

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FERNANDA TRENTINI LOPES RIBEIRO

**POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR
(PrP^C) E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO LINFÓIDE EM
OVINOS**

(Polymorphism of cellular prion protein (PrP^C) and immunohistochemistry of
lymphoid tissue of sheep)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2011

FERNANDA TRENTINI LOPES RIBEIRO

**POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR
(PrP^C) E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO LINFÓIDE EM
OVINOS**

(Polymorphism of cellular prion protein (PrP^C) and immunohistochemistry of
lymphoid tissue of sheep)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal,
área de concentração: Saúde Animal,
do setor de Ciências Agrárias e
Ambientais da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2011**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Humberto Maciel França Madeira, por abrir as portas do laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agropecuária da PUCPR.

À Profa. Vanessa Sotomaior, pela colaboração na parte prática do trabalho, bem como, por abrir as portas do Laboratório de Pesquisa.

Aos amigos e colegas de trabalho, pela cooperação e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Cristina Sotomaior, pela orientação e comprometimento no decorrer do trabalho.

À minha família, em especial ao meu irmão Bruno Trentini, pela paciência e apoio no decorrer do curso.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial, ao Prof. David Driemeier, por abrir as portas do laboratório para a realização de parte da pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
INTRODUÇÃO.....	08
CAPÍTULO 1 – SCRAPIE EM OVINOS: DIAGNÓSTICO <i>IN VIVO</i> E SELEÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE RESISTENTES.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PRIONS.....	18
3 TRANSMISSÃO, PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	23
4 DIAGNÓSTICO.....	26
4.1 DIAGNÓSTICO <i>IN VIVO</i>	28
4.2 SCRAPIE ATÍPICO.....	30
5 EPIDEMIOLOGIA.....	32
6 RESISTÊNCIA GENÉTICA.....	35
7 PROGRAMAS DE CONTROLE.....	41
8 REFERÊNCIAS.....	46
CAPÍTULO 2- POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP ^C) E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO LINFÓIDE EM REBANHO OVINO INTRODUZIDO EM PROPRIEDADE PÓS SURTO DE SCRAPIE.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	62
1 INTRODUÇÃO.....	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 ANIMAIS.....	65
2.2 GENOTIPAGEM DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR.....	67

2.2.1 Extração e purificação do DNA.....	67
2.2.2 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP).....	68
2.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	70
2.4 BIÓPSIA RETAL PARA DIAGNÓSTICO DA PrP ^{Sc}	71
2.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA PrP ^{Sc}	72
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
3 RESULTADOS.....	75
3.1 GENOTIPAGEM.....	75
3.2 BIÓPSIAS RETAIS.....	78
3.3 DIAGNÓSTICO DA PrP ^{Sc} POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	80
3.4 RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E PRESENÇA DA PrP ^{Sc}	80
4 DISCUSSÃO.....	81
5 CONCLUSÕES.....	87
6 REFERÊNCIAS.....	88
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 94

RESUMO

Scrapie é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs), ou doenças priônicas. O acúmulo de uma isoforma anormal (PrP^{Sc}) da proteína prion celular (PrP^{C}) do hospedeiro no tecido nervoso é a causa do scrapie. Os principais sinais clínicos são: prurido, alterações no comportamento, incoordenação motora, ataxia e perda progressiva de peso. O diagnóstico é baseado na demonstração da PrP^{Sc} no cérebro ou, no animal vivo, no tecido linfóide periférico. Como o acúmulo da PrP^{Sc} no tecido linfóide é anterior ao acúmulo no sistema nervoso central, biópsias de tecidos linfóides como tonsila, terceira pálpebra e tecido linfóide associado à mucosa reto-anal, seguida de imunocoloração para PrP^{Sc} , possibilita o diagnóstico pré-clínico do scrapie. A susceptibilidade dos ovinos ao scrapie depende de polimorfismos do gene da proteína prion celular (PRNP). Polimorfismos nos códons 136 (Alanina, A/Valina, V), 154 (Arginina, R/Histidina, H) e 171 (Glutamina, Q/Arginina, R/Histidina, H) são os principais determinantes de susceptibilidade/resistência ao scrapie clássico. Eles são combinados em 4 principais variantes do alelo ancestral ARQ: VRQ, AHQ, ARH e ARR. Programas de seleção genética na União Européia e Estados Unidos têm utilizado como estratégia aumentar a frequência do alelo resistente ARR e diminuir a do alelo susceptível VRQ em populações de ovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo do PRNP de ovinos introduzidos numa propriedade após um surto de scrapie ocorrido em 2003 e com abate de todos os animais em 2006, e relacionar com a suscetibilidade à doença por meio da análise da presença da PrP^{Sc} utilizando imunohistoquímica (IHC) de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal. Foram avaliados 42 ovinos, mestiços Texel com outras raças como Ile de France, Dorper e Suffolk. Eram fêmeas entre um e oito anos de idade, sendo que sete ovelhas (16,67%) foram introduzidas adultas na propriedade em 2006. As demais, 83,33%, eram nascidas na fazenda. A genotipagem dos 42 ovinos foi feita pela análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição - RFLP (*"Restriction Fragment Length Polymorphism"*). O genótipo ARQ/ARQ foi o mais frequente, 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 IHC em todas as amostras de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal foi negativo. Não foi possível, portanto, estabelecer uma relação entre genótipo e maior susceptibilidade ao scrapie, devido à ausência de PrP^{Sc} nas amostras examinadas. No Brasil, há poucos dados de genotipagem do PRNP e, até o momento, nenhum tipo de controle baseado em cruzamentos direcionados foi implementado.

ABSTRACT

Scrapie is a fatal, neurodegenerative disease that affects sheep and goats and belongs to the Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) or prion diseases. It is caused by the deposition of an abnormal isoform (PrP^{Sc}) of the host-encoded cellular prion protein (PrP^C) in the central nervous system. Characteristic clinical signs of the disease are behavioural disturbances, pruritus and increased difficulty in locomotion. Scrapie diagnosis is based on the demonstration of disease-associated prion protein (PrP^{Sc}) in brain or, in the live animal, in readily accessible peripheral lymphoid tissue. PrP^{Sc} accumulations are detectable in the lymphoid tissues of scrapie infected sheep before they can be detected in the central nervous system. So, biopsy of accessible lymphoid tissue such as tonsil, third eyelid or recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue (RAMALT) followed by immunostaining for PrP offers the possibility of preclinical diagnosis of scrapie. It is well known that susceptibility of sheep to scrapie is under the control of the host's prion protein gene (PRNP). PRNP polymorphisms at codons 136 (alanine, A/valine, V), 154 (histidine, H/arginine, R) e 171 (glutamine, Q/histidine, H/arginine, R) are the main determinants of susceptibility/resistance of sheep to classical scrapie. They are combined in four main variants of the wild-type ARQ allele: VRQ, AHQ, ARH and ARR. Breeding programmes have been undertaken on this basis in the European Union and the USA to increase the frequency of the resistant ARR allele and decrease the susceptible VRQ in sheep populations. The aim of this work was to study the polymorphism of the PrP gene of sheep flock raised in a farm where a scrapie outbreak occurred in 2003 and all animals were slaughtered in 2006, and to relate to disease susceptibility of possible animals infected with PrP^{Sc}, by immunohistochemical analysis of recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue (RAMALT). For this we used 42 sheep, crossbred with Texel, Ile de France, Dorper and Suffolk. 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^{Sc}. 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.

INTRODUÇÃO

Scrapie é uma doença infecciosa e fatal de pequenos ruminantes e se caracteriza por lesões de vacuolização no sistema nervoso central (SNC). Faz parte das encefalopatias espongiformes transmissíveis (ETTs), que são um grupo de doenças neurodegenerativas, presentes em diferentes animais, que tem como principal característica o acúmulo de uma forma patológica da proteína priônica (PrP) normal do hospedeiro no SNC e tecido linforreticular, com longos períodos de incubação, assintomáticos (HUNTER, 1997; PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999; PRUSINER, 2004a).

Em condições naturais, a infecção pelo agente do scrapie acontece pela via oral, normalmente quando ovinos e caprinos ingerem restos contaminados de membranas fetais de outros animais, logo após o parto (ANDRÉOLETTI et al., 2000; ANDRÉOLETTI et al., 2002). O período de incubação da doença é variável; no entanto, pode ser mensurado em anos (ESPINOSA et al., 2004) e sofrer influência da genética do animal e estirpe do agente (BOSSERS et al., 1996; OIE, 2009). Os sinais clínicos geralmente começam insidiosamente com alterações comportamentais; em seguida, avançam para sinais neurológicos, incluindo prurido, falta de coordenação motora e condição física deficiente, com perda de peso progressiva (COCKCROFT e CLARK, 2006; OIE, 2009; OLLHOFF, SOTOMAIOR, 2011).

A identificação da presença da isoforma anormal da PrP (PrP^{Sc}) pelas técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e imunoblotting é o método mais específico e sensível para o diagnóstico de scrapie (PRUSINER et al., 2004; GAVIER-WIDÉN et al. 2005), por se basearem no uso de anticorpos específicos. A técnica de IHQ detecta a PrP^{Sc} *in situ*, o que permite determinar tanto a presença da proteína patológica como sua distribuição no tecido, sua localização celular e as características morfológicas do acúmulo (GONZÁLEZ et al., 2003). Até recentemente, somente diagnósticos “post-mortem” eram possíveis de serem realizados. Atualmente, o diagnóstico *in vivo* pode ser realizado em ovinos e caprinos (GROSCHUP, 2006). Na maioria dos ovinos infectados, o prion acumula-se nos tecidos do sistema linforreticular. PrP^{Sc} primeiro se acumula em placas de Peyer do intestino, amígdalas e nos linfonodos de drenagem; mais tarde, é disseminada para outros tecidos

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

A suscetibilidade genética é reconhecida como fator importante para o desenvolvimento do scrapie (GOLDMANN et al. 1990; HUNTER et al. 1997a,b; DAWSON et al., 1998). A genotipagem do gene da proteína prion celular (PRNP) começou a ser estudada a partir dos anos 90, quando se descreveu a relação direta entre o scrapie clássico e o genótipo PrP nos rebanhos ingleses (HUNTER et al., 1989; DAWSON et al., 2008). Os parâmetros principais que determinam a susceptibilidade à doença são os polimorfismos nos códons 136 (alanina, A/ valina, V), 154 (histidina, H/ arginina, R) e 171 (glutamina, Q/ histidina, H/ arginina, R) (BELT et al., 1995; HUNTER et al., 1996; DAWSON et al., 1998). Considera-se que a susceptibilidade do genótipo ARR/ARR é muito baixa, porém há registros de animais deste genótipo com scrapie (GROSCHUP et al., 2007). Animais com genótipo VRQ/VRQ são considerados extremamente susceptíveis (HUNTER et al., 1997a; ELSEN et al., 1999; ACÍN et al., 2004). As demais combinações alélicas apresentam diferentes níveis de susceptibilidade (DAWSON et al., 1998). Diferenças de susceptibilidade também podem ser observadas em diferentes rebanhos e raças de ovinos (LÜHKEN et al., 2004; ACÍN et al., 2004; VACCARI et al., 2009).

Historicamente, o scrapie tem sido uma doença de difícil controle devido à informações ainda incompletas sobre a etiologia, patogenia e epidemiologia da doença (DAWSON et al., 2008). Antigos métodos para o controle do scrapie previam o abate de animais infectados ou a remoção de grupos de animais com a doença do rebanho original (DETWILER e BAYLIS, 2003). Programas de seleção genética na União Européia e Estados Unidos têm utilizado como estratégia aumentar a frequência do alelo resistente ARR e diminuir a do alelo susceptível VRQ em populações de ovinos (RODEN et al., 2006). Estes programas têm conseguido resultados relevantes na diminuição de animais clinicamente afetados (DOESCHL-WILSON et al., 2009; ORTIZ-PELAEZ e BIANCHINI, 2011).

No Brasil, desde o primeiro relato de FERNANDES et al. (1978), há vários casos notificados na Organização Mundial da Saúde Animal - OIE (www.oie.int) ou publicados em revistas científicas (RIBEIRO, 1996; DRIEMEIER, 1998; RIBEIRO et al., 2007). O caso ocorrido em 2003 no rebanho de ovinos 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).

O Setor de Ovinocultura da PUCPR permaneceu sem animais desde o abate do rebanho, que possuía alguns animais infectados pelo PrP^{Sc}, em abril de 2006 até agosto do mesmo ano quando, com autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram introduzidas no setor 10 ovelhas mestiças da raça Texel (SOTOMAIOR, 2007). Segundo Dawson et al. (1998), uma vez que o prion é difícil de ser inativado, a prolongada persistência do agente no ambiente deve ser considerado um fator importante na epidemiologia. Alguns dados demonstram que uma vez o ambiente contaminado, existe uma forte interação do prion com o solo, que permanece por pelo menos 3 anos infectivo (LEITA et al., 2006; JOHNSON et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi ampliar o estudo sobre o polimorfismo do PRNP em ovinos no Paraná e associar os diferentes genótipos encontrados à resistência ou susceptibilidade ao scrapie. Os objetivos específicos foram:

- Genotipar o PRNP dos ovinos do rebanho da PUCPR.
- Realizar a técnica de biópsia retal para a obtenção de amostras de tecido linfóide.
- Utilizar a técnica de imunohistoquímica nas amostras de tecido linfóide retal para realizar testes *in vivo* de diagnóstico da presença da PrP^{Sc} em ovinos.
- Correlacionar os genótipos e a presença da PrP^{Sc} em ovinos.

Esta dissertação será apresentada no formato de capítulos, sendo o primeiro capítulo uma revisão bibliográfica sobre scrapie em ovinos, com ênfase no diagnóstico e base genética da resistência. O segundo capítulo diz respeito aos dados experimentais do rebanho de ovinos da Fazenda Experimental Gralha Azul da PUCPR.

As referências serão apresentadas por capítulo, sendo que as referências citadas nesta introdução constam nas referências do capítulo 1.

CAPÍTULO 1

SCRAPIE EM OVINOS: DIAGNÓSTICO *IN VIVO* E SELEÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE RESISTENTES

SCRAPIE EM OVINOS: DIAGNÓSTICO *IN VIVO* E SELEÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE RESISTENTES

Fernanda Trentini Lopes Ribeiro¹, Cristina Santos Sotomaior^{2*}

¹ Mestranda em Ciência Animal- PUCPR; Bióloga, Pontifícia Universidade Católica do Paraná;

² Mestrado em Ciência Animal - PUCPR; Médica Veterinária, Professora Titular; Pontifícia Universidade Católica do Paraná;

* autor para correspondência – cristina.sotomaior@pucpr.br

RESUMO

Scrapie é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs), ou doenças priônicas, que inclui a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB). O acúmulo de uma isoforma anormal (PrP^{Sc}) da proteína priônica celular (PrP^C) do hospedeiro no tecido nervoso e linforreticular é a causa do scrapie. Os principais sinais clínicos são: prurido, alterações no comportamento, incoordenação motora, ataxia e perda progressiva de peso. Scrapie, assim como outras doenças priônicas, possui um impacto considerável na saúde e bem-estar animal e apresenta-se como uma doença emergente nos rebanhos ovinos brasileiros. O diagnóstico é baseado na demonstração da PrP^{Sc} no cérebro ou, no animal vivo, no tecido linfóide periférico. Como o acúmulo da PrP^{Sc} no tecido linfóide é anterior ao acúmulo no sistema nervoso central, biópsias de tecidos linfóides como tonsila, terceira pálpebra e tecido linfóide associado à mucosa reto-anal, seguida de imunocoloração para PrP^{Sc}, possibilita o diagnóstico pré-clínico do scrapie. A susceptibilidade dos ovinos ao scrapie depende de polimorfismos do gene da proteína prion celular (PRNP). Polimorfismos nos códons 136 (Alanina, A/Valina, V), 154 (Arginina, R/Histidina, H) e 171 (Glutamina, Q/Arginina, R/Histidina, H) são os principais determinantes de susceptibilidade/resistência ao scrapie clássico. Eles são combinados em 4 principais variantes do alelo ancestral ARQ: VRQ, AHQ, ARH e ARR. Programas de seleção genética na União Européia e Estados Unidos têm utilizado como estratégia aumentar a frequência do alelo resistente ARR e diminuir a do alelo susceptível VRQ em populações de ovinos. No Brasil, há poucos dados de genotipagem do PRNP e, até o momento, nenhum tipo de controle baseado em cruzamentos direcionados foi implementado. Esta revisão focará aspectos importantes como a etiologia, diagnóstico, principalmente *in vivo*, e resistência genética, como ferramenta de programas de controle de scrapie.

Palavras-chaves: Polimorfismo; Proteína prion celular; Scrapie; Genotipagem; Ovinos; Biópsia retal; Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Scrapie is a fatal, neurodegenerative disease that affects sheep and goats and belongs to the Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) or prion diseases, which include Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle. It is caused by the deposition of an abnormal isoform (PrP^{Sc}) of the host-encoded cellular prion protein (PrP^C) in the central nervous system and lymphoreticular system. Characteristic clinical signs of the disease are behavioural disturbances, pruritus and increased difficulty in locomotion. Scrapie, as other prion diseases, has considerable impact on animal health and welfare and is an emerging disease in Brazilian sheep. Scrapie diagnosis is based on the demonstration of disease-associated prion protein (PrP^{Sc}) in brain or, in the live animal, in readily accessible peripheral lymphoid tissue. PrP^{Sc} accumulations are detectable in the lymphoid tissues of scrapie infected sheep before they can be detected in the central nervous system. So demonstration of PrP^{Sc} in tissues of the lymphoreticular system can be used to detect preclinical cases of scrapie. Biopsy of accessible lymphoid tissue such as tonsil, third eyelid or recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue (RAMALT) followed by immunostaining for PrP offers the possibility of preclinical diagnosis of

scrapie. It is well known that susceptibility of sheep to scrapie is under the control of the host's prion protein gene (PRNP). PrP polymorphisms at codons 136 (alanine, A/valine, V), 154 (histidine, H/arginine, R) e 171 (glutamine, Q/histidine, H/arginine, R) are the main determinants of susceptibility/resistance of sheep to classical scrapie. They are combined in four main variants of the wild-type ARQ allele: VRQ, AHQ, ARH and ARR. Breeding programmes have been undertaken on this basis in the European Union and the USA to increase the frequency of the resistant ARR allele and decrease the susceptible VRQ in sheep populations. 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. This review will focus in important etiological aspects, diagnosis, mainly *in vivo*, and genetic resistance as a toll in breeding programmes in order to control scrapie.

Keywords: Polymorphism; Cellular prion protein, Scrapie; Genotyping; Sheep; Rectal biopsy, Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

Scrapie é uma doença neurológica fatal que acomete ovinos e caprinos. É uma enfermidade da lista da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), portanto de notificação obrigatória. Faz parte de um grupo heterogêneo de doenças priônicas ou Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs), que inclui Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Doença Crônica de Cervídeos e Encefalopatia Transmissível de Mink (PRUSINER, 1998). As EETs são doenças neurodegenerativas, com longos períodos de incubação, (PRUSINER, 2004a), que se caracterizam pela deposição da isoforma anormal da proteína priônica (PrP) celular do hospedeiro em vários tipos de células, especialmente no sistema nervoso central (SNC) e tecido linforreticular (baço, tonsilas e linfonodos) (BÜELER et al., 1993; PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999; ANDRÉOLETTI et al., 2000).

Scrapie também é denominada como Paraplexia Enzoótica dos Ovinos e Tremor Enzoótico Ovino. O termo scrapie vem da palavra inglesa *scrape*, que tem o significado de raspar, arranhar ou esfolar. Apesar de ser conhecida desde o século 18 e dos recentes avanços na área de pesquisa, principalmente impulsionados pelo advento da EEB, muitos aspectos do scrapie ainda permanecem parcialmente ou totalmente desconhecidos (DETWILER e BAYLIS, 2003; DAWSON et al., 2008).

A doença é caracterizada como uma das doenças priônicas que tipicamente exibem um longo período entre a infecção e a manifestação clínica, que pode durar meses ou anos (PRUSINER, 2004a). Os prions gastam grande parte deste “tempo de latência” executando a neuroinvasão via nervos periféricos (AGUZZI et al., 2003).

A proteína priônica, na sua forma anormal, também denominada prion, foi descoberta durante estudos experimentais com roedores (PRUSINER, 1982). Diferente das doenças infecciosas clássicas, provenientes de bactérias e vírus, o prion não é codificado por um ácido nucléico extrínseco, mas por genes primários do genoma (MASTRANGELO e WESTAWAY, 2001). Esta independência genética, de não necessitar de intermediários para desenvolver a doença, sugere a existência de duas isoformas: PrP^C e PrP^{Sc} (CAUGHEY et al., 1991). Eventos ocorridos após a tradução da proteína seriam responsáveis

pelas diferenças entre a isoforma celular (PrP^C) e a isoforma relacionada à doença (PrP^{Sc} - PrP Scrapie).

O scrapie foi a primeira das EETs a ser descrita e comprovada, com o primeiro registro em 1732 na Grã Bretanha (McGOWAN, 1922 apud DETWILER e BAYLIS, 2003). É considerada uma doença endêmica em vários países da Europa, no Canadá e nos Estados Unidos, sendo relatada em diversos países do mundo. Poucos países, como Austrália e Nova Zelândia, são consideradas livres da ocorrência desta enfermidade (DETWILER e BAYLIS, 2003; DAWSON et al., 2008; HARRINGTON et al., 2010). No Brasil, o primeiro relato de scrapie foi em 1978 em um ovino Hampshire Down, importado da Inglaterra (FERNANDES et al., 1978). Desde então, há várias notificações na Organização Mundial da Saúde Animal - OIE (www.oie.int). O caso ocorrido em 2003 no Paraná foi considerado o primeiro caso autóctone do Brasil (POHL DE SOUZA et al. 2005).

A transmissão do scrapie acontece de forma natural, porém o modo de transmissão da doença ainda não é totalmente conhecido (RYDER et al., 2004). A via oral é considerada o principal meio de infecção e a transmissão ocorre principalmente no parto e no período pós-parto imediato (DETWILER e BAYLIS, 2003). Os sinais clínicos variam conforme a região cerebral afetada e o desenvolvimento é lento e progressivo. O sinal mais visível é a mudança de comportamento e temperamento do animal dentro do seu ambiente de convívio. Há outros sinais secundários, que podem incluir aparente confusão e separação do rebanho, além de distúrbios neurológicos caracterizados por sinais de prurido e ataxia ou falta de coordenação no andar (OIE, 2009; OLLHOFF, SOTOMAIOR, 2011).

Historicamente, a ausência de diagnóstico *ante-mortem* de animais infectados dificultava o controle da disseminação da doença (HOINVILLE, 1996). Atualmente, são considerados animais com diagnóstico para scrapie os ovinos e caprinos com resultado positivo à prova de imunohistoquímica (IHQ) em amostras de tecido nervoso ou linfóide (BRASIL, 2008), que inclui, portanto, o diagnóstico a partir de biópsias de terceira pálpebra, tonsilas (VAN KEULEN et al., 1996; O'ROURKE et al., 1998, 2000; JEFFREY et al., 2001) e mais recentemente tecido linfóide associado à mucosa reto-anal (GONZÁLEZ et al., 2005, 2006, 2008a,b)

Apesar do scrapie não ser transmissível para o homem, a possibilidade da EEB estar circulando nas populações de pequenos ruminantes (FOSTER et al., 1993, 1996; ELOIT et al., 2005) tornou esta EET dos ovinos e caprinos uma preocupação de segurança alimentar e saúde pública (ELOIT et al., 2005). Historicamente, o scrapie clássico provou ser uma doença de difícil controle. O longo período de incubação e a má compreensão da etiologia, patogenia e epidemiologia limitam as opções de controle (DAWSON et al., 2008).

Inicialmente, como a ocorrência do scrapie era conhecida por estar associada a certas linhagens de ovinos, ela chegou a ser considerada como uma doença genética e não infecciosa. Atualmente, é definida como uma doença infecciosa e aceita-se que um animal para desenvolver a doença tem que ter um genótipo susceptível e ser exposto ao agente (STEVENS et al., 2009).

Polimorfismos nos códons 136 (alanina, A/ valina, V), 154 (histidina, H/ arginina, R) e 171 (histidina, H/ glutamina, Q/ arginina, R) do gene da proteína prion celular (PRNP) são capazes de indicar ou refletir as variações na susceptibilidade (GOLDMANN et al. 1990; BELT et al., 1995; HUNTER et al., 1997a,b). Entre as possíveis combinações dos aminoácidos nestes três principais códons, apenas cinco (ARR, ARQ, ARH, AHQ, VRQ) são normalmente encontrados em ovinos, cujos pareamentos em homozigose ou heterozigose geram 15 genótipos possíveis (BELT et al., 1995; 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 associado à alta susceptibilidade no desenvolvimento da doença (HUNTER et al., 1997a,b; ELSEN et al., 1999; ACÍN et al., 2004; BILLINIS et al., 2004).

Os programas baseados em seleção de animais geneticamente resistentes ao scrapie oferecem uma nova perspectiva de estratégias de controle e são a escolha de muitos países, como por exemplo, o *National Scrapie Plan* (NSP) da Grã Bretanha (DEFRA, 2003, 2007) e o *The National Genetics Based Flock Clean-up Plan* dos Estados Unidos (APHIS, 2005). Em geral, os planos e programas seletivos de cruzamentos, com maior ou menor

pressão de seleção, visam aumentar a frequência alélica do alelo ARR e diminuir a do VRQ.

Esta opção pela seleção de animais geneticamente resistentes a doenças é uma das alternativas mais interessantes na produção moderna, visto que diminui custos com tratamentos, melhora a condição de bem-estar dos animais, além de ser mais sustentável do ponto de vista ambiental. Atualmente, em ovinos, há várias doenças em que já se pratica a seleção para resistência: scrapie, foot-rot, mastite, paratuberculose, dermatofilose, salmonelose, nematodioses e míiase cutânea (BISHOP e MORRIS, 2007).

Toda a característica, porém, para poder ser utilizada como critério de seleção para cruzamentos tem que estar baseada num fundamento genético. Segundo Bishop (2006), se a doença não está presente, não se pode dizer se um animal é resistente ou não. Ainda que numerosos trabalhos demonstrem a relação genótipo e resistência/susceptibilidade ao scrapie, 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).

O objetivo desta revisão é abordar aspectos etiológicos e de diagnóstico, principalmente *in vivo*, do scrapie, assim como a situação atual do controle da doença, principalmente dos programas de seleção de animais geneticamente resistentes, baseados na genotipagem da proteína prion celular.

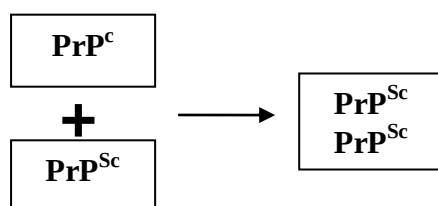
2 PRIONS

Prions são proteínas infecciosas e o termo “prion” denomina o agente infeccioso de uma série de doenças, caracterizadas por neurodegeneração espongiforme e proliferação de células da glia (PRUSINER, 2004b). Prusiner em 1982 estabeleceu que uma macromolécula específica, ou seja uma proteína, era necessária para criar um fator infeccioso; a partir daí criou o termo prion (dos termos em inglês: **proteinaceous** e **infectious**), para descrever as moléculas pequenas do processo infeccioso.

Logo depois, Bolton et al. (1982), por meio de purificação de prions a partir de cérebro de hamster infectado com scrapie, identificaram uma proteína com massa molecular variando de 27 a 30 kDa. Esta proteína apresentou resistência a tratamento com proteinase K (PK), podendo ser detectada em cérebro de animais infectados após digestão com esta enzima, mas não foi detectada em cérebro de animais sadios submetido ao mesmo tratamento. Sob ação da proteinase K, 67 aminoácidos da região N-terminal da proteína são degradados resultando na molécula que ficou conhecida como PrP 27-30, devido a variação de sua massa molecular. PrP 27-30 corresponde então à porção da proteína prion scrapie que é resistente a PK e capaz de manter infectividade (PRUSINER, 1998, 2004c; THACKRAY et al., 2007).

Prusiner (1982) propôs um modelo de infecção que descreve a capacidade da forma “scrapie” da proteína em induzir a modificação da proteína prion celular normal por “mímica” (Figura 1).

Figura 1 – A “Hipótese do Prion” sugere que a forma patogênica (PrP^{Sc}) é capaz de induzir a mudança conformacional da proteína celular normal (PrP^{C}) para a forma PrP^{Sc}

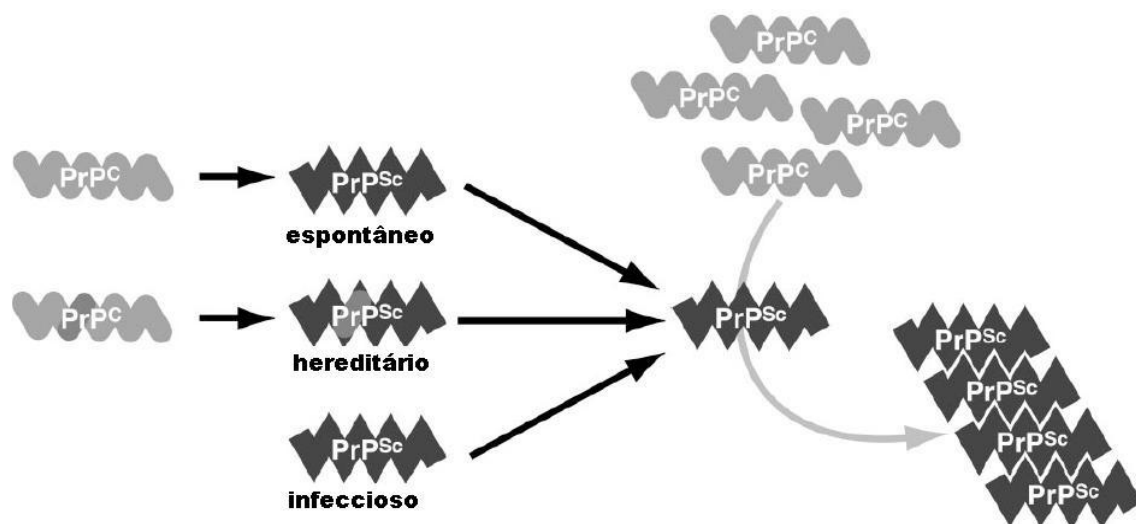


Fonte: adaptado de McKintosh et al. (2003).

Mais tarde, o gene para esta proteína foi identificado e sua sequência não apresentou nenhuma diferença entre animais infectados e sadios (BASLER et al., 1986). Esses dados mostram que a proteína priônica causadora do scrapie é codificada no genoma do próprio hospedeiro independentemente da doença e, portanto, indicam que eventos pós-traducionais seriam responsáveis pelas diferenças entre a isoforma celular e a isoforma relacionada à doença (CAUGHEY et al., 1991; BÜELER et al., 1993; HORIUCHI e CAUGHEY, 1999).

Segundo McKintosh et al. (2003), considerando as ETT de modo geral, sabe-se que a proteína modificada pode ter vários mecanismos de origem: infecciosos, hereditários ou espontâneos (Figura 2).

Figura 2 – Transformação da forma normal da proteína prion celular (PrP^c) na forma anormal da proteína (PrP^{Sc}), através de três mecanismos básicos: espontaneamente; em indivíduos que possuem uma mutação que faz a conversão mais provável; ou a partir de uma fonte infecciosa exógena. Uma vez que há a presença da forma anormal PrP^{Sc} , outras formas de PrP^c são convertidas, propagando a doença numa reação em cadeia



Fonte: McKintosh et al. (2003).

No caso do scrapie clássico, sabe-se que, para o animal se infectar, há a necessidade da infecção via oral pela proteína alterada (mecanismo infeccioso), ainda que os diferentes genótipos do animal possam interferir na velocidade da conversão do PrP^C para PrP^{Sc} (STEVENS et al., 2009). No entanto, em casos de scrapie atípico (BENESTAD et al., 2003), especula-se que este poderia ser resultado de mecanismos espontâneos, como ocorre na Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica em humanos (NÖREMARK, 2006).

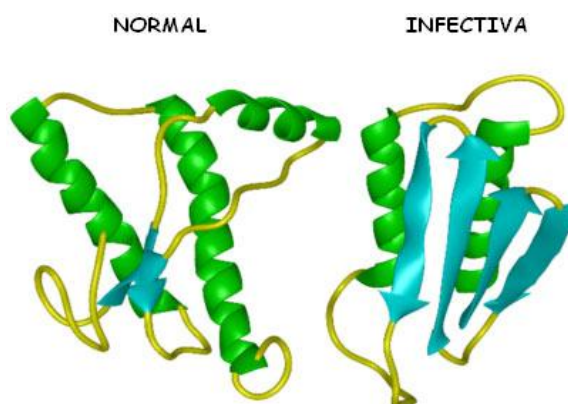
A PrP^C é uma proteína com cerca de 250 aminoácidos (dependendo da espécie), localizada na superfície da célula ancorada a um sistema denominado GPI (localizado na porção C-terminal glicofosfatidilinositol) e presente em todos os animais (HUNTER, 1997). Apesar de muitos estudos descritos, a função celular da PrP^C ainda não é totalmente conhecida (PRCINA e KONTSEKOVA, 2011). Porém, alguns estudos propõem que são muitos os papéis fisiológicos da PrP^C, variando desde a internalização do cobre e a homeostase até atividades anti-apoptose, proteção contra stress oxidativo, adesão celular, sinalização celular e modulação da função e estrutura sináptica (WESTERGARD et al., 2007; COBB e SUREWICZ, 2009).

O acúmulo anormal da proteína em tecidos linfóides e sistema nervoso acontece devido à transformação conformacional da alfa-hélice, presente em grande quantidade na isoforma normal (PrP^C) para beta-folha (Figura 3), presente em grande quantidade na isoforma atípica (PrP^{Sc}), insolúvel e particularmente resistente (CAUGHEY et al., 1991; SORBY et al., 2009). A mudança conformacional entre PrP^C e PrP^{Sc} reflete em diferentes respostas físico-químicas. Enquanto PrP^C responde de forma lábil, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a PrP^{Sc} apresenta uma resposta lenta e se torna propensa a formação de agregados, conhecidos como amilóide (PRUSINER, 1998, 2004c), e apresenta também resistência aos mais severos tratamentos químicos (MASTRANGELO e WESTAWAY, 2001). Além disso, PrP^{Sc} é insolúvel em detergentes e se acumula, ao contrário de PrP^C que é reciclada rapidamente (CAUGHEY et al., 1991; MASTRANGELO e WESTAWAY, 2001). Esta forma patológica possui características diferentes da forma normal (Quadro 1).

Figura 3 – Estrutura secundária das isoformas da proteína priônica

a) PrP^C com estruturas predominantes em alfa hélices (normal)

b) PrP^{Sc} com estruturas predominantes em beta folha (infectiva)



Fonte: www.agromear.com.br, acessado em 29/03/2011.

QUADRO 1 – Características da forma normal e anormal da proteína priônica (PrP)

	PrP normal	PrP anormal
Nomenclatura	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Proteinase K (PK)	Sensível	Parcialmente resistente
Comprimento	~250 aminoácidos	~250 aminoácidos
Estrutura predominante	α hélices e <i>loops</i>	β folha
Glicosilada	Dois sítios	Dois sítios
Peso molecular (-PK)	33-35 kDa	33-35 kDa
Peso molecular (+PK)	Degradada	27-30 kDa
Localização	Superfície celular, ancorada por GPI	Fibrilas, deposita
Expressão	Muitos tecidos	Cérebro, SNC, linfonodos, baço, tonsilas
Expressão na doença	Níveis protéicos constantes	Níveis protéicos aumentam
<i>Turnover</i>	Rápido	Lento
Infectividade com scrapie	Não co-purifica	Co-purifica

Fonte: adaptado de HUNTER (1997).

O gene da PrP (PRNP) nos ovinos possui três éxons, separados por 2 íntrons. O quadro aberto de leitura da PrP está codificada por um único éxon (número 3). O PRNP é um gene cromossômico de cópia única, localizado no cromossomo 13, muito similar nas distintas espécies de mamíferos, apresentando uma homologia de sequência de 80 a 90% (LEE et al. 1998). Sua expressão é constitutiva em quase todos os tecidos do organismo adulto, sendo sua expressão máxima nos tecidos neuronais, fundamentalmente no cérebro, cerebelo, medula e hipotálamo.

3 TRANSMISSÃO, PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

O meio mais comum pelo qual o scrapie é introduzido num rebanho livre da doença é através da introdução de animais infectados e que estejam na fase pré-clínica (HOINVILLE, 1996). Em condições naturais, a infecção pelo agente do scrapie acontece pela via oral (DETWILER e BAYLIS, 2003).

A principal fonte de contaminação do ambiente por tecidos infectivos é a placenta e os fluidos fetais, levando a um aumento na transmissão do scrapie durante a estação de nascimentos (ANDRÉOLETTI et al., 2002, TOUZEAU et al., 2006). Fluidos corporais como sangue, fezes, urina, sêmen e saliva são considerados como não contagiosos (DETWILER e BAYLIS, 2003).

Porém, Castilla et al. (2005) conseguiram detectar, pela primeira vez, a proteína priônica no sangue de hamster com scrapie. Franscini et al. (2006) demonstraram a presença do prion celular (PrP^C) no leite de várias espécies, inclusive dos ovinos e caprinos. Como Ligios et al. (2005) relataram a replicação do prion ocorrendo na glândula mamária de ovelhas com mastite, esta pode vir a ser mais uma via de transmissão.

A disseminação da doença inicia-se logo após a infecção direta do animal com o prion. A PrP^{Sc} se acumula e torna-se detectável nas placas de Peyer, onde a infecção provavelmente ocorre. A partir daí, a PrP^{Sc} se espalha progressivamente nos tecidos e estruturas linfóides secundárias replicando-se e chegando ao Sistema Nervoso Entérico (SNE) e o Sistema Nervoso Central (SNC) é invadido, a partir deste ponto, via tratos nervosos autônomos (ANDRÉOLETTI et al., 2006b). Ainda que os mecanismos de infecção do scrapie não sejam totalmente entendidos, a deposição da PrP^{Sc} nos tecidos está diretamente relacionada ao processo infeccioso das ETT's e este é o principal marcador molecular para este grupo (ANDRÉOLETTI et al., 2000).

Entretanto, o processo de infecção descrito acima, é observado em ovinos com os genótipos mais suscetíveis, não corroborando com os dados obtidos em ovinos naturalmente infectados e heterozigotos para o alelo ARR (VAN KEULEN et al., 1996), em alguns animais ARQ/VRQ (JEFFREY et al., 2000) ou na EEB bovina (WELLS e WILESMITH, 2004). Nestes estes casos, nenhuma quantidade (ou quantidades muito pequenas) da PrP^{Sc} é detectada no tecido linfóide.

Nos ovinos, a doença clínica se manifesta como uma desordem não febril, crônica, progressiva, neurodegenerativa e fatal. Os principais sinais clínicos que são relatados estão associados a uma irritação na pele, mudanças de comportamento, na postura e movimentação e perda de peso. Os sinais clínicos podem variar e alguns animais não apresentam um quadro típico (COCKCROFT e CLARK, 2006). Os relatos podem ser diferentes de acordo com o país onde se realizou a observação (VARGAS et al. 2005) e a acuidade da investigação, porém alguns sinais são constantemente relatados, tais como o prurido.

Segundo DICKINSON (1976), os sinais começam com uma modificação do comportamento social, seguido de falta de coordenação motora e/ou ataxia, com discretos tremores e grande prurido, o que leva os animais a se coçarem continuamente, esfregando-se em cercas, árvores ou mordendo as partes afetadas. As lesões ocasionadas pelo ato de se coçarem podem ser muito extensas, com grandes áreas de perda de lã. O prurido pode ser induzido, coçando-se o animal nos flancos, região lombar e inserção da cauda, suscitando no animal o erguimento da cabeça, levantamento dos lábios superiores e movimentos rápidos com a língua de lambem dos lábios, e movimentos de mastigação (TYLER e MIDDLETON, 2004). Apesar de o animal continuar se alimentando, há perda de peso progressiva.

LAMPERT et al. (1972) descrevem que nas primeiras fases, os animais somente apresentam ligeiras alterações do comportamento, mostrando-se nervosos, agressivos ou isolados do rebanho. Mais tarde começam a incoordenação motora (passadas altas nos membros anteriores e saltos de coelhos nos posteriores) e os tremores. Outros sinais podem incluir: déficit propioceptivo, bruxismo, tetraparesia, perda do reflexo de ameaça, nistagmos, vômitos, disfonia e timpanismo ruminal (VARGAS et al. 2005; TYLER e MIDDLETON, 2004; COCKCROFT e CLARK, 2006).

A duração dos sinais clínicos é muito variável, podendo ser de duas semanas a seis meses. Períodos de stress podem coincidir com o início dos sinais clínicos, ou exacerbar a severidade dos mesmos (COCKCROFT e CLARK, 2006). Estudos realizados por Foster e Dickinson (1989) indicam que a idade na qual o ovino infectado morre com sintomatologia de scrapie depende fundamentalmente da idade na qual foi primeiro exposto e da dose infectante.

O período de incubação é também bastante variável, de um a sete anos (ESPINOSA et al., 2004). Experimentalmente, o período de incubação varia de um a quatro anos (HUNTER, 1997). Atualmente, sabe-se que este período de incubação está diretamente relacionado ao genótipo do animal acometido, podendo variar de 174 dias para os animais VRQ/VRQ a 2150 dias em animais ARR/AHQ (HUNTER, 2006).

4 DIAGNÓSTICO

A detecção de PrP^{Sc} é o método mais específico para o diagnóstico da doença em qualquer animal (PRUSINER et al., 2004). PrP^{Sc} somente é encontrada nas doenças priônicas e, assim, a sua presença em ovinos e caprinos é diagnóstica da infecção priônica. No Brasil, segundo a Instrução Normativa nº 15 de 2008 (BRASIL, 2008) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são considerados animais com diagnóstico para scrapie os ovinos e caprinos com resultado positivo à prova de imunohistoquímica (IHQ) em amostras de tecido nervoso ou linfóide.

O diagnóstico diferencial do scrapie deve ser feito com doenças que apresentam sinais neurológicos, prurido, ataxia, hiperestesia e emagrecimento (COCKCROFT e CLARK, 2006). Entre as principais, pode-se destacar: pneumonia progressiva ovina, listeriose, pseudo-raiva, raiva, ectoparasitos, toxinas, toxemia da gestação, poliencefalomalácia, envenenamento por chumbo, migrações parasitárias no SNC, abscessos cerebrais, Maedi-visna e deficiência de vitamina A (ESPINOSA et al., 2004).

O diagnóstico das EETs foi inicialmente feito a partir da descoberta de mudanças espongiiformes e da deposição de amino-plaquetas no exame histológico. A histopatologia, no entanto, pode ser bastante variável, com vacuolização da neurópila e astrogliose reativa variando consideravelmente na intensidade e localização. Segundo Jeffrey (2006), as lesões histológicas de scrapie continuam a ser descritas como vacuolização, astrocitose e perda neuronal, ainda que de fato nenhuma das três esteja invariavelmente presente nos casos clínicos de scrapie e que a perda neuronal seja raramente observada histologicamente. As alterações espongiiformes da neurópila são comumente encontradas no scrapie clássico, mas a distribuição neuroanatômica da vacuolização na substância cinzenta e a proporção da vacuolização da neurópila e intra-neuronal são altamente variáveis. Alguns casos clínicos de scrapie podem demonstrar poucas evidências de vacuolização e, em algumas situações, não se detecta vacuolização no cérebro de animais clinicamente afetados (ERSDAL et al., 2003).

O diagnóstico baseado somente nos achados histopatológicos é possível quando há a presença característica dos vacúolos no encéfalo, com distribuição neuroanatômica típica (GAVIER-WIDÉN et al. 2005).

O teste mais específico para as EETs disponível até o momento é o reconhecimento da presença de imunomarcacão específica da doença nas áreas alvo e com os padrões característicos (GAVIER-WIDÉN et al. 2005). A detecção da doença associada com acúmulo de proteína priônica pode ser feita pelas técnicas de imunoblotting e imunohistoquímica (GONZÁLEZ et al., 2003). A produção de anticorpos tem permitido que a análise imunohistoquímica promova especificidade no diagnóstico, em especial nos casos onde placas não são prolíficas ou onde há dúvida sobre a causa das mudanças espongiformes (McKINTOSH et al., 2003). Há também evidências de que o acúmulo de PrP^{Sc} no tecido nervoso é prévio à neurodegeneração espongiforme (DeARMOND e PRUSINER, 1993; JEFFREY et al., 2001), o que permite que estes métodos possam diagnosticar as ETTs antes do aparecimento de sinais clínicos e também nos casos em que as lesões neuropatológicas são mínimas ou ausentes. Ambos os métodos podem ser utilizados para identificar PrP anormal nos tecidos linfóides, no trato alimentar e nos sistemas nervoso periférico e autônomo. O grau em que tecidos periféricos estão envolvidos no scrapie clássico depende da dose e cepa infectante e do genótipo do animal (JEFFREY, 2006).

A análise imunohistoquímica normalmente é realizada a partir de material conservado em formol e envolve o uso de pré-tratamento das secções histológicas com ácido fórmico e autoclavagem para a exposição dos epítomos e remoção da PrP^C normal (VAN KEULEN et al. 1995). Alguns protocolos incluem também a digestão proteolítica. Uma vasta gama de anticorpos monoclonais e policlonais anti-PrP podem ser usados e um número crescente estão agora disponíveis no mercado, variando apenas a eficiência de cada um dependendo da espécie utilizada. Alguns anticorpos têm melhor desempenho em uma determinada espécie, e outros são espécie-específicos (GAVIER-WIDÉN et al. 2005). Estes anticorpos não são necessariamente capazes de distinguir entre as duas isoformas de PrP. Portanto, previamente à detecção de PrP^{Sc} é necessário degradar a PrP^C, geralmente com proteinase K (PK). Estão sendo desenvolvidos alguns anticorpos que detectam epítomos específicos da

PrP^{Sc} (ZOU et al., 2004), possível pela alteração conformacional da proteína no momento de conversão da isoforma PrP^C para a PrP^{Sc}, expondo epítomos que na forma normal (celular) permanecem ocultos (PARAMITHIOTIS et al., 2003). Porém, até agora nenhum destes anticorpos provou ser realmente adequado para a identificação direta da PrP^{Sc} pela IHQ, e sua aplicação em outros testes ainda precisa ser estudada (GAVIER-WIDÉN et al. 2005).

A técnica de IHQ detecta a PrP^{Sc} *in situ*, permitindo determinar tanto a presença da proteína patológica como sua distribuição no tecido, sua localização celular e as características morfológicas do acúmulo (GONZÁLEZ et al., 2003).

4.1 DIAGNÓSTICO *IN VIVO*

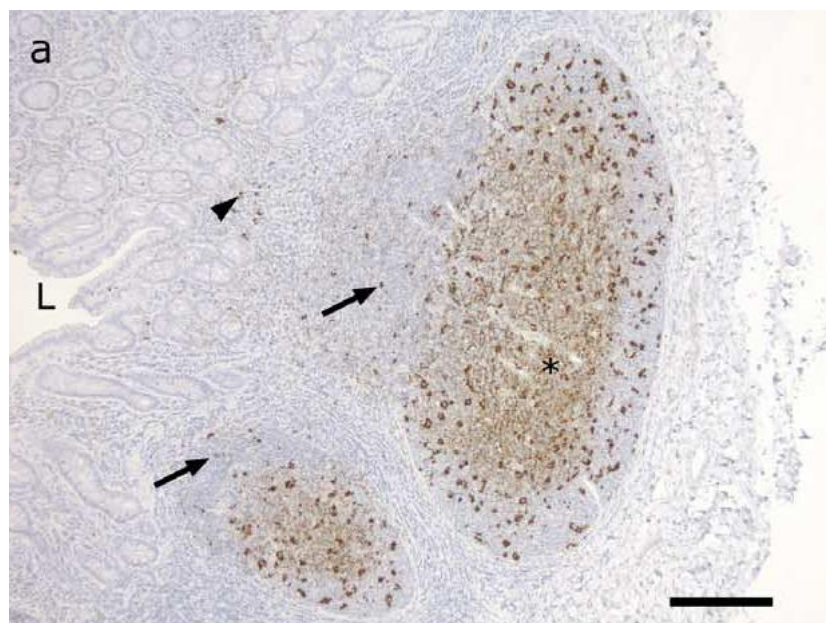
Historicamente, Hoinville (1996) responsabilizava a falta de diagnóstico *ante-mortem* de animais infectados pelo prion, como o principal fator de disseminação da doença. Até recentemente, somente diagnósticos post-mortem eram possíveis de serem realizados. Atualmente, o diagnóstico pré-clínico pode ser realizado em ovinos e caprinos (GROSCHUP, 2006). Considera-se possível a realização de diagnóstico pré-clínico a partir de biópsias de terceira pálpebra e tonsilas (VAN KEULEN et al., 1996; O'ROURKE et al., 1998, 2000; JEFFREY et al., 2001).

Entretanto, em casos de ovinos com genótipos menos susceptíveis ao desenvolvimento da doença, há uma menor distribuição da PrP^{Sc} relacionada ao tecido linfático, limitando-se ao tecido linfóide associado ao intestino (KONOLD et al., 2008). Estas limitações do acúmulo da PrP^{Sc}, levaram González et al. (2005, 2006), a pesquisar o potencial diagnóstico do tecido linfóide associado à mucosa reto-anal (RAMALT – do termo em inglês recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue) quanto ao acúmulo da PrP^{Sc}.

Além disso, segundo González et al. (2008b), o diagnóstico em animais vivos, assintomáticos, baseado em biópsias de tonsila palatina ou terceira pálpebra, são procedimentos pouco práticos de serem realizados a campo, em larga escala, devido a sua difícil metodologia e técnica. A biópsia da amostras da mucosa retal, para obtenção de tecido linfóide associado à mucosa retoanal (GONZÁLEZ et al. 2005; ESPENES et al., 2006), apresenta uma técnica de

colheita do material via mucosa retal que causa o mínimo de desconforto para o animal. Pode, entretanto, ocorrer hemorragia caso a coleta seja feita em dois momentos contínuos. Porém, segundo Espenes et al. (2006), quando desenvolvida da forma correta, apresenta caracteres morfológicos bem conservados, exceto artefatos localizados nas “bordas” da amostra (figura 4). Em animais com diagnóstico positivo por IHQ no SNC ou em outros tecidos linforreticulares, o método apresentou 97,0% de sensibilidade, detectando apenas aqueles animais cuja IHQ era positiva para SNC e não para os outros tecidos linfóides. Em 100% dos casos negativos para os outros órgãos ou tecidos, a IHQ da mucosa retal também foi negativa (GONZÁLEZ et al. 2005). Após certo treinamento, a técnica é rápida e simples de ser feita, não necessitando sedação e podendo ser repetida várias vezes durante a vida do animal (GONZALEZ et al., 2008a,b).

Figura 4 – Imunohistoquímica para PrP^{Sc} em tecido linfóide mucosa retal, em ovino VRQ/VRQ, 14 meses após a infecção. A imunomarcação está presente no folículo linfóide (asterisco), na corona folicular (setas) e na lâmina própria próxima aos folículos positivos (ponta da seta). L – lúmen do reto. Barra – 178 µm



Fonte: ESPENES et al. (2006).

Porém, estas técnicas também apresentam limitações. A detecção de PrP^{Sc} no tecido linfóide é eficiente quando a doença se encontra aproximadamente na metade do período de incubação. Estudos apontam que resultados negativos para o tecido linfóide, não garantem que ovinos e caprinos estejam livres da infecção do scrapie (SCHREUDER et al., 1995; GONZÁLEZ et al., 2008b). Enquanto que a IHQ de tecidos linfóides pode detectar casos em fase pré-clínica do scrapie, antes da PrP^{Sc} ser detectada no SNC, alguns ovinos que apresentam genótipos menos suscetíveis, mesmo em um estágio clínico mais avançado da doença, podem não apresentar acúmulo da PrP^{Sc} no tecido linfóides (VAN KEULEN et al., 1996; MONLEON et al., 2005).

Outra dificuldade das biópsias de tecidos linfóides é o fato de que, em muitos casos, uma quantidade insuficiente de tecido é obtida. A primeira distribuição da PrP^{Sc} no tecido linfóide não é homogênea, portanto, deve-se considerar, segundo Gavier-Widen et al. (2005), um número mínimo de quatro a seis folículos com centro germinal a ser examinado na IHQ para se considerar um diagnóstico confiável.

4.2 SCRAPIE ATÍPICO

O scrapie atípico/Nor 98 é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET) de pequenos ruminantes (BENESTAD et al., 2003; MOUM et al. 2005). Esta doença foi identificada em 1998 e sua etiologia e epidemiologia é pouco conhecida (BENESTAD et al., 2003; FEDIAEVSKY et al., 2009).

O Nor98 difere claramente do scrapie clássico em muitos aspectos e desafia o diagnóstico do scrapie. Os casos do Nor98 têm menos PrP^{Sc} PK-resistente no tecido encefálico que os casos de scrapie clássico. Essas características poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o porquê de alguns testes rápidos apresentarem problemas em detectar a maioria dos casos de Nor98 (BENESTAD et al., 2006).

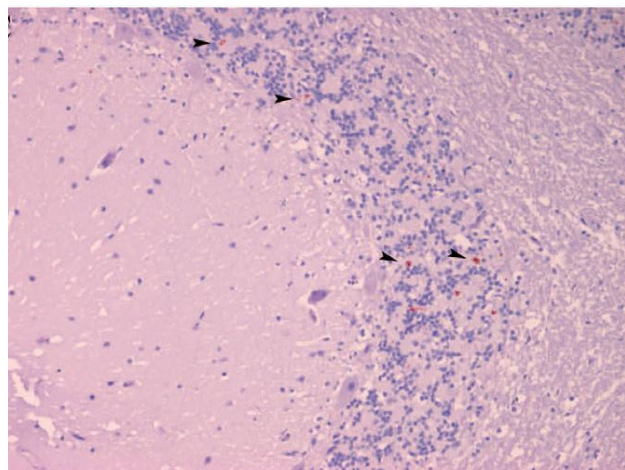
Em muitos casos, o scrapie atípico não coexiste com o scrapie clássico; porém, há relatos de desenvolvimento do prion atípico em rebanhos onde já existia a forma clássica da doença. Também são descritos em locais onde há biossegurança ativa e aonde não há qualquer ocorrência anterior de scrapie

clássico ou atípico (SIMMONS et al., 2010). Na maioria dos casos, a forma atípica é detectada apenas em um ovino por rebanho e no estudo de dois casos-controles ocorridos na Noruega e França nenhum fator de risco, indicando transmissão entre rebanhos, foi detectado (RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2010), o que poderia permitir que fosse considerada espontânea, como ocorre na Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica em humanos (NÖREMARK, 2006).

Os casos de Nor 98 diferem do scrapie clássico e do BSE em diversos fatores, incluindo a distribuição neuroanatômica de lesões histopatológicas e a deposição de PrP^{Sc}. A distinção entre os tipos se baseia nestas características e é confirmada pela observação do perfil eletroforético da Nor 98 no Western blot, caracterizado por uma rápida migração de uma banda de aproximadamente 12 KDa (BENESTAD et al., 2003).

Para scrapie clássico, a coloração de imunohistoquímica e as mudanças histopatológicas no encéfalo, nas regiões do óbex e da medula oblonga e principalmente no núcleo motor dorsal do nervo vago caracterizam a doença, porém no caso de amostras de scrapie atípico isso difere. Quando presente, a vacuolização e a coloração de IHQ se apresentam de forma mais acentuada nas regiões do córtex cerebelar e cerebral (Figura 7), caracterizando a região do cerebelo em adição a região do óbex, como pontos cruciais para o diagnóstico de Nor98 (BENESTAD et al., 2006; RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2010).

Figura 7 – Deposição acentuada de PrP^{Sc}, na região do cerebelo



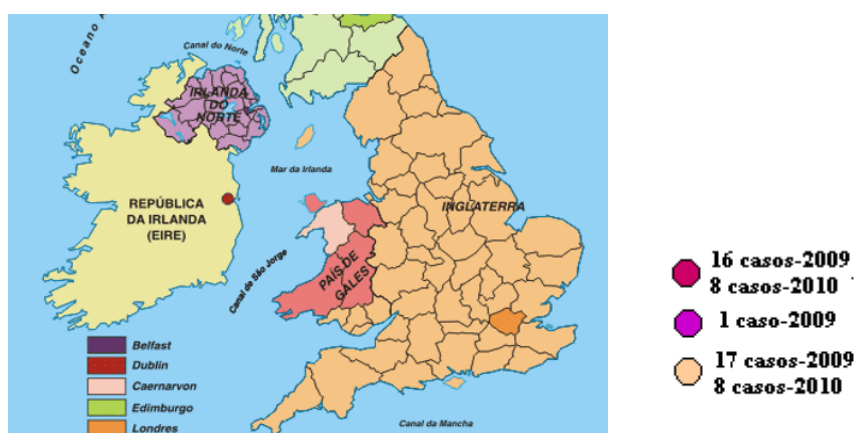
Fonte: RODRÍGUEZ -MARTINEZ et al. (2010)

5 EPIDEMIOLOGIA

Scrapie foi descrito pela primeira vez em 1732 (McGOWAN, 1922 apud DETWILER e BAYLIS, 2003). Inicia-se de forma insidiosa e pode não ser percebida nos rebanhos afetados. O scrapie é encontrado em muitos países produtores de ovinos e os relatos de ausência da doença precisam ser analisados com cuidado (DETWILER E BAYLIS, 2003). Países como Índia e a China, por exemplo, declaram estar livres da doença, porém relatos científicos descrevem o contrário (ZLOTNIK E KATYAR, 1961; FENG et al., 1987). Poucos países com ovinocultura de importância econômica, como Austrália e Nova Zelândia, são consideradas livres da ocorrência desta enfermidade (DETWILER e BAYLIS, 2003; DAWSON et al., 2008; HARRINGTON et al., 2010). Também há ocorrência natural da doença em caprinos nos Estados Unidos, Canadá, Chipre, Finlândia, Grécia, Itália, Áustria e Inglaterra (DETWILER E BAYLIS, 2003).

O número de casos de scrapie em ovinos na Grã-Bretanha é alvo de grandes preocupações para o país (Figura 5). Na Grã-Bretanha, os estudos não só se concentram na avaliação dos animais mortos, após o contato com o prion, mas também em testes de diagnósticos ante-mortem, a fim de evitar surtos significativos nos rebanhos (TONGUE et al., 2005).

Figura 5 – Mapa de distribuição do número de casos de scrapie clássico na Grã-Bretanha e Irlanda do Norte entre 2009-2010



Fonte: www.defra.gov.uk, acessado em 20/03/2011

Tabela 1 – Casos de scrapie ocorridos no Brasil desde o primeiro relato em 1978, segundo a raça afetada, país de procedência dos ovinos e Estado onde a doença foi diagnosticada

Ano	Raça	Procedência	Estado
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
2005			MG
2005			PR
2006	Hampshire Down	Brasil	MS
2006	Suffolk	Brasil	RS
2007***	Santa Inês		MT
2007***	caprino		MT
2008			MS
2008		Canadá	SP
2009		USA	SP
2010			PR

Fonte: adaptado de RIBEIRO et.al. (2007) e dados da OIE, disponíveis em www.oie.int

*primeira notificação oficial no Brasil

** primeira notificação em ovino nativo, considerado o primeiro caso autóctone

*** primeira notificação em caprino e ovino da raça Santa Inês

6 RESISTÊNCIA GENÉTICA

Polimorfismos em nucleotídeos que codificam a sequência do gene da proteína prion celular (PRNP) e resultam em uma mudança no aminoácido, tem sido associado ao scrapie em ovinos, bem como, sua progressão (HUNTER et al., 1989; GOLDMANN et al. 1990; HUNTER et al. 1997a,b).

Nos ovinos, o PRNP possui 31kb, sendo composto por dois íntrons e três éxons; a sequência codificante completa de 771 nucleotídeos está localizada no éxon 3 e codifica uma proteína precursora de 256 aminoácidos (LEE et al., 1998). Os três códons mais importantes associados com a susceptibilidade em ovinos, codificam aminoácidos nas posições 136 (alanina(A)/ valina(V)), 154 (arginina(R)/ histidina(H)) e 171 (glutamina(G)/ arginina(R)/ histidina(H)). Combinações destes polimorfismos resultam em cinco alelos comumente (tabela 2): ARQ (alanina/arginina/glutamina), VRQ (valina/arginina/glutamina), AHQ (alanina/ histidina/glutamina), ARH (alanina/arginina/histidina) e ARR (alanina/arginina/ arginina) (BELT et al., 1995; HUNTER et al. 1996; DAWSON et al., 1998). Levando em conta os códons 136, 154 e 171, respectivamente, a variante ARQ é considerada como o alelo ancestral porque a maioria das variações do PRNP poderia ter derivado de uma única mutação de ponto na sequência ARQ (EFSA, 2006).

Tabela 2 – Polimorfismos da proteína prion celular e 5 alelos comumente encontrados em ovinos

Códon	Aminoácido	Alelo
136	Valina (V) Alanina (A)	VRQ
		ARQ
		ARR
		AHQ
		ARH
154	Arginina (R)	VRQ
		ARQ
		ARR
		ARH
		AHQ
171	Histidina (H) Glutamina (Q)	VRQ
		ARQ
		AHQ
		ARR
		ARH

Fonte: HUNTER (2003)

Inúmeros trabalhos indicam que a susceptibilidade do genótipo ARR/ARR aos agentes causadores do scrapie clássico é extremamente baixa (HUNTER et al., 1997a; ELSESEN et al., 1999; THORGEIRSDOTTIR et al., 1999; TRANULIS et al., 1999; ACÍN et al., 2004; BILLINIS et al., 2004). Porém, atualmente, considera-se que resistência deste genótipo às EETs não é absoluta, visto que: 1) há casos confirmados de scrapie clássico em animais ARR/ARR (GROSCHUP et al., 2007); 2) há identificação em animais ARR/ARR de acúmulo atípico de PrP anormal (scrapie atípico) em ovinos (BUSCHMANN et al., 2004; LeDUR et al., 2005); 3) é comprovada a transmissão a ovinos ARR/ARR de EEB após desafio intracerebral (HOUSTON et al., 2003) e desafio oral (ANDRÉOLETTI et al., 2006a). Por outro lado, o alelo VRQ é considerado como associado à alta susceptibilidade às EETs em ovinos (ELSESEN et al., 1999; THORGEIRSDOTTIR et al., 1999; TRANULIS et al., 1999; ACÍN et al., 2004; BILLINIS et al., 2004). Porém, para a EEB, uma baixa susceptibilidade dos portadores de alelo VRQ pode ser observada (FOSTER et al., 2001).

A combinação dos demais alelos apresenta resistência/susceptibilidade intermediárias e variáveis. DAWSON et al. (1998) foram os primeiros a propor uma classificação para as diferentes combinações alélicas, agrupando os genótipos em 5 grupos, sendo o R1 o mais resistente e o R5 o mais susceptível (tabela 3).

TABELA 3 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos, em raças onde os 5 alelos estão presentes, quanto à resistência/ susceptibilidade à scrapie

Grupo	Genótipos do PrP
R1	ARR/ARR
R2	AHQ/AHQ; ARR/AHQ
R3	ARQ/AHQ; AHQ/ARH; ARR/ARH; ARR/ARQ
R4	AHQ/VRQ; ARR/VRQ; ARQ/ARQ; ARQ/ARH; ARH/ARH
R5	VRQ/VRQ; ARQ/VRQ; ARH/VRQ

Fonte: DAWSON et al. (1998)

Obs.: grupo R1 indica a menor susceptibilidade à scrapie, que vai aumentando até chegar ao grupo 5, que tem a maior susceptibilidade.

Segundo Hunter (1997), não se sabe exatamente como estes polimorfismos podem determinar a susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento da doença, inclusive porque ainda não se conhece totalmente a função biológica verdadeira da PrP e o efeito destes polimorfismos na sua função ou na conversão da PrP^C em PrP^{Sc}.

Há muitas diferenças entre as raças de ovinos, havendo raças como a Suffolk, que apresenta essencialmente três genótipos (ARQ/ARQ, ARQ/ARR e ARR/ARR) e raças como a Texel, com os 15 genótipos normalmente encontrados em ovinos, incluindo VRQ/VRQ (DAWSON et al., 1998). No caso da raça Suffolk, por exemplo, onde o genótipo VRQ/VRQ não é comumente encontrado, considera-se o genótipo ARQ/ARQ como o mais susceptível para a raça (HUNTER, 2003).

Podem ocorrer outros polimorfismos em outras posições como: M112T (metionina/treonina), M137T (metionina/treonina), S138N (serina/aspargina), L141F (leucina/fenilalanina), H143R (histidina/arginina), R151C (arginina/cisteína), Q171K (glutamina/lisina), N176K (aspargina/lisina) e R211Q (arginina/glutamina) (ACÍN et al., 2004).

A variante M112T no grupo haplóide ARQ tem sido associada com o caráter de resistência a doença em ovinos da raça Suffolk nos Estados Unidos. Já animais com uma ou duas cópias de T112 ARQ são caracterizados resistentes ao desenvolvimento do scrapie clássico quando comparados àqueles homozigotos para M112 ARQ (HEATON et al., 2010). Mais de 26 polimorfismos foram confirmado por pesquisadores e outros ainda estão por ser caracterizados (Tabela 4) (GOLDMANN et al., 1990; GOLDMANN et al., 1991; LAPLANCHE et al., 1993; BELT et al., 1995; CLOUSCARD et al., 1995; BOSSERS et al., 1996; THORGEIRSDOTTIR et al., 1999; TRANULIS et al., 1999; O'ROURKE et al., 1996; DeSILVA et al., 2003; GOMBOJAV et al., 2003; GUO et al., 2003; SEABURY e DERR, 2003; BILLINIS et al., 2004). Mais recentemente, Heaton et al. (2010) demonstraram 16 novos polimorfismos, incluindo a variante L237P do haplótipo F141.

A influência do genótipo PrP na resistência ou susceptibilidade ao scrapie pode variar entre rebanhos e raças de ovinos (DAWSON et al., 1998) e ainda depende da cepa do scrapie (GOLDMAN et al., 1994; DAWSON et al., 1998; VACCARI et al., 2009). Por exemplo, o alelo ARQ é considerado

altamente susceptível às EETs em geral (inclusive à infecção experimental por EEB); porém, em um isolado em particular, tipo SSBP-1, não se consegue propagá-lo em animais ARQ/ARQ (GOLDMANN et al., 1994). BAYLIS et al. (2004) e O'DOHERTY et al. (2002), analisando risco de determinado genótipo estar associado ao scrapie, encontram valores bastante diferentes para a presença dos alelos AHQ e ARQ.

Tabela 4 - Polimorfismos do PRNP presentes nos ovinos

Códon	Aminoácido da proteína PrP selvagem	Aminoácido da proteína PrP variante
112	Metionina – M	Treonina – T
116	Alanina – A	Prolina – P
127	Glicina – G	A; Valina – V; Serina – S
136	A	V; T
137	M	T
138	S	Asparagina – N
141	Leucina – L	Fenilalanina – F
143	Histidina – H	Arginina – R
151	R	Cisteína – C
154	R	H
167	R	S
171	Glutamina – Q	R; H; Lisina – K
176	N	K
180	H	Tirosina – Y
189	G	L; R
195	T	S
196	T	S
211	R	Q
241	P	S

Fonte: adaptado de EFSA (2006)

Há publicações de genotipagens em ovinos em diferentes países, especialmente europeus. O objetivo destes trabalhos é conhecer a variabilidade do PRNP presente nos seus rebanhos, a fim de servir como base para programas de seleção de animais geneticamente mais resistentes.

Há dados de rebanhos genotipados na Austrália (BOSSERS et al., 1999), Áustria (SIPOS et al., 2002), Alemanha (JUNGHANS et al., 1998; KUTZER et al., 2002), China (LAN et al., 2006; Xu et al., 2011), Espanha (HURTADO et al., 2002; ACÍN et al., 2004; MOLINA et al., 2006), Estados Unidos (WESTAWAY et al., 1994; O'ROURKE et al., 1996; DeSILVA et al.,

2003); França (ELSEN et al., 1999); Holanda (BELT et al., 1995); Itália (VACCARI et al., 2001; VACCARI et al., 2009), Irlanda (O'DOHERTY et al., 2000; 2001), Islândia (THORGEIRSDOTTIR et al., 1999); Grécia (BILLINIS et al., 2004); Paquistão (HUSSAIN et al., 2011); Portugal (GAMA et al., 2006), Grã Bretanha (HUNTER et al., 1997a,b; TONGUE et al., 2004, 2005; EGLIN et al., 2005; TOWNSEND et al., 2005), Nova Zelândia (BOSSERS et al., 1999), Turquia (ÜN et al., 2008; ALVAREZ et al. 2011), União Européia (LÜHKEN et al., 2008).

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos de genotipagem das raças criadas no país (SOTOMAIOR et al. 2008; PASSOS et al., 2008) e, principalmente, das raças nativas (LIMA et al., 2007; PACHECO et al., 2007). Ianella et al. (2011), no estudo com maior número de genotipagens feitas no país até o momento, analisaram 1400 animais de 13 raças, incluindo várias raças brasileiras como Crioula, Morada Nova, Rabo Largo, Santa Inês e Somalis Brasileiro. Comum a todos estes trabalhos é a presença de genótipos susceptíveis ao scrapie em praticamente todas as raças estudadas.

Como é conhecido que há diferenças de susceptibilidade entre raças, rebanhos e a cepa do agente infeccioso (LÜHKEN et al., 2004; ACÍN et al., 2004; VACCARI et al., 2009), fica claro que os critérios para a seleção não necessariamente podem e devem ser aplicados igualmente para ovinos de diferentes raças, rebanhos ou países. Ainda, segundo BISHOP (2006), se a doença não está presente, não se pode dizer se um animal é resistente ou não. Faz-se fundamental, portanto, estudar a relação genótipo e resistência/susceptibilidade das raças estrangeiras criadas no Brasil, das raças brasileiras e dos animais mestiços. Sotomaior (2007) relata um rebanho de ovinos Hampshire Down e também mestiços onde foi possível se avaliar a genotipagem e a presença de imunomarcacão para a PrP^{Sc} após o abate de todos os animais. No grupo dos animais mestiços, foi encontrado que o genótipo ARR/ARQ estaria relacionado à uma maior susceptibilidade, diferente de alguns dados da literatura (VAN KEULEN et al., 1996; ANDRÉOLETTI et al., 2000). Isto reforça a necessidade de serem avaliados mais rebanhos positivos no Brasil. Ortiz-Pelaez e Bianchini (2011) relatam a importância de se estudar rebanhos afetados pela doença, analisando fatores genéticos, ambientais e de manejo. A avaliação de genótipos em rebanhos afetados permite a

determinação do risco, utilizando a completa genotipagem do grupo e a frequência do scrapie mensurada pela prevalência da doença quando os animais são sacrificados em programas de controle da doença.

Portanto, em países onde há presença do scrapie, é possível estudar a associação dos genótipos, nas diferentes raças, com a presença da doença; também é possível direcionar os cruzamentos, principalmente se já existem programas de controle do scrapie no país. Mesmo nos países onde a doença não está relatada, a genotipagem permite uma visualização do grau de susceptibilidade que aqueles rebanhos, ou raças, teriam caso o agente estivesse presente. Dessa forma, é possível dimensionar a possibilidade de inclusão desta característica em futuros programas de seleção, que visem aumentar a resistência à doença, porém, sem perder ou prejudicar outras características produtivas (SOTOMAIOR et al., 2008).

7 PROGRAMAS DE CONTROLE

Em uma revisão sobre scrapie, Dawson et al. (2008) reforçam o fato de que, historicamente, esta doença é considerada de difícil controle. Aspectos ainda não totalmente elucidados da etiologia, patogenia e epidemiologia, somados ao fato de não existir nenhum tratamento possível, nem a possibilidade de vacinação, visto que a infecção não induz resposta humoral, tornam o controle do scrapie um grande desafio.

Desde a primeira publicação (HUNTER et al., 1989) indicando que variações no PRNP poderiam estar relacionadas à resistência ou susceptibilidade dos ovinos ao scrapie, dezenas de milhares de animais já foram genotipados. Somente o *National Scrapie Plan* (NSP) da Grã Bretanha genotipou mais de um milhão de ovinos (HUNTER, 2006).

Na Grã-Bretanha, o serviço de genotipagem comercial dos rebanhos ovinos está disponível desde 1994. Segundo Melchior et al. (2010), a preocupação com o controle da doença começou com fazendeiros ingleses que iniciaram a genotipagem dos seus rebanhos, a fim de melhorar a demanda de venda e troca e proporcionar uma maior segurança ao produtor quanto aos riscos do animal desenvolver a doença. Em 2001 foi lançado o *National Scrapie Plan* (NSP) (disponível em <http://www.defra.gov.uk>) para rebanhos de raças puras registradas e que foi estendido para os rebanhos de raças puras não registradas em 2002 (RODEN et al., 2006). O programa, que é voluntário, atualmente utiliza o sistema de dados denominado RAM Genotyping Scheme (RGS), onde há seleção positiva do alelo ARR e seleção negativa do alelo VRQ, além de ter uma tabela correspondente aos cruzamentos restritos de acordo com cada genótipo (tabela 5) (DAWSON, 2006; EHLING et al., 2006). Existe também o *Ewe Genotyping Service* (EGS), disponível para os criadores que já são membros do RGS, e que seleciona as ovelhas. Outros países da Europa também tiveram a mesma preocupação com os seus rebanhos e iniciaram alguns programas de controle, como foi o caso da Alemanha (DAWSON et al., 2008).

TABELA 5 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto ao grau de resistência/susceptibilidade ao scrapie, segundo o *Ram Genotyping Scheme* do NSP

Tipo	Genótipos	Grau de resistência/susceptibilidade
1	ARR/ARR	Ovinos que são geneticamente mais resistentes ao scrapie
2	ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	Ovinos que são geneticamente resistentes ao scrapie, mas que necessitam de seleção cuidadosa quando utilizados para cruzamentos
3	AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	Ovinos que geneticamente têm pouca resistência ao scrapie e que necessitam de seleção cuidadosa quando utilizados para cruzamentos
4	ARR/VRQ	Ovinos que são geneticamente susceptíveis ao scrapie e que não devem ser utilizados para reprodução, exceto dentro de um programa controlado de reprodução aprovado pelo <i>NSPAC*</i>
5	AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Ovinos que são geneticamente muito susceptíveis ao scrapie e que não devem ser utilizados para reprodução

*NSPAC** - National Scrapie Plan Administration Centre

Fonte: adaptado do NSP Genotypes Table - DEFRA (disponível em:

<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/other/tse/scrapie/nsp/publicationsrpts/tables.htm>)

Nos Estados Unidos, o Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal do Departamento de Agricultura (Department of Agriculture's – USDA – Animal Plant Health Inspection Service – APHIS) está usando a genotipagem para determinar quais os animais que, após terem sido expostos à infecção por scrapie, devem ser removidos ou restrito aos rebanhos afetados e quais estão livres para deslocamentos de forma irrestrita. São reconhecidos como importantes os códons 171 e 136 na determinação da susceptibilidade ao scrapie nos EUA (APHIS, 2005) (tabela 6).

O plano americano, denominado *The National Genetics Based Flock Clean-up Plan* permite que criadores com rebanhos afetados permaneçam ou

desloquem ovinos classificados como RR₁₇₁; AA₁₃₆ QR₁₇₁ e a maioria dos AV₁₃₆ QR₁₇₁ de forma irrestrita. Também há que se remover ou restringir todas as ovelhas QQ expostas, cabras expostas e os descendentes de ovelhas acometidas por scrapie (disponível no endereço <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahps/scrapie>).

TABELA 6 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto ao grau de resistência/susceptibilidade ao scrapie, segundo o *The National Genetics Based Flock Clean-up Plan* nos EUA

Genótipos	Grau de resistência/susceptibilidade
AA ₁₃₆ RR ₁₇₁	Ovinos que são quase completamente resistentes ao scrapie. Estes animais são altamente improváveis de carregar ou transmitir o scrapie.
AA ₁₃₆ QR ₁₇₁	Ovinos que são raramente susceptíveis ao scrapie. Não se sabe se animais deste genótipo infectados podem transmitir a doença. O risco a partir destes animais é provavelmente menor, uma vez que animais AA ₁₃₆ QR ₁₇₁ , quando infectados, raramente apresentam PrP anormal fora do encéfalo.
AV ₁₃₆ QR ₁₇₁	Ovinos que são susceptíveis a algumas cepas de scrapie. Somente dois casos foram identificados nos EUA. O risco a partir destes animais é provavelmente menor, uma vez que animais AV ₁₃₆ QR ₁₇₁ , quando infectados, raramente apresentam PrP anormal fora do encéfalo.
QQ ₁₇₁	Ovinos que são muito susceptíveis ao scrapie e que podem transmitir a doença a outros rebanhos susceptíveis.

Fonte: adaptado de APHIS (2005)
disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahps/scrapie>

Os planos e programas de controle ao scrapie objetivam simultaneamente o aumento da frequência do alelo ARR e a diminuição do alelo VRQ (DAWSON et al., 2008). Entretanto, com a ocorrência dos casos atípicos de scrapie (BENESTAD et al., 2003) com diferentes padrões de relação com o genótipo do PRNP, estas estratégias dos planos de controle tem sido questionadas. Os casos atípicos tem sido correlacionados com os alelos

AF141RQ e AHQ (MOUM et al., 2005; BENESTAD et al., 2008), enquanto que animais considerados resistentes são portadores do alelo VRQ.

Outras preocupações, como diminuição da variabilidade genética, também tem sido levantadas pela comunidade científica (BISHOP, 2006; ROUGHSEEDGE et al., 2006; EFSA, 2006). Apesar destas preocupações, uma recente avaliação de risco biológico (EFSA, 2006) considera que, baseado nos dados atuais disponíveis, não existem riscos associados com os atuais programa de cruzamentos da União Européia.

Segundo Dawson et al. (2008), o NSP tem sido um sucesso em seus objetivos e, em conjunto com outros programas similares em países europeus, demonstra que a seleção baseada no genótipo PrP é possível. Ortiz-Pelaez e Bianchini (2011), analisando quase 320.000 animais genotipados no NSP da Grã-Bretanha para avaliar o impacto do genótipo na prevalência do scrapie clássico no nível de população, concluíram que um aumento da proporção de genótipos ARR/ARR correspondeu a uma diminuição dos casos clínicos de scrapie. Os genótipos ARR/AHQ, AHQ/VRQ, ARH/VRQ and ARQ/VRQ, classificados como tipo V pelo NSP, e os alelos ARH, ARQ, AHQ and VRQ estão associados a uma aumento no número de casos de scrapie.

No Brasil, não existe nenhum programa de controle baseado na seleção de genótipos resistentes ao scrapie. Alguns trabalhos mostram que existem diferenças nas frequências genótípicas do PRNP, quando comparados aos resultados de outros países (SOTOMAIOR, 2007), indicando a necessidade de se ampliar o número de animais genotipados antes que qualquer programa de controle do scrapie seja implantado no Brasil. É essencial, também, que se conheça a estrutura populacional e o grau de variabilidade genética do PRNP entre as diferentes raças, como tem sido demonstrado nos primeiros trabalhos brasileiros sobre genotipagem de ovinos (LIMA et al., 2007; PACHECO et al., 2007; SOTOMAIOR et al. 2008; PASSOS et al., 2008; IANELLA et al., 2011).

Num mundo globalizado, observa-se o aumento de barreiras sanitárias, em substituição às alfandegárias. A presença do scrapie no Brasil e o perfil de genótipos susceptíveis nas principais raças criadas no país, pode ser uma dificuldade para a exportação destes animais e seus produtos, inclusive de outras espécies como bovinos e suínos. Portanto, programas de controle e vigilância de doenças devem ser conduzidos com muito cuidado e

responsabilidade, a fim que garantir a aceitação dos produtos brasileiros sem quaisquer restrições. Vale ressaltar, também, que qualquer programa de seleção deve ser conduzido de forma gradual, combinando a manutenção de variabilidade genética, adaptação e produção com a resistência a doenças (Sotomaior et al., 2008).

A possibilidade de implementação de programas de seleção genética de animais resistentes ao scrapie deve ser considerada como uma importante ferramenta para impedir a disseminação da doença em rebanhos de ovinos e caprinos nas diferentes regiões do Brasil e garantir a qualidade sanitária destes animais.

8 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**, v. 85, p. 2103-2110, 2004.

AGUZZI, A.; HEPPNER, F.L.; HEIKENWALDER, M.; PRINZ, M.; MERTZ, K.; SEEGER, H.; GLATZEL, M. Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. **British Medical Bulletin**, v.66, p.141-159, 2003.

ALVAREZ, A, L.; GUTIERREZ-GILA, B.; UZUNB, M.; PRIMITIVO, F.S.; ARRANZA, J.J. Genetic variability in the prion protein gene in Five indigenous Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v.99, p.93-98, 2011.

APHIS. **Animal disease eradication programs and control and certification programs.**, 2005 Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/AHR_Web_PDF/E_chapter_3.pdf> Acesso em 18 ago. 2011.

ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; KEULEN, L. van; SCHELCHER, F.; ELSESEN, J.M.; LANTIER, F. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 3115-3126, 2000.

ANDRÉOLETTI, O.; LACROUX, C.; CHABERT, A.; MONNREAU, L.; TABOURET, G.; LANTIER, F.; BERTHON, P.; EYCHENNE, F.; BENESTAD, S.L.; ELSESEN, J.M.; SCHELCHER, F. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2607-2616, 2002.

ANDRÉOLETTI, O.; MOREL, N.; LACROUX, C.; ROUILLON, V.; BARC, C.; TABOURET, G.; SARRADIN, P.; BERTHON, P.; BERNARDET, P.; MATHEY, J.; LUGAN, S.; COSTES, P.; CORBIERE, F.; ESPINOSA, J.C.; TORRES, J.M.; GRASSI, J.; SCHELCHER, F.; LANTIER, F. Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. **Journal of General Virology**, v. 87, v. 4, p. 1043-1046, 2006a.

ANDRÉOLETTI, O.; TABOURET, G.; LACROUX, C.; FOUCRAS, G.; CHABERT, A.; LUGAN, S.; ROUILLON, V.; EYCHENNE, F.; ELSESEN, J.M.; SCHELCHER, F. The pathogenesis of scrapie in small ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006b, p. 41.

BASLER, K.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, v.46, p.417-428, 1986.

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

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**, v. 76, p. 509-517, 1995.

BENESTAD, S.L.; SARRADIN, P.; THU, B.; SCHÖNHEIT, J.; TRANULIS, M.A.; BRATBERG, B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. **Veterinary Record**, v. 153, p. 202-208, 2003.

BENESTAD, S.L.; ANDRÉOLETTI, O.; LAUDE, H.; GRASSI, J.; BILHEUDE, J.M.; SARRADIN, P.; MOUM, T.; MOLDAL, T.; BRATBERG, B. Atypical scrapie in Norway. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 55.

BENESTAD, S.L.; ARSAC, J.N.; GOLDMANN, M.N. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. **Veterinary Research**, v. 39, p. 19, 2008.

BILLINIS, C.; PSYCHAS, V.; LEONTIDES, L.; SPYROU, V.; ARGYROUDIS, S.; VLEMMAS, I.; LEONTIDES, S.; SKLAVIADIS, T.; PAPADOPOULOS, O. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 547-554, 2004.

BISHOP, S. The potential adverse consequences of breeding for resistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 28.

BISHOP, S.C.; MORRIS, C.A. Genetics of disease resistance in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 70, p. 48–59, 2007.

BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science**, v. 218, p. 1309-1311, 1982.

BOSSERS, A.; SCHREUDER, B.E.; MUILEMAN, I.H.; BELT, P.B.; SMITS, M.A. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 77, v. 10, p. 2669-2673, 1996.

BOSSERS, A.; HARDERS, F.L.; SMITS, M.A. PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie. **Archives of Virology**, v. 144, p. 829-834, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 02 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, de 04 abri. 2008.

BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73, p. 1339-1347, 1993.

BUSCHMANN, A.; LUHKEN, G.; SCHULTZ, J. ERHARDT, G.; GROSCHUP, M.H. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie resistant genotype (PrP ARR/ARR). **Journal of General Virology**, v. 85, v. 9, p.2727-2733, 2004.

CASTILLA, J.; SAA, P.; SOTO, C. Detection of prions in blood. **Nature Medicine**. v.11, n. 9, p. 982-985, 2005.

CAUGHEY, B.W.; DONG, A.; BHAT, K.S.; ERNST, D.; HAYES, S.F.; CAUGHEY, W.S. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. **Biochemistry**, v.30, v. 43, p. 7672-7680, 1991.

CLOUSCARD, C.; BEAUDRY, P.; ELSER, J.M.; MILAN, D.; DUSSAUCY, M.; BOUNNEAU, C.; SCHELCHER, F.; CHATELAIN, J.; LAUNAY, J.M.; LAPLANCHE, J.L. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 76, v. 8, p. 2097-2101, 1995.

COBB, N.J.; SUREWICZ, W.K. Prion diseases and the biochemical mechanisms. **Biochemistry**, v.31, p.2574-2585, 2009.

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**, 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**, v. 142, p. 623-625, 1998.

DAWSON, M. Approaches for breeding for resistance – the GB experience. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 27.

DAWSON, M., MOORE, R.C., BISHOP, S.C. Progress and limits of PrP gene selection. **Veterinary Research**, v. 39:25, 2008.

DETWILER, L.A.; BAYLIS, M. The epidemiology of scrapie. **Revue scientifique et technique. Office International des Epizooties**, v. 22, n. 1, p. 121-143, 2003.

DEFRA **National Scrapie Plan for Great Britain**. Department for Food, Environment and Rural Affairs, 2003. Disponível em: < <http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/bse/other/tse/scrapie/nsp.htm>> Acesso em 10 de agosto de 2011.

DEFRA - Department for Food, Environment and Rural Affairs. NSP update. **Technical Report 9** (Spring/Summer), 2007.

DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B. The neurochemistry of prion diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1589-601, 1993.

DeSILVA, U.; GUO, X.; KUPFER, D.M.; FERNANDO, S.C.; PILLAI, A.T.V.; NAJAR, F.Z.; SO, S.; FITCH, G.Q.; ROE, B.A. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, p. 89-94, 2003.

DICKINSON, A.G. Scrapie in sheep and goat. **Slow Virus Diseases of Animals and Man**, p. 209-241, 1976.

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** 4(11): e7970, 2009.

DRIEMEIER, D. **Scrapie**. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. (Eds.), **Doenças em Ruminantes e Equinos**, 1 ed. Pelotas Editora e Gráfica Universitária, 1998, p. 305–311.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the breeding programme for TSE resistance in sheep” **The EFSA Journal**, v. 382, p. 1-46, 2006.

EGLIN, R.D.; WARNER, R.; GUBBINS, S.; SIVAM, S.K.; DAWSON, M. Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. **Veterinary Record**, v. 156, p. 433-437, 2005.

ELOIT, M.; ADJOU, K.; CUOLPIER, M.; FONTAINE, J.J.; HAMEL, R.; LILIN, T.; MESSIAEN, S.; ANDREOLETTI, O.; BARON, T.; BENCSIK, A.; BIACABE, A.G.; BERINGUE, V.; LAUDE, H.; LE DUR, A.; VILOTTE, J.L.; COMOY, E.; DESLYS, J.P.; GRASSI, J.; SIMON, S.; LANTIER, F.; SARRADIN, P. BSE agent signatures in a goat. **Veterinary Record**, v. 156, p. 523-524, 2005.

ELSEN, J.M.; AMIGUES, Y.; SCHELCHER, F.; DUCROCQ, V.; ANDREOLETTI, O. EYCHENNEM, F.; TIEN KHANG, J.V.; POIVEY, J.P.; LANTIER, F.; LAPLANCHE, J.L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. **Archives of Virology**, v. 144, p. 431-445, 1999.

EHLING, C.; RATH, D.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; SCHINDLER, L.; NIEMANN, H. Utilization of frozen–thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2160-2164, 2006.

ERSDAL, C.; ULVUND, M.J.; BENESTAD, S.L.; TRANULIS, M.A. Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 164-174, 2003.

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

ESPINOSA, J.C.; DÍAZ-SAN SEGUNDO, F.; PARRA, B.; RODRÍGUEZ-BENITO, J. A.; HERVA, M. E.; RELAÑO-GINÉS, A.; BRUN, A.; CANO, M. J.; MORALES, M.; TORRES, J.M. Scrapie: susceptibilidad/resistencia a la enfermedad. **Mundo Ganadero**, v. 169, 2004.

FEDIAEVSKY, A.; MORIGNAT E.; DUCROT, C.; CALAVAS, D. A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.710-718, 2009.

FENG, Z.G.; WANG, K.Y.; ZHANG, H.J.; LUO, R.L.; LI, M.; AO, X.C.; TIAN, N. Report of scrapie in sheep in China. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v.18, p. 114-119, 1987.

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**, v. 6, p. 139-143, 1978.

FOSTER, J.D.; DICKINSON, A.G. Age at death from natural scrapie in a flock of Suffolk sheep. **Veterinary Record**, v.125, p.415-417, 1989.

FOSTER, J.; HOPE, J.; FRASER, H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. **Veterinary Record**, v. 133, p. 339-341, 1993.

FOSTER, J.; BRUCE, M.E.; McCONNEL, L.; CHREE, A.; FRASER, H. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. **Veterinary Record**, v. 138, p. 546-548, 1996.

FOSTER, J. D.; PARNHAM, D.; CHONG, A.; GOLDMANN, W.; HUNTER, N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. **Veterinary Record**, v. 148, n. 6, p. 165-171, 2001.

FRANSCINI, N.; GEDAILY, A.E.; MATTHEY, U.; FRANITZA, S.; SY, M-S.; BÜRKLE, A.; GROSCHUP, M.; BRAUN, U.; ZAHN, R. Prion protein in milk. **PLoS ONE**, v. 1, n.1, e71, 2006.

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**, 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**, v.17, p.509-527, 2005.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; SALBAUM, J.M.; BEUREYTHIER, 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**, v. 87, p. 2476-2480, 1990.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; MARTIN, T.; DAWSON, M.; HOPE, J. Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 1, p. 201-204, 1991.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; SMITH, G.; FOSTER, U.; HOPE, J. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 989-995, 1994.

GOMBOJAV, A.; ISHIGURO, N.; HORIUCHI, M.; SERJMYADAG, D.; BYAMBAA, B.; SHINAGAWA, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 1, p. 75-81, 2003.

GONZÁLEZ, L.; MARTIN, S.; JEFFREY, M. Distinct profiles of PrP^{Sc} immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1339–1350, 2003.

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**, v.156, p. 846-847, 2005.

GONZÁLEZ, L.; DAGLEISH, M.P.; BELLWORTHY, S.J.; SISÓ, S.; STACK, M.J.; CHAPLIN, M.J.; DAVIS, L.A.; HAWKINS, S.A.; HUGHES, J. JEFFREY, M. Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. **Veterinary Record**, v.158, p.325-331, 2006.

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**, 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**, v.20, p.203-208, 2008b.

GROSCHUP, M. An overview of diagnostic tests for prion disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 49.

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**, v. 13, p. 1201-1207, 2007.

GUO, X.; KUPFER, D.M.; FITCH, G.Q.; ROE, B.A.; DeSILVA, U. Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. **Animal Genetics**, v.34, n. 4, p. 303-305, 2003.

HARRINGTON, N.P.; O'ROURKE, K.I.; FENG, Y.; RENDULICH, J.; DIFRUSCIO, C.; BALACHANDRAN, A. Prion genotypes of scrapie-infected Canadian sheep 1998–2008. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 228-232, 2010.

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

HEATON, M.P.; LEYMASTER, K.A.; KALBFLEISCH, T.S.; FREKING, B.A.; SMITH, T.P.L.; CLAWSON, M. L.; LAEGREID, W.W. Ovine reference materials and assays for prion genetic testing. **BMC Veterinary Research**, v.6: 23, 2010.

HOINVILLE, L.J. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, 15: 827-852, 1996.

HORIUCHI, M.; CAUGHEY, B. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. **The EMBO Journal**, v.18, p. 3193–3203, 1999.

HOUSTON, F.; GOLDMANN, W.; CHONG, A.; JEFFREY, M.; GONZÁLEZ, L.; FOSTER, J.; PARNHAM, D.; HUNTER, N. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. **Nature**, v. 423, p. 498, 2003.

HUNTER, N. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 331-334, 1997.

HUNTER, N. Scrapie and experimental BSE in sheep. **British Medical Bulletin**, v. 66, p. 171 – 183, 2003.

HUNTER, N. The role of genetics in the epidemiology and pathogenesis of scrapie. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 26.

HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; DICKINSON, A.G.; HOPE, J. Linkage of the gene for scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. **Veterinary Record**, v. 124, p. 364-366, 1989.

HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; GOLDMANN, W.; STEAR, M.J.; BOSTOCK, C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. **Archives of Virology**, v. 141, p. 809-824, 1996.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; FOSTER, J.D.; CAIRNS, D.; SMITH, G. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. **Veterinary Record**, 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**, v. 140, p. 59-63, 1997b.

HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BELTRÁN de HEREDIA, I.; BARANDIKA, J.; SANZ-PARRA, A.; BERRIATUA, E.; JUSTE, R.A. Genetic susceptibility to scrapie in a population of Latxa breed in the Basque Country, Spain. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 255-259, 2002.

HUSSAIN, A., BABAR, M.E., IMRAN, M., HAQ, I.U., JAVED, M.M. Detection of four novel polymorphisms in PrP gene of Pakistani sheep (Damani and Hashtnagri) and goats (Kamori and Local Hairy) breeds. **Virology Journal**, v.8, n.246, 2011.

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**. Article in press.

JEFFREY, M.; MCGOVERN, G.; MARTIN, S.; GOODSIR, C.M.; BROWN, K.L. Cellular and sub-cellular localization of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. **Archives of Virology**, v. 16, p. 23-28, 2000.

JEFFREY, M.; MARTIN, S.; THOMSON, J.R.; DINGWALL, W.S.; BEGARA-MCGORUM, I.; GONZÁLEZ, L. Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie-affected Suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p. 48-57, 2001.

JEFFREY, M. Scrapie: phenotypes, case definitions and strains. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 35.

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**, v. 2, n. 4, e32, 2006.

JUNGHANS, F.; TEUFEL, B.; BUSCHMANN, A.; STENG, G.; GROSCHUP, M.H. Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility. **Veterinary Record**, v. 143, p. 340-341, 1998.

KONOLD, T., MOORE, S.J., BELLWORTHY, S.J., SIMMONS, H.A. Evidence of scrapie transmission via milk. **BMC Veterinary Research**, v. 4:14, 2008.

KUTZER, T.; PFEIFFER, I.; BRENIG, B. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 119, p. 201-208, 2002.

LAMPERT, P.W.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.JR. Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. **American Journal of Pathology**, v. 68, n. 3, p. 626-652, 1972.

LAN, Z.; WANG, Z.L.; LIU, Y.; ZHANG, X. Prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Xinjiang local sheep breeds in China. **Archives of Virology**, v. 151, p. 2095-2101, 2006.

LAPLANCHE, J. L.; CHATELAIN, J.; BEAUDRY, P.; DUSSAUCY, M.; BOUNNEAU, C.; LAUNAY, J.M. French autochthonous scrapied sheep without the 136Val PrP polymorphism. **Mammalian Genome**, v.4, n. 8, p. 463-464, 1993.

LeDUR, A.; BERINGUE, V.; ANDREOLETTI, O.; REINE, F.; LAI, T.L.; BARON, T.; BRATBERG, B.; VILOTTE, J.L.; SARRADIN, P.; BENESTAD, S.L.; LAUDE, H. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrPgenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 44. p. 16031-16036, 2005.

LEE, I.Y.; WESTAWAY, D.; SMIT, A.F.A.; WANG, K.; SETO, J.; CHEN, L.; ACHARYA, C.; ANKENER, M.; BASKIN, D.; COOPER, C.; YAO, H.; PRUSINER, S.B.; HOOD, L.E. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genome Research**, n 8, p. 1022 – 1037, 1998.

LEITA, L.; FORNASIER, F.; NOBILI, M. de; BERTOLI, A.; GENOVESI, S.; SEQUI, P. Interactions of prion proteins with soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1638-1644, 2006.

LIGIOS, C.; SIGURDSON, C.J.; SANTUCCIU, C.; CARCASSOLA, G.; MANCO, G.; BASAGNI, M.; MAESTRALE, C.; CANCEDDA, M.G.; MADAU, L.; AGUZZI, A. PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. **Nature Medicine**, v. 11, p. 1137–1138, 2005.

LIMA, A.C.B.; BOSSERS, C.E.; SOUZA, S.M.P. OLIVEIRA AND OLIVEIRA, D.M. Prp genotypes in a pedigree flock of a Santa Inês sheep. **Veterinary Records**, v.160, p.336-337, 2007.

LÜHKEN, G.; BUSCHMANN, A.; GROSCHUP, M.H.; ERHARDT, G. Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. **Archives of Virology**, v. 149, n. 8, p. 1571-1580, 2004.

LUHKEN, G., LIPSKY, S., PETER, C., ERHARDT, G. Prion protein polymorphisms in autochthonous European sheep breeds in respect to scrapie eradication in affected flocks. **Small Ruminant Research**, v.75, p.43-47, 2008.

MASTRANGELO, P.; WESTAWAY, D. Biology of the prion gene complex. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 79, p. 613-628, 2001

McGOWAN, J.P. Scrapie in sheep. **Scottish Journal of Agriculture**, v. 5, p. 365-375, 1922.

MCKINTOSH, E.; TABRIZI, S.J.; COLLINGE, J. Prion diseases. **Journal of NeuroVirology**, v. 9, p.183–193, 2003.

MELCHIOR, M.B.; WINDIG, J.J.; HAGENAARS, T.J.; BOSSERS, A.; DAVIDSE, A.; VAN ZIJDERVELD, F.G: Eradication of scrapie with selection breeding: are we nearly there? **BMC Veterinary Research**, v.6:24, 2010.

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**, v. 75, p. 239-250, 2006.

MONLEON, E., MONZON, M., HORTELLS, P., ACIN, C., VARGAS, F., BADIOLA, JJ. Approaches to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. **Journal of Virology Methods**, v.124, p.165-171, 2005.

MOUM, T.; OLSAKER, I.; HOPP, P.; MOLDAL, T.; VALHEIM, M.; MOUM, T.; BENESTAD, S.L. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 231-235, 2005.

NÖREMARK, M. Atypical scrapie in Europe – an epidemiologist's view. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 56.

OIE - ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. Terrestrial Manual 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/2008/pdf/2.07.13_SCRAPIE.pdf> Acesso em: 04 de maio 2010.

OJEDA, D.B.; OLIVEIRA, N.M. Serviço de Avaliação Genética de Reprodutores Ovinos. S.A.G.R.O.: Resultados de 1998. Bagé, Embrapa Pecuária Sul, 31p.,1998.

OLLHOFF, R. D.; SOTOMAIOR, C. S. Scrapie. Boletim Técnico. **Instituto Biológico**. v. 24, p. 54-60, 2011.

O'DOHERTY, E.; AHERNE, M.; ENNIS, S.; WEAVERS, E.; HUNTER, N.; ROCHE, J.F.; SWEENEY, T. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep. **Veterinary Record**, v. 146, p. 335-338, 2000.

O'DOHERTY, E.; AHERNE, M.; ENNIS, S.; WEAVERS, E.; ROCHE, J.F.; SWEENEY, T. Prion protein gene polymorphisms in pedigree sheep in Ireland. **Research in Veterinary Science**, v. 70, p. 51-56, 2001.

O'DOHERTY, E.; HEALY, A.; AHERNE, M.; HANRAHAN, J.P.; WEAVERS, E.; O'DOHERTY, M.; ROCHE, J.F.; GUNN, M.; SWEENEY, T. Prion protein (PrP) gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 243-250, 2002.

O'ROURKE, K.I.; MELCO, R.P.; MICKELSON, J.R. Allelic frequency of an ovine scrapie susceptibility gene. **Animal Biotechnology**, v. 7, p. 155-162, 1996.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; PARISH, S.M.; KNOWLES, D.P. Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. **Veterinary Record**, v. 142, p. 489-491, 1998.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; BESSER, T.E.; MILLER, J.M.; CUTLIP, R.C.; WELLS, G.A.H.; RYDER, S.J.; PARISH, S.M.; HAMIR, A.N.; COCKETT, N.E.; JENNY, A.; KNOWLES, D.P. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3254-3259, 2000.

ORTIZ-PELAEZ, A.; BIANCHINI, J. The impact of the genotype on the prevalence of classical scrapie at population level. **Veterinary Research**, v.42, p.1-8, 2011.

PACHECO, A.C.L., OLIVEIRA, S.M.P., GOUVEIA, M.C., DINI, E.J.R., VASCONCELOS, D.A. VIANA, G.M.S., ROSINHA, R.B., COSTA, R. MAGGIONI AND 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**, v.17, p.27-36, 2007.

PARAMITHIOTIS, E.; PINARD, M.; LAWTON, T.; LABOISSIERE, S.; LEATHERS, V.L.; ZOU, W-Q.; ESTEY, L.A.; LAMONTAGNE, J.; LEHTO, M.T.; KONDEJEWSKI, L.H.; FRANCOEUR, G.P.; PAPADOPOULOS, M.; HAGHIGHAT, A.; SPATZ, S.J. HEAD, M.; WILL, R.; IRONSIDE, J.; O'ROURKE, K.; TONELLI, Q.; LEDEBUR, H.C.; CHAKRABARTTY, A.; CASHMAN, N.R. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 893-899, 2003.

PASSOS, D.T.; RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C.; HEPP, D.; WEIMER, T.A. PrP polymorphisms in Brazilian sheep. **Small Ruminant Research**, 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 do IV Congresso Latino-Americano de Especialistas em Pequenos Ruminantes e Camelídeos Sul-Americanos**. 2005.

PRCINA, M., KONTSEKOVA, E. Has prion protein important physiological function? **Medical Hypotheses**, v. 76, p. 567-569, 2011.

PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, p. 136-144, 1982.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 13363-13383, Nobel Lecture, 1998.

PRUSINER, S.B. An introduction to prion biology and diseases. In: PRUSINER, S.B. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004a, p.1-87.

PRUSINER, S.B. Development of the prion concept. In: PRUSINER, S.B. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004b, p.89-141.

PRUSINER, S. B. Early evidence that a protease-resistant protein is an active component of the infectious prion. **Cell**, v. 116, p. 109, 2004c.

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. Anais. **Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul**, 1, Campo Grande, p. 89-95, 1996.

RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C. Scrapie. **A Hora Veterinária**, v. 120, p. 15-22, 2001.

RIBEIRO, L.A.O.; PASSOS, D.T.; RODRIGUES, N.C.; WEIMER, T.A.; Scrapie (paraplexia enzoótica) em ovinos no Brasil. **Veterinária em Foco**, 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 (PrP) genotype frequencies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 1-16, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, A.B.; GARRIDO, J.M.; MAZA, S.; BENEDICTO, L. GEIJO, M.; GÓMEZ, N. Atypical /Nor98 scrapie in Basque Country: a case report of eight outbreaks. **BMC Veterinary Research**, v.6: 17, 2010.

ROUGHSEGE, T.; VILLANUEVA, B.; WOOLLIAMS, J.A. Determining the relationship between restorative potential and size of a gene bank to alleviate the risks inherent in a scrapie eradication breeding programme. **Livestock Science**, v.100, p. 231-241, 2006.

RYDER, S.; DEXTER, G.; BELLWORTHY, S.; TONGUE, S. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. **Research in Veterinary Science**, v. 76, p. 211-217, 2004.

SCHREUDER, H. A.; RONDEAU, J. M.; TARDIF, C.; SOFFIENTINI, A.; SARUBBI, E.; AKESON, A.; BOWLIN, T.L.; YANOFISKY, S.; BARRETT, R.W. Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist. Presence of a disulfide link and a cis-proline. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v.227, p.838-847, 1995.

SEABURY, C. M; DERR, J.N. Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, n. 1-4, p. 85-88, 2003.

SIMMONS, M.M.; KONOLD, T.; THURSTON, L.; BELLWORTHY, S.; CHAPLIN, M.J.; MOORE, S.J. The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. **Veterinary Research**, v.6: 14, 2010.

SIPOS, W.; KRAUS, M.; SCHMOLL, F. ACHMANN, R.; BAUMGARTNER, W. PrP genotyping of Austrian sheep breeds. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 49, n. 8, p. 415-418, 2002.

SORBY, R.; AUSTBO, L.; PRESS, C.M.; SKRETTING, G.; LANDSVERK, T.; ESPENES, A. PrP Expression, PrP^{Sc} Accumulation and Innervation of Splenic Compartments in Sheep Experimentally Infected with Scrapie. **PLoS One**, V. 4, e6885, 2009.

SOTOMAIOR, C.S.; **Polimorfismo do gene da proteína prion celular (PrP^C) e a susceptibilidade/resistência ao scrapie em ovinos no estado do Paraná.** 2007.120p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná.

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**, v. 39, p. 659-661, 2008.

STEVENS, K.B.; DEL RÍO VILAS, V.J.; GUITIÁN, J. Classical sheep scrapie in Great Britain: spatial analysis and identification of environmental and farm-related risk factors. **BMC Veterinary Research**, v. 5: 33, 2009.

THACKRAY, A.M.; HOPKINS, L.; BUJDOSO, R. Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. **Biochemical Journal**, v. 401, p. 475 – 483, 2007.

THORGEIRSDOTTIR, S.; SIGURDARSON, S.; THORISSON, H.M.; GEORGSSON, G.; PALSDOTTIR, A. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2527-2534, 1999.

TONGUE, S.C.; WILESMITH, J.W.; COOK, C.J. Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie affected flocks in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 154, p. 9-16, 2004.

TONGUE, S.C.; WEBB, P.; SIMMONS, M.M.; GUBBINS, S. Prevalence of scrapie infection in cull animals from 14 scrapie-affected flocks in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 157, p. 480-482, 2005.

TOUZEAU, S.; CHASE-TOPPING, M. E.; MATTHEWS, L.; LAJOUS, D.; EYCHENNE, F.; HUNTER, N.; FOSTER, J. D.; SIMM, G.; ELSEN, J.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. **Archives of Virology**, v. 151, p.735-751, 2006.

TOWNSEND, S.J.; WARNER, R.; DAWSON, M. PrP genotypes of rare breeds of sheep in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 156, p. 131-134, 2005.

TRANULIS, M. A.; OSLAND, A.; BRATBERG, B.; ULVUND, M.J. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 4, p. 1073-1077, 1999.

TYLER, J. W.; MIDDLETON, J.R. Transmissible spongiform encephalopathies in ruminants. **Veterinary Clinics - Food Animal Practice**, v.20, p.303-326, 2004.

ÜN, C.; OZTABAK, K., OZDEMIR, N., AKIS, I., MENGI, A. Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v.74, p.260-264, 2008.

VACCARI, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U.; ELENİ, C.; PERFETTI, M.G.; DiBARI, M.A.; MORELLI, L.; LIGIOS, C.; BUSANI, L.; NONNO, R.; DiGUARDO, G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2029-2037, 2001.

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**, v.40: 19, 2009.

VAN KEULEN, L.J.; SCHREUDER, B.E.; MELOEN, R.H.; POELEN-VAN DEN BERG, M.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.; LANGEVELD, J.P. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 299-308, 1995.

VAN KEULEN, L.J.; SCHREUDER, B.E.; MELOEN, R.H.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.; LANGEVELD, J.P. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1228-1231, 1996.

VARGAS, F.; BOLEA, R.; MONLEÓN, E.;ACÍN, C.; VARGAS, A.; DE BLAS, I.; LUJÁN, L.; BADIOLA, J.J. Clinical characterization of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. **Veterinary Record**, v. 156, p. 318-320, 2005.

XU, L., ZHANG, Z., ZHOU, X., YIN, X., YANG, L., ZHAO, D. Molecular cloning and polymorphism analysis of prion protein gene in Tan sheep of Ningxia, China. **Gene**, v.485, p.102-105, 2011.

ZLOTNIK, I., KATIYAR, R.D. The occurrence of scrapie disease in sheep of the remote Himalayan foothills. **Veterinary Record**, v.73, p.543-545, 1961.

ZOU, W.Q., ZHENG, J., GRAY, D.M. et.al. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.1380-1385, 2004.

WELLS, G.A.; WILESMITH, J.W. Bovine spongiform encephalopathy and related diseases. In: PRUSINER, S.B. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p. 595-628.

WESTAWAY, D.; ZULIANI, V.; COOPER, C.M.; COSTA, M. da; NEUMAN, S.; JENNY, A.L.; DETWILLER, L.; PRUSINER, S.B. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. **Genes and Development**, v. 8, p. 959-969, 1994.

WESTERGARD, L.; CHRISTENSEN, H.M.; HARRIS, D.A. The cellular prion protein (PrP^C): its physiological function and role in disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 629-644, 2007.

CAPÍTULO 2

POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C) E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO LINFÓIDE EM REBANHO DE OVINO INTRODUZIDO EM PROPRIEDADE PÓS SURTO DE SCRAPIE

POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C) E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO LINFÓIDE EM REBANHO DE OVINO INTRODUZIDO EM PROPRIEDADE PÓS SURTO DE SCRAPIE

Fernanda Trentini Lopes Ribeiro¹, Helen Caroline Raksa², Adriane Holtz Tirabassi², Laire Schidlowski Ferreira³, Juliano Leal⁴, David Driemeier⁴, Cristina Santos Sotomaior^{5*}

¹ Mestranda em Ciência Animal - PUCPR; Bióloga; Pontifícia Universidade Católica do Paraná;

² Mestranda em Ciência Animal – PUCPR, Médica Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná;

³ Aluna do curso de Biologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná;

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Médico Veterinário;

⁵ Mestrado em Ciência Animal - PUCPR; Médica Veterinária, Professora Titular; Pontifícia Universidade Católica do Paraná;

* autor para correspondência – cristina.sotomaior@pucpr.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo do gene da proteína prion celular (PRNP) 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^{Sc}) utilizando imunohistoquímica de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal. Foram avaliados 42 ovinos, mestiços Texel com outras raças como Ile de France, Dorper e Suffolk. 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 PRNP dos 42 ovinos 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 em todas as amostras de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal foi negativo. Não foi possível, portanto, estabelecer uma relação entre genótipo e maior susceptibilidade ao scrapie, devido à ausência de PrP^{Sc} na amostras examinadas. No Brasil, há poucos dados de genotipagem do PRNP e, até o momento, nenhum tipo de controle baseado em cruzamentos direcionados foi implementado.

Palavras-chaves: Scrapie; Polimorfismo; Proteína prion celular; Genotipagem; Ovinos; Biópsia retal; Imunohistoquímica.

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 occurred, and to relate to disease susceptibility of possible animals infected with altered prion protein (PrP^{Sc}), by immunohistochemical analysis of recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue (RAMALT). For this we used 42 sheep, crossbred with Texel, Ile de France, Dorper and Suffolk. Females are 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^{Sc}. 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: Scrapie; Polymorphism; Cellular prion protein, Genotyping; Sheep; Rectal biopsy, Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

Scrapie faz parte das encefalopatias espongiformes transmissíveis (ETTs), que são um grupo de doenças neurodegenerativas, e tem como principal característica o acúmulo de uma forma patológica da proteína priônica (PrP^{Sc}) normal do hospedeiro no Sistema Nervoso Central (SNC) e tecido linforreticular (baço, tonsilas e linfonodos) (HUNTER, 1997; PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999).

Polimorfismos no gene da proteína prion celular (PRNP) estão associados a diferenças de susceptibilidade 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; ELSEN et al., 1999; ACÍN et al., 2004). As demais combinações apresentam níveis variados de susceptibilidade (DAWSON et al., 1998). Porém, rebanhos de diferentes raças de ovinos, podem vir a apresentar diferenças na suscetibilidade e/ou resistência ao prion (LÜHKEN et al., 2004; ACÍN et al., 2004; VACCARI et al., 2009).

Em muitos países, há programas de seleção genotípica com o objetivo de controlar o aparecimento clínico da doença, selecionando os animais considerados mais resistentes. Em geral, busca-se aumentar a frequência 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 e BIANCHINI, 2011).

O diagnóstico do scrapie pode ser presumido pelos sinais clínicos característicos (COCKCROFT e CLARK, 2006; OLLHOFF, SOTOMAIOR, 2011), porém a confirmação somente é possível por meio da detecção de PrP^{Sc} pelas técnicas de imunoblotting e imunohistoquímica (PRUSINER et al., 2004; GAVIER-WIDÉN et al. 2005). PrP^{Sc} 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).

Até recentemente, somente diagnósticos “post-mortem” eram possíveis de serem realizados. Atualmente, o diagnóstico pré-clínico pode ser realizado em ovinos e caprinos (GROSCHUP, 2006). Na maioria dos ovinos infectados, a proteína prion alterada 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 al., 1998a; O’ROURKE et al., 2000). Mais recentemente, tem sido testada a técnica de diagnóstico pré-clínico em amostras da mucosa retal, por meio de provas imunohistoquímicas da presença de PrP^{Sc} 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 e RODRIGUES, 2001; RIBEIRO et al., 2007) e notificados na Organização Mundial da Saúde Animal - OIE (www.oie.int).

O caso ocorrido em 2003 no rebanho de ovinos 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 positivos para a PrP^{Sc} (SOTOMAIOR, 2007). Três 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 um fator importante na epidemiologia. Dados demonstram que uma vez o ambiente contaminado, existe uma forte interação do prion com o solo, permanecendo por pelo menos mais de 3 anos infectivo (LEITA et al., 2006; JOHNSON et al., 2006).

O objetivo do presente trabalho foi genotipar o gene da proteína prion celular dos ovinos do atual rebanho da PUCPR, assim como obter amostras de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal para análise imunohistoquímica da presença da PrP^{Sc} e posterior correlação com os genótipos encontrados.

2 MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi realizado em duas etapas concomitantes: genotipagem do gene da proteína prion celular (PRPN) e biópsia retal para o diagnóstico, por meio de análise imunohistoquímica (IHQ), da presença da PrP^{Sc}.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

2.1 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). Em 2003 e 2004, houve três casos clínicos de scrapie no Setor de Ovinocultura (POHL DE SOUZA et al. 2005). Em 2006, todos os animais foram abatidos e houve casos de animais positivos para a presença de PrP^{Sc} (SOTOMAIOR, 2007). Aproximadamente quatro meses após o abate dos animais, foram introduzidas 10 fêmeas mestiças Texel no mesmo local. Estes animais eram provenientes de rebanho sem nenhuma notificação ou indício de scrapie. O manejo foi realizado da mesma forma que nos anos anteriores, usando as mesmas instalações e pastos.

Atualmente, 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 sete (16,67%) ovelhas são do rebanho trazido para o Setor de ovinocultura em 2006 e, portanto, não nascidas na propriedade. As demais, 83,33%, são nascidas na Fazenda da PUC. Detalhes do rebanho podem ser observados na tabela 1.

2.2 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”*).

2.2.1 Extração e purificação do DNA

A extração do DNA foi feita a partir de amostras congeladas de sangue. O sangue foi colhido da veia jugular externa, utilizando frascos à vácuo contendo etilenodiaminotetrácetico (EDTA) como anticoagulante. Após a colheita, os frascos foram mantidos sob refrigeração até chegarem ao laboratório, onde foram colocados no freezer à temperatura de -20°C até o início da extração.

A extração e a purificação do DNA foram feitas utilizando o protocolo de Nonidet Modificado. Adicionou-se volume/volume de sangue e TKM 1 (Tris-HCl pH 7,6 1M; KCl 1M; MgCl₂ 1M; EDTA 0,1M) (função tamponante) e 25µl de Nonidet (para a lise da membrana plasmática). A amostra, então, foi misturada por inversão e submetida à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, com descarte do sobrenadante. O pellet foi ressuscitado com 1 ml de TKM 1 e centrifugado por 10 minutos (repetiu-se 3x este procedimento, a fim de que a amostra se apresentasse da forma mais límpida possível). Após as três lavagens, o pellet foi ressuscitado novamente, com 165µl de TKM 2 (TKM 1+NaCl 1M) e misturado utilizando o vórtex. Logo adicionou-se 65µl de NaCl 6M (para a precipitação de proteína) e misturou-se a amostra por inversão, antes de ser centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e coletado o sobrenadante. Depois da coleta do sobrenadante, adicionaram-se dois volumes de etanol 100% à amostra (para a precipitação dos ácidos nucleicos) e misturou-se, novamente, por inversão até a precipitação do DNA. A amostra então foi submetida a uma otimização da precipitação, a -20°C até a manhã

seguinte (overnight). Posteriormente, centrifugou-se a amostra a 12000 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 715µl de álcool 70%, centrifugou a 12000 rpm durante 10 minutos e descartou, mais uma vez, o sobrenadante. A amostra foi, então, submetida ao processo de secagem durante 1 hora e ressuspensa com 100µl de TE (Tris-HCl pH 8,0 10mM; EDTA pH 8,0 1mM) (função tamponante).

Com a finalização da técnica de extração, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%, a fim de confirmar a presença de DNA na amostra estudada e sua integridade.

O gel para a extração foi preparado com 1g de agarose e 100ml de TBE 1X (Tris; Ácido bórico; EDTA 0,5M pH 8,0). Foram adicionados 3µl de tampão da amostra (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) aos 5µl da amostra. A corrida eletroforética, à 122V, foi de aproximadamente 40 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos. A observação do gel foi feita sob luz ultravioleta e fotografado para posterior estudo.

Para a quantificação do DNA das amostras, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop®, onde foram analisadas 2µl de cada amostra extraída, determinando a absorbância em 260 e 280nm.

2.2.2 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)

Para distinguir os cinco alelos (ARR, ARQ, ARH, AHQ, VRQ) as amostras de DNA obtidas na extração foram submetidas a duas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). Posteriormente, o produto de cada uma delas, foi clivado pelas enzimas de restrição (ER) *BspDI* e *BspHI*, segundo LÜKHEN et al. (2004).

Para a amplificação dos dois fragmentos de DNA, foi realizada uma reação de 30 µl (tabela 2). Após a preparação da mistura, era acrescentado o DNA do animal, homogeneizado e as misturas para a amplificação eram colocadas no termociclador. Após uma desnaturação inicial a 94 °C durante 1,5 minutos, eram realizados 40 ciclos de amplificação, incluindo desnaturação a 94°C por 20 segundos, hibridação a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de uma extensão final durante 5 minutos a 72°C.

TABELA 2 – Componentes e suas concentrações nas duas reações de PCR realizadas para a posterior clivagem por enzimas de restrição

	Concentração Final
Tampão	1 x
Cloreto de magnésio	1,5 mM
deoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP)	0,2 mM
Iniciador direto	10 pmol
Iniciador reverso	10 pmol
Taq Polimerase	0,6 U
DNA	variável

Em ambas as PCRs, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) diretos foram iguais, denominados iniciadores 1 e 2 (5'-TGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCT-3'), variando os iniciadores reversos. O produto de 197 pb da primeira PCR foi produzido pelo iniciador reverso modificado 3 (5'-TGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATC-3'), o produto de 196pb da segunda PCR, produzido pelo iniciador reverso modificado 4 (5'-GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATAT-3') (LÜKHEN et al. 2004). No produto de 197 pb, cria-se um sítio de restrição artificial para ER *Bsp*HI quando há histidina na posição 171. Para o produto de 196 pb, é criado um sítio de restrição artificial para ER *Bsp*DI 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 *Bsp*HI. A região amplificada corresponde à do nucleotídeo 342 até a do nucleotídeo 539 (iniciadores 1 e 3) e 538 (iniciadores 2 e 4) do PRNP, gerando produtos de, respectivamente, 197 e 196 pares de bases (pb).

Após a amplificação no termociclador, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética a 100V, em gel de agarose na concentração de 1,5%, durante cerca de 50 minutos, a fim de identificar as amostras com produtos únicos da amplificação.

Para as reações de clivagem, o produto da primeira PCR (iniciadores 1 e 3) era clivado somente com a ER *Bsp*HI. O produto da segunda PCR (iniciadores 2 e 4) era submetido à digestão com as duas enzimas. A reação de clivagem, com volume final de 15µl (tabela 3) depois de preparada era mantida em estufa a 37 °C, durante toda a noite (média de 12 horas). As amostras eram

submetidas à eletroforese em gel de agarose em concentração de 2,5%, preparado em tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). A corrida eletroforética era feita a 35V, durante 6 horas. Para aplicação no gel, o volume total da reação de clivagem, 15 µl, era misturado a 1,5 µl de tampão para aplicação de amostras de DNA em gel 10X (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol). Também eram aplicadas amostras de padrão de massa molecular. O gel posteriormente era corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 20 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado para a análise dos genótipos.

TABELA 3 – Componentes e suas concentrações nas reações de clivagem dos produtos das duas PCR pelas ER *BspDI* e *BspHI*

	Concentração final	
	1ª PCR (primers 1 e 3)	2ª PCR (primers 2 e 4)
Tampão 10x	1x	1x
<i>BspHI</i> (10 U/µl)	2,5 U	2,5 U
<i>BspDI</i> (5 U/µl)	-	2,5 U
Produto da PCR	variável	variável

Incluindo todas as possibilidades para cada alelo em cada uma das PCR-RFLP, é possível identificar 15 diferentes genótipos do PrP normalmente encontrados em ovinos a partir do tamanho dos fragmentos encontrados em cada reação (Tabela 4).

2.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas pela contagem direta dos alelos e genótipos.

Tabela 4 – Tamanhos dos produtos de PCR (em pares de bases), obtidos após a digestão com as enzimas *Bsp*HI e *Bsp*DI dos produtos de 197 e 196 pb, que caracterizam os 5 alelos e 15 genótipos do gene PrP comumente encontrados em ovinos

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

2.4 BIÓPSIA RETAL PARA DIAGNÓSTICO DA PrP^{Sc} EM OVINOS

Todos os ovinos do rebanho da PUCPR que foram genotipados, tiveram amostras de tecido linfóide colhidos a partir de biópsias retais para a posterior detecção da PrP^{Sc}. Cada animal teve pelo menos uma amostra de mucosa

retal colhida, segundo as técnicas de GONZÁLEZ et al. (2005) e ESPENES et al. (2006).

Para a realização do procedimento, o animal foi individualmente contido, 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), era utilizado um espécule especial, de uso individual e previamente lubrificado, para abrir a cavidade retal, facilitando o acesso para melhor obtenção das amostras. Em seguida, utilizando pinça hemostática especial e uma tesoura reta fina especial, foi colhida a amostra com aproximadamente 2 a 3 cm².

Os fragmentos colhidos foram conservados em formol 10% e, em seguida, processados e fixados em lâmina para análise microscópica do material.

Para a confecção das lâminas, os fragmentos de tecido foram submetidos às técnicas de rotina histológica:

- Neutralização —→ em álcool amônia por 1 hora.
- Desidratação —→ em 5 álcoois, 1 hora em cada.
- Diafanização —→ 3 fases de xilol, 1 hora em cada.

Após permanecerem em parafina derretida à 56°C por 6 horas, foram emblocados em blocos de parafina, cortados com micrótomo na espessura de 5µm e fixados em lâmina permanente. Essas lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e submetidas à leitura histopatológica para a identificação da presença ou não de tecido linfóide nas amostras de mucosa retal.

2.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA PrP^{Sc}

Uma vez identificada a presença de tecido linfóide, foram preparadas outras lâminas para a avaliação imunohistoquímica e, em colaboração com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram analisadas para presença da PrP^{Sc}.

Todo o material foi processado para a análise imunohistoquímica conforme descrito por O'Rourke et al. (2002). Os fragmentos a serem analisados estavam conservados em formol 10%. Após o tempo necessário à fixação, os tecidos foram clivados em fragmentos de aproximadamente dois milímetros de espessura e colocados em cassetes para inclusão em parafina. Para a descontaminação, foram embebidos em ácido fórmico a 95-98% durante 60 minutos. Após serem lavadas em água destilada, as lâminas foram colocadas novamente em formol a 10% tamponado, durante 24 horas, para re-equilibrarem.

Para o processamento e inclusão dos tecidos em parafina, foi seguido o processo de desidratação dos tecidos, através da imersão em seqüência das amostras em álcool 95%, por uma hora (3 vezes); álcool absoluto por uma hora (2 vezes) e xilol por uma hora (3 vezes). Após este processamento, foi feita a inclusão do material em parafina a uma temperatura entre 58 °C a 65 °C. Após foi retirada a parafina e a reidratação dos tecidos foi feita com lavagens subseqüentes em: xilol por cinco minutos; álcool absoluto por dois minutos; álcool 95% por dois minutos; álcool 80% por dois minutos; álcool 70% por um minuto.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado enxaguando as lâminas com uma solução de água oxigenada (10ml) e metanol a 3% (90ml). O material permaneceu por 10 minutos entre 22 °C e 25 °C com a mesma solução e, logo após, as lâminas foram enxaguadas submergindo-as quatro vezes em água bidestilada. A ativação do antígeno foi feita incubando-se os tecidos em uma solução de ácido fórmico a 95% por cinco minutos entre 22 °C e 25 °C, em um recipiente resistente ao ácido. As lâminas foram lavadas cuidadosamente e a neutralização foi em tampão Tris-HCl, usando três enxágües rápidos, seguido de incubação por um minuto em tampão fresco.

Após, o suporte com as lâminas foi transferido para um recipiente resistente ao calor contendo solução tampão adequada, para a recuperação antigênica a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para o tampão tris com Tween 20 (TBST) por dez minutos. Para a coloração imunohistoquímica, proteinase K (concentração final de 250 µg/mL) foi colocada sobre o corte do tecido na lâmina e incubada por 1,5 minutos. Após as lâminas foram enxaguadas por três vezes por vinte segundos, em

TBST. Em seguida, foi adicionado o anticorpo monoclonal F89/160.1.5 (O'ROURKE et al., 1998b), diluído conforme recomendações do fabricante, e incubado por dez minutos. Enxague com TBST, três vezes por vinte segundos. Foi colocado o anticorpo secundário biotinalado por dez minutos, entre 22 °C e 25 °C. Novo enxágüe. Foi colocado peroxidase-estreptavidina por dez minutos entre 22 °C e 25 °C. Novo enxágüe. Foi adicionado o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) por quatro a cinco minutos. Enxague com água destilada, duas vezes por vinte segundos. A lâmina foi contracorada com hematoxilina por 30 segundos para tecidos linfóides. Novo enxágüe com água. As lâminas foram deixadas na água até começar a montagem com lamínula.

Para a desidratação dos tecidos foram realizadas as seguintes lavagens: álcool 70% por dois minutos; álcool 80% por dois minutos; álcool 95% por dois minutos; álcool absoluto por dois minutos; xilol por cinco minutos (2 vezes). As lâminas foram montadas utilizando bálsamo do Canadá para fixar a lamínula e a leitura foi feita em microscópio óptico. Havia controle positivo e negativo de amostras de tecido linfóide.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística da associação entre diferentes genótipos e a presença ou não do prion que possa ser identificado nas biópsias retais foram realizadas montando-se tabelas de contingência e utilizando o método de qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher.

3 RESULTADOS

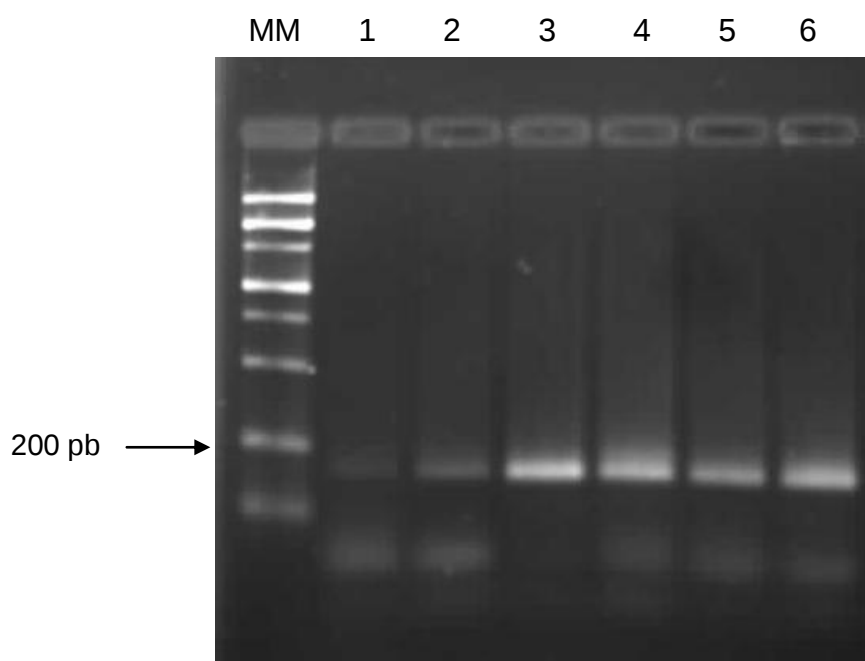
Foram genotipados as 42 ovelhas do rebanho, assim como todas também foram avaliadas pela imunohistoquímica quanto à presença da PrP^{Sc} no tecido linfóide da mucosa retal.

3.1 GENOTIPAGEM

As extrações de DNA das 42 amostras, avaliadas em gel de agarose a 1%, demonstraram integridade, qualidade e quantidade do DNA consideradas adequadas. A concentração média de DNA das amostras foi de 22,19ng/ul, variando entre 8,7ng/ul a 59,9 ng/ul de DNA. A relação 260/280, indicativa da pureza da amostra, foi em média superior a 1,76.

As amostras de DNA extraídas foram submetidas a duas reações de PCR. Todas as amostras, após a amplificação, foram analisadas para a presença de bandas únicas de 197 pb (reação com iniciadores 1 e 3) ou 196 pb (iniciadores 2 e 4), conforme demonstra a figura 1.

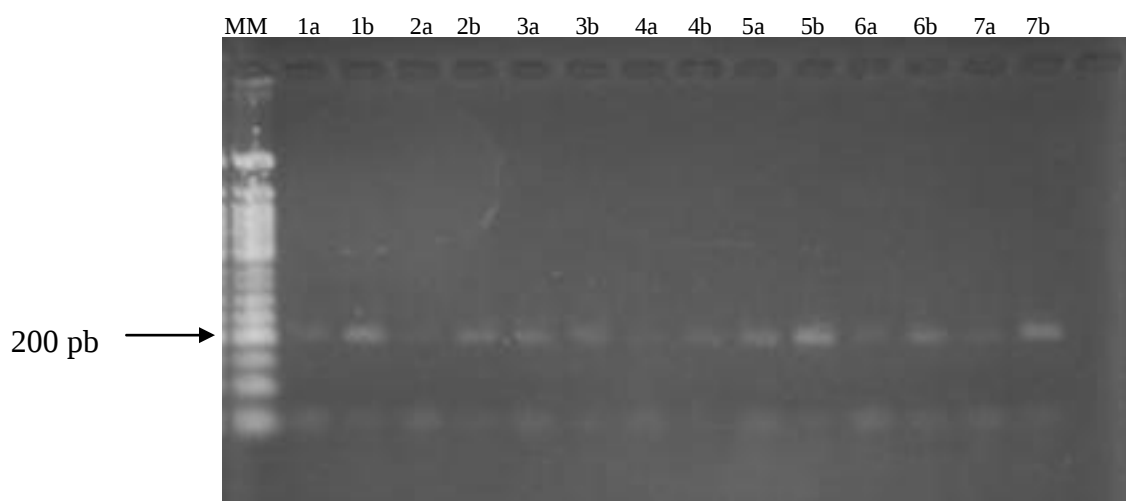
FIGURA 1 – Bandas únicas de produtos de PCR de 197/196 pb, avaliados em gel de agarose a 1,5% e corados em brometo de etídeo.



Legenda: MM – marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen)
1, 2, 3, 4, 5 e 6: produtos de amplificação de 196/197 pb,
avaliados em gel de agarose a 1,5% e corados em brometo de etídeo.

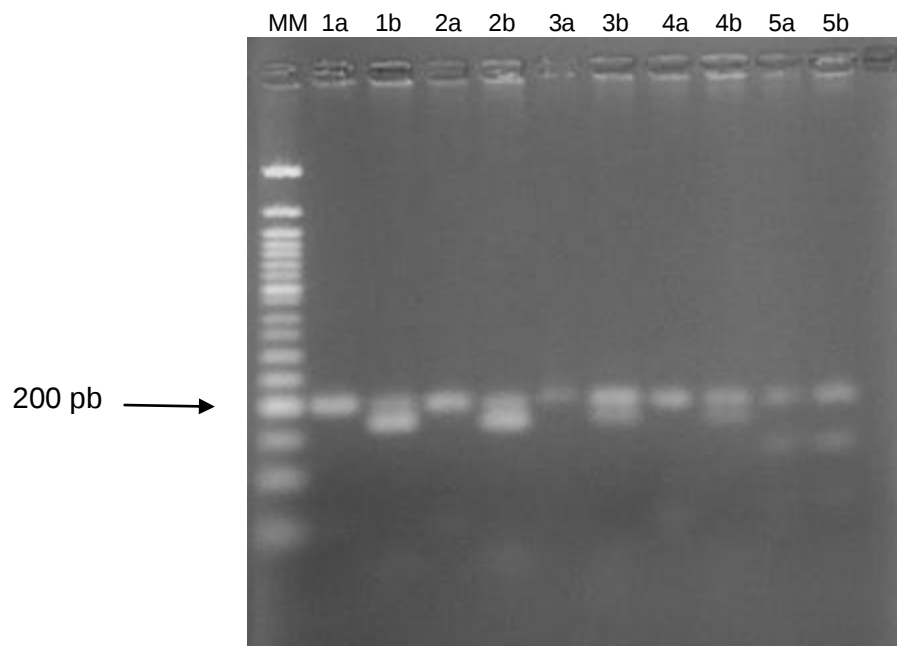
A digestão do produto de PCR de 197pb com a enzima *Bsp*HI e a dupla digestão do produto de 196pb com as enzimas *Bsp*HI e *Bsp*DI resultam em dois padrões, que juntos definem os genótipos do PRNP pela análise dos seus alelos (tabela 4). Nas 42 análises de RFLP, dos 15 genótipos normalmente encontrados em ovinos, foram observados somente os genótipos ARQ/ARQ (figura 2), ARR/ARQ e ARQ/VRQ (figura 3).

Figura 2 – PCR enzimática de 7 amostras com genótipo ARQ/ARQ do gene PrP 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).
 Amostras de 1 -7 com genótipos ARQ/ARQ 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 *Bsp*HI;
 b) Fragmento de PCR de 196 pb digerido pelas enzimas *Bsp*HI e *Bsp*DI.

Figura 3 – Análise de 5 amostras, com dois genótipos (ARR/ARQ – amostras 1 a 4 – e ARQ/VRQ – amostra 5) do gene PrP 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*.

O genótipo ARQ/ARQ foi o mais freqüente, encontrado em 73,81% dos animais, seguido do ARR/ARQ, com 16,67% e ARQ/VRQ, com 9,52% (tabela 5). 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.

TABELA 5 – Freqüência genotípica e distribuição (n) dos genótipos 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

3.2 BIÓPSIAS RETAIS

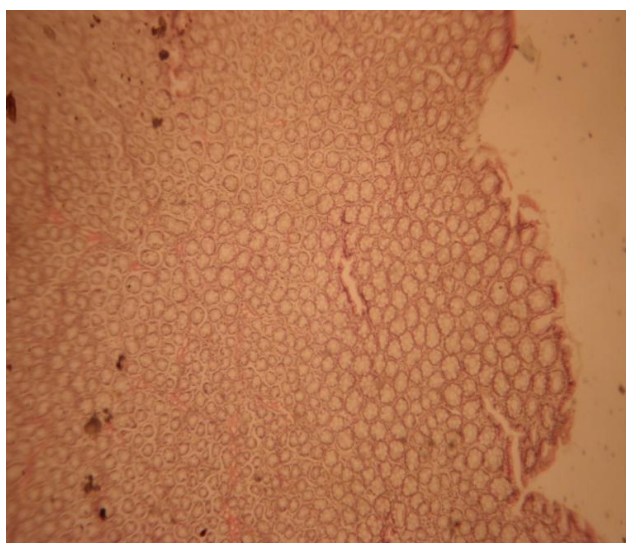
As primeiras biópsias retais realizadas encontraram baixa proporção de tecido linfóide nas amostras obtidas, inferior aos quatro a seis folículos linfóides necessários para a imunohistoquímica, segundo Gavier-Widén et al. (2005). De 42 amostras obtidas, apenas 26,19% apresentaram quatro ou mais folículos (tabela 6). Estas amostras iniciais eram de aproximadamente 1 cm².

Tabela 6 – Número de folículos linfóides encontrados nas 42 amostras de biópsia retal de ovinos submetidas à biópsia com amostras de 1 cm²

Número de Folículos	Número de Amostras	%
> 4 Folículos	11	26,19
3 Folículos	10	23,81
2 Folículos	3	7,14
1 Folículo	15	35,71
Negativo	3	7,14
Total	42	100,0

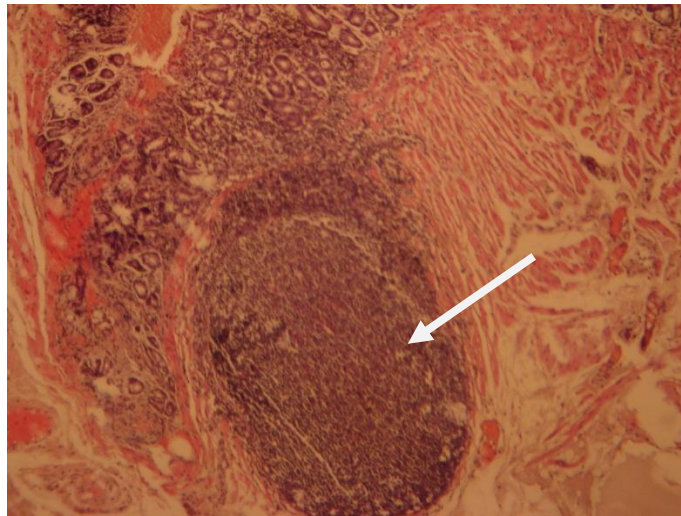
Os resultados considerados negativos foram os que não apresentaram nenhum folículo linfóide na lâmina histopatológica, demonstrando apenas tecido glandular, como mostra a Figura 4. Os resultados considerados insuficientes são os que apresentaram folículos linfóides, mas apenas de um a três (Figura 5), não atingindo o mínimo de quatro folículos necessários para a análise imunohistoquímica.

Figura 4 – Imagem histopatológica de tecido glandular encontrado na mucosa retal de um ovino



Lâmina corada com Hematoxilina - Eosina, em aumento de 100x.

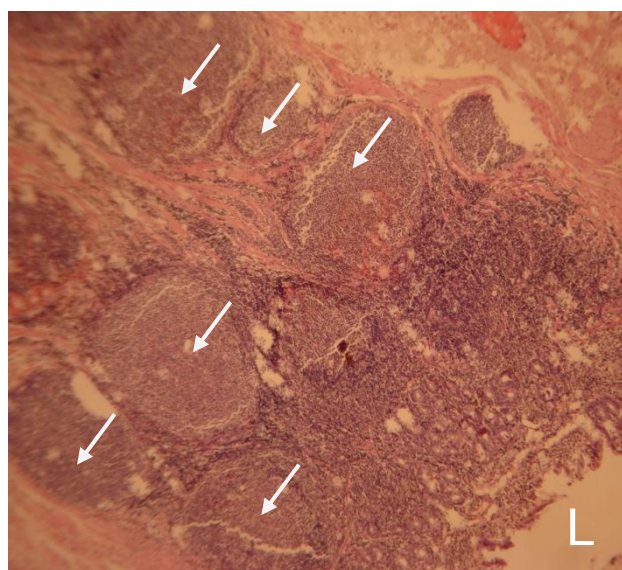
Figura 5 – Imagem histopatológica de um folículo linfóide (indicado pela seta) encontrado na mucosa retal de um ovino



Lâmina corada com Hematoxilina - Eosina, em aumento de 100x.

As lâminas que apresentaram mais que quatro folículos (Figura 6), foram consideradas adequadas, pois estariam aptas a serem encaminhadas à imunohistoquímica.

Figura 6 – Imagem histopatológica de vários folículos linfóides (indicados pela setas) localizados na mucosa retal de um ovino



Lâmina corada com Hematoxilina - Eosina, em aumento de 100x.

L – lúmen do reto

Em nova tentativa, em função dos resultados anteriores (apenas 26,19% com número de folículos suficiente), optou-se por obter uma área maior de tecido. Então, foram colhidas amostras de 2 - 3cm² de tecido da mucosa retal de todos os animais para avaliar se existia uma maior quantidade de folículos linfóides. De todas as amostras colhidas, 100,0 % estavam com mais de quatro folículos.

3.3 DIAGNÓSTICO DA PrP^{Sc} POR IMUNOHISTOQUÍMICA

O resultado das análises imunohistoquímicas (IHQ) dos 42 ovinos demonstrou que todos foram negativos.

3.4 RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E PRESENÇA DA PrP^{Sc}

Como não houve animais positivos para a presença da PrP^{Sc}, não foi possível estabelecer uma relação estatística entre genótipo de presença do prion.

4 DISCUSSÃO

Scrapie no Brasil deixou ser considerada uma 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 para a presença de PrP^{Sc}, apresentando reação para um ou mais tecidos analisados (SOTOMAIOR, 2007).

O objetivo do presente trabalho era acompanhar o rebanho introduzido no Setor de Ovinocultura após surto de 2003 e abate de todos os animais em 2006. Pesquisas demonstram que uma vez o ambiente contaminado, existe uma forte interação do prion com o solo, permanecendo por pelo menos 3 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^{Sc}. 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^{Sc} 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 permite que os mesmos animais sejam avaliados várias vezes, sem qualquer problema (GONZÁLEZ et al., 2008a,b). 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). Tanto as amostras de 1cm² quanto as de 2-3cm², causaram hemorragias leves, que foram contidas facilmente com uso de compressão com gaze. Porém, Espenes et al. (2006) não aconselham colher mais de duas amostras por animal de cada vez, devido a eventual ocorrência de hemorragia leve.

Durante as colheitas, foi necessária mais de uma tentativa para a padronização do local correto da biópsia, indicando que, mesmo apresentando vantagens em relação à biópsia de terceira pálpebra (principalmente a possibilidade de repetição da técnica), a biópsia retal precisa de treinamento antes de ser executada. Segundo Espenes et al. (2006), o reto alberga grande quantidade de folículos linfóides, os quais estão presentes entre as pregas da mucosa. Porém, na primeira colheita em 73,81% das amostras, não foi possível a obtenção de mais de três folículos, sendo que o número mínimo para a realização da imunohistoquímica seria quatro a seis folículos (GAVIER-WIDÉN et al. 2005), o que demonstra a necessidade de colher uma maior e mais profunda quantidade de tecido. Leal (2009) encontrou 29 amostras consideradas insuficientes entre 379 enviadas para análise. Porém, neste caso, Leal (2009) considerou como número suficiente a presença de 3 folículos. González et al. (2008a,b) reforçam que, após treinamento, a técnica é rápida e

simples de ser feita, não necessitando sedação e podendo ser repetida várias vezes durante a vida do animal.

Outra análise que deve ser feita sobre ao resultado negativo das biópsias quanto à presença da PrP^{Sc}, refere-se ao genótipo dos animais avaliados. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma relação entre susceptibilidade à infecção pela PrP^{Sc} e o polimorfismo do 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 scrapie, mesmo em um estágio clínico mais avançado doença, podem não apresentar acúmulo da PrP^{Sc} 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 do 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^{Sc} 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 do scrapie. 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 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 e também os 2 alelos raros (AHR e VRR) descritos em raças como Suffolk e Texel (KUTZER et al., 2002; LÜHKEN et al., 2004). Na presença destes dois alelos, ao utilizar metodologias diferentes da descrita neste trabalho, alguns genótipos poderiam ser identificados incorretamente. Por exemplo, ao se encontrar o resultado AA₁₃₆ HR₁₅₄ QR₁₇₁, poderia ser ARR/AHQ ou ARQ/AHR. 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 que podem ocorrer, mas que ainda não estão associados ao scrapie, poderiam passar despercebidos (LÜHKEN et al., 2004).

Apesar dos muitos polimorfismos identificados do gene PrP, para o scrapie clássico, considera-se que os códons 136, 154 e 171 são os únicos relacionados à maior resistência ou susceptibilidade ao scrapie, 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 só 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; Hurtado et al. (2002) – raça Latxa – Espanha; 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 PrP.

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; 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 mostras e o fato de se trabalhar com um único rebanho (alta grau de parentesco) poderia explicar esta menor variabilidade.

Trabalhos demonstram a relação genótipo e resistência/susceptibilidade ao scrapie; 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^{Sc} a determinados genótipos, poder-se-ia afirmar que um genótipo é mais resistente ou susceptível ao scrapie. Sotomaior (2007) encontrou resultados diferentes quanto à susceptibilidade (expressa pelos resultados positivos da presença da PrP^{Sc} em amostras de tecido linfóide) dos animais mestiços portadores de alelo ARR.

No Brasil, atualmente, não existe qualquer proposta de programas de controle genético do 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 PRNP e a resistência/susceptibilidade ao scrapie, é necessário saber a estrutura populacional e o grau de variabilidade existente nas diferentes raças, genotipando a 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^{Sc} nos diferentes genótipos, também é essencial para se começar qualquer programa de controle (SOTOMAIOR, 2007).

Vale ressaltar, também, que qualquer programa de seleção deve ser conduzido de forma gradual, cominando a manutenção de variabilidade genética, adaptação e produção com a resistência a doenças (Sotomaior et al., 2008).

5 CONCLUSÕES

Não foi observada presença de PrP^{Sc} na análise imunohistoquímica de amostras de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal de 42 ovelhas após 5 anos da introdução destes animais em propriedade onde houve casos de scrapie.

Amostras 2 a 3cm² de tecido linfóide, obtidas em biópsias retais, foram suficientes para as análises de IHQ, porém houve necessidade de treinamento prévio. Não foram observadas intercorrências relevantes durante a biópsia, como sangramentos persistentes ou dificuldades de acesso ao tecido.

Foram encontrados três genótipos do PRNP nas 42 amostras analisadas: ARQ/ARQ (73,81%), ARR/ARQ (16,67%) e ARQ/VRQ (9,52%).

No rebanho avaliado, não foi possível estabelecer relação entre genótipo e susceptibilidade ao scrapie, em função de não haver animais positivos para a presença da PrP^{Sc}.

6 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**, 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**, v. 15, pp. 413-422, 1991.

ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; KEULEN, L. van; SCHELCHER, F.; ELSEIN, J.M.; LANTIER, F. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. **Journal of General Virology**, 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**, v. 76, p. 509-517, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 02 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, de 04 abri. 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**, 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**, v. 142, p. 623-625, 1998.

DRIEMEIER, D., 1998. **Scrapie**. In: Riet-Correa, Franklin., Schild, Ana Lucia., Méndez, Maria C. (Eds.), *Doenças em Ruminantes e Equinos*, first ed. Pelotas Editora e Gráfica Universitária, pp. 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** 4(11): e7970, 2009.

ELSEIN, J.M.; AMIGUES, Y.; SCHELCHER, F.; DUCROCQ, V.; ANDREOLETTI, O. EYCHENNEM, F.; TIEN KHANG, J.V.; POIVEY, J.P.; LANTIER, F.; LAPLANCHE, J.L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. **Archives of Virology**, v. 144, p. 431-445, 1999.

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^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. **Journal of Comparative Pathology**, 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**, 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**, 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**, 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**, 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**, 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**, 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**, 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**, v.20, p.203-208, 2008b.

GROSCHUP, M. An overview of diagnostic tests for prion disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006.

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**, v. 13, p. 1201-1207, 2007.

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

HUNTER, N. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 331-334, 1997.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; FOSTER, J.D.; CAIRNS, D.; SMITH, G. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. **Veterinary Record**, 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**, v. 140, p. 59-63, 1997b.

HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BELTRÁN de HEREDIA, I.; BARANDIKA, J.; SANZ-PARRA, A.; BERRIATUA, E.; JUSTE, R.A. Genetic susceptibility to scrapie in a population of Latxa breed in the Basque Country, Spain. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 255-259, 2002.

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**. Article in press.

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**, 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**, 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**, v. 151, p. 2095-2101, 2006.

LEAL, J.S. **Biópsia da mucosa retal e terceira pálpebra de ovinos e otimização do protocolo de imuno-histoquímica para diagnóstico de PrPsc em ruminantes**. Porto Alegre, 2009. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LEITA, L.; FORNASIER, F.; NOBILI, M. de; BERTOLI, A.; GENOVESI, S.; SEQUI, P. Interactions of prion proteins with soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1638-1644, 2006.

LIMA, A.C.B., BOSSERS, C.E., SOUZA, S.M.P. OLIVEIRA AND OLIVEIRA, D.M. Prp genotypes in a pedigree flock of a Santa Inês sheep. **Veterinary Records**, v.160, p.336-337, 2007.

LÜHKEN, G.; BUSCHMANN, A.; GROSCHUP, M.H.; ERHARDT, G. Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. **Archives of Virology**, v. 149, 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**, 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**, v.124, p.165-171, 2005.

OLLHOFF, R. D. ; SOTOMAIOR, C. S. . Scrapie. Boletim Técnico. **Instituto Biológico**. v. 24, p. 54-60, 2011.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; PARISH, S.M.; KNOWLES, D.P. Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. **Veterinary Record**, 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**, v. 36, n. 6, p. 1750-1755, 1998b.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; BESSER, T.E.; MILLER, J.M.; CUTLIP, R.C.; WELLS, G.A.H.; RYDER, S.J.; PARISH, S.M.; HAMIR, A.N.; COCKETT, N.E.; JENNY, A.; KNOWLES, D.P. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3254-3259, 2000.

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**, 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**, v.42, p.2-8, 2011.

PACHECO, A.C.L., OLIVEIRA, S.M.P., GOUVEIA, M.C., DINI, E.J.R., VASCONCELOS, D.A. VIANA, G.M.S., ROSINHA, R.B., COSTA, R. MAGGIONI AND 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**, 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**, 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 do IV Congresso Latino-Americano de Especialistas em Pequenos Ruminantes e Camelídeos Sul-Americanos**. 2005.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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. Anais. Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul, 1, Campo Grande, p. 89-95, 1996.

RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C. Scrapie. **A Hora Veterinária**, v. 120, p. 15-22, 2001.

RIBEIRO, L.A.O.; PASSOS, D.T.; RODRIGUES, N.C.; WEIMER, T.A.; Scrapie (paraplexia enzoótica) em ovinos no Brasil. **Veterinária em Foco**, 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 (PrP) genotype frequencies. **Preventive Veterinary Medicine**, 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**, 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**, v. 49, n. 8, p. 415-418, 2002.

SOTOMAIOR, C.S.; **Polimorfismo do gene da proteína prion celular (PrPC) e a susceptibilidade/resistência ao scrapie em ovinos no estado do Paraná**. 2007.120p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná.

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**, 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**, v.40: 19, 2009.

VAN KEULEN, L.J.; SCHREUDER, B.E.; MELOEN, R.H.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.; LANGEVELD, J.P. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1228-1231, 1996.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços conquistados com a possibilidade de diagnósticos mais precoces da presença da PrP^{Sc}, associados à possibilidade de direcionamento nos cruzamentos para aumentar a resistência dos animais, tem diminuído a incidência do scrapie em alguns países.

No Brasil, ainda que haja poucas notificações de scrapie, considera-se que a situação do controle de todas as encefalopatias espongiformes transmissíveis é essencial para a comercialização dos produtos de origem animal, tanto a partir de rebanhos de pequenos ruminantes, quanto de bovinos.

A possibilidade de implementação de programas de seleção genética de animais resistentes ao scrapie poderia ser uma importante ferramenta para impedir a disseminação da doença em rebanhos de ovinos e caprinos nas diferentes regiões do Brasil.

Este trabalho traz a perspectiva de ainda possibilitar um estudo de associação entre diferentes genótipos e a presença da PrP^{Sc}, desde que o rebanho continue a ser acompanhado com biópsias retais. Todos os estudos que auxiliem na compreensão e entendimento das vias de infecção, disseminação e controle do scrapie são importantes para o desenvolvimento desta área de pesquisa no Brasil.