

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**HELEN CAROLINE RAKSA**

**DIAGNÓSTICO DE SCRAPIE ANTE E POST MORTEM EM OVINOS E  
CAPRINOS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS**

*(Ante and post mortem diagnosis in sheep and goats with monoclonal and polyclonal antibodies)*

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS  
2013**

**HELEN CAROLINE RAKSA**

**DIAGNÓSTICO DE SCRAPIE ANTE E POST MORTEM EM OVINOS E  
CAPRINOS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS**

*(Ante and post mortem diagnosis in sheep and goats with monoclonal and polyclonal antibodies)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Santos Sotomaior

Coorientador: Prof. Dra. Michele Dietrich Moura Costa

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS  
2013**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	vii
<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	viii
<b>RESUMO GERAL.....</b>	ix
<b>ABSTRACT.....</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	xii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xiv
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	3
2.1 PRION.....	3
2.2 PATOGENIA.....	6
2.3 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA.....	7
2.4 DIAGNÓSTICO DO SCRAPIE CLÁSSICO.....	8
<b>2.4.1 Diagnóstico <i>ante mortem</i> do scrapie.....</b>	10
<b>2.4.2 Scrapie Atípico.....</b>	12
<b>2.4.3 Testes rápidos.....</b>	13
<b>2.4.4 Diagnóstico no Brasil.....</b>	14
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3 NÚMERO DE FOLÍCULOS LINFÓIDES EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA RETAL DE OVINSO E CAPRINOS EM DUAS COLHEITAS SEGUIDAS....</b>	16
Resumo.....	16
Abstract.....	17
3.1 INTRODUÇÃO.....	18
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
<b>3.2.1 Seleção dos animais e colheitas de amostra.....</b>	19
<b>3.2.2 Técnicas histológicas.....</b>	20
<b>3.2.3 Análise estatísticas.....</b>	21
3.3 RESULTADOS .....	22
<b>3.3.1 Localização correta.....</b>	22
<b>3.3.2 Número de Folículos Linfóides.....</b>	22
<b>3.3.3 Influência da idade na adequação das amostras.....</b>	26
<b>3.3.4 Amostras com indícios de colheita anterior.....</b>	27
3.4 DISCUSSÃO.....	28
3.5 CONCLUSÃO.....	31

<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>4 UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS PARA DIAGNÓSTICO DE SCRAPIE.....</b>	<b>32</b>
Resumo.....	32
Abstract.....	33
4.1 INTRODUÇÃO.....	34
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
<b>4.2.1 Imunohistoquímica.....</b>	<b>35</b>
4.2.1.1 Amostras.....	35
4.2.1.2 Anticorpos.....	36
4.2.1.3 Protocolo de imunohistoquímica.....	36
<b>4.2.2 Western Blot.....</b>	<b>37</b>
4.2.2.1 Amostras.....	37
4.2.2.2 Preparação dos extratos protéicos.....	38
4.2.2.3 Protocolo de Western Blotting.....	38
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
<b>4.3.1 Imunohistoquímica.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.2 Western Blot.....</b>	<b>46</b>
4.4 CONCLUSÃO.....	47
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

*À Deus pela força e determinação, a qual me acompanha sempre,  
Aos meus pais, minha irmã e minha família,  
Aos amigos e a todos que participam da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que trilhou meus rumos e me deu a oportunidade de concluir o Mestrado em Ciência Animal.

Aos meus pais, Dorival e Elenir, que me deram a vida e possibilitaram a realização de mais esse sonho, sempre me apoiando com imenso carinho e amor.

A minha irmã, Vivian, pela força, amizade e exemplo de dedicação.

A minha família e meus amigos, principalmente ao Rodrigo por sempre estar me apoiando.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Cristina e a minha coorientadora Prof. Dra. Michele Dietrich da Costa, pela atenção, paciência e conhecimento transmitido.

Ao Animal Health Veterinary Laboratory Agency, em especial ao Lorenzo González, pela oportunidade de conhecer o laboratório, o trabalho realizado, além do imenso conhecimento transmitido.

Ao Laboratório de Patologia da UFRGS, em especial ao Prof. David Driemeier e doutoranda a Caroline Andrade, por abrirem as portas do laboratório para a realização de parte da pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos do estudo realizado.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

Os capítulos 3 a 4 são artigos em diferentes estágios de publicação em periódicos científicos.

O Capítulo 5 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

Scrapie é uma doença que acomete ovinos e caprinos, sendo caracterizada pelo acúmulo de uma isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>) no Sistema Nervoso Central (SNC) e em tecidos linfóides. A presença da PrP<sup>Sc</sup> também em tecidos do Sistema Linforreticular (SLR) indica que esta forma patogênica pode ser detectada em amostras de biópsia de tonsila, terceira pálpebra e mucosa retal. O presente estudo teve como objetivo avaliar a correta localização e quantidade do tecido linfóide associado à mucosa retal para posterior diagnóstico *ante mortem* da doença, comparar a eficácia dos anticorpos monoclonais F99/97.6.1, F89/160.1.5 e P4 e os anticorpos policlonais R486 e M52 na utilização da técnica de imunohistoquímica (IHQ) para diagnóstico de scrapie com amostras de tecido linfóide e sistema nervoso, além de testar a técnica de Western Blot (WB) com o anticorpo M52 para identificação da PrP<sup>C</sup> em encéfalo e tecido linfóide. Foram colhidas amostras de mucosa retal de 56 ovinos e 32 caprinos em duas etapas. Na primeira, todos os animais foram submetidos a colheitas no dia 0 e, para a segunda, os animais foram divididos em grupos e as colheitas foram em datas diferentes: para ovinos 7, 14, 21 e 28 dias após a primeira colheita e, para caprinos, 14, 21 e 28 dias após a primeira colheita. As amostras foram submetidas às técnicas histológicas, para avaliação da correta localização e quantidade de folículos linfóides (FL) na mucosa retal. Para os experimentos de IHQ, foram analisadas amostras positivas e negativas de cérebro e tonsila palatina de ovinos, cedidas pelo Animal Health Veterinary Laboratory Agency (AHVLA), Reino Unido, e, para WB, foram utilizadas amostras de encéfalo, baço, linfonodo, terceira pálpebra e mucosa retal de ovino. A leitura microscópica revelou que 86% das 176 amostras de mucosa retal, de ambas as espécies, foram colhidas no local adequado. Na comparação do número de FL, dos mesmos animais, entre a primeira e segunda colheita, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre os dias 0 e 7, para os ovinos, e entre o grupo dos dias 0 e 28, para os caprinos. Comparando as duas espécies, não houve diferença significativa no número de FL em todas as datas avaliadas ( $p > 0,05$ ). As análises IHQ utilizando anticorpos monoclonais e policlonais em amostras positivas de cérebro confirmaram a deposição da PrP<sup>Sc</sup> em neurônios, caracterizada por marcações de aspecto granular intraneural. Na amostra negativa de cérebro, os anticorpos monoclonais não apresentaram marcações positivas, mas os anticorpos policlonais apresentaram. Testando a amostra positiva de tonsila palatina com os anticorpos monoclonais e policlonais, identificaram-se marcações positivas e, com a amostra negativa, não se observaram marcações com nenhum dos anticorpos, porém o monoclonal P4 e os policlonais ocasionaram background. Na técnica de WB, o anticorpo M52 foi capaz de reconhecer a PrP<sup>C</sup> presente em grande quantidade no encéfalo de ovinos. Observou-se, também, uma marcação tênue no baço, porém, nas amostras de 3ª pálpebra e linfonodo, nenhuma marcação foi observada. Na amostra de mucosa retal, uma marcação com massa de aproximadamente 50 kDa foi observada. Conclui-se com os experimentos de biópsia retal que é necessária a avaliação histológica prévia de amostras de biópsia retal, para verificação do número de FL, antes da realização do diagnóstico por IHQ e que, após 14 dias da colheita anterior, é possível submeter os animais ao mesmo procedimento, sem alterações significativas no número de FL. Os testes com diferentes anticorpos revelaram que a utilização dos

anticorpos policlonais é inviável, pois o resultado da análise pode ser dado como falso positivo. A utilização do anticorpo M52 para identificação da PrP<sup>C</sup> em amostra de encéfalo e baço, através da técnica de western blot, mostrou-se eficiente, mas em tecidos do sistema linfóide a PrP<sup>C</sup> não foi identificada.

**Palavras-chave:** Scrapie. Ovinos. Anticorpos. Folículos Linfóides. Biópsia retal.

## ABSTRACT

Scrapie is a disease that affects sheep and goats, and that is characterized by the accumulation of an abnormal isoform (PrP<sup>Sc</sup>) of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) in the central nervous system (CNS) and in lymphoid tissues. The presence of PrP<sup>Sc</sup> in tissue of the Lymphoreticular System (LRS) also suggests that it can be detected in samples of tonsil, third eyelid and rectal mucosa biopsy. The objective of this study was to evaluate the amount and exact location of lymphoid tissue associated with the rectal mucosa to *ante mortem* disease diagnosis, to compare the efficacy of monoclonal antibodies F89/160.1.5, F99/97.6.1 and P4 and polyclonal antibodies M52 and R486, for the detection of PrP<sup>Sc</sup> in lymphoid and CNS tissue samples by immunohistochemistry (IHC). In addition, the ability of M52 antibody for the identification of PrP<sup>C</sup> by WB was also tested. Rectal mucosa samples were collected from 56 sheep and 32 goats in two steps. In the first step, on day 0, all animals were tested and, for the second step, the animals were divided into groups and each group was subjected to collection on different dates: for sheep 7, 14, 21 and 28 days after the first one and, for goats, on day 14, 21 and 28. The samples were subjected to histological techniques to assess the number of lymphoid follicles (LF) and the correct location of samples. In these experiments, IHC positive and negative control samples of brain and tonsil of sheep were provided by the Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA, UK). For WB, samples of brain, spleen, lymph node, third eyelid and rectal mucosa of sheep were tested. From both sheep and goats, 86% of the 176 samples were collected from the appropriate place. Comparing the number of LF of the same animals between the first and second collections, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) only between days 0 and 7 for sheep and days 0 and 28 for goats. There was no significant difference in the number of FL assessed on all dates when comparing the different species ( $p > 0.05$ ). The IHC examinations with monoclonal and polyclonal antibodies confirmed granular deposition of PrP<sup>Sc</sup> in neurons of positive control tissues. However, while monoclonal antibodies did not produce positive reactions in negative controls, polyclonal antibodies gave some non-specific staining. Testing of positive control tonsil samples with polyclonal and monoclonal antibodies identified positive specific reactions, while negative control tissues were IHC negative with all antibodies, although P4 and polyclonal antibodies produced some background staining. In WB, antibody M52 was able to recognize PrP<sup>C</sup> present in large quantities in the brain of sheep, and to a lesser extent in the spleen, while samples of third eyelid and lymph node were negative. Samples of rectal mucosa gave a positive band of a mass of approximately 50 kDa. These data demonstrate the importance of a histological evaluating of the rectal biopsy samples, to check the number of FL, before performing the diagnosis by immunohistochemistry, and that after 14 days from the previous collection, animals can undergo the same procedure without significant changes in the number of lymphoid follicles. Tests with different antibodies revealed that the use of polyclonal antibodies is not advised because of false positive reactions. While antibody M52 was able to identify PrP<sup>C</sup> in brain and spleen by WB, other lymphoid tissues were negative.

**Keywords:** Scrapie. Sheep. Antibodies. Lymphoid follicles. Rectal biopsy.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob
EEB	Encefalopatia Espongiforme Bovina
EET	Encefalopatia Espongiforme Transmissível
FL	Folículo Linfóide
HE	Hematoxilina eosina
IHQ	Imunohistoquímica
PrP <sup>C</sup>	Proteína Priônica Celular
PrP <sup>Sc</sup>	Proteína Priônica Celular Alterada
RAMALT	<i>Recto-anal Mucosa Associated Lymphoid Tissue-</i> Tecido linfóide associado à mucosa retal
SNC	Sistema Nervoso Central
WB	Western Blot

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
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.....	14
Tabela 2. Comparação entre a porcentagem de amostras de mucosa retal de ovinos que apresentaram número $\geq 3$ de folículos linfóides (FL), e os valores de $\chi^2$ calculado e $\chi^2$ tabelado na primeira e segunda colheitas.....	24
Tabela 3. Comparação entre a porcentagem de amostras de mucosa retal de caprinos que apresentaram número $\geq 3$ de folículos linfóides (FL), e os valores de $\chi^2$ calculado e $\chi^2$ tabelado na primeira e segunda colheita.....	25
Tabela 4. Comparação entre a porcentagem de amostras de mucosa retal de ovinos e caprinos que apresentaram número $\geq 3$ de folículos linfóides (FL) e os valores de $\chi^2$ calculado e $\chi^2$ tabelado.....	25
Tabela 5. Número e porcentagem dos 51 ovinos e dos 31 caprinos, com amostras colhidas do local adequado, primeira colheita, com as idades: 1 a 2 anos, 3 a 4 anos e com $>$ de 4 anos.....	26
Tabela 6. Número de amostras de mucosa retal que apresentaram reação inflamatória, tecido de granulação, reação inflamatória + tecido de granulação ou reepitelização, nos dias de colheita: 7, 14, 21 e 28, para ovinos, e nos dias 14, 21 e 28, para caprinos.....	27

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Estrutura conformacional da proteína priônica .....	4
Figura 2. A proteína modificada pode ter três mecanismos de origem: infeccioso, hereditário ou espontâneo, e a partir da presença da forma anormal PrP <sup>Sc</sup> , outras formas de PrP <sup>C</sup> são convertidas, propagando a doença.....	5
Figura 3. (A) Amostra de biópsia de terceira pálpebra de um ovino. Imunomarcção em folículos linfóides com acúmulo de PrP <sup>Sc</sup> em linfócitos, macrófagos e células dendríticas com uma margem escura. (B) Amostra de tronco cerebral com presença de PrP <sup>Sc</sup> . Imunomarcção ao redor dos neurônios (seta grande), das placas no neurópilo (setas médias), e agregações em torno de células gliais com núcleos hiper cromáticos (setas pequenas) .....	6
Figura 4. Acúmulo de PrP <sup>Sc</sup> (vermelho) dentro de um núcleo do tronco cerebral com lesões espongiiformes, que consistem em espongiose do neurópilo (ponta de setas pequena) e vacúolos intraneuronais (ponta de seta grande). Imunomarcção granular dentro do neurópilo e em torno da periferia de vacúolos intraneuronais (ponta de seta grande).....	9
Figura 5. Membrana nictante de um ovino Suffolk. O tecido linfóide é visualizado da área vermelha para a rosa (seta inferior). Área submetida anteriormente a biópsia de terceira pálpebra (seta superior). O tecido linfóide neste local não se regenera.....	10
Figura 6. Mucosa retal de ovino. A flecha indica o local correto para colheita de amostras de tecido linfóide associado a mucosa retal.....	11
Figura 7. Área correta para colheita de mucosa retal (flecha) de ovino (A) e caprino (B) submetidos à técnica de biópsia retal.....	20

Figura 8. Cortes histológicos, corados com Hematoxilina-eosina (HE), de amostras de biópsia retal de ovinos. (A) Amostra inadequada, presença de epitélio pavimentoso estratificado (flechas) característico do canal anal. Aumento de 100x. (B) Amostra adequada, contendo mucosa e submucosa (flechas), com presença de folículos linfóides. Aumento de 100x.....	22
Figura 9. Porcentagem de amostras de mucosa retal de ovinos, obtidas por meio de biópsia retal, segundo o número de folículos linfóides (FL) e dias de colheita.....	23
Figura 10. Porcentagem de amostras de mucosa retal de caprinos, obtidas por meio de biópsia retal, segundo o número de folículos linfóides (FL) e dias de colheita.....	24
Figura 11. Quantidade de amostras que apresentaram $\geq 3$ FL segundo a idade dos animais. (A) ovinos (B) caprinos.....	27
Figura 12. Amostra de medula/obex de um ovino positivo para PrP <sup>Sc</sup> testada com diferentes anticorpos. (A) Teste com o anticorpo F99. As flechas indicam neurônios com marcações granulares característica da deposição de PrP <sup>Sc</sup> , obj. 20x. (B) Teste com o anticorpo F89. Flechas indicam marcações intraneurais, obj. 20x. (C) Teste com o anticorpo P4. Flechas indicam marcações positivas discretas, obj. 20x. (D) Teste com o anticorpo R486. Neurônios com marcações positivas (flechas) porém com background intenso (ponta de flecha), obj. 20x. (E) Teste com o anticorpo M52. Positividade intraneural indicada pelas flechas, obj. 20x.....	40

- Figura 13. Amostra negativa para PrP<sup>Sc</sup> de mesencéfalo de ovino submetida à técnica de imunohistoquímica com diferentes anticorpos. (A) Teste com o anticorpo F99, amostra sem marcações (flecha), obj. 20x. (B) Teste com o anticorpo F89, amostra sem marcações (flecha), obj. 20x. (C) Teste com o anticorpo P4, amostra sem marcações (flecha), obj. 20x. (D) Teste com o anticorpo R486, marcações características de positividade (ponta de flecha), obj. 20x. (E) Teste com o anticorpo M52, marcações intensas características de amostra positiva (ponta de flecha), obj. 20x ..... 42
- Figura 14. Amostra positiva de tonsila palatina de ovino. (A) Teste com o anticorpo F99. Marcações de coloração marrom do centro germinativo do FL (flecha), obj. 10x. (B) Teste com o anticorpo F89. Amostra com marcações discretas no centro germinativo do FL (flecha), obj. 10x. (C) Teste com o anticorpo P4. Marcações intensas (flecha), obj. 10x. (D) Teste com o anticorpo R486. Marcações moderadas (flecha), obj. 10x. (E) Teste com o anticorpo M52. Background intenso que dificulta a identificação de positividade (ponta de flecha), obj. 10x..... 43
- Figura 15. Amostra negativa de tonsila palatina de ovino. (A) Teste com o anticorpo F99, amostra negativa e sem background (flecha), obj. 10x. (B) Teste com o anticorpo F89, amostra sem marcações (flecha), obj. 10x. (C) Teste com o anticorpo P4, amostra negativa com background (flecha), obj. 10x. (D) Teste com o anticorpo R486, amostra negativa com background (flecha), obj. 10x. (E) Teste com o anticorpo M52, presença apenas de background (flecha), obj. 10x..... 45

Figura 16. Das cinco amostras de ovino testadas no experimento (encéfalo (1), baço (2), mucosa retal (3), 3ª pálpebra (4) e linfonodo (5) apenas foram observadas bandas nas amostras de baço, cérebro e mucosa retal, de ovinos. Utilizado o anticorpo primário policlonal anti-PrP<sup>C</sup> M52 na diluição de 1:500 e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na diluição 1:4000. A banda da mucosa retal apresentou peso molecular de aproximadamente 50 kDa e as bandas de baço e encéfalo entre 35 kDa. As amostras de linfonodo e 3ª pálpebra não apresentaram marcações..... 48

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

As doenças priônicas, também conhecidas como Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET), são desordens neurodegenerativas, progressivas e com longos períodos de incubação (Prusiner, 2004). Estas doenças são associadas ao acúmulo da isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>) no Sistema Nervoso Central (SNC), e as lesões histológicas que compreendem vacuolização, perda neural e astrocitose (Jeffrey e González, 2007). Neste grupo de doenças enquadram-se a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) nos bovinos, Scrapie nos ovinos e caprinos, a Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) em humanos, entre outras (Prusiner, 1998).

Scrapie, também conhecido como Paraplexia Enzoótica ou Tremor Epizoótico, é conhecido na Europa desde 1732 (Prusiner, 1982), sendo a primeira EET identificada em animais. Tem sido relatado em diversos países criadores de ovinos, exceto na Austrália e Nova Zelândia (Sargison, 1995; Dawson et al., 2008; OIE, 2009).

A doença normalmente acomete ovinos de dois a cinco anos de idade (OIE, 2009) e o período de incubação é bastante variável, de um a sete anos (Espinosa et al., 2004). Em condições naturais, a infecção pelo agente PrP<sup>Sc</sup> 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).

Os sinais clínicos do scrapie podem durar de duas semanas a seis meses e muitas vezes começam com o comportamento incomum e extremas reações nervosas a estímulos, como o contato humano (Dickinson, 1976). Em seguida, avançam para prurido, falta de coordenação motora e condição física deficiente, com perda de peso progressiva, apesar de o animal continuar se alimentando (Cockcroft e Clark, 2006; OIE, 2009; Ollhoff e Sotomaior, 2011).

As técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e western blot (WB) são metodologias empregadas na detecção da PrP<sup>Sc</sup>, sendo consideradas técnicas específicas, sensíveis e confiáveis para o diagnóstico do scrapie (Prusiner et al., 2004). A presença da PrP<sup>Sc</sup>

em cérebro de animais com scrapie é importante para confirmar o diagnóstico clínico, porém a presença da PrP<sup>Sc</sup> no sistema linfóide tem possibilitado o diagnóstico *ante mortem* da doença. O acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> em tecidos linfóides levou ao desenvolvimento de procedimentos de biópsia para o diagnóstico de scrapie, utilizando tecidos acessíveis, tais como amígdala (Jeffrey et al., 2001), terceira pálpebra (O'Rourke et al., 1998) e mucosa retal (González et al., 2008).

O scrapie em ovinos é uma doença infecciosa, na qual a susceptibilidade genética tem um papel importante. Polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do gene da proteína priônica celular (PRNP) influenciam no aparecimento da doença (Goldmann et al. 1990; Hunter et al., 1997). Alguns países têm utilizado programas de seleção genotípica para reduzir os casos da doença clínica, devido ao importante papel que susceptibilidade genética tem sobre a doença.

No Brasil, a doença foi introduzida pela importação, em 1978, de ovinos Hampshire Down provenientes de rebanhos infectados da Inglaterra (Fernandes et al., 1978), mas o caso ocorrido em 2003 no Paraná, no setor de Ovinocultura da PUC-PR, foi considerado o primeiro caso autóctone do Brasil (Pohl de Souza et al., 2005). O scrapie é de notificação compulsória e sua suspeita ou ocorrência devem ser imediatamente informadas à autoridade de defesa sanitária animal de quaisquer das instâncias. O diagnóstico dos animais suspeitos é realizado através da prova de IHQ em amostras de tecido nervoso ou linfóide, ou por meio de outras técnicas diagnósticas e metodologias aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2008).

O objetivo desta dissertação é avaliar a correta localização e quantidade do tecido linfóide associado à mucosa retal, obtida em biópsias retais, para posterior diagnóstico *ante mortem* da presença da PrP<sup>Sc</sup>. Objetiva-se, também, por meio da utilização da técnica de IHQ, com amostras de tecido linfóide e sistema nervoso, comparar a eficácia dos anticorpos monoclonais F99/97.6.1, F89/160.1.5e P4, e os anticorpos policlonais R486 e M52 para diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos. Por fim, testar a técnica de WB com o anticorpo M52 para identificação da presença da PrP<sup>C</sup> em encéfalo e tecido linfóide.

## CAPÍTULO 2

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 PRION

Prion é o termo que foi escolhido por Prusiner (1982) para descrever o agente de natureza proteínica e infecciosa, que se refere ao estado conformacional anormal ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) da proteína priônica celular ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), causador de doenças.  $\text{PrP}^{\text{C}}$  é uma sialoglicoproteína, localizada na superfície da célula via âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Prusiner et al., 1998) e possui 33-35 kDa (Hunter, 1997). É produto de um único gene denominado PRNP (Prusiner, 1998), sendo constituída por aproximadamente 250 aminoácidos, que podem variar dependendo da espécie (Hunter, 1997).

$\text{PrP}^{\text{C}}$  é uma proteína expressa em diversos tecidos:

- no sistema nervoso central, com a quantidade variando de acordo com as diferentes regiões e com os subtipos celulares (Wecheselberger et al., 2002);
- em neurônios, onde pode se acumular em membranas pré e pós sinápticas (Prusiner, 1998);
- no sistema imunológico, em órgãos como tonsila e baço (Wecheselberger et al., 2002);
- também na medula óssea, sangue, em tecidos periféricos e, em menor quantidade, é expressa no coração, rins e fígado (Wecheselberger et al., 2002).

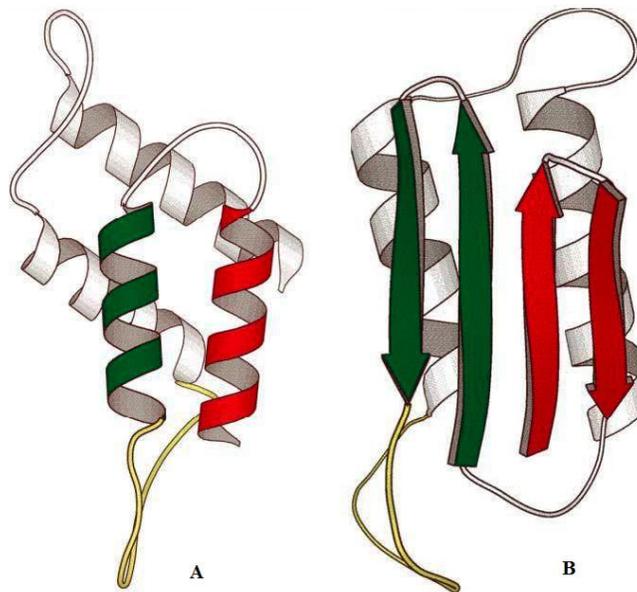
$\text{PrP}^{\text{C}}$  possui diversas funções fisiológicas, dentre elas a participação no amadurecimento e formação dos prolongamentos dos neurônios, proteção contra morte celular programada (apoptose), participação na formação da memória, modulação da resposta imune às inflamações e na proteção das células do coração contra agressão química (Linden et al., 2008). Demonstrou-se também que  $\text{PrP}^{\text{C}}$  possui função no metabolismo do cobre, pois ligada a este metal tem um papel importante na proteção celular aos danos causados por radicais livres (Wong et al., 1999).

A forma normal e a patogênica apresentam a mesma sequência primária, sendo que a conversão de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  para  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  representa uma alteração exclusivamente

conformacional (Harris, 1999). PrP<sup>C</sup> é convertida em PrP<sup>Sc</sup> através de um processo pelo qual uma parte da  $\alpha$ -hélice é redobrada em  $\beta$ -folha. A PrP<sup>C</sup> possui 42% de  $\alpha$ -hélice e somente 3% de  $\beta$ -folha, enquanto a PrP<sup>Sc</sup> implica no aumento de estruturas  $\beta$ -folheadas (43%) e redução da conformação  $\alpha$ -hélice (30%) (Pan et al., 1993) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura conformacional da proteína priônica

- A) PrP<sup>C</sup> com predominância de  $\alpha$ -hélice
- B) PrP<sup>Sc</sup> com predominância de  $\beta$ -folha



Fonte: [http://www.sussex.ac.uk/Users/ctf20/dphil\\_2005/Thesis/Chapter1/prions.htm](http://www.sussex.ac.uk/Users/ctf20/dphil_2005/Thesis/Chapter1/prions.htm)

PrP<sup>Sc</sup> quando em contato com PrP<sup>C</sup> atua na conversão da estrutura conformacional da PrP<sup>C</sup> que, assim, exerce o papel de substrato na replicação da PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1982). A “Hipótese do Prion” sugere que a forma patogênica é capaz de induzir a mudança conformacional da proteína celular normal para a forma PrP<sup>Sc</sup> (McKintosh et al. 2003).

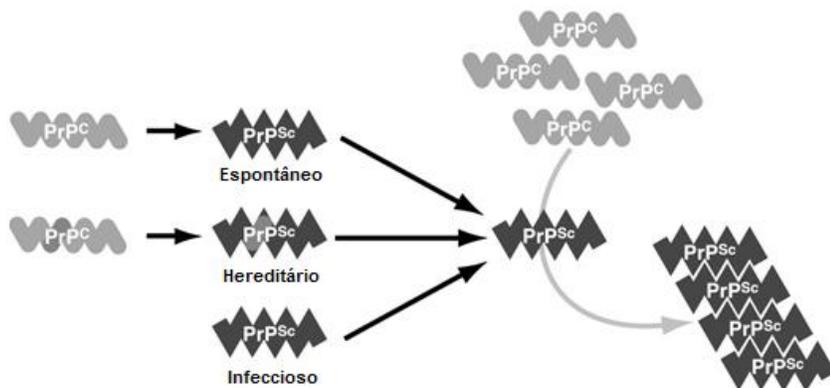
Segundo Hunter (1997), em ovinos, a proteína produzida pelo alelo ligado à maior susceptibilidade ao scrapie (VRQ), pode ser convertida facilmente à PrP<sup>Sc</sup>, o que resulta no rápido aparecimento da doença. Em contraste, o alelo associado com a

maior resistência (ARR), pode produzir uma forma de PrP<sup>C</sup> que não se converte ou faz isso com extrema dificuldade.

A forma patogênica possui características diferentes da forma normal. A PrP<sup>Sc</sup> é uma proteína hidrofóbica, com 27 a 30 kDa, constituída por uma única cadeia polipeptídica de 250 aminoácidos (Hunter, 1997). A mudança conformacional associada à PrP<sup>Sc</sup> confere resistência à digestão por proteinase, sendo esta uma importante diferença entre PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup> (Heggebo et al., 2003). Além disso, PrP<sup>Sc</sup> é insolúvel em detergentes (Caughey et al., 1991) e não pode ser inativada pelo uso de formaldeído, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), proteases (tripsina, pepsina), nucleases, radiação ultravioleta e radiação ionizante (Espinosa et al., 2004). Segundo Johnson et al. (2006), o ambiente, uma vez contaminado, pode permanecer pelo menos 3 anos infectivo, pois existe uma forte interação do prion com o solo.

As EET podem ter três mecanismos de origem: infeccioso, hereditário ou espontâneo (Figura 2), e todos envolvem modificações da PrP<sup>C</sup>. No caso do scrapie clássico, para o animal se infectar, há a necessidade da infecção via oral pela proteína alterada, mesmo que os diferentes genótipos do animal possam interferir na velocidade da conversão da PrP<sup>C</sup> para PrP<sup>Sc</sup> (Stevens et al., 2009). No entanto, em casos de scrapie atípico, acredita-se que este poderia ser resultado de mecanismos espontâneos (Benestad et al., 2003).

Figura 2: A proteína modificada pode ter três mecanismos de origem: infeccioso, hereditário ou espontâneo e, a partir da presença da forma anormal PrP<sup>Sc</sup>, outras formas de PrP<sup>C</sup> são convertidas, propagando a doença.



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

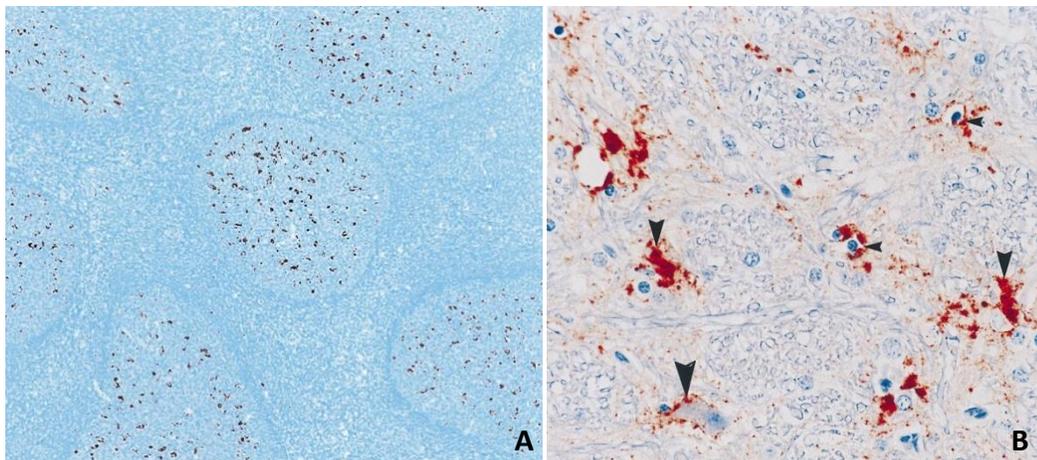
## 2.2 PATOGENIA

Scrapie é definido pelo acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> no SNC e que também que pode ser detectada em outros tecidos, tais como no sistema linforreticular (LRS) e variavelmente em outros tecidos e fluidos corporais (OIE, 2009).

Em condições naturais, a infecção pelo agente do scrapie acontece após uma infecção via oral e, na fase precoce da doença, há detecção da PrP<sup>Sc</sup> em tecidos linfóides da orofaringe (amígdalas) e intestino (placas de Peyer), assim como no baço e em linfonodos de drenagem, sugerindo que a replicação primária do agente infeccioso ocorre nestes tecidos. A replicação no intestino e órgãos linfóides geralmente se desenvolve por vários meses, até mesmo anos, antes de atingir o SNC (Andreoletti et al., 2000).

A replicação secundária ocorre no cérebro e na medula espinhal (Hadlow et al, 1982; Kimberlin, 1990). Em nível celular, a replicação da PrP<sup>Sc</sup> em tecidos linfóides correlaciona-se com a presença de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> em macrófagos e células dendríticas foliculares (Van Keulen et al., 1996). A infecção do SNC é caracterizada por acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> em astrócitos e neurônios (Van Keulen et al., 1995) (Figura3).

Figura 3: (A) Amostra de biópsia de terceira pálpebra de um ovino. Imunomarcação em folículos linfóides com acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> em linfócitos, macrófagos e células dendríticas com uma margem escura. (B) Amostra de tronco cerebral com presença de PrP<sup>Sc</sup>. Imunomarcação ao redor dos neurônios (seta grande), das placas no neurópilo (setas médias), e agregações em torno de células gliais com núcleos hipercromáticos (setas pequenas).



Fonte: (A) O'Rourke et al. (2002); (B) O'Rourke et al. (1998)

Na fase clínica da doença, Andreolètti et al. (2000) encontraram relação entre o acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> no sistema linfóide com o genótipo do animal, ou seja, o genótipo do hospedeiro tem importante papel na patogenia do prion. Foi detectada PrP<sup>Sc</sup> tanto nos tecidos linfóides, quanto no SNC, para os animais VRQ/VRQ, enquanto nos ovinos VRQ/ARR, a PrP<sup>Sc</sup> foi encontrada apenas no SNC.

Anteriormente, fluidos corporais como sangue, fezes, urina, sêmen e saliva eram considerados como não contagiosos (Detwiler e Baylis, 2003). Porém, recentemente, dados de Maddison et al. (2010) demonstram que o agente infeccioso está presente em amostras de swab bucal de ovinos com genótipo VRQ/VRQ, durante estágio pré-clínico do scrapie. Konold et al. (2008) e Maddison et al. (2009) indicam a presença de PrP<sup>Sc</sup> no leite, durante as fases iniciais da progressão da doença, e questionaram um papel para o leite, na transmissão do agente infeccioso. Houston et al. (2008), em experiências de transfusão de sangue, observaram que o scrapie pode ser transmitido entre ovelhas por transfusão de sangue, utilizando-se volumes semelhantes aos utilizados para transfusões em humanos.

## 2.3 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

O scrapie em ovinos é uma doença infecciosa, na qual a susceptibilidade genética tem um papel importante. Polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do gene da proteína priônica celular (PRNP) influenciam no aparecimento da doença (Goldmann et al. 1990; Hunter et al., 1997). No códon 136, o aminoácido pode ser valina (V) ou alanina (A); no códon 154, arginina (R) ou histidina (H); e, no códon 171, arginina (R), glutamina (Q) ou histidina (H) (Hunter, 2003). 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).

Os genótipos VRQ/VRQ e VRQ/ARQ são associados com aumento da susceptibilidade e também com acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> na periferia de tecidos linfóides durante o período de incubação (Andreolètti et al., 2000). O alelo ARR está associado à resistência à doença, porém Groschup et al. (2007) relataram casos comprovados de

animais ARR/ARR infectados. As demais combinações alélicas apresentam diferentes níveis de susceptibilidade (Dawson et al., 1998). 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 (Dawson et al., 1998; Vaccari et al., 2009).

Alguns países estão utilizando programas de seleção genotípica para reduzir os casos da doença clínica. Segundo Roden et al. (2006), as estratégias se baseiam em reduzir a frequência do alelo VRQ e aumentar a frequência do alelo ARR, associado ao menor risco da doença.

## 2.4 DIAGNÓSTICO DO SCRAPIE CLÁSSICO

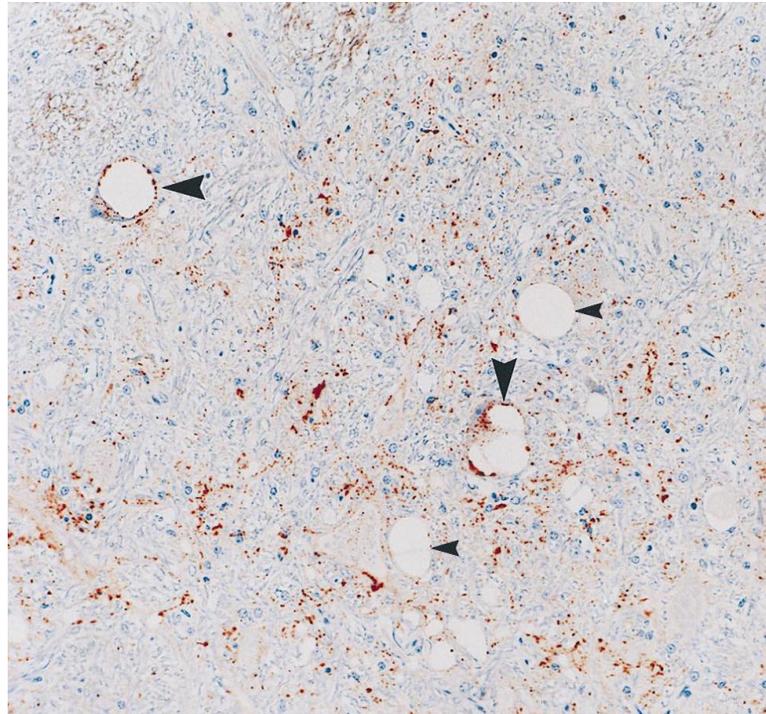
Na histopatologia, as alterações morfológicas no SNC compreendem principalmente vacuolização de corpos celulares neuronais e do neurópilo, acompanhadas por uma gliose variável e habitualmente pouco visível (em particular, uma reação astrocítica). As alterações espongiiformes do neurópilo são comumente encontradas no scrapie clássico, mas a distribuição neuroanatômica da vacuolização na substância cinzenta e a proporção da vacuolização do neurópilo e intra-neuronal são altamente variáveis. Tipicamente, as lesões têm uma distribuição bilateralmente simétrica (Ersdal et al., 2003; OIE, 2009).

Existe uma considerável variação no padrão de distribuição da vacuolização e outras alterações, mas as lesões, pelo menos em scrapie clássico, são geralmente mais aparentes no tronco cerebral e frequentemente afetam o núcleo dorsal do nervo vago. A ausência de lesões não é a prova da ausência do scrapie, que pode existir sem sinais clínicos ou alterações morfológicas detectáveis (OIE, 2009). Nestes casos, o diagnóstico deve ser confirmado por métodos mais sensíveis, tais como IHQ e WB (Gavier-Windén et al., 2005), que são as técnicas mais confiáveis para demonstrar a presença da infecção por PrP<sup>Sc</sup>.

A IHQ permite uma avaliação detalhada da localização e das características morfológicas do acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> (González et al., 2003). A técnica identifica a

presença da PrP<sup>Sc</sup> através da imunomarcação nas áreas alvo e com os padrões característicos (Figura 4).

Figura 4: Acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> (vermelho) dentro de um núcleo do tronco cerebral com lesões espongiformes, que consistem em esponjose do neurópilo (ponta de setas pequena) e vacúolos intraneuronais (ponta de seta grande). Imunomarcação granular dentro do neurópilo e em torno da periferia de vacúolos intraneuronais (ponta de seta grande).



Fonte: O'ROURKE et al. (1998)

As amostras utilizadas geralmente são fixadas em formol e, após, é utilizado um pré-tratamento dos tecidos com ácido fórmico e autoclavagem para desmascarar o epítipo e remover a PrP<sup>C</sup> (Van Keulen et al., 1995). Alguns protocolos incluem também a digestão por proteinase K. Uma vasta gama de anticorpos monoclonais e policlonais pode ser utilizada e está comercialmente disponível. Alguns anticorpos podem ser utilizados em diversas espécies, outros têm melhor desempenho em determinadas espécies, e outros são espécie específicos (Gavier Widén et al., 2005). A IHQ também é eficaz para a análise de amostras de tecidos linfóides e pode ser utilizada em estudos de diagnóstico *ante mortem* do scrapie em ovinos (Andréolleti et al., 2000; Van Keulen et al., 1996).

O diagnóstico diferencial do scrapie deve ser feito com doenças que também apresentam sinais como 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, poliencfalomalácea, envenenamento por chumbo, migrações parasitárias no SNC, abscessos cerebrais, Maedi-visna e deficiência de vitamina A (Espinosa et al., 2004).

#### 2.4.1 DIAGNÓSTICO ANTE MORTEM DO SCRAPIE

Em contraste com a EEB, a detecção do PrP<sup>Sc</sup> em tecidos linfóides permite o diagnóstico *ante mortem* do scrapie. A PrP<sup>Sc</sup> pode se acumular nos tecidos linfóides antes de atingir o sistema nervoso e alguns autores têm proposto o uso desse tecido para o diagnóstico *ante mortem* e *post mortem* do scrapie (O'Rourke et al., 2000; Espenes et al., 2006).

O diagnóstico *ante mortem* do scrapie em ovinos foi inicialmente proposto com amostras de biópsia de tonsila (Jeffrey et al., 2001) e terceira pálpebra (O'Rourke et al., 2000) (Figura 5). No entanto, devido às restrições técnicas e metodológicas, incluindo necessidade de pessoal especializado, anestesia geral ou local e o fato do tecido linfóide não se regenerar (O'Rourke et al., 2002), estes métodos não são aplicáveis para testes em larga escala.

Figura 5 Membrana nictante de um ovino Suffolk. O tecido linfóide é visualizado da área vermelha para a rosa (seta inferior). Área submetida anteriormente a biópsia de terceira pálpebra (seta superior).

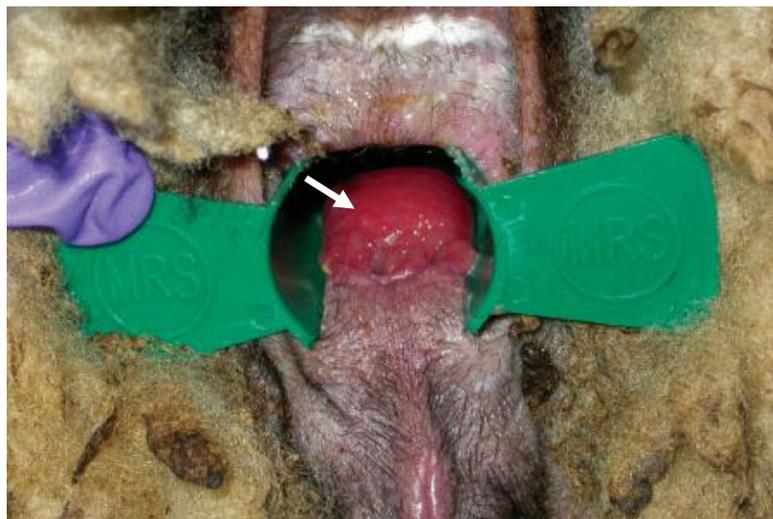


Fonte: O'Rourke et al. (2002)

Van Keulen et al. (1996) identificaram a presença da PrP<sup>Sc</sup> por IHQ no baço, tonsila palatina, linfonodo retrofaríngeo e linfonodos mesentéricos, em 98% dos ovinos com scrapie utilizados em seu estudo. No entanto, a PrP<sup>Sc</sup> em tonsila palatina foi identificada em maior percentagem de folículos linfóides, comparada com o baço e linfonodos, sendo o tecido linfóide mais adequado para diagnóstico *ante mortem*(Van Keulen et al., 1996; O'Rourke et al., 2000).

A descrição de uma grande área de folículos linfóides no intestino grosso dos ovinos, o reto (Aleksandersen et al., 1991), possibilitou a utilização da técnica de biópsia retal, por meio de provas IHQ da presença de PrP<sup>Sc</sup>, para diagnóstico *ante mortem*do scrapie (González et al. 2005; Espenes et al., 2006). Nesse tecido, os folículos são encontrados entre as pregas da mucosa, 2 - 3 cm anterior à linha retoanal (Figura 6) (Aleksandersen et al., 1991).

Figura 6: Mucosa retal de ovino. A flecha indica o local correto para colheita de amostras de tecido linfóide associado a mucosa retal.



Fonte: González et al. (2008)

O procedimento da biópsia retal é simples e rápido, não necessita de instrumentos específicos, sedação ou anestesia geral, e pode ser realizado várias vezes, sem efeitos prejudiciais ao animal. Colher duas amostras de um mesmo animal ou avaliar várias seções da mesma amostra aumenta o número de folículos disponíveis(González et al., 2008); porém, segundo Espenes et al. (2006), não é

aconselhável a colheita de mais de duas amostras por vez de cada animal, pois pode ocorrer leve hemorragia.

Resultados negativos para o tecido linfóide não garantem que ovinos e caprinos estejam livres do scrapie (González et al., 2008). Ovinos que apresentam genótipos menos suscetíveis podem estar em um estágio clínico mais avançado da doença, porém não apresentar acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> nos tecidos linfóides (Van Keulen et al., 1996; Monleon et al., 2005).

A colheita de uma quantidade suficiente de tecido também é uma dificuldade encontrada nas biópsias de tecidos linfóides. A primeira distribuição da PrP<sup>Sc</sup> 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. Leal et al. (2012) descrevem a necessidade de um número mínimo de três folículos linfóides.

A transmissão da PrP<sup>Sc</sup> através de experimentos de transfusão (Houston et al., 2008) deveria, teoricamente, favorecer a detecção do scrapie em animais infectados, antes que os sinais clínicos aparecessem, mas o sucesso a este respeito tem sido limitado (González et al., 2008). Vários métodos de diagnóstico estão sendo desenvolvidos e avaliados quanto à sua detecção em amostras de sangue (Brown, 2005). No entanto, nenhum deles atingiu uma fase adequada para a sua validação em amostras de hospedeiros naturais (González et al., 2008).

#### 2.4.2 SCRAPIE ATÍPICO

Um novo tipo de scrapie, denominado Nor98, foi descrito na Noruega em 1998, onde cinco casos de scrapie com características incomuns foram diagnosticados (Benestad et al., 2003). São muitas as diferenças entre os casos atípicos designados Nor98 e os casos clássicos, que incluem diferenças na distribuição neuroanatômica das lesões histopatológicas e da PrP<sup>Sc</sup> no encéfalo e no padrão de deposição da PrP<sup>Sc</sup> (Rodríguez-Martinez et al., 2010). O Nor98 geralmente ocorre em ovelhas mais velhas, desde os cinco até mais de 10 anos de idade, enquanto o scrapie clássico normalmente afeta ovelhas de três a cinco anos (Luhken et al., 2007).

Benestad et al. (2003) observaram que os ovinos afetados pelo scrapie atípico apresentavam sinais neurológicos de ataxia, e os genótipos do gene PRNP encontrados eram homozigotos AHQ/AHQ ou heterozigotos AHQ/ARQ, que raramente são associados com scrapie. O exame histopatológico revelou vacuolização do neurópilo, essencialmente nos córtices cerebral e cerebelar; a vacuolização foi menos proeminente no tronco cerebral, e não foram observadas lesões no óbex. Os depósitos de PrP<sup>Sc</sup> eram principalmente no córtex do cerebelo e cérebro. Testes de IHQ e ELISA demonstraram que PrP<sup>Sc</sup> não estava presente em tecidos linfoides. A distinção entre os dois tipos se baseia nestas características e é confirmada pela observação do perfil eletroforético do Nor 98 no WB, caracterizado por uma rápida migração de uma banda de aproximadamente 12 KDa (Benestad et al., 2003).

Os casos do Nor98 também apresentam menos PrP<sup>Sc</sup> resistente a proteinase K no tecido encefálico, que os casos de scrapie clássico. Característica que poderia explicar, pelo menos parcialmente, porque alguns testes rápidos apresentam problemas em detectar a maioria dos casos de Nor98 (Benestad et al., 2006).

A presença esporádica de casos únicos de scrapie atípico nos rebanhos, sem prévio contato, levou à especulação de que estes casos atípicos, apesar do scrapie ser considerado como uma doença infecciosa, pudessem ser espontâneos, como acontece na DCJ esporádica em humanos (Benestad et al., 2003; Nöremark, 2006).

#### 2.4.3 TESTES RÁPIDOS

Desde 2002, os testes rápidos são utilizados para a vigilância ativa do scrapie nos rebanhos de ovinos dos países membros da União Europeia (UE). Estes testes foram aprovados pela Comissão Europeia e incluem o teste de ELISA bem como um ensaio rápido de WB. De acordo com a legislação da UE (EU, 2001), os testes rápidos são apenas para o rastreamento. As amostras, de animais saudáveis com mais de 18 meses, são coletadas e submetidas aos testes rápidos e, no caso de um resultado reativo, a amostra deve ser examinada no laboratório nacional de referência, utilizando um dos métodos de confirmação aprovados pela OIE que são WB e IHQ (European Commission, 2010).

Nos Estados Unidos, também se utiliza o Sistema de Vigilância Ativa, que foi criado em abril de 2003, dentro do Programa de Controle de Scrapie (APHIS, 2005).

#### 2.4.4 DIAGNÓSTICO NO BRASIL

O primeiro relato de scrapie, no Brasil, foi em 1978 em um ovino Hampshire Down, importado da Inglaterra (Fernandes et al., 1978) e, em 2003, houve a ocorrência do primeiro caso autóctone (Pohl de Souza et al. 2005); desde então, diversos casos tem sido relatados(Tabela 1)

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.

<b>Ano</b>	<b>Raça</b>	<b>Procedência</b>	<b>Estado</b>
1978	Hampshire Down	Reino Unido	RS
1985*	Wiltshire Horn	Reino Unido	PR
1995	Suffolk	USA	RS
1997	Suffolk	USA	PR
2001	Hampshire Down	Canadá	PR
2003**	Hampshire Down	Brasil	PR
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: Sotomaior et al. (2012). \* 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.

No Brasil, não há vigilância ativa para scrapie, apenas “Procedimentos para a Atuação em Caso de Suspeita ou Ocorrência de Paraplexia Enzoótica dos Ovinos”, descritos na Instrução Normativa nº 15, de 02 de abril de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2008). Segundo esta Instrução Normativa, o scrapie é de notificação compulsória e sua suspeita ou ocorrência devem ser imediatamente informadas à autoridade de defesa sanitária animal. São considerados animais com suspeita clínica de scrapie, os ovinos e caprinos, maiores de 12 (doze) meses de idade, que apresentam ou apresentaram sinais clínicos nervosos tais como mudanças no comportamento, na locomoção e na postura, com apresentação isolada ou conjunta, persistentes por mais de 15 (quinze) dias. E são considerados animais com diagnóstico positivo para scrapie, os ovinos e caprinos com resultado positivo à prova de IHQ em amostras de tecido nervoso ou linfóide, ou por meio de outras técnicas diagnósticas e metodologias aprovadas pelo MAPA.

## CAPÍTULO 3

### **BIÓPSIA RETAL EM OVINOS E CAPRINOS: NÚMERO DE FOLÍCULOS LINFOIDES EM DUAS COLHEITAS CONSECUTIVAS** (*Rectal biopsy in sheep and goats: number of lymphoid follicles in two consecutive collections*)

#### RESUMO

Scrapie é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal, que acomete ovinos e caprinos. É definida pelo acúmulo de uma isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>) no Sistema Nervoso Central (SNC) e em tecidos linfóides. A presença da PrP<sup>Sc</sup> também em tecidos do Sistema Linforreticular (SLR) sugere que esta forma patogênica pode ser detectada em amostras de biópsia da mucosa retal. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a correta localização e quantidade do tecido linfóide associado à mucosa retal, em ovinos e caprinos, e a possibilidade de realizar duas colheitas consecutivas em diferentes intervalos de tempo, utilizando a técnica de biópsia retal. Foram colhidas amostras de mucosa retal de 56 ovinos e 32 caprinos em duas etapas. Na primeira, todos os animais foram submetidos a colheitas no dia 0 e, para a segunda, os animais foram divididos em grupos e as colheitas foram em datas diferentes: para ovinos 7, 14, 21 e 28 dias após a primeira colheita e, para caprinos, 14, 21 e 28 dias após a primeira colheita. As amostras foram armazenadas em formol 10% e posteriormente submetidas às técnicas histológicas, para avaliação da correta localização e quantidade de folículos linfóides (FL) na mucosa retal. A leitura microscópica revelou que 86% das 176 amostras, de ambas as espécies, foram colhidas no local adequado. Em 51,78% das amostras de ovinos, colhidas no dia 0, havia a presença de três ou mais FL ( $\geq 3$  FL) e, para caprinos, em 50%. Na segunda colheita, 41% das amostras de ovinos possuíam  $\geq 3$  FL e, para caprinos, 31,25%. Na comparação do número de FL, dos mesmos animais, entre a primeira e segunda colheita, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre os dias 0 e 7, para os ovinos, e entre o grupo dos dias 0 e 28, para os caprinos. Comparando as duas espécies, não houve diferença significativa no número de FL em todas as datas avaliadas ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que é necessária a avaliação histológica prévia de amostras de biópsia retal, para verificação do número de FL, antes da realização do diagnóstico por imunohistoquímica e que, após 14 dias da colheita anterior, é possível submeter os animais ao mesmo procedimento, sem alterações significativas no número de FL.

**Palavras-chave:** Scrapie, biópsia retal, folículos linfóides, mucosa retal associada ao tecido linfóide, pequenos ruminantes.

## ABSTRACT

Scrapie is a neurodegenerative, progressive and fatal disease that affects sheep and goats. It is characterized by the accumulation of an abnormal isoform ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) of the cellular prion protein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in the central nervous system (CNS) and in lymphoid tissues. The presence of  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  also in tissue of the lymphoreticular system (LRS) suggests that it can be detected in samples of rectal mucosa biopsy of sheep and goats. The objective of this work was to evaluate the amount and exact location of lymphoid tissue associated with the rectal mucosa and the possibility to collect samples over short time intervals using rectal mucosa biopsy of sheep and goats. Rectal mucosa samples were collected from 56 sheep and 32 goats in two steps. In the first step, on day 0, all animals were tested and, for the second step, the animals were divided into groups and each group was subjected to collection on different dates: for sheep 7, 14, 21 and 28 days after the first one and, for goats, on day 14, 21 and 28. The samples were fixed in 10% formalin and subsequently subjected to histological techniques to assess the number of lymphoid follicles (LF) and the correct location of samples. From both sheep and goats, 86% of the 176 samples were collected from the appropriate place. On day 0, 51.78% of the sheep and 50% of the goat samples showed the presence of three or more LF ( $\geq 3$  LF). In the second collection, 41% of the sheep samples showed  $\geq 3$  LF and the goats, 31.25%. Comparing the number of LF of the same animals between the first and second collections, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) only between days 0 and 7 for sheep and days 0 and 28 for goats. There was no significant difference in the number of LF assessed on all dates when comparing the different species, sheep and goats ( $p > 0.05$ ). These data demonstrate the importance of a histological evaluating of the rectal biopsy samples, to check the number of LF, before performing the diagnosis by immunohistochemistry, and that after 14 days from the previous collection, animals can undergo the same procedure without significant changes in the number of lymphoid follicles.

**Keywords:** Scrapie, rectal biopsy, lymphoid follicles, recto-anal mucosa associated lymphoid tissue, small ruminants.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (ETT), ou doenças priônicas, são desordens neurológicas, progressivas e fatais, que afetam animais e humanos. Essas doenças são associadas ao acúmulo anormal da proteína priônica alterada no Sistema Nervoso Central (SNC) e a lesões histológicas que compreendem vacuolização, perda neural e astrocitose (Jeffrey e González 2007). Neste grupo de doenças enquadraram-se a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Scrapie, Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), entre outras (Prusiner, 1995).

Segundo Detwiler e Baylis (2003), scrapie tem sido relatado em diversos países do mundo e afeta muitas regiões produtoras de ovinos. É uma doença endêmica em vários países da Europa, Canadá e Estados Unidos, porém a Austrália e Nova Zelândia são consideradas livres da doença (Detwiler e Baylis, 2003; Dawson et al., 2008; OIE, 2009). Scrapie é definido pelo acúmulo de uma isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>) não apenas no SNC, mas também no sistema linforreticular (SLR) e, variavelmente, em outros tecidos e fluidos corporais (Jeffrey e González, 2007).

O acúmulo da PrP<sup>Sc</sup> em tecidos linfóides levou ao desenvolvimento de procedimentos de biópsia, utilizando tecidos acessíveis, tais como a tonsila (Jeffrey et al., 2001) e terceira pálpebra (O'Rourke et al., 1998), associada à técnica de imunohistoquímica (IHQ), para o diagnóstico *ante mortem* de scrapie em ovinos. A descrição da presença de uma grande área de folículos linfóides no reto de ovinos (Aleksandersen et al., 1991), tornou a técnica de biópsia retal uma nova possibilidade de diagnóstico *ante mortem* do scrapie. Amostras da mucosa retal tem sido colhidas e analisadas por meio de provas de IHQ para avaliar a presença de PrP<sup>Sc</sup> no tecido linfóide associado à mucosa retoanal (RAMALT, do inglês *Recto-Anal Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) (González et al., 2005; Espenes et al., 2006).

No Brasil, o primeiro relato de scrapie foi em 1978 em um ovino Hampshire Down, importado da Inglaterra (Fernandes et al., 1978). Segundo a OIE, de 2008 a 2011, foram 22 animais sacrificados, no país, em surtos de scrapie (<http://web.oie.int/wahis/public.php>). Desde 2008, o diagnóstico para scrapie é feito por

meio da técnica de IHQ a partir de amostras de sistema nervoso central e tecidos linfóides (Brasil, 2008). Porém, no caso de tecidos linfóides associados à mucosa retal, pode haver a necessidade de novas colheitas em curtos intervalos de tempo devido à insuficiência de tecido para o diagnóstico da doença que, segundo Leal et al. (2012), deve ser de no mínimo três folículos linfóides (FL).

O presente estudo tem como objetivo avaliar, em ovinos e caprinos, a correta localização e quantidade do tecido linfóide associado à mucosa retal, obtido por meio da técnica de biópsia retal, e a possibilidade de realizar duas colheitas consecutivas em diferentes intervalos de tempo.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Seleção dos animais e colheita de amostras

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso em Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob número 452. Foram selecionados 88 animais do rebanho da Fazenda Experimental Gralha Azul (FEGA) da PUCPR, sendo 56 ovinos e 32 caprinos. Amostras de tecido linfóide associado à mucosa retal foram colhidas, por meio de biópsia retal, em duas etapas para cada espécie. Na primeira etapa para ovinos (dia 0), foram colhidas amostras dos 56 animais selecionados. Para a segunda etapa, os animais foram divididos em quatro grupos, cada um com 14 animais. As colheitas da segunda etapa foram realizadas 7, 14, 21 e 28 dias após a primeira colheita. Para caprinos, a primeira colheita (dia 0) foi realizada nos 32 animais e, na segunda etapa, os caprinos foram divididos em três grupos (dois grupos com 10 animais e um com 12 animais) e as colheitas foram realizadas nos dias 14, 21 e 28 após a primeira colheita. Para ambas as espécies, as duas colheitas foram realizadas com o intuito de avaliar a correta localização do tecido linfóide e o número de FL presentes nas amostras. A segunda colheita teve o objetivo adicional de avaliar se é possível colher amostras do mesmo animal em curtos intervalos de tempo.

Para as colheitas, realizadas segundo González et al. (2008), os animais foram submetidos a contenção física e anestesiados localmente com pomada de xilocaína

2%. Um espécúlo especial (RAMALT Biopsy Rectal Speculum - Veterinary Instrumentation), individual, vazado na parte inferior foi introduzido no reto dos animais para melhor obtenção de amostras e menor agressão ao órgão (Figura 7). Assim que localizada a área para colheita, situada aproximadamente 1cm da junção mucocutânea, uma amostra de mucosa retal foi colhida com auxílio de pinça e tesoura. As amostras foram identificadas e conservadas em formol 10% até serem submetidas às técnicas histológicas.

Figura 7: Área correta para colheita de mucosa retal (flecha) de ovino (A) e caprino (B) submetidos à técnica de biópsia retal.



### 3.2.2 Técnicas histológicas

Para a confecção das lâminas histológicas, os fragmentos de tecido colhidos foram submetidos às técnicas de rotina: neutralização (em álcool amônia por 1 hora), desidratação (em 5 álcoois, 1 hora em cada), diafanização (em 3 fases de xilol, 1 hora em cada), permanência em parafina derretida a 56°C por 6 horas, inclusão em bloco de parafina, corte com micrótomo, fixação em lâminas e coloração.

Com as amostras da primeira e segunda colheitas, foram confeccionadas lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), utilizadas para identificar a presença de tecido linfóide associado à mucosa. Amostras contendo a lâmina própria, estrutura da mucosa onde se encontram os FL, foram classificadas como colhidas do local adequado, independentemente da presença de FL, e as demais, como colhidas de local

inadequado. A coloração HE também foi utilizada para avaliar a presença e quantificar os FL nas amostras, classificando-as em amostras com quantidade de FL igual ou maior que três ( $\geq 3$  FL), e as amostras com menos de três FL ( $< 3$  FL). Segundo Leal et al. (2012), três é o número mínimo de FL em amostras de mucosa retal para posterior realização de IHQ para diagnóstico de scrapie. Após a classificação das amostras e identificação dos FL, também se tabulou a quantidade de FL encontrada e a correta localização dos mesmos de acordo com a idade dos animais.

Com as amostras de segunda colheita, a coloração de HE foi utilizada para identificar a presença de reação inflamatória e reepitelização, indícios comuns a áreas que sofreram lesão anterior, o que indica que a amostra foi colhida do mesmo local ou local próximo à primeira colheita. Além da lâmina de HE, com as amostras de segunda colheita, outra lâmina de cada amostra foi confeccionada e corada com Mallory, para visualizar se havia presença de tecido de granulação, que é indicativo de processo de cicatrização da área lesionada, ou seja, também indicaria que a segunda amostra foi colhida da mesma área ou área próxima à primeira colheita.

### **3.2.3 Análise estatística**

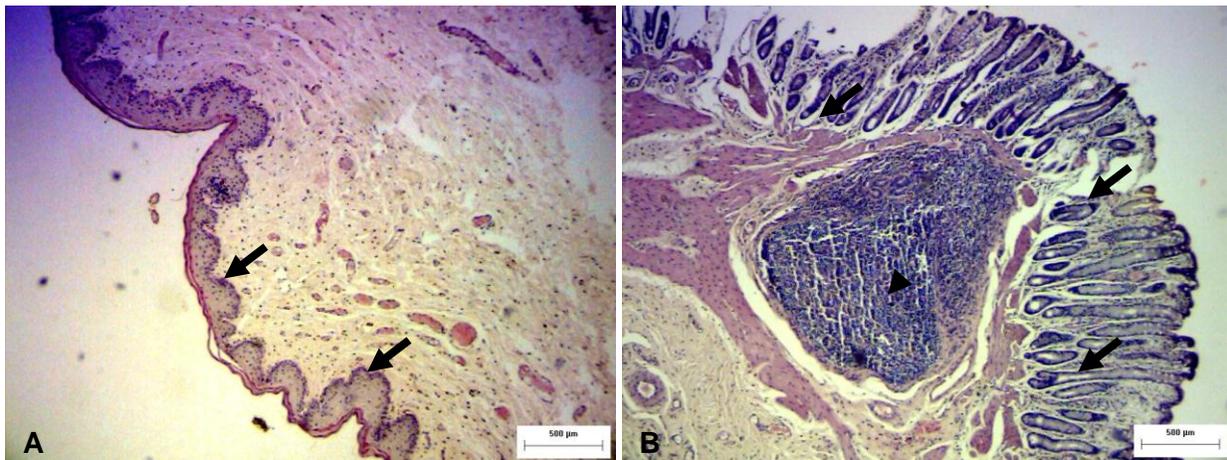
A análise estatística foi realizada pelo método de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (utilizando o software Statgraphics plus for Windows) para avaliar a correta localização do tecido linfóide (utilizando a correção de Yates), comparar a quantidade de FL entre a primeira e segunda colheita de cada animal, a quantidade de FL entre as diferentes datas da segunda colheita, quantidade de FL encontrados em ovinos e caprinos nos dias 0, 14, 21 e 28, avaliando se houve influência da espécie, além de analisar se a idade dos animais influenciou na adequação das amostras. A H0 foi que o número de FL fosse igual para todas as comparações e a H1 que o número de FL tenha variado significativamente, considerando nível de significância de 5%. Para os achados microscópicos de reação inflamatória, reepitelização e tecido de granulação, foi realizada análise descritiva.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Localização correta do tecido linfóide

Quanto ao local correto de colheita das biópsias, do total de 176 amostras, 151 (85,8%) foram colhidas do local adequado e 25 (14,2%) de local inadequado (Figura 8). Considerando as 56 amostras colhidas de ovinos na primeira colheita, 51 (91%) foram colhidas do local adequado e, para caprinos, das 32 amostras, 31 (96,9%) estavam adequadas. Na segunda colheita, 39 (69,6%) amostras de ovinos foram colhidas do local adequado e, para caprinos, 30 (93,7%) amostras. Para ovinos houve diferença significativa entre a quantidade de colheitas adequadas e não adequadas na 1ª e 2ª colheita ( $p=0,01$ ); para caprinos, não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ).

Figura 8: Cortes histológicos, corados com Hematoxilina-eosina (HE), de amostras de biópsia retal de ovinos. (A) Amostra inadequada, presença de epitélio pavimentoso estratificado (flechas) característico do canal anal, obj. 10x. (B) Amostra adequada, contendo mucosaesubmucosa (flechas), com presença de folículo linfóide (ponta de flecha),obj. 10x.

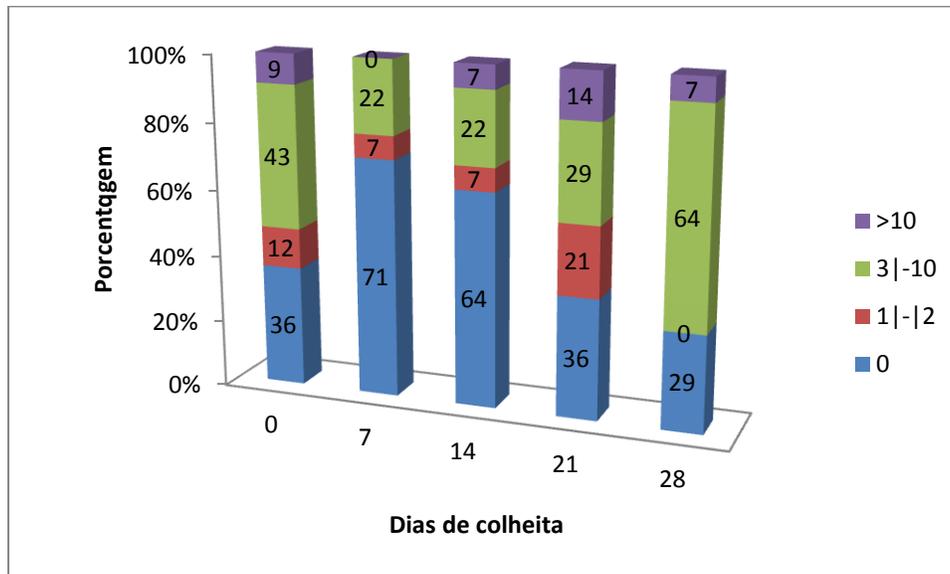


#### 3.3.2 Número de folículos linfóides

Para ovinos, o número de FL encontrados variou de 0 a 15, sendo que na primeira colheita, em 29 (51,78%) das 56 amostras foram observados  $\geq 3$  FL e,

considerando todos os grupos da segunda colheita, em 23 (41%) amostras havia a presença de  $\geq 3$  FL. Na figura 9, é possível visualizar a porcentagem de amostras que continham 0, 1 a 2, 3 a 10 e  $>10$  FL para os diferentes dias de colheita.

Figura 9: Porcentagem de amostras de mucosa retal de ovinos, obtidas por meio de biópsia retal, segundo o número de folículos linfóides (FL) e dias de colheita.



A tabela 2 mostra a comparação do número de FL, entre a primeira e segunda colheita para os animais de cada grupo (0-7, 0-14, 0-21 e 0-28). Houve diferença significativa no número de FL entre os dias 0 e 7, com maior porcentagem de amostras com  $\geq 3$  FL, no dia 0 do que no dia 7 (57,17% x 21,43%). Entre os dias 0-14, 0-21 e 0-28 não houve diferença significativa entre o número de FL. Entre os dias 7 e 14, 7 e 21, 14 e 21, e 21 e 28, também não houve diferença significativa no número de FL entre as colheitas realizadas.

TABELA 2: Comparação entre a porcentagem de amostras de mucosa retal de ovinos que apresentaram número  $\geq 3$  de folículos linfóides (FL), e os valores de  $\chi^2$  calculado e  $\chi^2$  tabelado na primeira e segunda colheitas.

Nº animais	Data da colheita		% amostras $\geq 3$ FL		$\chi^2$ c	$\chi^2$ t
	1ª	2ª	1ªcolheita	2ªcolheita		
14	0	7	57,14	21,43	7,75*	3,84
14	0	14	42,86	28,57	0,62	3,84
14	0	21	57,14	42,86	0,57	3,84
14	0	28	50,00	71,43	1,35	3,84

O grau de liberdade para todas as análises foi igual a 1 e o valor de  $\alpha$  95%.

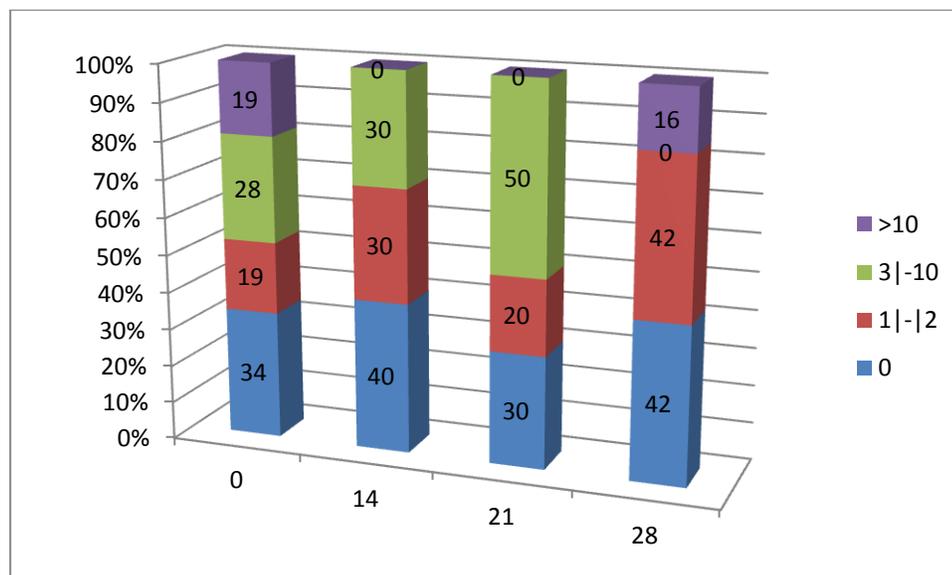
\* houve significância entre o número de folículos linfóides

$\chi^2$ c :  $\chi^2$  calculado

$\chi^2$ t :  $\chi^2$  tabelado

O número de FL, para caprinos, variou de 0 a 35, sendo que das 32 amostras na primeira colheita, 16 (50%) continham número de FL  $\geq 3$  e, na segunda colheita, 10 (31,25%). A porcentagem de amostras que continham 0, 1 a 2, 3 a 10 e acima de 10 FL pode ser observada na figura 10.

Figura 10: Porcentagem de amostras de mucosa retal de caprinos, obtidas por meio de biópsia retal, segundo o número de folículos linfóides (FL) e dias de colheita.



Para caprinos, na comparação do número de FL entre as colheitas, não houve diferença significativa entre os dias 0-14 e 0-21. Entre os dias 0-28 houve diferença significativa, sendo que no dia 0 a porcentagem de amostras de mucosa retal com  $\geq 3$  FL, dos 12 animais, foi maior que no dia 28 (58,33% x 16,66%) (Tabela 3). Não houve diferença significativa no número de FL entre as diferentes datas da segunda colheita.

Tabela 3: Comparação entre a porcentagem de amostras de mucosa retal de caprinos que apresentaram número  $\geq 3$  de folículos linfóides (FL), e os valores de  $\chi^2$  calculado e  $\chi^2$  tabelado na primeira e segunda colheita.

Nº animais	Data da colheita		% amostras $\geq 3$ FL		$\chi^2$ c	$\chi^2$ t
	1ª	2ª	1ª colheita	2ª colheita		
10	0	14	30,00	30,00	0,00	3,84
10	0	21	60,00	50,00	0,20	3,84
12	0	28	58,33	16,66	4,44*	3,84

O grau de liberdade para todas as análises foi igual a 1 e o valor de  $\alpha$  95%.

\* houve significância entre o número de folículos linfóides.

$\chi^2$  c :  $\chi^2$  calculado

$\chi^2$  t :  $\chi^2$  tabelado

Comparando as duas espécies, ovinos e caprinos, não houve diferença significativa entre o número de FL encontrados nos dias 0, 14, 21 e 28 (Tabela 4).

TABELA 4: Comparação entre a porcentagem de amostras de mucosa retal de ovinos e caprinos que apresentaram número  $\geq 3$  de folículos linfóides (FL) e os valores de  $\chi^2$  calculado e  $\chi^2$  tabelado.

Dias	% amostras $\geq 3$ FL		$\chi^2$ c	$\chi^2$ t
	Ovino	Caprino		
0	51,79	50,00	0,03	3,84
14	28,57	30,00	0,62	7,81
21	42,86	50,00	0,77	7,81
28	71,43	16,66	5,79	7,81

O grau de liberdade para todas as análises foi igual a 1 e o valor de  $\alpha$  95%.

$\chi^2$  c :  $\chi^2$  calculado

$\chi^2$  t :  $\chi^2$  tabelado

### 3.3.3 Influência da idade na adequação da amostra

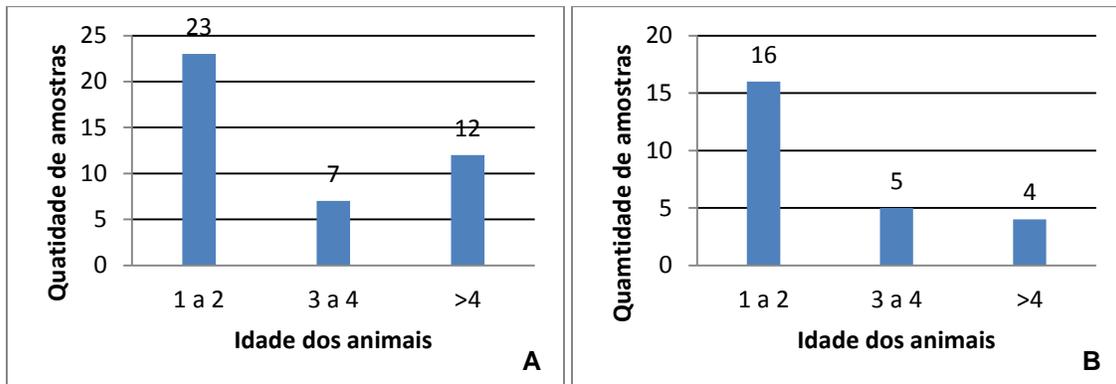
Analisando apenas as amostras colhidas do local adequado na primeira colheita, 51 amostras de ovinos e 31 de caprinos, e comparando com a idade dos animais, observou-se que a idade não influenciou significativamente na correta localização das amostras colhidas para ovinos ( $p>0,05$ ) e caprinos ( $p>0,05$ ), como mostra a tabela 5.

TABELA 5: Número e porcentagem dos 51 ovinos e dos 31 caprinos, com amostras colhidas do local adequado, primeira colheita, segundo as idades: 1 a 2 anos, 3 a 4 anos e com > de 4 anos.

Idade	Nº ovinos	% ovinos	Nº caprinos	% caprinos
1 a 2 anos	20	39,22%	12	38,71%
3 a 4 anos	16	31,37%	9	29,03%
> 4 anos	15	29,41%	10	32,26%
TOTAL	51	100%	31	100%

Ao comparar-se as amostras adequadas contendo  $\geq 3$  FL com a idade dos animais, observou-se que a porcentagem de amostras com  $\geq 3$  FL foi superior para animais com idade entre 1 e 2 anos (Figura 11). Das 40 amostras de ovinos (2 colheitas de 20 animais) entre um e dois anos, 82,5% apresentaram  $\geq 3$  FL e, para caprinos, foram 70,83% das 24 amostras (12 animais). Já a quantidade de amostras dos animais com idade superior a quatro anos, que apresentaram  $\geq 3$  FL, foi inferior, sendo para ovinos 40% de 30 amostras (15 animais) e para caprinos 20% de 20 amostras (10 animais). A análise estatística mostrou que houve influência significativa da idade sobre a quantidade de FL ( $p<0,01$ ), em ambas as espécies.

FIGURA 11: Quantidade de amostras, primeira e segunda colheita, que apresentaram  $\geq 3$ FL, segundo a idade dos animais. (A) ovinos (B) caprinos.



### 3.3.4 Amostras com indícios de colheita anterior

Nas amostras de segunda colheita, para ovinos, 25 (44,64%) apresentaram indícios de colheita próxima ou no local da colheita anterior, e para caprinos, em quatro (12,5%) amostras (Tabela 6). Destas amostras, em ovinos, oito (32%) apresentaram  $\geq 3$  FL e, em caprinos, uma (25%).

TABELA 6: Número de amostras de mucosa retal que apresentaram indícios de colheita anterior, nos dias de colheita: 7, 14, 21 e 28, para ovinos, e nos dias 14, 21 e 28, para caprinos.

	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28	
<b>Ovino</b>	Reação inflamatória	4	3	1	0
	Tecido de granulação	0	1	0	2
	Reação inflamatória + Tecido de granulação	4	2	3	2
	Reepitelização	0	0	3	0
<b>Caprino</b>	Reação inflamatória		2	0	0
	Tecido de granulação		0	0	0
	Reação inflamatória + Tecido de granulação		2	0	0
	Reepitelização		0	0	0

### 3.4 DISCUSSÃO

Como o longo período de incubação dificulta o controle do scrapie, as técnicas de diagnóstico *ante mortem*, como é o caso da técnica de biópsia retal associada à imunohistoquímica, tornam-se cada vez mais importantes. Segundo O'Rourke et al. (2000), a detecção da PrP<sup>Sc</sup> no tecido linfóide pode ser feita meses ou anos antes do desenvolvimento da doença clínica. No Brasil, desde 2008, o diagnóstico *ante mortem* passou a ser possível, em casos de surtos, para testar os animais suspeitos (Brasil, 2008).

Apesar da biópsia da terceira pálpebra ter sido o primeiro passo para o diagnóstico pré-clínico, não invasivo, em ovinos (O'Rourke et al., 2000), nesta área a quantidade tecido linfóide é pouca e o tecido não se regenera (O'Rourke et al., 2002). Desta forma, além da técnica de biópsia retal ser mais simples de executar, tem como vantagem a obtenção de um maior número de FL (González et al., 2008). E também possibilita submeter os animais a novas colheitas, o que ocorre caso a quantidade de FL seja insuficiente na amostra inicial, o diagnóstico seja inconclusivo, ou haja a necessidade de acompanhamento de rebanhos onde houve surto ou ainda os animais entrem em contato com outros suspeitos ou positivos.

Durante as biópsias retais realizadas neste experimento, não foram observados efeitos adversos, o sangramento foi mínimo e ocasional, e o desconforto pós-procedimento imperceptível (pois os animais continuavam se comportando normalmente), corroborando os dados descritos por González et al. (2005). Dennis et al. (2009) observaram complicações potencialmente associadas com o procedimento apenas em 3 (1,7%) das 180 ovelhas submetidas a biópsia, sendo elas prolapso retal, hemorragia retal e perfuração de reto. Espenes et al. (2006) não aconselham colher mais de duas amostras por animal de cada vez, devido a eventual ocorrência de hemorragia leve.

No presente estudo, 151 (85,8%) das 176 amostras foram colhidas do local adequado. Os 14,2% de amostras colhidas de local inadequado evidenciam que pode haver a necessidade de se realizar novas colheitas, para obtenção de tecido linfóide associado à mucosa reto-anal suficiente para a IHQ. A diferença significativa observada

na porcentagem de amostras adequadas na primeira e segunda colheita dos ovinos ocorreu devido à colheita realizada no dia 7, quando ainda havia indícios da colheita anterior, dificultando a localização correta. Os indícios da primeira colheita foram observados apenas na colheita com sete dias; nas demais, as lesões já estavam macroscopicamente cicatrizadas, como também descrito por González et al. (2008), que avaliando as ovelhas 10 a 15 dias após biópsia, observaram que as lesões já estavam cicatrizadas, além de relatar que as biópsias podem ser repetidas no mesmo animal, sem detrimento do seu bem-estar.

Outro fator importante, antes de submeter as amostras à análise IHQ, é a avaliação do número de FL. No presente estudo, foi utilizado como critério a presença mínima de 3 FL, padrão publicado por Leal et al. (2012). Gavier-Widén et al. (2005), no entanto, relatam a necessidade de no mínimo 4 a 6 FL, por amostra. No estudo de Dennis et al. (2009), quando uma amostra de tecido de mucosa retal ou terceira pálpebra com número inferior a seis FL não apresentava imunomarcagem específica da PrP<sup>Sc</sup>, os resultados dos testes foram considerados inconclusivos porque havia pouco tecido para detectar a doença. Portanto, para a IHQ, não há ainda um consenso quanto ao número mínimo de FL por amostra.

Nos animais avaliados, a quantidade de FL variou de 0 a 15 para ovinos e 0 a 35 para caprinos, sendo que, para ovinos, em 57% do total de amostras colhidas foram encontrados FL e, para caprinos, em 64%. Espenes et al. (2006) obtiveram FL em 87% de 84 amostras, variando de 1 a 30 e Leal et al. (2012) obtiveram folículos linfóides da mucosa retal em 263 de 318 biópsias (82,70%). Portanto, a porcentagem de amostras com FL neste trabalho foi inferior às relatadas, assim como houve uma alta porcentagem de amostras com número de FL inferior ao necessário. Considerando o dia 0, em apenas 51,79% das amostras colhidas de ovinos e em 50% para caprinos foi encontrado  $\geq 3$  FL (tabela 4). Aleksandersen et al. (1991) relataram a localização agregada dos folículos linfóides entre pregas longitudinais, na mucosa retal, o que poderia explicar as variações na quantidade de FL. Outra possibilidade, segundo Dennis et al. (2009), seria a realização da colheita mais caudal à junção reto-anal, que diminui a quantidade de FL obtidos nas biópsias. Esses pontos são importantes, pois a

colheita inadequada e em quantidade insuficiente de FL é um limitador para a utilização da biópsia da mucosa retal no diagnóstico de scrapie (Leal et al.; 2012).

O número de FL neste trabalho também pode ter sido influenciado pela idade dos animais (figura 11). Segundo González et al. (2008) e Monleón et al. (2011), o número de FL na mucosa retal diminui com a idade, assim animais jovens apresentam maior número de FL que os grupos de animais mais velhos.

Além da idade dos animais, colheitas anteriores da mesma área também podem interferir na quantidade de FL, pois a lesão ocasionada pela colheita não é suficiente para desencadear a formação de novos FL, assim como descrito por O'Rourke et al. (2002) em estudo utilizando amostras de tecido linfóide da terceira pálpebra. No caso dos animais avaliados neste experimento, existe a possibilidade de ter havido colheitas anteriores, pois alguns ovinos e caprinos foram utilizados para treinamento da técnica, sem que, no entanto, houvesse um controle de quais eram estes animais. A forma de evitar colheitas da mesma área seria dividir a região da mucosa retal em quadrantes e realizar cada colheita de um quadrante diferente, tendo todas estas informações armazenadas. Segundo Dennis et al. (2009), em seu estudo, não houve diferença significativa entre a sensibilidade para IHQ em diferentes áreas colhidas da mucosa retal: região esquerda ventral (10 a 11 horas), esquerda dorsal (7 a 9 horas) e direita dorsal (3 a 5 horas) da mucosa retal.

A análise da possibilidade de colheitas consecutivas demonstrou que, a partir de 14 dias em ovinos, não houve diferença significativa no número de FL, corroborando dados de González et al. (2008). A colheita do dia 7, entretanto, apresentou número inferior de FL, não sendo indicado repetir a colheita neste intervalo de tempo. Para caprinos, houve uma redução no número de FL no dia 28, apesar dos dias 14 e 21 não apresentarem redução, o que poderia ter ocorrido por fatores associados, como a idade dos animais e a possibilidade de colheitas anteriores não registradas.

Na comparação do número de FL entre ovinos e caprinos, não foi observado influência da espécie, diferente de Monleón et al. (2011), que relatam um número de FL maior em ovinos. Baseado nos dados deste experimento, a técnica poderia ser utilizada para ambas as espécies.

No Brasil, scrapie deixou de ser considerada uma doença exótica desde o surto ocorrido no rebanho de ovinos da Fazenda Gralha Azul da PUCPR em 2003 e, desde então, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem trabalhado, no Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Controle das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, num programa específico de controle para scrapie. Atualmente, são considerados animais com diagnóstico positivo para scrapie os ovinos e caprinos com resultado positivo à prova de imunohistoquímica em amostras de tecido nervoso ou linfóide (Brasil, 2008). Em trabalho recente, Leal et al. (2012) demonstraram que a utilização de tecidos linfóides no diagnóstico por IHQ através de biópsias mostrou-se um método viável e eficaz para o diagnóstico pré-clínico de scrapie. Devido ao ainda pequeno número de publicações brasileiras sobre biópsias retais em ovinos e caprinos, pesquisas como a realizada neste trabalho podem auxiliar na avaliação da técnica correta de biópsia de mucosa retal, evitando que sejam realizadas de forma inadequada ou com número de FL insuficiente, fator que torna necessária uma nova colheita.

### 3.5 CONCLUSÃO

Mesmo a técnica de biópsia retal sendo simples, há possibilidade de se colher material de área inadequada ou amostras com poucos FL, o que torna necessário avaliar as amostras através de técnicas histológicas antes de submetê-las à IHQ. O estudo também demonstrou que animais jovens apresentam quantidade de FL superior aos animais mais velhos e que é possível realizar colheitas em curtos intervalos de tempo, a partir de 14 dias, com quantidade de FL suficiente, em ovinos e caprinos.

## CAPÍTULO 4

### UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS PARA DIAGNÓSTICO DE SCRAPIE (*Monoclonal and polyclonal antibodies for ante- and post-mortem detection of PrP<sup>Sc</sup> in sheep and goats*)

#### RESUMO

Definida pelo acúmulo de uma isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>) no Sistema Nervoso Central (SNC) e em tecidos linfóides, scrapie é uma doença que afeta ovinos e caprinos. Para as técnicas de eleição do diagnóstico de scrapie, imunohistoquímica (IHQ) e western blot (WB), podem ser utilizados uma vasta gama de anticorpos monoclonais e policlonais comercialmente disponíveis. O objetivo deste estudo foi testar e comparar a eficácia dos anticorpos monoclonais utilizados comercialmente, F89/160.1.5, F99/97.6.1e P4, e os anticorpos policlonais R486 e M52, para a identificação da presença PrP<sup>Sc</sup> em amostras de tecido linfóide e SNC através da técnica de IHQ. Além de testar a técnica de WB com o anticorpo M52 para identificação da PrP<sup>C</sup>. Foram utilizadas, nos experimentos de IHQ, amostras positivas e negativas de cérebro e tonsila palatina de ovinos, cedidas pelo Animal Health Veterinary Laboratory Agency (AHVLA), Reino Unido. Para WB, foram utilizadas amostras de encéfalo, baço, linfonodo, terceira pálpebra e mucosa retal de ovino. As análises IHQ utilizando anticorpos monoclonais e policlonais em amostras positivas de cérebro confirmaram a deposição da PrP<sup>Sc</sup> em neurônios, caracterizada por marcações de aspecto granular intraneural. Na amostra negativa de cérebro, os anticorpos monoclonais não identificaram marcações positivas, mas os anticorpos policlonais sim. Testando a amostra positiva de tonsila palatina com os anticorpos monoclonais e policlonais, identificaram-se marcações positivas e, com a amostra negativa, não se observaram marcações com nenhum dos anticorpos, porém o monoclonal P4 e os policlonais ocasionaram background. Na técnica de WB, o anticorpo M52 foi capaz de reconhecer a PrP<sup>C</sup> presente em grande quantidade no encéfalo de ovinos e houve uma marcação mais tênue no baço. Nas amostras de 3ª pálpebra e linfonodo nenhuma marcação foi observada e, na amostra de mucosa retal, uma marcação com massa de aproximadamente 50 kDa foi observada. Apesar dos anticorpos policlonais possuírem valores mais acessíveis, o presente estudo revelou que a utilização dos anticorpos policlonais é inviável, pois o resultado da análise pode ser dado como falso positivo. A utilização do anticorpo M52 para identificação da PrP<sup>C</sup> em amostra de encéfalo e baço, através da técnica de WB, mostrou-se eficiente, mas em tecidos do sistema linfóide a PrP<sup>C</sup> não foi identificada.

**Palavras - chave:** Scrapie. Diagnóstico. Imunohistoquímica. Anticorpos. Western Blotting.

## ABSTRACT

Scrapie is a disease that affects sheep and goats, and that is characterized by the accumulation of an abnormal isoform (PrP<sup>Sc</sup>) of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) in the central nervous system (CNS) and in lymphoid tissues. Detection of PrP<sup>Sc</sup> in those tissues can be attempted by a variety of techniques including immunohistochemistry (IHC) and Western blotting (WB), for which a wide range of monoclonal and polyclonal antibodies are commercially available. The objective of this study was to test and compare the efficacy of monoclonal antibodies F89/160.1.5, F99/97.6.1 and P4 and polyclonal antibodies M52 and R486, for the detection of PrP<sup>Sc</sup> in lymphoid and CNS tissue samples by IHC. In addition, the ability of M52 antibody for the identification of PrP<sup>C</sup> by WB was also tested. In these experiments, IHC positive and negative control samples of brain and tonsil of sheep were provided by the Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA, UK). For WB, samples of brain, spleen, lymph node, third eyelid and rectal mucosa of sheep were tested. The IHC examinations with monoclonal and polyclonal antibodies confirmed granular deposition of PrP<sup>Sc</sup> in neurons of positive control tissues. However, while monoclonal antibodies did not produce positive reactions in negative controls, polyclonal antibodies gave some non-specific staining. Testing of positive control tonsil samples with polyclonal and monoclonal antibodies identified positive specific reactions, while negative control tissues were IHC negative with all antibodies, although P4 and polyclonal antibodies produced some background staining. In WB, antibody M52 was able to recognize PrP<sup>C</sup> present in large quantities in the brain of sheep, and to a lesser extent in the spleen, while samples of third eyelid and lymph node were negative. Samples of rectal mucosa gave a positive band of a mass of approximately 50 kDa. We conclude that, although polyclonal antibodies may be more accessible, their use is not advised because of false positive reactions. While antibody M52 was able to identify PrP<sup>C</sup> in brain and spleen by WB, other lymphoid tissues were negative.

**Keywords:** Scrapie. Diagnosis. Immunohistochemistry. Antibody. Western Blotting.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Scrapie ou Paraplexia Enzoótica é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, que ocorre de forma natural. Foi a primeira Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET) identificada em animais (Prusiner, 1982) e tem sido relatada em diversos países criadores de ovinos, exceto na Austrália e Nova Zelândia (Dawson et al., 2008; OIE, 2009). Esta doença está associada ao acúmulo da isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) da proteína priônica celular (PrP<sup>C</sup>) no sistema nervoso central (SNC) e também no sistema linforreticular (Andréoletti et al., 2000).

A infecção normalmente acontece pela via oral, 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). Os sinais clínicos do scrapie podem durar de duas semanas a seis meses e, muitas vezes, começam com o comportamento incomum e extremas reações nervosas a estímulos (Dickinson, 1976).

Até recentemente, somente diagnósticos *pos mortem* eram utilizados; porém, técnicas de diagnóstico *ante mortem* tem sido desenvolvidas e realizadas (González et al., 2008). As técnicas de biópsia de tonsila (Jeffrey et al., 2001) e terceira pálpebra (O'Rourke et al., 1998) foram inicialmente propostas. Entretanto, segundo González et al. (2005), estes procedimentos são pouco práticos de serem realizados a campo e não permitem reavaliações constantes. A descrição de uma grande área de folículos linfóides no intestino grosso dos ovinos, o reto (Aleksandersen et al., 1991), possibilitou a utilização da técnica de biópsia retal, por meio de provas imunohistoquímicas da presença de PrP<sup>Sc</sup>, para diagnóstico *ante mortem* do scrapie (González et al., 2005). Esta é uma técnica simples e rápida, que não necessita de instrumentos específicos, sedação ou anestesia geral, e que pode ser realizada várias vezes, sem efeitos prejudiciais ao animal (González et al., 2008).

Para as técnicas de eleição do diagnóstico de scrapie, imunohistoquímica (IHQ) e western blotting (WB), podem ser utilizados uma vasta gama de anticorpos monoclonais e policlonais comercialmente disponíveis (Gavier Widén et al., 2005). Os monoclonais são anticorpos que provém de somente um linfócito B, selecionado artificialmente e replicado diversas vezes como um clone e, desta forma, este anticorpo

se liga somente a um epítopo de uma única forma. Os anticorpos policlonais possuem vários clones, ou seja, originam-se de diferentes linfócitos B, o que significa que reagem com vários epítopos do antígeno (por exemplo, várias partes de uma proteína).

No Brasil, para o diagnóstico de scrapie, diversos anticorpos monoclonais são comercializados e utilizados, porém todos são produzidos fora do país, fato que torna a aquisição destes anticorpos mais difícil e o diagnóstico da doença mais caro. Desta forma, este estudo teve como objetivo testar e comparar, por meio de IHQ, a eficácia de cinco anticorpos, três monoclonais comerciais; um policlonal já padronizado e utilizado por pesquisadores do Reino Unido e outros países; e um policlonal produzido no Brasil (Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná) e utilizado para identificação da PrP<sup>C</sup> em cérebro de camundongos pela técnica de WB. A comparação entre os anticorpos teve o intuito de avaliar a possibilidade de utilização deste anticorpo nacional para diagnóstico da doença. Objetivou-se, também, testar a eficiência do anticorpo nacional na identificação da PrP<sup>C</sup> em diferentes tecidos de ovinos, utilizando a técnica de WB.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Imunohistoquímica - IHQ

#### 4.2.1.1 Amostras

As amostras de tecidos utilizadas nos experimentos de imunohistoquímica (cérebro e tecido linfóide de ovinos) foram cedidas pelo Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), Reino Unido. Estas estavam em bloco de parafina e inicialmente foram submetidas às técnicas de histologia para avaliar integridade do material para posterior análise imunohistoquímica. Dentre as amostras utilizadas, seis eram positivas (uma de tálamo, três de mesencéfalo, uma de medula e óbex e uma de tonsila palatina) e duas negativas (uma de mesencéfalo e uma de tonsila palatina).

#### 4.2.1.2 Anticorpos

Para as análises foram utilizados cinco anticorpos diferentes, os monoclonais utilizados comercialmente, F89/160.1.5, F99/97.6.1 e P4, e os anticorpos policlonais R486 e M52.

O anticorpo F99 (VRMD, Pullman, EUA) é um monoclonal que reconhece a sequência de aminoácidos 200 – 225. O anticorpo F89 (VRMD, Pullman EUA) reconhece a sequência de 142 -145 e o P4 (R-Biopharm AG), de 89 – 104 (Hardt et al., 2000). O anticorpo R486 é um policlonal cedido pelo Animal Health and Veterinary Laboratories Agency – AHVLA e reconhece a sequência de aminoácidos 217–231 (González et al., 2002).

O anticorpo policlonal M52 foi produzido no Laboratório de Neurobiologia da UFPR. Segundo Zanata et al. (2002), camundongos nocautes para o gene que codifica a proteína prion celular (gene PRNP) foram imunizados com proteína prion celular murina recombinante (6His-PrP<sup>C</sup>) expressa em sistema heterólogo de *E. coli*. Foram feitas quatro imunizações com intervalos de 15 dias, aplicando-se 15 µg de proteína recombinante juntamente com 50% v/v de adjuvante de Freund (Sigma-Aldrich) (completo na primeira imunização e incompleto nas demais) e 16% v/v de hidróxido de alumínio por dose, e o volume foi completado para 100 µL com solução salina tamponada com fosfato (PBS, 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Onze dias após a última imunização, o soro foi obtido e testado por ELISA usando a proteína recombinante e, por western blotting, usando como amostra extrato de encéfalo de camundongo.

#### 4.2.1.3 Protocolo de Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos à técnica de IHQ segundo protocolo utilizado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, local onde as análises foram realizadas. As lâminas foram submetidas à secagem por 16 horas a 37° C, resfriadas à temperatura ambiente, e marcadas com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®), delimitando a área do corte. Os cortes foram desparafinados e, para bloqueio da

peroxidase endógena, foram tratados com 10% de peróxido de hidrogênio em metanol por 20 minutos; após, as lâminas foram enxaguadas com TBST (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) por cinco minutos e tratadas com ácido fórmico 95% por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas três lavagens com TBST e tratamento com Proteinase K (DAKO, Ready-to-use), diluída em água destilada (1:1) por 1 minuto. Após nova lavagem, para o bloqueio protéico e assim redução das ligações inespecíficas, os cortes de tecido nervoso foram tratados com leite desnatado (Molico, Néstle) na diluição de 5% por 30 minutos e lavados com TBST. Para os cortes de tonsila palatina foram realizados testes com e sem o bloqueio protéico. Alíquotas de anticorpos (monoclonais anti-prion protein F89.160.1.5, F99.160.1.5, P4 e os policlonais R486 e M52), na diluição 1:500, foram aplicadas e as lâminas permaneceram armazenadas em câmara úmida, por 16 horas à 4°C. Posteriormente, os cortes foram tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit®, DAKO Corp., Carpinteria, EUA), por 20 minutos, lavados e tratados com conjugado estreptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, EUA), por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado o cromógeno DAB (DAKO), diluído em água destilada (1:1), até a visualização da cor castanha e, então, as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada. Foi realizada a contra coloração com hematoxilina por 15 segundos; em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente, desidratadas com álcool, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo sintético. De cada uma das oito amostras foram preparadas cinco lâminas, uma para cada anticorpo testado, totalizando 40 lâminas analisadas.

## **4.2.2 Western Blotting - WB**

### **4.2.2.1 Amostras**

Como controle positivo, um encéfalo de camundongo adulto (~40 dias após o nascimento) foi retirado do animal sacrificado por deslocamento cervical e lavado em PBS (solução salina tamponada com fosfato) gelado. Para os testes com tecidos de ovino, um animal foi sacrificado (~60 dias após o nascimento) por meio de sedação

seguida de sangramento da veia jugular, e amostras de mucosa retal, terceira pálpebra, linfonodo, baço e encéfalo foram colhidas.

#### 4.2.2.2 Preparação dos extratos protéicos

As amostras dos diferentes tecidos foram colocados em tubos (individuais) de homogeneização e adicionado tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% de NP40; 0,2% Deoxicolato de sódio) (um volume 5 vezes maior que o ocupado pelo tecido) acrescido dos inibidores de proteases PMSF e NEM e EDTA (na concentração final de 1 mM). A lise foi realizada por 40 minutos em banho de gelo e, a cada 10 minutos, um ciclo de maceração com pistilo de vidro (10-15 vezes). Após os 40 minutos de lise, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 19000 xg a 4°C. O sobrenadante foi colhido e guardado e o sedimento foi passado por um novo ciclo de lise (usando a metade do volume inicial de tampão de lise) seguido de centrifugação. O sobrenadante proveniente deste segundo lisado foi combinado com o primeiro sobrenadante. O extrato teve sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e foi submetido à reação de WB.

#### 4.2.2.3 Protocolo de Western Blotting

As amostras de extrato de tecido que foram submetidas a eletroforese de uma dimensão em gel 12% de poliacrilamida (12% SDS-PAGE - SDS- polycrylamide gel electroforesis) (Sambrooke Russel,2001). As amostras foram eletrotransferidas do gel para membrana de nitrocellulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante uma hora, sob voltagem de 100 V em tampão de transferência gelado (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol). As membranas foram bloqueadas durante duas horas com TBST (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-PrP<sup>C</sup> M52 na concentração de 1:500 diluído em tampão de bloqueio, por 16 horas à 4°C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada cinco vezes por três minutos com TBST e, em seguida, adicionou-se o anticorpo

secundário, anti-imunoglobulina de camundongo, conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) (BD Bioscience) na diluição de 1:4000. A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente, empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-radiograma Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

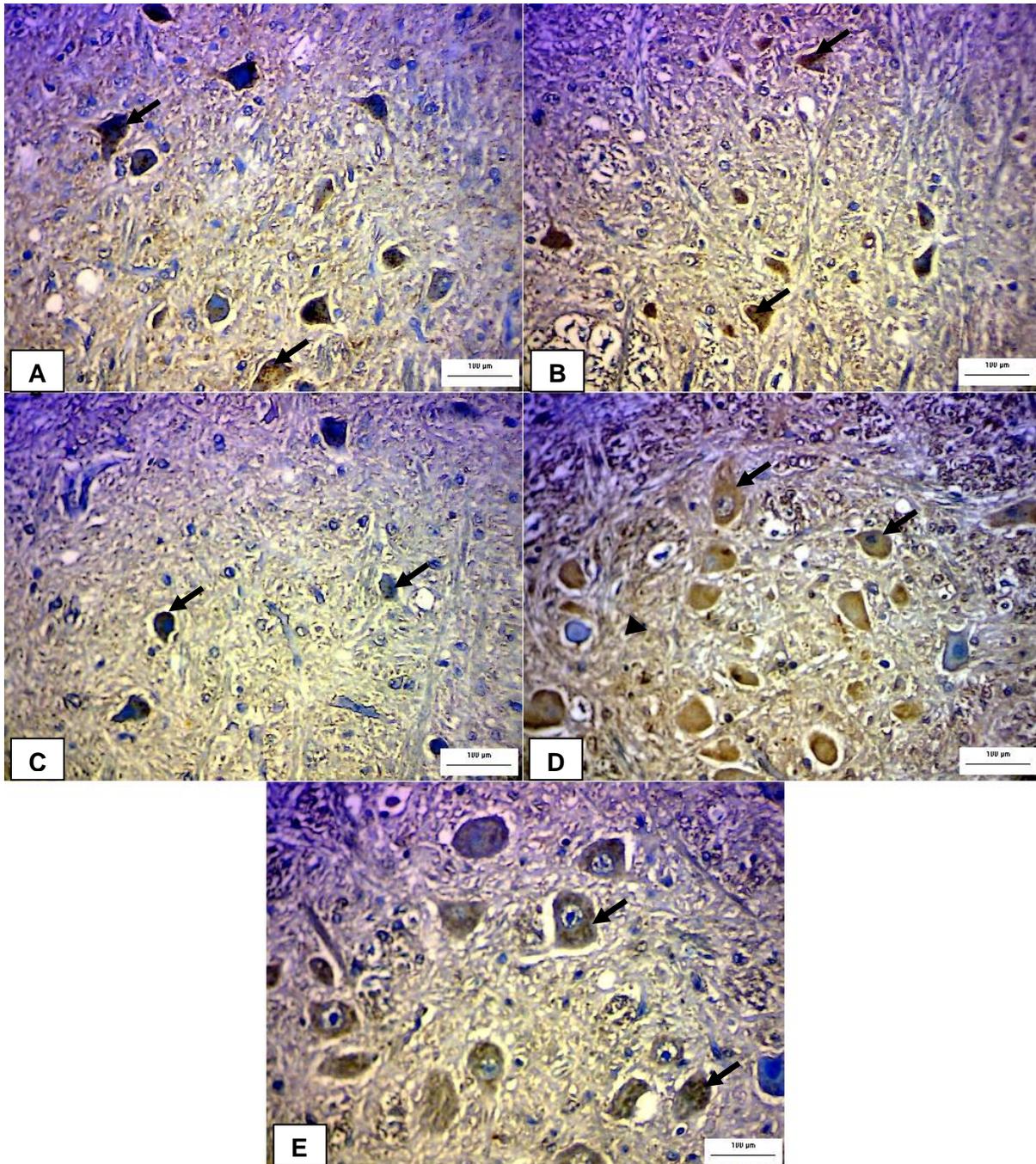
## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Imunohistoquímica

As análises imunohistoquímicas utilizando anticorpos monoclonais em amostras positivas de cérebro (mesencéfalo, tálamo e medula oblonga até o óbex) confirmaram a deposição da PrP<sup>Sc</sup> em neurônios (Figura 12), caracterizada por marcações de aspecto granular intracitoplasmáticas, como também descrito por Van Keulen et al. (1995), Thorgeirsdottir et al. (2002) e González et al. (2002). Com o anticorpo F99 (Figura 12a), observaram-se marcações mais intensas quando comparadas com as marcações visualizadas nas lâminas onde se utilizaram os anticorpos F89 (Figura 12b) e P4 (Figura 12c).

As análises utilizando os anticorpos policlonais também apresentaram positividade apenas intraneural, porém com background mais acentuado com o anticorpo R486 (Figura 12d). Neste experimento, optou-se por trabalhar com todos os anticorpos na mesma diluição, 1:500, o que pode ter resultado no aumento de background dos anticorpos policlonais. González et al. (2002), ao trabalhar com o anticorpo policlonal R486, na diluição de 1:10.000, relatou marcações positivas evidentes e sem background. Thorgeirsdottir et al. (2002) e Martins et al. (2012), além de identificarem marcações positivas intraneurais, visualizaram marcações no neurópilo, e O'Rourke et al. (1998) descreveram grânulos no neurópilo e ao redor dos vacúolos intraneurais, além de agregados de PrP<sup>Sc</sup> em torno das células da glia.

Figura 12: Amostra de medula/óbex de um ovino positivo para PrP<sup>Sc</sup> testada com diferentes anticorpos. (A) Teste com o anticorpo F99. As flechas indicam neurônios com marcações granulares característica da deposição de PrP<sup>Sc</sup>, obj. 20x. (B) Teste com o anticorpo F89. Flechas indicam marcações intraneurais, obj. 20x. (C) Teste com o anticorpo P4. Flechas indicam marcações positivas discretas, obj. 20x. (D) Teste com o anticorpo R486. Neurônios com marcações positivas (flechas), porém com background intenso (ponta de flecha), obj. 20x. (E) Teste com o anticorpo M52. Positividade intraneural indicada pelas flechas, obj. 20x.



A amostra negativa de cérebro, quando testada com os anticorpos monoclonais, não apresentou nenhuma marcação, apenas background. Quando testada com os anticorpos policlonais, identificou-se a presença de marcações intraneurais características de amostras positivas (Figura 13), ou seja, marcações inespecíficas que caracterizaram um diagnóstico falso positivo; desta forma, segundo este estudo, inviabilizando a utilização dos anticorpos policlonais R486 e M52 para diagnóstico de scrapie. O anticorpo policlonal M52 anteriormente foi testado apenas na técnica de WB para identificação da PrP<sup>C</sup> em encéfalo de camundongos (Costa et al., 2009); porém, o anticorpo R486 foi utilizado por González et al. (2002), (2003) e Lezmi et al. (2004) para diagnóstico da PrP<sup>Sc</sup> com bons resultados. González et al. (2003) e Lezmi et al. (2004) também obtiveram bons resultados com outros anticorpos policlonais produzidos em camundongos, o anticorpo 521 e o 505.

Nas análises de tecido linfóide, a amostra positiva de tonsila palatina submetida à imunohistoquímica, com os anticorpos monoclonais e policlonais, apresentou marcações evidentes no centro germinativo dos folículos linfóides (FL) como descrito por Leal et al. (2012) e, em maior grau, na zona clara do que na escura, assim como relatado por Gomez et al. (2007). Com o anticorpo F99 (figura 14a), as marcações foram mais intensas e em diversos focos do FL, sendo o anticorpo que apresentou melhores resultados. Com os anticorpos P4 (figura 14c) e R486 (figura 14d), as marcações também foram bem evidentes e suficientes para caracterizar uma amostra positiva, como também observado por Lezmi et al. (2004). Com os anticorpos F89 (figura 14b) e M52 (figura 14e) as marcações ficaram pouco evidentes. O'Rourke et al. (2002) observaram, em amostra de terceira pálpebra de ovinos pré-clínicos, a presença de PrP<sup>Sc</sup> em FL, nos linfócitos, macrófagos e células dendríticas, utilizando uma mistura dos anticorpos F99 e F89.

Figura 13: Amostra negativa para PrP<sup>Sc</sup> de mesencéfalo de ovino submetida à técnica de imunohistoquímica com diferentes anticorpos. (A) Teste com o anticorpo F99, amostra sem marcações (flecha), obj. 20x. (B) Teste com o anticorpo F89, amostra sem marcações (flecha), obj. 20x. (C) Teste com o anticorpo P4, amostra sem marcações (flecha), obj. 20x. (D) Teste com o anticorpo R486, marcações características de positividade (ponta de flecha), obj. 20x. (E) Teste com o anticorpo M52, marcações intensas características de amostra positiva (ponta de flecha), obj. 20x.

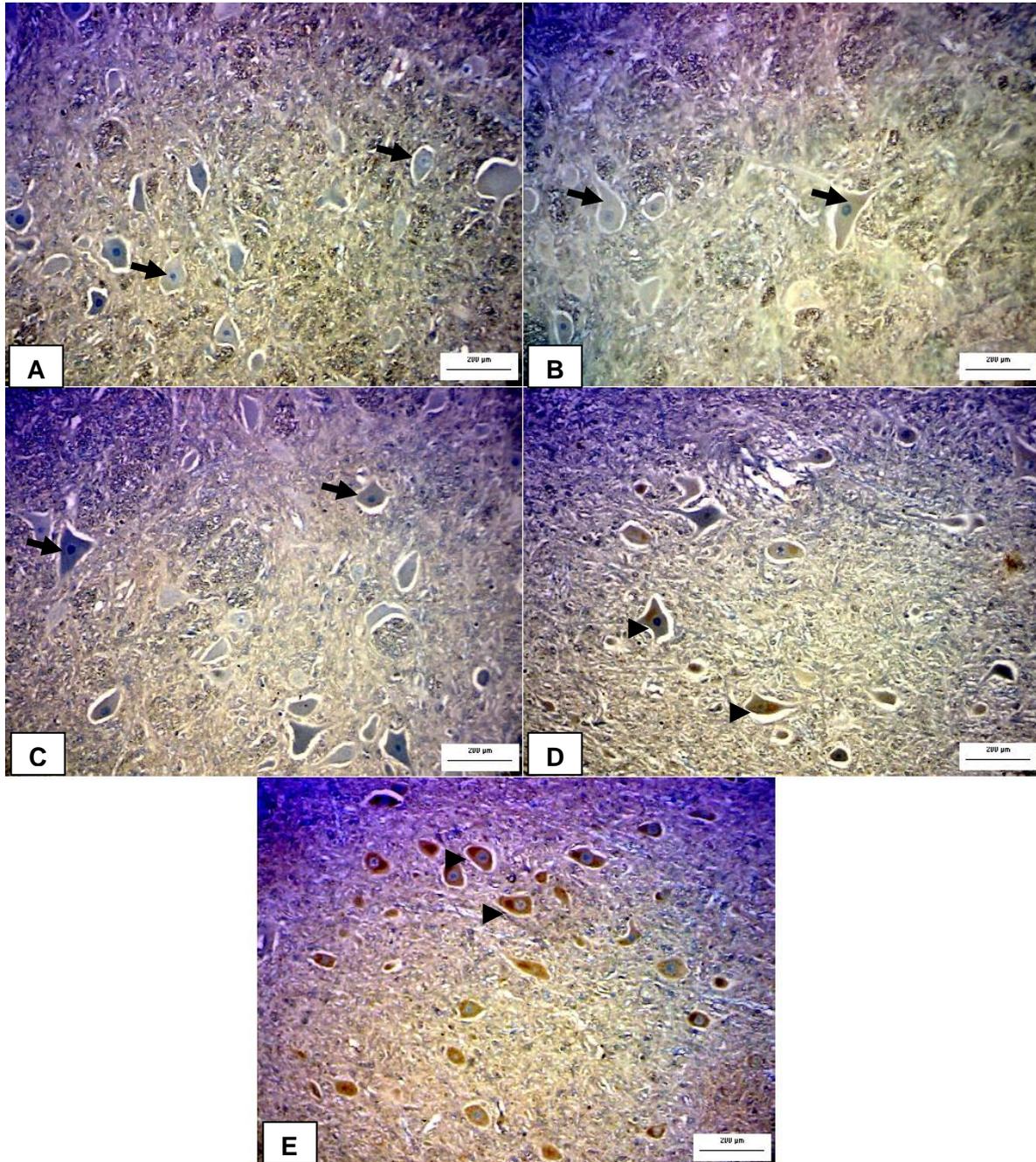
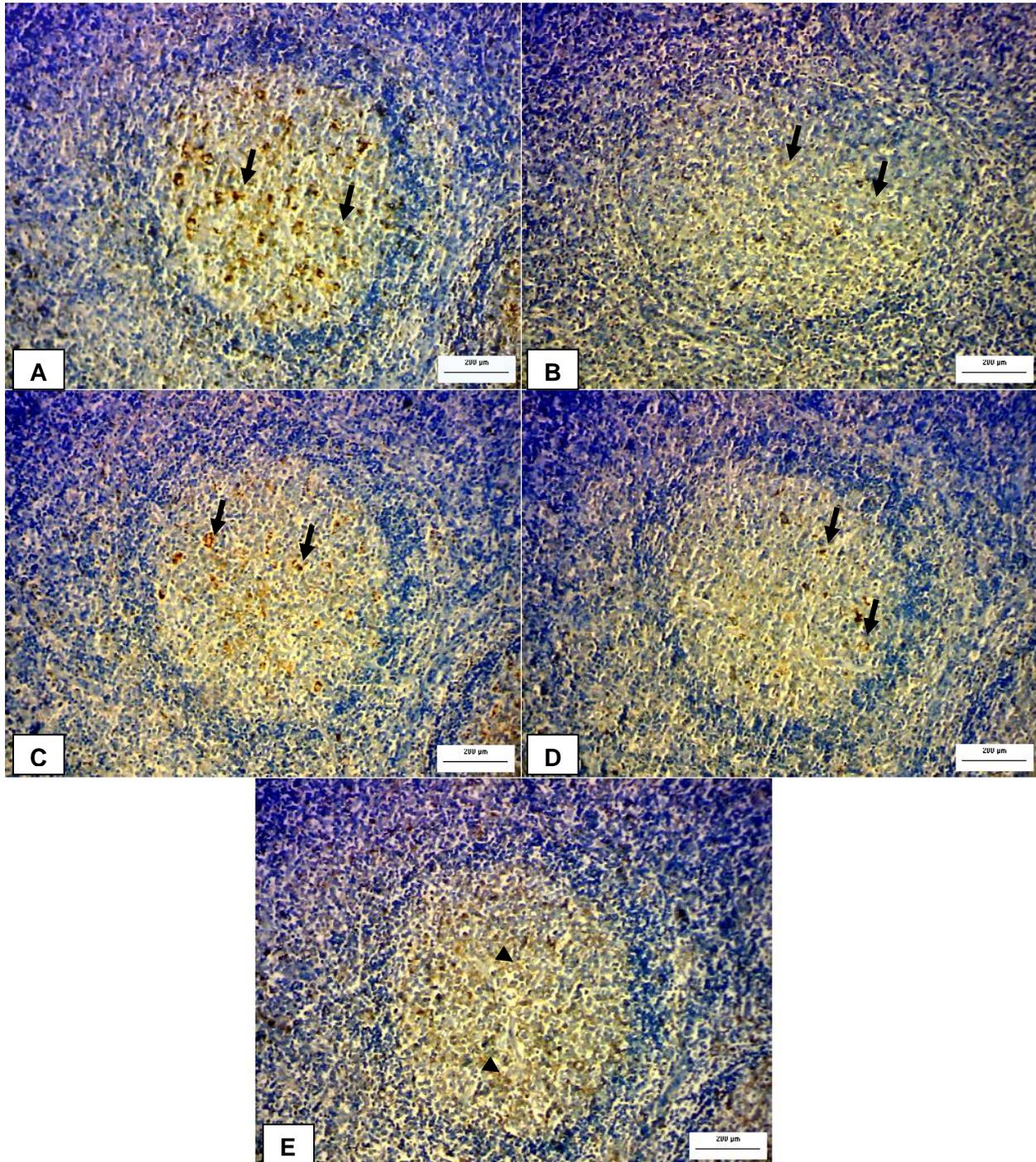


Figura 14: Amostra positiva de tonsila palatina de ovino. (A) Teste com o anticorpo F99. Marcações de coloração marrom do centro germinativo do FL (flecha), obj. 10x. (B) Teste com o anticorpo F89. Amostra com marcações discretas no centro germinativo do FL (flecha), obj. 10x. (C) Teste com o anticorpo P4. Marcações intensas (flecha), obj. 10x. (D) Teste com o anticorpo R486. Marcações moderadas (flecha), obj. 10x. (E) Teste com o anticorpo M52. Background intenso que dificulta a identificação de positividade (ponta de flecha), obj. 10x.

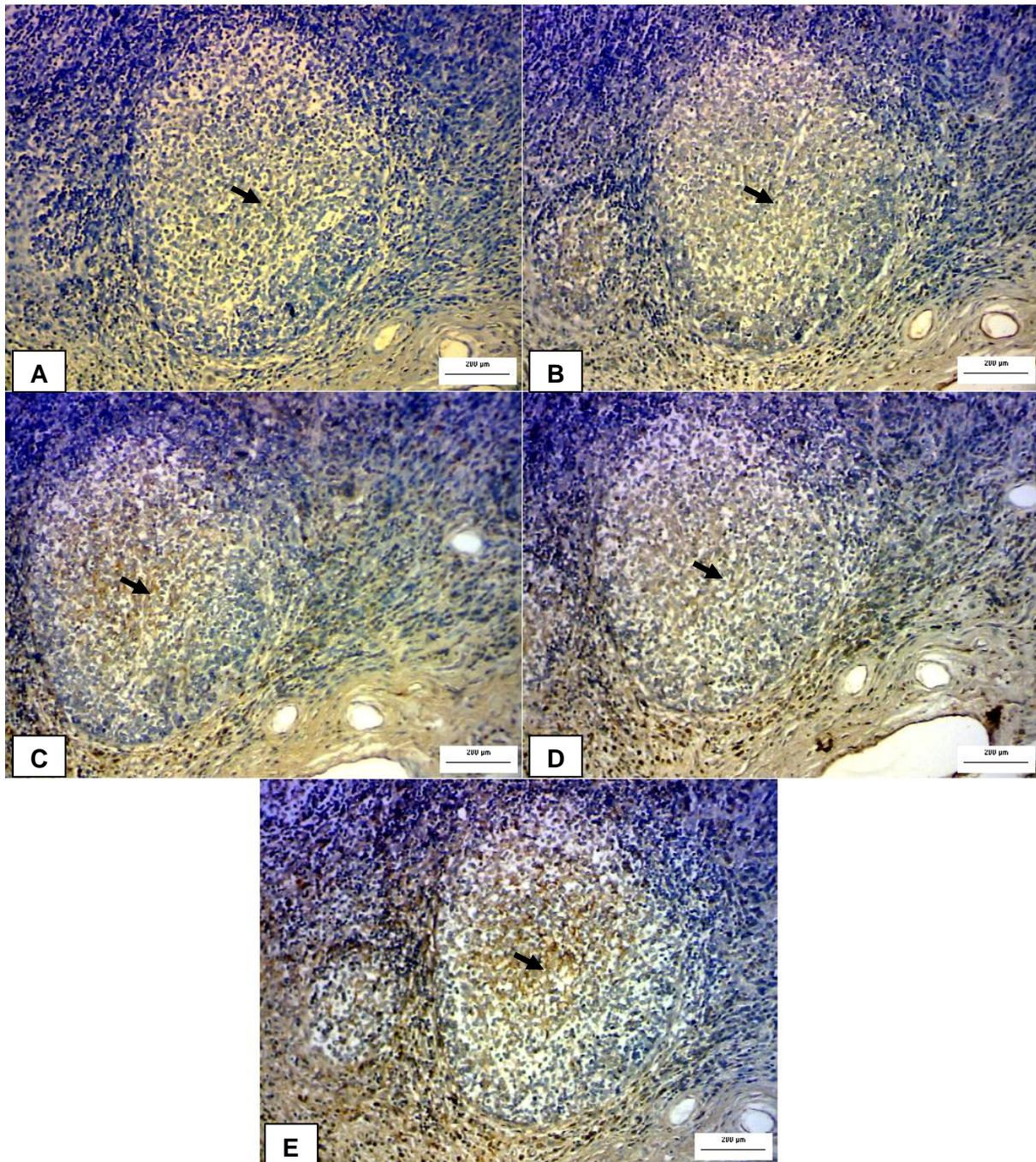


A amostra de tonsila palatina negativa testada com os anticorpos monoclonais F99 (figura 15a) e F89 (figura 15b) apresentou aspecto de amostra negativa e sem background, como também observado por O'Rourke et al. (2000) em amostra negativa para PrP<sup>Sc</sup>. Os anticorpos monoclonal P4 (figura 15c), policlonal R486 (figura 15d) e policlonal M52 (Figura 15e) apresentaram aspecto de amostra negativa, porém com background acentuado.

A identificação dos animais afetados no período pré-clínico é fundamental para o controle do scrapie, eliminando ovinos que poderiam ser potenciais fontes de infecção para outros animais no próprio ou em outros rebanhos (Leal et al., 2012). A detecção da PrP<sup>Sc</sup> no tecido linfoide é útil para a identificação dos ovinos afetados durante a etapa pré-clínica da doença (González et al. 2008). As tonsilas, o tecido linfoide de terceira pálpebra, o tecido linfóide presente na mucosa retal (RAMALT) e os linfonodos retrofaríngeos acumulam quantidades de PrP<sup>Sc</sup> detectáveis por IHQ no início da infecção (O'Rourke et al. 1998, 2000).

Os resultados falsos positivos encontrados com os anticorpos policlonais R486 e M52 em testes com amostra negativa de cérebro e a intensidade de background observada na amostra de tonsila palatina testada com os mesmos anticorpos, inviabilizam a utilização destes para diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos, nas condições do presente estudo. Apesar dos anticorpos monoclonais terem um custo mais elevado se comparado com os anticorpos policlonais, estes garantem a confiabilidade dos diagnósticos realizados. Resultados falsos positivos, ocasionados por diagnósticos com anticorpos pouco eficientes podem causar grandes perdas aos produtores, pois segundo INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 2 DE ABRIL DE 2008 (Brasil, 2008), no Brasil os animais com testes laboratoriais positivos devem ser submetidos a sacrifício sanitário e a propriedade deve ser interditada até a conclusão das ações realizadas no estabelecimento.

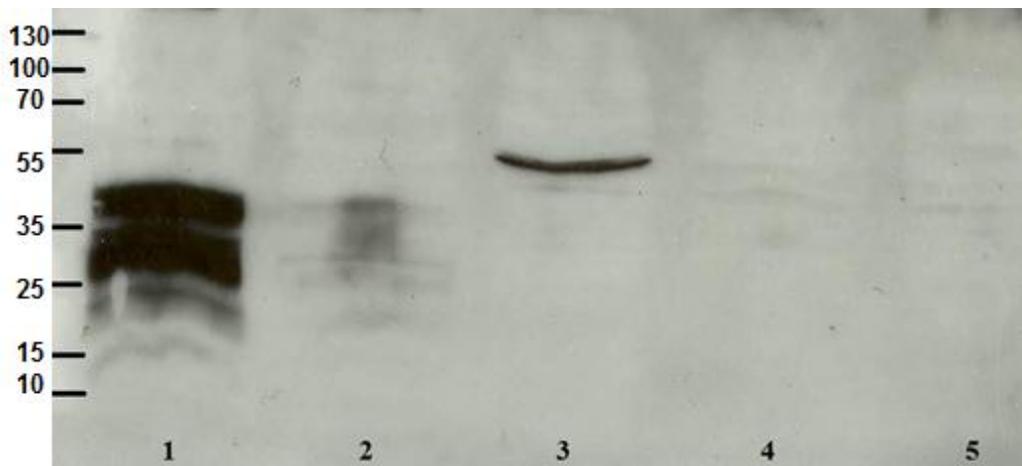
Figura 15: Amostra negativa de tonsila palatina de ovino. (a) Teste com o anticorpo F99, amostra negativa e sem background (flecha), obj. 10x. (b) Teste com o anticorpo F89, amostra sem marcações (flecha), obj. 10x. (c) Teste com o anticorpo P4, amostra negativa com background (flecha), obj. 10x. (d) Teste com o anticorpo R486, amostra negativa com background (flecha), obj. 10x. (e) Teste com o anticorpo M52, presença apenas de background (flecha), obj. 10x.



### 4.3.2 Western Blot

Nas amostras de encéfalo e tecidos linfóides (baço, linfonodo, mucosa retal e 3ª pálpebra), de acordo com a figura 16, observa-se que o anticorpo M52 é capaz de reconhecer a PrP<sup>C</sup> presente em grande quantidade no encéfalo de ovinos, como descrito por Prusiner (1998). O anticorpo em questão reconheceu o antígeno na sua forma biglicosilada (35 kDa), monoglicosilada e não glicosilada. Na amostra de baço, uma marcação mais tênue também pode ser observada. Nas amostras de 3ª pálpebra e linfonodo, nenhuma marcação foi observada. Na amostra de mucosa retal, uma marcação com massa de aproximadamente 50 kDa foi observada, no entanto não se pode afirmar que é a proteína príon celular, devido à discrepância na massa encontrada.

Figura 16: Cinco amostras de ovino; encéfalo (1), baço (2), mucosa retal (3), 3ª pálpebra (4) e linfonodo (5), analisadas pela técnica de Western Blot, utilizado o anticorpo primário policlonal anti-PrP<sup>C</sup> M52 na diluição de 1:500 e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na diluição 1:4000. A banda da mucosa retal apresentou peso molecular de aproximadamente 50 kDa e as bandas de baço e encéfalo entre 35 kDa. As amostras de linfonodo e 3ª pálpebra não apresentaram marcações.



Diversos autores tem descrito a utilização da técnica de WB para identificação da PrP<sup>Sc</sup> em amostras de encéfalo de ovinos (O'Rourke et al., 1998; Bilheude et al., 2007).

Porém, para diagnóstico *ante mortem* da doença, na análise de tecidos linfóides, este método possui algumas limitações, como a amostra colhida possuir uma pequena quantidade de FL, o que reduz a probabilidade de se obter quantidades detectáveis de PrP<sup>Sc</sup> e aumenta a probabilidade de resultados falso negativos (Leal et al., 2012). Este fato pode ter ocorrido no presente estudo, onde não se identificou a presença da PrP<sup>C</sup> nas amostras de terceira pálpebra e linfonodo.

No caso da amostra de mucosa retal, observou-se uma banda com peso molecular superior ao esperado para PrP<sup>C</sup>, assim como Priola et al. (1995) observaram uma marcação para PrP de 60 kDa em um estudo utilizando hamster. A PrP, segundo os autores, apresentava características de ambas as formas PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>, parecendo ser um dímero, ligado de forma covalente, de dois monômeros de 30 kDa.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Apesar dos anticorpos policlonais possuírem um valor mais acessível que os anticorpos monoclonais e, no caso do anticorpo M52 ser produzido no Brasil, nas condições do presente estudo, a utilização dos anticorpos policlonais seria inviável, pois o resultado da análise pode ser dado como falso positivo, ou seja, não ser confiável. A utilização do anticorpo M52 para identificação da PrP<sup>C</sup> em amostra de encéfalo e baço, através da técnica de western blot, mostrou-se eficiente, mas em outros tecidos do sistema linfóide a PrP<sup>C</sup> não foi identificada.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ovinocultura brasileira tem crescido significativamente nos últimos anos, com o aumento do consumo interno de carne ovina. Além disto, o Brasil é o maior exportador de carne bovina no mundo. Torna-se essencial, portanto, um controle rigoroso da sanidade dos rebanhos, visto que restrições sanitárias são impeditivas de comercialização. O Brasil possui um Programa de Controle das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, entre elas a Encefalopatia Espongiforme Bovina e Scrapie.

O diagnóstico precoce do scrapie tem grande importância, sendo essencial a realização correta da colheita de amostras de tecido linfóide. Com este estudo, observou-se que, apesar da técnica de biópsia retal ser simples, há a possibilidade de se colher material de área inadequada ou amostras com poucos FL, fato que torna necessário avaliar as amostras através de técnicas histológicas antes de submetê-las à IHQ. É de extrema importância que haja um treinamento prévio para as pessoas responsáveis por realizar as colheitas, evitando desta forma que as amostras sejam colhidas de local inadequado ou com uma pequena quantidade de FL, o que pode ocasionar um diagnóstico falso negativo. O fato dos animais jovens apresentarem quantidade de FL superior aos animais mais velhos é uma questão que também deve ser considerada, optando-se por colher uma amostra maior para animais mais velhos ou até mesmo duas amostras, o que pode aumentar o número de FL.

Ao submeter amostras para diagnóstico de scrapie, a escolha do anticorpo é de suma importância, pois se trata do diagnóstico de uma doença de notificação obrigatória e a presença de animais positivos irá ocasionar o abate de todos os casos confirmados. Apesar dos anticorpos policlonais possuírem um valor mais acessível que os anticorpos monoclonais, no presente estudo, sua utilização demonstrou ser inviável para o diagnóstico de scrapie, pois o resultado demonstrou um falso positivo, ou seja, resultados de análises com estes anticorpos não são confiáveis. Novos testes com os anticorpos policlonais, com alterações no protocolo de IHQ e diferentes diluições podem trazer novos resultados. A utilização do anticorpo M52 para identificação da PrP<sup>C</sup> em amostra de encéfalo e baço, através da técnica de WB,

mostrou-se eficiente, mas em tecidos do sistema linfóide a PrP<sup>C</sup> não foi identificada. Outros testes com novas amostras e testando não apenas o anticorpo M52, mas sim os cinco anticorpos utilizados na IHQ, é uma possibilidade para futuros estudos, não apenas com o intuito de identificar a PrP<sup>C</sup> mas também a PrP<sup>Sc</sup>.

## REFERÊNCIAS

Aleksandersen M, Nicander L, Landsverk T. Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid in the large intestine of sheep. *Developmental and Comparative Immunology*. 1991; 15: 413 - 422.

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](http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/AHR_Web_PDF/E_chapter_3.pdf)> Acesso em 11 jul. 2012.

Andréoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, Keulen LV, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 2000; 81:3115 - 3126.

Andréoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnreau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Benestad SL, Elsen JM, Schelcher F. PrP<sup>Sc</sup> 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*. 2002; 83: 2607-2616.

Belt PBGM, Muileman IH, Schreuder BEC, Bos-De-Ruijter J, Gielkens ALJ, Smits MA. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 1995; 76: 509 - 517.

Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record*. 2003; 153: 202-208.

Benestad SL, Andréoletti O, Laude H, Grassi J, Bilheude JM, 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.

Bilheude JM, Brun A, Morel N, Díaz San Segundo F, Lecroix S, Espinosa JC, González, Steele P, Grassi J, Andréoletti O, Torres JM. Discrimination of sheep susceptible and resistant to transmissible spongiform encephalopathies by an haplotype specific monoclonal antibody. *Journal of Virological Methods*. 2007; 145:169–172.

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

Brown, P. Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. *Vox Sanguinis*. 2005; 89: 63-70.

Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*. 1991; 30:7672-7680.

Cockcroft PD, Clark AM. The Shetland Islands scrapie monitoring and control programme: analysis of the clinical data collected from 772 scrapie suspects 1985-1997. *Research in Veterinary Science*. 2006; 80: 33-44.

Costa MDM, Paludo KS, Klassen G, Lopes MH, Mercadante AF, Martins VR, Camargo AA, Nakao LS, Zanata SM. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. *Neuroscience Letters*. 2009; 461:16-20.

Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record*. 1998; 42:623-625.

Dawson M, Moore RC, Bishop SC. Progress and limits of PrP gene selection. *Veterinary Research*. 2008; 39:25.

Dennis MM, Thomsen BV, Marshall KL, Hall SM, Wagner BA, Salman MD, Norden DK, Gaise C, Sutton DL. Evaluation of immunohistochemical detection of prion protein in rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue for diagnosis of scrapie in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 2009; 70:63-72.

Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie. *Revue scientifique et technique. Office International des Epizooties*. 2003; 22:121-143.

Dickinson AG. Scrapie in sheep and goats. In: Kimberlin, R.H. (ed), *Slow virus diseases of animals and man*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1976. p.209-241.

Ersdal C, Ulvund MJ, Benestad SL, Tranulis MA. Accumulation of pathogenic prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Veterinary Pathology*. 2003; 40:164-174.

Espenes A, Press C, McL, Landsverk T, Tranulis MA, Aleksandersen M, Gunnes G, Benestad SL, Fuglestad R, Ulvund MJ. Detection of PrP<sup>Sc</sup> in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *Journal of Comparative Pathology*. 2006; 134:115-125.

Espinosa JC, Díaz-San Segundo F, Parra B, Rodríguez-Benito JA, Herva ME, Relaño-Ginés A, Brun A, Cano MJ, Morales M, Torres JM. Scrapie: susceptibilidad/resistencia a la enfermedad. *Mundo Ganadero*. 2004; 169.

EU. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain

transmissible spongiform encephalopathies. Official Journal of the European Union, v.147, p. 1-40, 2001.

EUROPEAN COMMISSION Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) in the EU in 2010. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse\\_bse/docs/annual\\_report\\_tse2010\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/annual_report_tse2010_en.pdf)>. Acesso em: 17 jul. 2012.

Fernandes RE, Real CM, Fernandes JCT. "Scrapie" em ovinos no Rio Grande do Sul. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. 1978; 6:139-143.

Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2005; 17:509-527.

Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beureyther 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. 1990; 87:2476-2480.

Gomez N, Benedicto L, Geijo MV, Garrido JM, Garcia-Crespo D, Korkostegi JL, Hurtado A, Juste RA. Use of immunodiagnostic tests on an outbreak of scrapie in Latxa sheep: Pathogenetic and epidemiologic implications. Small Ruminant Research. 2007; 72: 141–148

González L, Martin S, Begara-McGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M, Jeffrey M. Effects of Agent Strain and Host Genotype on PrP Accumulation in the Brain of Sheep Naturally and Experimentally Affected with Scrapie. Journal Comparative Pathology. 2002, 126;17–29.

González L, Martin S, Jeffrey M. Distinct profiles of PrP<sup>d</sup> immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. Journal of General Virology. 2003; 84:1339-1350.

González L, Jeffrey M, Sisó S, Martin S, Bellworthy SJ, Stack MJ, Chaplin MJ, DAVIS L, Dagleish M, Reid H. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. Veterinary Pathology. 2005; 156:846-847.

González L, Dagleish MP, 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. 2008; 162:397-403.

Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A, Lühken G, Mathey J, Eiden M, Lugan S, Hoffmann C, Espinosa JC, Baron T, Torres JM, Erhardt G, Androletti O. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. Emerging Infectious Diseases. 2007; 13:1201-1207.

Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *Journal of Infectious Diseases*. 1982; 146:657- 664.

HARDT, M.; BARON, T.; GROSCHUP, M. H. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Comparative Pathology*, v. 122, p. 43 – 53, 2000.

Harris D.A. Cellular biology of prion disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12:429-444.

Heggebo R, Press CMcL, Gunnes G, Ulvundt MJ, Tranulis MA, Landsverk T. Detection of PrPSc in lymphoid tissue of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *Journal of Comparative Pathology*. 2003; 128:172-181.

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

Hunter N, Moore L, Hosie BD, Dingwall WS, Greig A. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Veterinary Record*. 1997; 140:59-63.

Hunter N. Scrapie and experimental BSE in sheep. *British Medical Bulletin*. 2003; 66:171-183.

Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, Chong A, Foster J, Sisó S, González L, Jeffrey M, Hunter N. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*. 2008; 112:4739-4745.

Jeffrey M, Martin S, González L, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Jackman R. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 2001; 125: 271-284.

Jeffrey M, González L. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2007; 33:373-394.

Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PlosPathogens*. 2006; 2.

Kimberlin RH. Transmissible encephalopathies in animals. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1990; 54:30-37.

Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, Simmons HA. Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Veterinary Research*. 2008; 4:14.

Leal JS, Correa GLF, Dalto AGC, Boos GS, Oliveira EC, Bandarra PM, Lopes RFF, Driemeier D. Utilização de biópsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para

diagnóstico de scrapie em uma propriedade da região sul do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012; 32:990-994.

Lezmi S, Martin S, Simon S, Comoy E, Bencsik A, Deslys JP, Grassi J, Jeffrey M, Baron T. Comparative Molecular Analysis of the Abnormal Prion Protein in Field Scrapie Cases and Experimental Bovine Spongiform Encephalopathy in Sheep by Use of Western Blotting and Immunohistochemical Methods. Journal of Virology. 2004; 78: 3654–3662.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. Physiological Reviews. 2008; 88:673-728.

Luhken G, Buschmann A, Brandt H, Eidenb M, Groschupb MH, Erhardt G. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. Veterinary Research. 2007; 38:65-80.

Maddison BC, Baker CA, Rees HC, Terry LA, Thorne L, Bellworthy SJ, Whitlam G.C.; Gough KC. Prions Are Secreted in Milk from Clinically Normal Scrapie-Exposed Sheep. Journal of Virology. 2009; 83:8293-8296.

Maddison BC, Rees HC, Baker CA, Taema M, Bellworthy LEIGH THORNE, S.J.; TERRY, L.A.; GOUGH, K.C. Prions Are Secreted into the Oral Cavity in Sheep with Preclinical Scrapie. The Journal of Infectious Diseases. 2010; 201:1672-1676.

Martins HM, Carvalho NM, Ribas NLKS, Driemeier D, Lemos RAA, Guimarães EB. Scrapie e seu diagnóstico diferencial em ovinos no Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012; 32:1230-1238.

Mckintosh E, Tabrizi SJ, Collinge J. Prion diseases. Journal of NeuroVirology. 2003; 9:183-193.

Monleón E, Monzon M, Hortells P, Bolea R, Acin C, Vargas F, Badiola JJ. Approach to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. Journal of Virological Methods. 2005; 124:165-171.

Monleón E, Garza MC, Sarasa R, Álvarez-Rodríguez J, Bolea R, Monzón M, Vargas MA, Badiola JJ, Acin C. An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. Veterinary Microbiology. 2011; 147:237–243.

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; 56.

OIE. Scrapie. 2009 Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.13\\_SCRAPIE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_SCRAPIE.pdf)>. Acesso em: 03 de julho de 2012.

Ollhoff RD, Sotomaior CS. Scrapie. Boletim Técnico. Instituto Biológico. 2011; 24:54-60.

O'Rourke KI, Baszler TV, Parish SM, Knowles DP. Preclinical detection of PrP<sup>Sc</sup> in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Veterinary Record*. 1998; 142:489-491.

O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE, Miller JM, Cutlip RC, Wells GAH, Ryder SJ, Parish SM, Hamir AN, Cockett NE, Jenny A, Knowles DP. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38:3254-3259.

O'Rourke KI, Duncan JV, Logan JR, Anderson AK, Norden DK, Williams ES, Combs BA, Stobart RH, Moss GE, Sutton DL. Active Surveillance for Scrapie by Third Eyelid Biopsy and Genetic Susceptibility Testing of Flocks of Sheep in Wyoming. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002; 9:966-971.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90: 10962-10966.

Pohl de Souza FP, Sotomaior CS, Ollhoff RD, Rodrigues N. Ocorrência de três casos de tremor enzoótico dos ovinos. 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.

Priola SA, Caughey B, Wehrly K, Chesebro B. A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:3299-305.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982; 216:136-144.

Prusiner SB. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nobel Lecture. 1998; 95:13363-13383.

Prusiner SB, Scott MR, DeArmond, SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell*. 1998; 93:337-348.

Prusiner SB. An introduction to prion biology and diseases. In: Prusiner SB. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004; 1-87.

Prusiner SB, Williams E, Laplanche JL, Shinagawa M. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. In: Prusiner SB. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004; 545-594.

Roden JA, Nieuwhof GJ, Bishop SC, Jones DA, 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*. 2006; 73:1-16.

Rodríguez-Martínez AB, Garrido JM, Maza S, Benedicto L, Geijo M, Gómez N. Atypical /Nor98 scrapie in Basque Country: a case report of eight outbreaks. *BMC Veterinary Research*. 2010; 6:17.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001; 3.

Sargison N. Scrapie in sheep and goats. *In Practice*. 1995; 17:467-469.

Stevens KB, Del Río Vilas VJ, Guitián J. Classical sheep scrapie in Great Britain: spatial analysis and identification of environmental and farm-related risk factors. *BMC Veterinary Research*. 2009; 5: 33.

Sotomaior CS, Ribeiro FTL, Ollhoff RD. Seleção de ovinos geneticamente resistentes ao scrapie. *Biotemas*. 2012; 25:237-247.

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*. 2009; 40:19.

Thorgeirsdóttir S, Georgsson G, Reynisson E, Sigurdarson S, Palsdóttir A. Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection of sheep in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PrP genotypes. *Archives of Virology*. 2002, 147; 709–722.

Van Keulen LJM, Schreuder BEC, Meloen RH, Poelen-Van Den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans MEW, Langeveld J.P.M. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Veterinary Pathology*. 1995; 32:299-308.

Van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34:228-231.

Wechselberger C, Wurm S, Pfarr W, Höglinger O. The Physiological Functions of Prion Protein. *Experimental Cell Research*. 2002; 281.

Wong B, Wang H, Brown DR, Jones IM. Selective oxidation of methionine residues in prion proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 259:2352-355.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GNM, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas ARO, Cabral ALB, Lee KS, Juliano MA, Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO Journal*, 2002; 21: 3307-3316.