for the diagnosis of sheep scrapie in samples of rectal mucosa. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v.20, p.203-208, 2008b.

GROSCHUP, M.H.; LACROUX, C.; BUSCHMANN, A.; LÜHKEN, G.; MATHEY, J.; EIDEN, M.; LUGAN, S.; HOFFMANN, C.; ESPINOSA, J. C.; BARON, T.; TORRES, J. M.; ERHARDT, G.; ANDREOLETTI, O. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 1201-1207, 2007.

HARRIS, D. A. Cellular biology of prion disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 429-444, 1999.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; FOSTER, J. D.; CAIRNS, D.; SMITH, G. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. **Veterinary Record**, London, v. 141, p. 137-140, 1997a.



- HUNTER, N.; MOORE, L.; HOSIE, B. D.; DINGWALL, W. S.; GREIG, A. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. **Veterinary Record**, London, v. 140, p. 59-63, 1997b.
- IANELLA, P.; McMANUS, C.M.; CAETANO, A.R.; PAIVA, S.R. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: Issues for conservation and breeding programs. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, p. 219-225, 2011.
- JOHNSON, C.J.; PHILLIPS, K.E.; SCHRAMM, P.T.; MCKENZIE, D.; AIKEN, J.M.; PEDERSEN, J.A. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 2, n. 4, e32, 2006.
- KUTZER, T.; PFEIFFER, I.; BRENIG, B. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 119, p. 201-208, 2002.
- LAN, Z.; WANG, Z. L.; LIU, Y.; ZHANG, X. Prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Xinjiang local sheep breeds in China. **Archives of Virology**, Wien, v. 151, p. 2095-2101, 2006.
- LEAL, J. S. **Biópsia da mucosa retal e terceira pálpebra de ovinos e otimização do protocolo de imunohistoquímica diagnóstico de PrPsc em ruminantes**. 2009. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.
- LEITA, L.; FORNASIER, F.; NOBILI, M. de; BERTOLI, A.; GENOVESI, S.; SEQUI, P. Interactions of prion proteins with soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 1638-1644, 2006.
- LIMA, A.C.B., BOSSERS, C.E., SOUZA, S.M.P.; OLIVEIRA, S.M.; OLIVEIRA, D.M. PrP genotypes in a pedigree flock of a Santa Inês sheep. **Veterinary Record**, London, v.160, p.336-337, 2007.
- LÜHKEN, G.; BUSCHMANN, A.; GROSCHUP, M.H.; ERHARDT, G. Prion protein allele A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. **Archives of Virology**, Wien, v. 149, n. 8, p. 1571-1580, 2004.
- MOLINA, A.; JUÁREZ, M.; RODERO, A. Merino sheep breed's genetic resistance to scrapie: genetic structure and comparison of five eradication strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 75, p. 239-250, 2006.
- MONLEON, E., MONZON, M. HORTELLS, P., BOLEA, R., ACIN, C., VARGAS, F., BADIOLA, J.J. Approach to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.124, p.165-171, 2005.
- O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; PARISH, S.M.; KNOWLES, D.P. Preclinical detection of PrP<sup>Sc</sup> in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. **Veterinary Record**, London, v. 142, p. 489-491, 1998a.
- O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; MILLER, J.M.; SPRAKER, T.R.; RIGGLEMAN, I.S.; KNOWLES, D.P. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1750-1755, 1998b.
- O'ROURKE, K.I.; DUNCAN, J.V.; LOGAN, J.R.; ANDERSON, A.K.; NORDEN, D.K.; WILLIAMS, E.S.; COMBS, B.A.; STOBART, R.H.; MOSS, G.E.; SUTTON, D.L. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, 966-971, 2002.
- ORTIZ-PELAEZ, A.; BIANCHINI, J. The impact of the genotype on the prevalence of classical scrapie at population level. **Veterinary Research**, London, v.42, p.1-8, 2011.
- PACHECO, A. C. L.; OLIVEIRA, S. M. P.; GOUVEIA, J. J. S.; DINIZ, M. C.; VASCONCELOS, E. J. R.;

- VIANA, D. A.; ROSINHA, G. M. S.; MAGGIONI, R.; COSTA, R. B.; OLIVEIRA, D. M. Analysis of prion protein gene (PRNP) polymorphisms in healthy Morada Nova sheep reveals the presence of genotypes susceptible to scrapie. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 17, p. 27-36, 2007.
- PASSOS, D. T.; RIBEIRO, L. A. O.; RODRIGUES, N. C.; HEPP, D.; WEIMER, T. A. PrP polymorphisms in Brazilian sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 74, p. 130-133, 2008.
- POHL DE SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C. S.; OLLHOFF, R. D.; RODRIGUES, N. Ocorrência de três casos de tremor enzoótico dos ovinos. In: IV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM PEQUENOS RUMINANTES E CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS, 2005, Curitiba. **Anais...** Curitiba: AVEPER, 2005.
- PRUSINER, S. B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 13363-13383, Nobel Lecture, 1998.
- PRUSINER, S. B.; WILLIAMS, E.; LAPLANCHE, J. L.; SHINAGAWA, M. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. In: PRUSINER, S. B. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p. 545 – 594.
- RIBEIRO, L. A. O. Enfermidades de ruminantes diagnosticadas no CPVDF, RS. In: ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL, 1, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996, p. 89-95.
- RIBEIRO, L. A. O.; PASSOS, D. T.; RODRIGUES, N. C.; WEIMER, T. A. Scrapie (paraplexia enzoótica) em ovinos no Brasil. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 4, p. 203-209, 2007.
- RODEN, J. A.; NIEUWHOF, G. J.; BISHOP, S. C.; JONES, D. A.; HARESIGN, W.; GUBBINS, S. Breeding programmes for TSE resistance in British sheep. I. Assessing the impact on prion protein genotype frequencies. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SEDGMEN, B. J.; LOFTHOUSE, S. A.; SCHEERLINCK, J. P.; MEEUSEN, E. N. Cellular and molecular characterisation of the ovine rectal mucosal environment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 86, p. 215-220, 2002.
- SIPOS, W.; KRAUS, M.; SCHMOLL, F.; ACHMANN, R.; BAUMGARTNER, W. PrP genotyping of Austrian sheep breeds. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Berlin, v. 49, n. 8, p. 415-418, 2002.
- SOTOMAIOR, C. S. **Polimorfismo do gene da proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) e a susceptibilidade/resistência ao scrapie em ovinos no estado do Paraná**. 2007.120p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- SOTOMAIOR, C. S.; SOTOMAIOR, V. S.; MADEIRA, H. M. F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the State of Paraná, Brazil. **Animal Genetics**, Oxford, Inglaterra, v. 39, p. 659-661, 2008.
- VACCARI, G.; SCAVIA, G.; SALA, M.; COSSEDDU, G.; CHIAPPINI, B.; CONTE, M.; ESPOSITO, E.; LORENZETTI, R.; PERFETTI, G.; MARCONI, P.; SCHOLL, F.; BARBARO, K.; BELLA, A.; NONNO, R.; AGRIMI, U. Protective effect of the AT137RQ and ARQK136 PrP alleles against classical scrapie in Sarda breed sheep. **Veterinary Research**, Paris, v. 40, n. 19, 2009.
- VAN KEULEN, L. J.; SCHREUDER, B. E.; MELOEN, R. H.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M. E.; LANGEVELD, J. P. Immunohistochemical detection of PrP in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1228-1231, 1996.