CAIO RODRIGUES DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE DA
PROTEÍNA PRIÔNICA NO REBANHO OVINO DO
ESTADO DE SÃO PAULO: MÉTODOS E
APLICABILIDADE À SELEÇÃO PARA RESISTÊNCIA AO
SCRAPIE**

SÃO PAULO

2012

CAIO RODRIGUES DOS SANTOS

**Detecção de polimorfismos do gene da proteína priônica
no rebanho ovino do Estado de São Paulo: métodos e
aplicabilidade à seleção para resistência ao scrapie**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

De acordo:

Orientador

São Paulo

2012

Obs.: A versão original se encontra disponível na biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2572
FMVZ

Santos, Caio Rodrigues dos
Detecção de polimorfismos do gene da proteína priônica no rebanho
ovino do Estado de São Paulo: métodos e aplicabilidade à seleção para
resistência ao scrapie / Caio Rodrigues dos Santos. -- 2012.
127 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Scrapie. 2. Genotipagem de polimorfismos. 3. Sequenciamento
genômico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de polimorfismos do gene da proteína priônica do rebanho ovino nacional, métodos e aplicabilidades para resistência ao scrapie", protocolado sob o nº 1972/2010, utilizando 150 (cento e cinquenta) ovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Detection of polymorphisms of the prion protein gene of the National Sheep Flock, method and applications for resistance to scrapie", protocol number 1972/2010, utilizing 150 (one hundred and fifty) sheep, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Caio Rodrigues

Título: Detecção de polimorfismos do gene da proteína priônica no rebanho ovino no Estado de São Paulo: Métodos e aplicabilidade à seleção para resistência ao Scrapie.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo carinho e pelo amor

Aos meus irmãos

Aos meus alunos

AGRADECIMENTOS

- Ao meu eterno orientador e pai científico; Prof. Dr. Paulo César Maiorka, por acreditar em minha evolução como cientista e como ser humano.
- Aos colegas do grupo de pesquisa em Neuropatologia; (em ordem alfabética) Adriana, Anna, Bruna Penna, Claudia Mori, Denise, Elza Marlet, Fernando Hosomi e para Beth (VPS)
- Aos colegas de pós graduação do VPT
- Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão e ao Dr. Ênio Mori, o meu eterno agradecimento.
- A todos os funcionários da FMVZ-USP, em especial ao Raimundo, Edson, Suli, Lúcio, Buga e Claudio Arroyo, sem a ajuda de vocês não há ciência!
- Ao amigo de profissão, empresa e pessoal Guilherme Durante Cruz, pelas risadas e pelo companheirismo.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto Nº 578158/2008-6. Edital MAPA 64/2008.

RESUMO

SANTOS, C. R. dos. **Deteção de polimorfismos do gene da proteína priônica no rebanho ovino no Estado de São Paulo:** métodos e aplicabilidade à seleção para resistência ao scrapie. [Detection of polymorphisms in the prion protein gene in sheep flock in the State of São Paulo: methods and applicability of selection for scrapie resistance]. 2012. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Scrapie ou paraplexia enzoótica dos ovinos é uma doença neurodegenerativa fatal que acomete ovinos e raramente caprinos. A doença é influenciada por polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do gene prnp que codifica a proteína priônica. Os animais podem ser susceptíveis ou resistentes, de acordo com as sequências alélicas observadas nos referidos códons. No Brasil ocorreram apenas casos de animais que foram importados, sendo o país considerado livre da doença. Neste trabalho foi realizada a genotipagem dos diferentes polimorfismos associados ao desenvolvimento do scrapie e a categorização em animais susceptíveis e resistentes. Foram sequenciadas 118 amostras provenientes de ovinos da raça Santa Inês criados em propriedades localizadas no Estado de São Paulo. Destas amostras foram identificados 6 alelos e 11 genótipos (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/VRQ, AHQ/AHQ, ARR/ARR, ARR/AHQ, VRQ/VRQ, ARQ/TRQ, TRR/TRR, TRQ/TRQ), dentre os quais o genótipo ARQ/ARQ teve ocorrência de 56,7%. Em nosso estudo foi detectada a presença da tirosina no códon 136, observação rara na medida em que não existem relatos nacionais e relatos envolvendo a raça Santa Inês descrevendo este polimorfismo. Com os resultados obtidos, foi possível determinar a existência de grande variabilidade genética relacionada à raça Santa Inês no Estado de São Paulo, apesar da variabilidade, apenas 1,69% dos genótipos observados são extremamente resistentes ao scrapie. Estes dados demonstram que a raça nativa Santa Inês pode ser considerada potencialmente susceptível ao scrapie.

Palavras-chave: Scrapie. Genotipagem de polimorfismos. Sequenciamento genômico.

ABSTRACT

SANTOS, C. R. dos. **Detection of Polymorphisms in the prion protein gene in Sheep flock in the State of São Paulo:** Methods and Applicability of Selection for Scrapie Resistance.[Detecção de Polimorfismos do Gene da Proteína Priônica no Rebanho Ovino no Estado de São Paulo: Métodos e Aplicabilidade à Seleção para Resistência ao Scrapie]. 2012. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil, 2012.

Enzootic paraplexia or scrapie is a fatal neurodegenerative disease affecting mainly sheep and rarely goats. The disease is influenced by polymorphisms at codons 136, 154 and 171 of prnp gene that encodes the prion protein. The animals may be susceptible or resistant to the development of the disease according to the allelic sequences observed in these codons. In Brazil there were only cases of scrapie in imported animals, therefore the country is considered free of the disease. This study performed the genotyping of different polymorphisms associated to the development of scrapie. Then, based on these findings the animals were categorized in resistant and susceptible. A total of 118 samples were sequenced from the Santa Ines sheep raised on properties located in the State of Sao Paulo. From these samples, 6 alleles and 11 genotypes were identified (ARQ / ARQ, ARR / ARQ, ARQ / AHQ, ARQ / VRQ, AHQ / AHQ, ARR / ARR, ARR / AHQ, VRQ / VRQ, ARQ / TRQ, TRR / TRR, TRQ / TRQ), the genotype ARQ / ARQ presented a frequency of 56.7%. It was also detected the presence of tyrosine at codon 136, which may be considered a rare observation, since there is no report regarding Santa Ines breeding presenting this polymorphism. These results showed the great genetic variability in Santa Ines in Sao Paulo and only 1,69% of the genotypes observed are extremely resistant to scrapie. These data demonstrate that the Santa Ines sheep can be considered potentially susceptible to scrapie

Keywords: Scrapie. Genotyping of polymorphisms. Genomic sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo da Proteína Priônica.....	23
Figura 2 -	Distribuição de casos positivos de scrapie no mundo.....	32
Figura 3 -	Casos positivos de scrapie na comunidade europeia.....	33
Figura 4 -	Distribuição Geográfica de casos positivos para scrapie nos EUA...	34
Figura 5 -	Ocorrências de casos positivos de scrapie no território Brasileiro....	35
Figura 6 -	Ocorrências de casos positivos de scrapie no Estado de São Paulo	35
Figura 7 -	Mapa do Estado de São Paulo.....	43
Figura 8 -	Mapa da Cidade de São Paulo.....	44
Figura 9 -	Tela inicial da ferramenta BLASTN.....	56
Figura 10 -	Gel representativo da integridade do material genético.....	65
Figura 11 -	Gel representativo para a análise da reação de PCR.....	66
Figura 12 -	Eletoferograma representativo de uma reação de sequenciamento	67
Figura 13 -	Comparação genotípica entre sequencias ARQ/ARQ.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Funções fisiológicas atribuídas a proteína priônica.....	21
Quadro 2 -	Proteína priônica com alterações de conformação.....	24
Quadro 3 -	SNPs já descritos associados ao gene PRNP.....	25
Quadro 4 -	Categorização dos animais quanto ao genótipo.....	26
Quadro 5 -	Relação dos animais utilizados neste trabalho.....	45
Quadro 6 -	Concentração final dos componentes das reações de PCR.....	51
Quadro 7 -	Volume final dos componentes das reações de PCR.....	52
Quadro 8 -	Concentração dos componentes do sequenciamento.....	55
Quadro 9 -	Sequências de oligonucleotídeos utilizados no q-PCR.....	57
Quadro 10 -	Sequências das sondas utilizadas no q-PCR.....	58
Quadro 11 -	Componentes utilizados na reação de q-PCR.....	58
Quadro 12 -	Categorização dos animais quanto ao genótipo.....	59
Quadro 13 -	Valores obtidos após quantificação do material genético.....	61
Quadro 14 -	Genótipos obtidos com as reações de sequenciamento.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Categorização genotípica geral.....	69
Gráfico 2 -	Categorização geral quanto a susceptibilidade.....	70
Gráfico 3 -	Categorização genotípica propriedade A.....	71
Gráfico 4 -	Categorização quanto a susceptibilidade propriedade A.....	72
Gráfico 5 -	Categorização genotípica propriedade B.....	73
Gráfico 6 -	Categorização quanto a susceptibilidade propriedade B.....	74
Gráfico 7 -	Categorização genotípica propriedade C.....	75
Gráfico 8 -	Categorização quanto a susceptibilidade propriedade C.....	76
Gráfico 9 -	Categorização genotípica propriedade D.....	77
Gráfico 10 -	Categorização quanto a susceptibilidade propriedade D.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = Alanina

ABI = Applied Biosystems

BLASTN = Programs Search Nucleotide Databases Using a Nucleotide Query

CJD = Creutzfeldt-Jakob Disease

Cu = Cobre

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

EEB = Encefalopatia Espongiforme Bovina

EET = Encefalopatia Espongiforme Transmissível

EUA = Estados Unidos da América

GALT = Gut-associated Lymphoid Tissues (tecidos linfóides associado ao intestino)

H = Histidina

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

kDA = Kilodalton

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NSEP = National Scrapie Eradication Program

NSP = National Scrapie Plan

OIE = Organização Internacional de Epizootíases

ORF = Open Reading Frame

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

PrPc = Proteína Príon Celular

PrPSC = Proteína Príon Associada ao scrapie

Q = Glutamina

q-PCR = Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (Tempo Real)

R = Arginina

R = Resistência

S = Susceptibilidade

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismo de base única)

T = Treonina

UE = União Européia

UV = Raio Ultravioleta

V = Valina

vCJD = Variante da Creutzfeldt-Jakob Disease

SUMÁRIO

1 Introdução	16
2 Revisão de Literatura	21
2.1 Proteína Priônica Fisiológica	21
2.2 Proteína Priônica Patogênica	22
2.3 Gene PRNP	24
2.4 Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	27
2.4.1 <i>Encefalopatias Espongiformes em Humanos</i>	27
2.4.2 <i>Encefalopatias Espongiformes em Animais de Produção</i>	29
3 Objetivos	38
3.1 Objetivos Gerais	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 Justificativa	40
5 Material e Métodos	43
5.1 Animais	43
5.2 Extração do Material Genético	50
5.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR)	51
5.4 Purificação dos Produtos de PCR	55
5.5 Sequenciamento Genômico	55
5.5.1 <i>Análise de polimorfismos</i>	56
5.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR)	57
5.7 Categorização dos Animais	59
6 Resultados	61
6.1 Animais	61
6.2 Extração e Verificação da Integridade Genética	61
6.3 Reação em Cadeia da Polimerase	66
6.4 Sequenciamento Genômico	66
6.4.1 <i>Análise Geral dos genótipos obtidos</i>	67
6.4.2 <i>Propriedade A</i>	70
6.4.3 <i>Propriedade B</i>	72
6.4.4 <i>Propriedade C</i>	74

6.4.5 <i>Propriedade D</i>	76
6.4.6 <i>Análise dos Polimorfismos</i>	78
6.5 <i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)</i>	79
7 Discussão	81
7.1 Alelos	81
7.2 Genótipos	82
7.3 Categorização quanto a susceptibilidade e resistência	84
7.3.1 <i>Grupo R5</i>	84
7.3.2 <i>Grupo R4</i>	85
7.3.3 <i>Grupo R3</i>	86
7.3.4 <i>Grupo R2</i>	87
7.3.5 <i>Grupo R1</i>	87
7.4 Métodos Utilizados	88
7.4.1 <i>Sequenciamento Genômico</i>	88
7.4.2 <i>q-PCR</i>	89
7.5 Perspectivas	90
8 Conclusões	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

Scrapie ou Paraplexia Enzoótica dos ovinos é a mais antiga encefalopatia espongiforme transmissível descrita na literatura, sendo que os primeiros relatos científicos ocorreram ainda no século 18 (ROELS et al., 2004). Esta doença é caracterizada por lesões neurodegenerativas e vacuolizações no sistema nervoso central (SNC). Clinicamente o animal acometido apresenta alterações comportamentais como ataxia, descoordenação e paralisia motoras, tremores e intenso prurido (MCGAVIN, 2006).

O termo Scrapie deriva-se da expressão inglesa *“to scrapie against something”* que significa “esfregar-se contra alguma coisa” (BRASIL, 2008). Pela presença de intenso prurido, a doença tem a sinonímia “prurido lombar”apresenta um período de incubação bastante variável, acometendo animais com dois a quatro anos de idade

O scrapie é causado pelo acúmulo de uma proteína anormal, denominada príon (PrPsc), que é o resultado de uma alteração de conformação da molécula proteica normal, que é codificado pelo próprio hospedeiro(ROELS et al., 2004). Polimorfismos presentes no gene que sintetiza a proteína priônica normal (PRNP) estão relacionados com o grau de susceptibilidade do animal no desenvolvimento do scrapie. Um método utilizado em diversos países para o seu controle é o melhoramento genético baseado na seleção de animais com maior resistência à apresentação clínica da doença(ROELS et al., 2004).

As EETs ou doenças priônicas, são descritas em diversas espécies, entre elas os ovinos, os bovinos e até mesmo os seres humanos (WANG et al., 2008). A EET nos bovinos é designada Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), vulgarmente conhecida como “doença da vaca louca”. Em humanos diversas doenças priônicas são descritas na literatura, abrangendo as doenças de Kuru, de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, de Creutzfeldt-Jakob (CJD)e sua variante Creutzfeldt-Jakob (vCJD), e a insônia familiar fatal (WANG et al., 2008).

Apesar do primeiro registro de EET ter acontecido no século 18 (ROELS et al., 2004), passaram a ser causa de maior preocupação após surtos e disseminação

da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) no Reino Unido (WELLS et al., 1987). A associação da EEB com a saúde pública pode ser constatada após relatos de uma nova doença humana, designada como variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) (WILL et al., 1996). Infecções experimentais comprovadas de EEB em ovinos e caprinos (FOSTER; HOPE; FRASER, 1993), fizeram com que estes pequenos ruminantes passassem a ocupar extrema importância na saúde pública, pois até então, estes animais não faziam parte de estratégias epidemiológicas no controle das EETs.

Em 2003 houve a implantação de um plano de controle do scrapie na Grã-Bretanha com o lançamento do *National Scrapie Plan* (NSP). As razões que levaram o governo britânico a desenvolver o NSP, estavam relacionadas a questões referentes à saúde pública. Primeiramente, porque os ovinos podem carrear a EEB para rebanhos bovinos, por razões econômicas ligadas às restrições de comercialização e por causarem grandes perdas de rebanhos contaminados (EGLIN et al., 2005). Ainda em 2003 a União Europeia publicou a regulamentação para planos de vigilância ativa voltada para erradicação da transmissão de EETs por ovinos e caprinos (EUROPEAN, 2003). Neste mesmo ano os Estados Unidos da América (EUA) também lançou um plano de vigilância ativa, chamado de *National Scrapie Eradication Program* (NSEP) (APHIS, 2003).

Para que um país seja considerado livre de scrapie, a OIE exige que o mesmo tenha programas de vigilância ativa (OIE, 2010), mesmo que este apresentem a ausência de notificações de scrapie de um determinado país, não significa que o mesmo seja considerado livre, pois para isto são indispensáveis programas de controle, erradicação e rastreabilidade da doença. (OIE, 2010). Para que os programas de vigilância sejam mais eficientes, é preciso levar em consideração o longo período de incubação do agente infeccioso e a resistência que o mesmo tem fora do organismo, pois o príon pode permanecer no ambiente por até 4 anos, o que dificulta o seu controle.

Os métodos utilizados atualmente nos estudos genéticos sobre a resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento de EETs, são os mais eficazes no controle e erradicação de scrapie. Na atualidade diversos países possuem programas de melhoramento genético do rebanho ovino (ROELS et al., 2004).

A última pesquisa pecuária municipal realizada em 2010 pelo IBGE, demonstra que o Brasil é o 13º produtor mundial de ovinos, contando atualmente com um efetivo de 17.380.581 cabeças, resultado que mostra um crescimento de 3,4%, se comparado com os números da pesquisa realizada em 2009. Naquela ocasião o efetivo estava estimado em 16.812.105 de cabeças de ovinos (IBGE, 2010). A região nordeste possui o maior rebanho ovino nacional, com 9.857.754 cabeças, seguida da região sul, com 4.886.541 (IBGE, 2010). A região sudeste por sua vez possui um rebanho ovino com um efetivo de 781.874 cabeças, dentre as quais 59,7% pertencem a criações localizadas no Estado de São Paulo (IBGE, 2010). Estes números indicam que a ovinocultura no Brasil está em constante expansão.

Desta maneira, pode-se perceber que esse aumento deve-se à aprovação e aplicação da Instrução Normativa nº 37 de 13 de fevereiro de 2007, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) da República Federativa do Brasil, que normatizou as condutas nos procedimentos de atuação no caso de suspeita ou ocorrência de scrapie no território nacional

O primeiro relato de scrapie no Brasil, em 1978, foi em um ovino importado (FERNANDES; C.M.; J.C., 1978). Já as últimas comprovações, ocorreram entre 2005 e 2010 (WAHID, 2011), sendo todos observados em animais importados.

No entanto, estudos sobre o perfil de susceptibilidade da doença ainda se fazem necessários, pois poderão auxiliar enormemente na seleção e melhoramento animal, com vistas a um plantel resistente ao desenvolvimento da doença.

Estudos de polimorfismos do gene PRNP em ovinos é um exemplo do avanço na compreensão molecular do desenvolvimento de scrapie, estão sendo realizados em diversos países, como Alemanha (LUHKEN et al., 2004), Bélgica (ROELS et al., 2004), China (WANG et al., 2008), Holanda (MELCHIOR et al., 2010) e Brasil (SANTOS et al., 2012). A PCR tem grande aplicabilidade na demonstração do DNA em amostras biológicas colhidas “in vivo” (GOING; GUSTERSON, 1999). O emprego dos diferentes tipos, e adaptações da técnica da PCR, também possibilitam os estudos de características genotípicas e suas manifestações fenotípicas encontradas no caso de doença. O sequenciamento genômico permite identificar

características individuais ou populacionais, que podem ser herdadas ou adquiridas pelos animais e que estão associadas à susceptibilidade ao desenvolvimento, por exemplo, do scrapie.

Neste sentido, o presente trabalho propôs através de estudos moleculares realizar um mapeamento genotípico de rebanhos criados no Estado de São Paulo, completando com a categorização de susceptibilidade e resistência ao scrapie e avaliações dos diferentes métodos utilizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteína Priônica Fisiológica

A proteína priônica é uma glicoproteína, encontrada em diversos tecidos dos mamíferos, formada em média por 250 aminoácidos, sendo que este número pode variar conforme a espécie em questão. A proteína é glicosilada, possuem sítios de glicosilação que se ancoram externamente a membrana citoplasmática de neurônios através de ligações de glicofosfoinositol (PRUSINER et al., 1984). A isoforma fisiológica da proteína que é designada como PrP^c (PrP Celular), possui 42% de α hélices e são sensíveis a ação de proteases. As funções atribuídas à PrP^c ainda não são totalmente conhecidas. Entretanto, existem evidências de que a mesma exerce papel importante na atividade sináptica dos neurônios (COLLING; COLLINGE; JEFFERYS, 1996) e na inibição da apoptose mediada por bax (BOUNHAR et al., 2001). As principais funções fisiológicas da proteína priônica estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 –Funções fisiológicas atribuídas a proteína priônica sem alterações de conformação

Mantém os níveis de Cu em condições adequadas
Participação no transporte e metabolismo de Zinco
Inibição do estresse oxidativo
Participação nas transmissões sinápticas
Inibidor da apoptose neuronal

2.2 Proteína Priônica Patogênica

A forma patogênica é chamada de PrP^{Sc} (PrP Scrapie), esta variação da PrP^C possui uma quantidade menor de α hélices (17%) e uma quantidade maior de folha β (47%). Estas informações levam à teoria de que a PrP^{Sc} possui alterações na estrutura secundária ocasionando erros em sua conformação (CAUGHEY et al., 1991). A PrP^{Sc} foi descrita pela primeira vez em 1982 (PRUSINER, 1982) e na ocasião, foi isolado o agente infeccioso, que consistia principalmente de uma proteína específica. Até então considerada apenas uma hipótese, foi formulada para explicar a resistência do agente causador de scrapie e CJD à radiação ultravioleta (UV) (PRUSINER, 1982). Os raios UVs causam danos diretos ao DNA pela excitação de moléculas do polímero de DNA, causando erros na sequência de pares de bases.

O termo príon foi proposto por sua natureza **proteinácea** e **infecciosa**, referindo-se ao fato das pequenas partículas proteicas, serem resistentes à exposição a tratamentos que alteram e destroem ácidos nucleicos (PRUSINER, 1982). Ainda no ano de 1982, através da purificação de príons a partir de tecido cerebral de animais infectados, foi possível identificar a estrutura proteica. Tratava-se de uma proteína com peso molecular variando entre 27 e 30 kDa (BOLTON; MCKINLEY; PRUSINER, 1982). Na ocasião a proteína purificada foi tratada com proteinase K, observando-se então, que ela resistia a este tipo de exposição. Da mesma forma foi feito com tecidos cerebrais de animais sadios, sendo observado que a partícula proteica não era detectada após tratamento com proteinase K (BOLTON; MCKINLEY; PRUSINER, 1982).

Em 1986 foi identificado o gene que sintetiza a proteína (PRNP), verificando-se que não havia diferenças entre animais doentes e sadios. Desta maneira foi possível determinar que a proteína priônica é codificada no genoma do próprio hospedeiro, mesmo que o animal não esteja infectado (BASLER et al., 1986).

Estes dados mostram que as alterações de conformação encontradas na PrP^{Sc} são eventos resultantes de alterações que aconteceram após a tradução da

mesma. As conformações das estruturas secundárias da PrPc e PrP^{SC} estão ilustradas na figura 1.

Figura 1 – Modelo da Proteína Priônica. (A) Forma patogênica da proteína priônica, representado pelo predomínio de folhas β . (B) Forma fisiológica da proteína priônica, representado pelo predomínio em α hélices (BYTES)

A conversão de PrPc para PrP^{SC} ainda não está totalmente elucidada. As duas isoformas apresentam na mesma sequência primária, pequenas diferenças conformacionais ocasionadas por: interações físicas, mutações dentro das regiões de curva da PrPc (PRIOLA, 1999). Recentemente, uma nova hipótese descreve que

a presença do próprio RNA pode funcionar como estimulador na conversão da PrP^c em PrP^{sc} (DELEAULT; LUCASSEN; SUPATTAPONE, 2003).

A transmissão de príons entre espécies diferentes é um fenômeno raro se compararmos com transmissões entre animais da mesma espécie. Isto se deve ao fato da proteína priônica se diferenciar entre as espécies (PRUSINER et al., 1990). Estas diferenças estão presentes na sequência de aminoácidos, mostrando que quanto menor a semelhança, menor a possibilidade de ocorrer infecção entre duas espécies (PRUSINER et al., 1990). As principais características da PrP^{sc} estão descritas no quadro 2.

Quadro 2 – Características da proteína priônica com alterações de conformação

Resistentes à ação de Proteinases K
Resistentes à ação de raios UV
Resistentes a ribonucleases e desoxiribonucleases
Rica em estruturas folha β
Hidrofóbica
Meia Vida com eficácia de dias ou até meses

2.3 Gene PRNP

O gene da proteína priônica (PRNP) nos ovinos são representados por três éxons com 52, 98 e 4028 nucleotídeos respectivamente, que são intercalados por 2 introns com 2421 e 14031 nucleotídeos respectivamente. O quadro aberto de leitura (ORF – Open Reading frame) da PrP é codificada pelo exon 3 (ROELS et al., 2004). Localizado no cromossomo 13 o PRNP possui uma homologia de até 90% entre as espécies de mamíferos (LEE et al., 1998).

Sabe-se que polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do exon 3 têm relação com a resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento do scrapie (ROELS et al., 2004; WANG et al., 2008), apresentando alterações na cadeia de nucleotídeos na forma de polimorfismo de base única (SNP – Single Nucleotide Polymorphisms) (WANG et al., 2008). Apesar dos polimorfismos nos códons citados acima serem responsáveis pela resistência ou susceptibilidade, diversos outros polimorfismos foram descritos no gene PRNP (VACCARI et al., 2001), como exposto no quadro 3.

Quadro 3 – SNPs já descritos associados ao gene PRNP, em destaque os códons 136, 154 e 171, envolvidos na susceptibilidade do animal ao scrapie.

Códon	Alelo Selvagem	SNP
112	Met	Thr
136	Ala	Val
137	Met	Thr
138	Ser	Asn
141	Leu	Phe
151	Arg	Cys
154	Arg	His
171	Gln	Arg ou His
176	Lys	Asn
211	Arg	Gln

De acordo com a susceptibilidade ao desenvolvimento de scrapie os animais podem ser classificados em altamente susceptíveis, susceptíveis ou resistentes (DAWSON et al., 1998). Estas possibilidades dependem da combinação alélica dos códons 136, 154 e 171 do gene prnp (ROELS et al., 2004). Os alelos do gene prnp codificadores para os aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Arginina (R) no códon 171, são denominados ARR; para os aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Histidina (H) no códon 154 e Glutamina (Q) no códon 171 são denominados AHQ; para os aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Glutamina no códon 171, são denominados ARQ; para os

aminoácidos Valina (V) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Glutamina (Q) no códon 171 são denominados VRQ e para os aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Glutamina (R) no códon 154 e Histidina (H) no códon 171 são denominados (LUHKEN et al., 2004).

São considerados altamente susceptíveis ao scrapie, animais que apresentem no seu genótipo a combinação VRQ para o gene prnp, independentemente do outro alelo. São considerados como suscetíveis, ovinos que apresentem no seu genótipo a combinação alélica ARQ, AHQ, ou ARH e são considerados resistentes ao desenvolvimento da doença os ovinos que apresentem no genótipo dois alelos ARR para o referido gene (WANG et al., 2008). As combinações alélicas e os respectivos graus de susceptibilidade e resistência estão listados no quadro 4.

Quadro 4 – Categorização dos animais quanto ao genótipo.

<i>Grau de Susceptibilidade</i>	<i>Genótipos</i>
Extremamente Resistente	ARR/ARR
Resistente	ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ
Leve Resistência	ARQ/ARQ ARQ/ARH ARQ/AHQ AHQ/AHQ, ARH/ARH AHQ/ARH
Susceptível	ARR/VRQ
Altamente Susceptível	VRQ/VRQ ARQ/VRQ ARH/VRQ AHQ/VRQ

Fonte: (DAWSON et al., 1998)

2.4 Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) são doenças neurodegenerativas causadas por príons. Estas afecções geralmente permanecem assintomáticas durante anos, pelo fato de ter uma progressão muito lenta. Entretanto, a doença se torna fatal após o longo período de incubação e o início das manifestações neurológicas. Por ser uma proteína alterada e resistente a proteases, a PrPSC acumula de forma desordenada no SNC, e é o fator responsável pelos sintomas neurológicos.

2.4.1 Encefalopatias Espongiformes em Humanos.

Abaixo estão listadas algumas doenças priônicas descritas em seres humanos, sendo que elas são reconhecidas pelo fato de afetarem estruturas cerebrais ou outros tecidos neurais. Não existe cura e são sempre fatais.

Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ)

A Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) é uma rara doença degenerativa cerebral que acomete os seres humanos e os sintomas geralmente ocorrem em torno dos 60 anos de idade. A evolução da doença após o período de incubação ocorre da seguinte maneira: falta de memória, alterações de comportamento e descoordenação motora, sendo que esse quadro evolui rapidamente para demência e óbito do indivíduo. Existem três formas da DCJ: esporádica, quando a origem da infecção é desconhecida, hereditária, quando a forma de infecção é vertical e a adquirida, ocorre através de contatos com tecidos infectados.

Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ)

A variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) foi descrita pela primeira vez em 1996 no Reino Unido (WILL et al., 1996) e difere tanto clinicamente quanto patologicamente da DCJ clássica (LLOYD; MEAD; COLLINGE, 2011), acometendo pessoas com idade média de 28 anos e que vieram a óbito. Existem fortes evidências de que o agente responsável pela doença priônica em bovinos (BSE) é o mesmo agente responsável pela vDCJ (DE SILVA, 2000).

Doença de Kuru

Nos anos de 1950 e 1960 ocorreu uma epidemia entre os papuas, habitantes nativos da Nova Guiné. Vitimaram principalmente mulheres, crianças e pessoas que ingeriam o cérebro de entes queridos em rituais que representavam luto. Esta prática de canibalismo foi responsável pela transmissão do agente infeccioso, no caso o príon, e ficou conhecida como doença de Kuru (BECK; DANIEL, 1976).

Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker

A síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker é uma doença extremamente rara, caracterizada por distúrbio cerebral de natureza neurodegenerativa e é quase sempre hereditária. O início da doença ocorre geralmente entre 35 e 55 anos de idade (BUGIANI et al., 2000). Nos estágios iniciais, os doentes podem apresentar níveis variados de ataxia, que se caracteriza pelo desequilíbrio e dificuldade ao caminhar. Conforme a doença progride, a ataxia se torna mais pronunciada e a maioria dos pacientes desenvolve o estado de demência (BUGIANI et al., 2000).

2.4.2 As Encefalopatias Espongiformes em Animais de Produção

Abaixo são apresentadas e descritas algumas doenças do grupo das encefalopatias espongiformes em animais de produção, que pertencem a lista A da OIE, sendo obrigatória a notificação de ocorrência das mesmas.

Encefalopatia Espongiforme Bovina

A encefalopatia espongiforme bovina (BSE) pertence ao grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), semelhante às doenças neurodegenerativas fatais em humanos (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011). A BSE foi descrita pela primeira vez em 1986 no Reino Unido (WELLS et al., 1987), e desde então, mais de 180.000 animais já foram afetados em todo mundo. A via de contaminação é oral, ocorrendo principalmente, através de concentrados e substitutos do leite contaminados, utilizados na alimentação de vitelos, em seus primeiros 6 meses de vida (DONNELLY, 2002).

Por ser considerada zoonose (GHANI et al., 2002), a BSE pode ser transmitida para os seres humanos pela ingestão de alimentos contaminados, como o cérebro, a medula espinhal ou do trato digestório das carcaças infectadas (HOFFMANN et al., 2011). No entanto, importante ser levado em consideração que o agente infeccioso, embora altamente concentrado no tecido nervoso, eventualmente pode ser encontrado em praticamente todos os tecidos do organismo, incluindo o sangue (GHANI et al., 2002). A infecção pelo agente infeccioso da BSE no seres humanos desencadeia a vCDJ (GHANI et al., 2002).

Scrapie

As encefalopatias espongiformes transmissíveis possuem um mecanismo de “barreira e espécie”, que impede a transmissão de doenças priônicas em diferentes espécies (DETWILER; BAYLIS, 2003). Exceção é feita pela EEB no caso da espécie humana, que irá ocasionar o aparecimento da vCDJ. O scrapie ao contrario da EEB, não acomete outras espécies além de ovinos e eventualmente os caprinos (HUNTER, 2003). Nos ovinos a doença ocorre entre 1 e 4 anos de idade, com longos períodos de incubação, podendo haver diferenças de acordo com o genótipo do animal acometido (IMRAN; MAHMOOD, 2011), como descrito logo abaixo.

O período de incubação da doença varia entre 2 e 5 anos e o óbito do animal acontece entre 2 semanas e 6 meses após a manifestação clínica da doença (IMRAN; MAHMOOD, 2011). O genótipo do animal acometido pode influenciar diretamente no período de incubação, quando o animal infectado possui está entre os casos com maior susceptibilidade (VRQ/VRQ). Em contrapartida o período de incubação é menor, em animais portadores do genótipo mais resistente (ARR/ARR), quando o período de incubação é mais longo (JEFFREY; GONZALEZ, 2004).

A contaminação com o agente infeccioso pode ocorrer de 3 formas: hereditária, no contato com o agente infeccioso e por influencias de polimorfismos no gene PRNP, que é responsável pela síntese da proteína priônica (SANTOS et al., 2012).

Podem ocorrer duas formas clínicas da doença: a forma pruriginosa e a forma neurológica sendo que os sintomas vão se manifestar de acordo com uma das formas clínicas (IMRAN; MAHMOOD, 2011).

Por se tratar de lesões no SNC os sintomas clínicos incluem mudanças de comportamento, pois os animais tendem a se isolar do grupo, e apresentar descoordenação motora seguida de ataxia, tremores e intenso prurido (LAMPERT; GAJDUSEK; GIBBS, 1972; IMRAN; MAHMOOD, 2011), que é responsável pelo hábito dos animais infectados esfregarem-se contra cercas, troncos e árvores, fatos esses que influenciaram no nome scrapie (BRASIL, 2008). Dependendo da

intensidade do prurido, lesões provenientes deste ato são representadas por extensas áreas de alopecia e lesões cutâneas.

Quanto à evolução dos sintomas neurológicos, a progressão pode levar ao bruxismo, que é a perda de reflexo e faz com que os animais choquem-se contra paredes pois ficam sem a noção de espaço, ao nistagmo, à convulsões e ao óbito, todos com ausência de quadro febril (IMRAN; M AHMOOD, 2011).

Pelo fato de existir diversas formas de o animal desenvolver scrapie, a patogenia ainda não está muito bem esclarecida. Quando se trata de uma infecção adquirida e não genética, ou seja, contato com o agente infeccioso, a contaminação acontece pela via oral, com ingestão de alimentos ou restos de placenta contaminados. Após a ingestão a contaminação pela PrPSC ocorre nas placas de Peyer e no GALT (Gut-associated lymphoid tissues ou tecido linfóides associado ao intestino), ambas estruturas situadas ao longo do trato entérico. Por vias linfáticas a PrPSC se dissemina para outros tecidos linfóides e após intensa replicação em estruturas desses tecidos, a infecção alcança o sistema nervoso entérico e autônomo, que são locais utilizados como vias de disseminação para o SNC (HUNTER, 2003; KRETLOW et al., 2008).

Scrapie é uma doença cosmopolita, considerada endêmica em diversos países da Europa e da América do Norte. Países europeus possuem programas de vigilância ativa, importantíssimos para que um país seja considerado livre da doença. A figura 2 indica a distribuição mundial e os locais onde foram relatados casos de scrapie (WAHID, 2011).

Figura 2 – Distribuição de casos positivos de scrapie no mundo durante o ano de 2011.

Fonte:(WAHID, 2011)

Em 2010, um total de 344211 ovinos e 142668 caprinos foram estudados em 27 países da UE participantes dos programas de vigilância ativa. Foram considerados positivos: 1112 ovinos e 435 caprinos (EUROPEAN, 2011), como mostra a Figura 3.

Figura 3 – Distribuição de casos positivos de scrapie no território da comunidade europeia durante o ano de 2011

Fonte: EUROPEAN, 2011

Após a implantação do NSP em 2003 na Grã-Bretanha, houve uma redução significativa de casos notificados de scrapie. Em 2000 foram notificados 550 casos e em 2005 o número de notificações caiu para 260 (WARNER; MORRIS; DAWSON, 2006). Essa queda foi após a NSP, pois com programas de melhoramento houve também a diminuição do desenvolvimento de scrapie nas progênes e consequentemente a valorização do rebanho (WARNER; MORRIS; DAWSON, 2006).

Nos EUA com a implantação do NSEP em 2003, os casos de scrapie reduziram-se de 598 em 2005 para 28 casos confirmados em 2010. Os diagnósticos foram realizados por laboratórios credenciados ao NSEP. A figura 4 mostra o mapa dos EUA com a distribuição dos relatos por estado.

Figura 4 – Distribuição Geográfica de casos positivos para scrapie nos EUA, diagnosticados no ano de 2010.

Fonte: (NSEP 2010)

O primeiro relato de scrapie no Brasil aconteceu em 1978 (FERNANDES; C.M.; J.C., 1978). O país não é considerado livre da doença, pois ainda existem focos restritos à região sul do país. Os últimos casos relatados no Brasil aconteceram entre 2005 e 2011, todos em animais importados (WAHID, 2011). Já o último fato ocorreu no primeiro semestre de 2011 e apontou a infecção como sendo restrita ao Estado do Paraná. Ao todo foram eutanasiados 8 animais, 7 em abril e 1 em maio (WAHID, 2011). Abaixo a figura 5 mostra a situação do território brasileiro nos últimos 2 anos segundo a OIE. Pode-se chamar a atenção ao fato de ainda não terem sido apresentados relatos no ano de 2012.

Figura 5 – Ocorrências de casos positivos de scrapie no território Brasileiro, período correspondente aos anos de 2011 e 2012, segundo dados da OIE

Brazil																								
location	2011												2012											
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Administrative divisions																								
PARANA				+	+					...						...								
Totals				+	+																			

Fonte: (WAHID, 2011)

No Estado de São Paulo houve relato de scrapie em 2009 e na ocasião foram descritos 7 casos positivos, todos no mês de janeiro. Desde então o Estado de São Paulo não faz parte das zonas consideradas não livre da doença. Figura 6.

Figura 6 – Ocorrências de casos positivos de scrapie no Estado de São Paulo, período correspondente ao ano de 2009, segundo dados da OIE

Brazil												
location	2009											
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Administrative divisions												
SAO PAULO	1											+
Totals	1											+

Fonte: (WAHID, 2011)

A Instrução Normativa nº 37 de 13 de fevereiro de 2007, foi aprovada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Anexo A) e a Instrução Normativa nº 15 de 2 de abril de 2008 (Anexo B), normatizando os procedimentos na atuação em caso de suspeita ou ocorrência de Paraplexia Enzoótica dos Ovinos (scrapie). Dentre as diversas normas e medidas pode-se ressaltar:

- Controlar e erradicar a enfermidade, a partir da vigilância efetuada pelo serviço oficial (BRASIL, 2008);

- Certificar estabelecimentos que executam atividades previstas nesta Instrução (BRASIL, 2008);
- Promover educação sanitária por meios dos Médicos Veterinários oficiais e cadastrados (BRASIL, 2008);
- Agregar valores aos produtos originais desta exploração econômica (BRASIL, 2008).

Apesar de diversos programas de vigilância ativa, o scrapie ainda possui grande relevância no cenário da ovinocultura nacional e internacional, incluindo os países considerados como zona livre. Isso demonstra a importância de se incorporar um sistema de seleção eficaz, através de estudos epidemiológicos e melhoria genética com a geração de produtos geneticamente resistentes à doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Desenvolvimento de métodos para avaliação do gene da proteína priônica em ovinos de rebanhos localizados no Estado de São Paulo.
- Categorização e padronização dos genótipos obtidos em animais resistentes e animais susceptíveis.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecimento do método reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior sequenciamento genômico.
- Estabelecimento do método de reação em cadeia de polimerase em tempo real (q-PCR).
- Estabelecimento do método de sequenciamento genômico.
- Desenvolver através das técnicas de rotina e de um estudo populacional, uma avaliação na frequência na população no Estado de São Paulo.
- Identificação de genótipos de resistência (R) e susceptibilidade (S) ao desenvolvimento do scrapie.

4 JUSTIFICATIVA

Segundo Goings e Gusterson (1999) estamos vivenciando uma revolução “molecular” na patologia. A demonstração da transcrição de genes específicos, ou de pequenos segmentos genômicos e dos seus produtos protéicos, através de hibridação “in situ” e imunoistoquímica, já se tornaram rotina em patologia experimental e diagnóstica. Estes novos métodos são rotineiramente empregados na identificação de subtipos celulares e de citocinas que participam da resposta inflamatória e imune, com evidente abertura de novas fronteiras na compreensão da relação hospedeiro-parasita.

Uma revolução ainda maior pode ser esperada com a aplicação de novas tecnologias emergentes ao estudo da Patologia. Técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm contribuído para o entendimento de mecanismos moleculares envolvidos na patogenia das doenças. O desenvolvimento de novas ferramentas e a evolução dos métodos moleculares ampliaram os conceitos e o entendimento das relações desarmônicas entre hospedeiro e agente agressor, que culminam com o desenvolvimento da doença. Da mesma forma, o entendimento mais aprofundado de tais relações desarmônicas permitiu o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e de estratégias terapêuticas.

O estudo de Polimorfismos do gene da proteína Príon em ovinos é um exemplo de avanço na compreensão molecular do desenvolvimento de Scrapie.

No Brasil há relatos de scrapie somente em raças importadas (SOTOMAIOR et al., 2008), no entanto estudos genotípicos envolvendo raças nacionais são necessários para a eliminação de possíveis animais susceptíveis. Em diversos países estudos envolvendo o gene PRNP tem sido realizado a fim de selecionar animais resistentes ao desenvolvimento da doença, assim contribuindo para o aprimoramento genético e para a erradicação da doença (ROELS et al., 2004).

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de categorizar o rebanho ovino do Estado de São Paulo em animais susceptíveis ou resistentes, através de genotipagens por técnicas de análises biomoleculares e estabelecer protocolos para

o uso destes métodos, corroborando com a vigilância epidemiológica, defesa agropecuária e desenvolvimento econômico do país.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Abaixo estão relacionados todos animais doadores, respectivas propriedades e as técnicas utilizadas para análise genotípica.

5.1 Animais

Para a realização deste projeto, foram coletadas 147 amostras de sangue de diferentes animais, todas as amostras foram coletadas pela veia jugular. Este procedimento foi realizado com tubos Vacutanier contendo EDTA. As amostras de sangue foram aliquotadas em três partes iguais de 1,5 ml cada, depois de identificadas foram conservadas a -80°C . Os animais doadores das amostras pertencem a 4 propriedades em diferentes localidades do estado de São Paulo, as propriedades foram nomeadas como A localizada na cidade de São Paulo, B localizada na cidade de São Paulo, C localizada na cidade de Rio Claro e D localizada na cidade de Sarapuí. O mapa do Estado de São Paulo esta representado na figura 7 e a cidade de São Paulo na figura 8.

Figura 7 – Mapa do Estado de São Paulo – Brasil. (A) Município de Rio Claro. (B) Município de Sarapuí. (C) Município de São Paulo.

Figura 8 – Mapa da Cidade de São Paulo - Estado de São Paulo – Brasil. Em destaque as zonas oeste e sul da cidade.

Todos os 147 animais doares são da espécie Ovina (*Ovis aries*), raça Santa Inês, com mais de 8 meses de vida, sendo o animal mais velho com 4 anos e meio. Ambos os sexos foram utilizados, porém o número de fêmeas é maior que o número de machos. Todos os animais utilizados não apresentavam no momento da coleta

do material, qualquer sintomatologia clínica compatível com scrapie. Os animais e os respectivos números estão listados no quadro 5.

Quadro 5 – Relação dos animais utilizados neste trabalho, estão separados de acordo com a propriedade de origem. Como identificação foram utilizados o número.

Nº do Animal	Espécie	Idade	Sexo	Propriedade
01	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
02	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
03	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
04	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
05	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
06	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
07	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
08	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
09	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Macho	A
10	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
11	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
12	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
13	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
14	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
15	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
16	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
17	<i>Ovis Airies</i>	2 -5 Anos	Fêmea	A
18	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
19	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
20	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
21	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B

Nº do Animal	Espécie	Idade	Sexo	Propriedade
22	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
23	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
24	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
25	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
26	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
27	<i>Ovis Airies</i>	3 -4 Anos	Macho	B
28	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
29	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
30	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
31	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
32	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
33	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
34	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
35	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
36	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
37	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
38	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
39	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
40	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
41	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
42	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
43	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
44	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
45	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
46	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
47	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
48	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C

Nº do Animal	Espécie	Idade	Sexo	Propriedade
49	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
50	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
51	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
52	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
53	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
54	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
55	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
56	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
57	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
58	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
59	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
60	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
61	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
62	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
63	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
64	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
65	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
66	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
67	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Macho	C
68	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
69	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
70	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
71	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
72	<i>Ovis Airies</i>	2 - 4 Anos	Fêmea	C
73	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
74	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
75	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D

Nº do Animal	Espécie	Idade	Sexo	Propriedade
76	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
77	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
78	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
79	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
80	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
81	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
82	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
83	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
84	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
85	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
86	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
87	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
88	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
89	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
90	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
91	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
92	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
93	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
94	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
95	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
96	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
97	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
98	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
99	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
100	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
101	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
102	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D

Nº do Animal	Espécie	Idade	Sexo	Propriedade
103	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
104	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
105	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
106	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Macho	D
107	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
108	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
109	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
110	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
111	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Macho	D
112	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Macho	D
113	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
114	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
115	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
116	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
117	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
118	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
129	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
120	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
121	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
122	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
123	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
124	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
125	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
126	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
127	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
128	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
129	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D

Nº do Animal	Espécie	Idade	Sexo	Propriedade
130	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
131	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
132	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
133	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
134	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
135	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
136	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
137	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
138	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
139	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
140	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
141	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Macho	D
142	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Macho	D
143	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Macho	D
144	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
145	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
146	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D
147	<i>Ovis Airies</i>	1 - 3 Anos	Fêmea	D

5.2 Extração do Material Genético

As extrações do DNA genômico foram realizadas a partir de sangue total. Para o procedimento foi adotado como método de extração o kit comercial illustra™ Blood genomic GE Healthcare®. O protocolo de extração foi realizado de acordo com o fabricante.

Após a extração o DNA obtido foi aliquotado em três partes iguais e armazenados em freezer com temperatura - 80°C.

5.4 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR)

Os componentes da reação estão listados no quadro 6, variando conforme o animal e a concentração do DNA após a extração. Os oligonucleotídeos iniciadores foram 5'-ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGT-3' o direto e 5'-CTATCCTACTATGAGAAAAATGAG-3' o reverso.

Os materiais genéticos foram amplificados utilizando o kit AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). As reações foram submetidas a 40 ciclos de amplificação como descrito a seguir: 1x 5 minutos a 95° C, 40x 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 60° C , 1,5 minutos a 72° C e 1x 7 minutos a 72° C. As concentrações dos componentes de cada reação estão listadas no quadro 5. O protocolo para as reações foi fornecido pelo fabricante, sendo que os volumes finais de cada reação estão listados no quadro 7.

Quadro 6 – Concentração final dos componentes utilizados nas reações de PCR.

Componente	Concentração
Master Mix	25 ul
Primer F	0.5 uM
Primer R	0,5 uM
DNA	1ug
Água Deionizada	Variável

Quadro 7 – Volume final dos componentes utilizados nas reações de PCR.

<i>Animal</i>	<i>H2O (µl)</i>	<i>DNA (µl)</i>	<i>Mix</i>	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<i>Total</i>
1	19,9	3,11	25µl	1µl	1µl	50µl
2	21,3	1,72	25µl	1µl	1µl	50µl
3	8	15	25µl	1µl	1µl	50µl
4	21	2,08	25µl	1µl	1µl	50µl
5	19,4	3,61	25µl	1µl	1µl	50µl
6	14,4	8,57	25µl	1µl	1µl	50µl
7	19,76	3,24	25µl	1µl	1µl	50µl
8	11	12	25µl	1µl	1µl	50µl
9	20,9	2,1	25µl	1µl	1µl	50µl
10	14,43	8,57	25µl	1µl	1µl	50µl
11	21,3	1,68	25µl	1µl	1µl	50µl
12	19,6	3,43	25µl	1µl	1µl	50µl
13	16,8	6,19	25µl	1µl	1µl	50µl
14	17,5	5,5	25µl	1µl	1µl	50µl
15	15,5	7,5	25µl	1µl	1µl	50µl
16	19,76	3,24	25µl	1µl	1µl	50µl
17	20,64	2,36	25µl	1µl	1µl	50µl
18	20,21	2,79	25µl	1µl	1µl	50µl
19	19,47	3,53	25µl	1µl	1µl	50µl
20	17,5	5,5	25µl	1µl	1µl	50µl
21	18,5	4,44	25µl	1µl	1µl	50µl
22	21,7	1,27	25µl	1µl	1µl	50µl
23	19	3,97	25µl	1µl	1µl	50µl
24	21,3	1,69	25µl	1µl	1µl	50µl
25	20,75	2,25	25µl	1µl	1µl	50µl
26	18,83	4,17	25µl	1µl	1µl	50µl
27	20,87	2,13	25µl	1µl	1µl	50µl
28	19,81	3,19	25µl	1µl	1µl	50µl
29	17,78	5,22	25µl	1µl	1µl	50µl
30	20,97	2,03	25µl	1µl	1µl	50µl
31	19,13	3,87	25µl	1µl	1µl	50µl
32	20,81	2,19	25µl	1µl	1µl	50µl
33	21,25	1,75	25µl	1µl	1µl	50µl
34	20,58	2,42	25µl	1µl	1µl	50µl
35	21,29	1,71	25µl	1µl	1µl	50µl
36	21,43	1,57	25µl	1µl	1µl	50µl
37	19,34	3,66	25µl	1µl	1µl	50µl
38	19,84	3,16	25µl	1µl	1µl	50µl
39	19,67	3,33	25µl	1µl	1µl	50µl
40	20,65	2,35	25µl	1µl	1µl	50µl
41	21,49	1,51	25µl	1µl	1µl	50µl
42	18,68	4,32	25µl	1µl	1µl	50µl
43	20,74	2,26	25µl	1µl	1µl	50µl
44	20,91	2,09	25µl	1µl	1µl	50µl
45	19,47	3,53	25µl	1µl	1µl	50µl
46	19,59	3,41	25µl	1µl	1µl	50µl
47	20,45	2,55	25µl	1µl	1µl	50µl
48	20,87	2,13	25µl	1µl	1µl	50µl
49	20,6	2,4	25µl	1µl	1µl	50µl

<i>Animal</i>	<i>H2O (μl)</i>	<i>DNA (μl)</i>	<i>Mix</i>	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<i>Total</i>
50	21,8	1,2	25μl	1μl	1μl	50μl
51	21,45	1,55	25μl	1μl	1μl	50μl
52	20,42	2,58	25μl	1μl	1μl	50μl
53	21	2	25μl	1μl	1μl	50μl
54	20,79	2,21	25μl	1μl	1μl	50μl
55	20,24	2,76	25μl	1μl	1μl	50μl
56	20,1	2,9	25μl	1μl	1μl	50μl
57	19,15	3,85	25μl	1μl	1μl	50μl
58	19,34	3,66	25μl	1μl	1μl	50μl
59	19,79	3,21	25μl	1μl	1μl	50μl
60	20,47	2,53	25μl	1μl	1μl	50μl
61	20	2,93	25μl	1μl	1μl	50μl
62	20,1	2,86	25μl	1μl	1μl	50μl
63	19,4	3,53	25μl	1μl	1μl	50μl
64	19	3,92	25μl	1μl	1μl	50μl
65	19,2	3,73	25μl	1μl	1μl	50μl
66	20,6	2,34	25μl	1μl	1μl	50μl
67	20,7	2,23	25μl	1μl	1μl	50μl
68	20,9	2,04	25μl	1μl	1μl	50μl
69	20,4	2,6	25μl	1μl	1μl	50μl
70	20,6	2,35	25μl	1μl	1μl	50μl
71	21,5	1,43	25μl	1μl	1μl	50μl
72	20,31	2,69	25μl	1μl	1μl	50μl
73	21,42	1,58	25μl	1μl	1μl	50μl
74	20,77	2,23	25μl	1μl	1μl	50μl
75	20,32	2,68	25μl	1μl	1μl	50μl
76	21,4	1,6	25μl	1μl	1μl	50μl
77	18,16	4,84	25μl	1μl	1μl	50μl
78	20,6	2,41	25μl	1μl	1μl	50μl
79	20,8	2,18	25μl	1μl	1μl	50μl
80	19,3	3,66	25μl	1μl	1μl	50μl
81	17,83	5,17	25μl	1μl	1μl	50μl
82	21,14	1,86	25μl	1μl	1μl	50μl
83	18,49	4,51	25μl	1μl	1μl	50μl
84	21,36	1,64	25μl	1μl	1μl	50μl
85	20,18	2,82	25μl	1μl	1μl	50μl
86	21,67	1,33	25μl	1μl	1μl	50μl
87	18,62	4,38	25μl	1μl	1μl	50μl
88	20,42	2,58	25μl	1μl	1μl	50μl
89	19,7	3,3	25μl	1μl	1μl	50μl
90	21,12	1,88	25μl	1μl	1μl	50μl
91	21,41	1,59	25μl	1μl	1μl	50μl
92	21,31	1,69	25μl	1μl	1μl	50μl
93	21,97	1,03	25μl	1μl	1μl	50μl
94	18,62	4,38	25μl	1μl	1μl	50μl
95	19,2	3,8	25μl	1μl	1μl	50μl
96	19,34	3,66	25μl	1μl	1μl	50μl
97	20,82	2,18	25μl	1μl	1μl	50μl
98	20,26	2,74	25μl	1μl	1μl	50μl
99	21,42	1,58	25μl	1μl	1μl	50μl
100	21,57	1,43	25μl	1μl	1μl	50μl
101	20,52	2,48	25μl	1μl	1μl	50μl
102	21,4	1,62	25μl	1μl	1μl	50μl

Animal	H2O (µl)	DNA (µl)	Mix	Primer F	Primer R	Total
103	21,9	1,15	25µl	1µl	1µl	50µl
104	14,4	8,57	25µl	1µl	1µl	50µl
105	21,3	1,68	25µl	1µl	1µl	50µl
106	29	1,2	25µl	1µl	1µl	50µl
107	21,6	1,43	25µl	1µl	1µl	50µl
108	21,6	1,38	25µl	1µl	1µl	50µl
109	21	1,99	25µl	1µl	1µl	50µl
110	21,4	1,59	25µl	1µl	1µl	50µl
111	20,3	2,71	25µl	1µl	1µl	50µl
112	20,4	2,61	25µl	1µl	1µl	50µl
113	19,8	3,21	25µl	1µl	1µl	50µl
114	20,8	2,23	25µl	1µl	1µl	50µl
115	19	4,05	25µl	1µl	1µl	50µl
116	16,2	6,82	25µl	1µl	1µl	50µl
117	20,2	2,8	25µl	1µl	1µl	50µl
118	20,4	2,6	25µl	1µl	1µl	50µl
119	16,3	6,67	25µl	1µl	1µl	50µl
120	20	2,93	25µl	1µl	1µl	50µl
121	21	1,96	25µl	1µl	1µl	50µl
122	18,9	4,14	25µl	1µl	1µl	50µl
123	20	2,91	25µl	1µl	1µl	50µl
124	20	3,06	25µl	1µl	1µl	50µl
125	18,4	4,26	25µl	1µl	1µl	50µl
126	20,3	2,7	25µl	1µl	1µl	50µl
127	18	5	25µl	1µl	1µl	50µl
128	19,87	3,13	25µl	1µl	1µl	50µl
129	20,26	2,74	25µl	1µl	1µl	50µl
130	20,7	2,3	25µl	1µl	1µl	50µl
131	21,9	1,1	25µl	1µl	1µl	50µl
132	20,68	2,32	25µl	1µl	1µl	50µl
133	19,43	3,57	25µl	1µl	1µl	50µl
134	19,51	3,49	25µl	1µl	1µl	50µl
135	21,05	1,95	25µl	1µl	1µl	50µl
136	21,2	1,8	25µl	1µl	1µl	50µl
137	21,2	1,82	25µl	1µl	1µl	50µl
138	19,79	3,21	25µl	1µl	1µl	50µl
139	18,38	4,62	25µl	1µl	1µl	50µl
140	20,69	2,37	25µl	1µl	1µl	50µl
141	20	2,93	25µl	1µl	1µl	50µl
142	20,24	2,76	25µl	1µl	1µl	50µl
143	19,03	3,97	25µl	1µl	1µl	50µl
144	21,08	1,92	25µl	1µl	1µl	50µl
145	20,84	2,16	25µl	1µl	1µl	50µl
146	19,45	3,55	25µl	1µl	1µl	50µl
147	21,28	1,72	25µl	1µl	1µl	50µl

A análise da amplificação foi realizada através do método de eletroforese em gel de agarose 2%, sendo que os géis foram corados por Brometo de Etideo e analisados através de luz ultravioleta (UV).

5.5 Purificação do Produto de PCR

Todos os produtos de PCR foram purificados. Para esta etapa foi utilizado o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification GE Healthcare®. Após a purificação os produtos gerados foram submetidos à reação de sequenciamento.

5.6 Sequenciamento Genômico

O sequenciamento do DNA ocorreu a partir de produtos de PCR com a utilização do sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kite as corridas realizadas em capilares de 36cm com polímero POP7. Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amostra, uma para cada fita de DNA.

Os oligonucleotídeos utilizados foram:
 5'GTAAGCCAAAAACCAACATGAAGC3' o iniciador e
 5'TCGCTCCATTATCTTGATGTCAGTTT3' o reverso. As concentrações dos componentes da reação estão listadas no quadro 6.

Quadro 8 – Concentração final dos componentes utilizados nas reações de sequenciamento

Reagente	Concentração / Volume
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready	2µl
BigDye® Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer	1 µl
Primer	5 µM / 1µl
Produto de PCR	40 ng
H2O ultrapura	10µl

5.5.1 Análise de polimorfismos

As sequências obtidas foram analisadas pelos software Chromas, onde também foram gerados os eletroferogramas das amostras e traduzidos em formato FASTA, formato padrão do programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990). Os arquivos no formato FASTA foram comparados individualmente e manualmente com a sequência HM639755.1 depositada no genbank através do programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990), responsável pelo alinhamento das seqüências. Após a análise do alelo 1 foi feita a análise do alelo 2 para a identificação e diferenciação de indivíduos homozigotos e heterozigotos. Figura 9.

Figura 9 – Tela inicial da ferramenta BLASTN, utilizado para alinhar duas sequencias de interesse

Fonte: (NCBI, 2011)

5.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR)

As amplificações por q-PCR foram realizadas em triplicatas e as reações foram preparadas com reagentes padronizados para q-PCR (TaqMan Universal PCR Master Mix®, Applied Biosystems) acrescentados de primers e sondas para os respectivos códon. As reações foram realizadas no equipamento 7500Real-Time PCR Systems(Applied Biosystems)e submetidas a 1 ciclo inicial de 2 minutos a 50° C, seguido de 1 ciclo de 10 minutos a 95° C e 40 repetições de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise citadas acima.

Para cada reação foram utilizadas triplicatas tanto para as amostras analisadas como para o controle negativo, sendo distribuídas em placa especial de q-PCR com capacidade de 48 amostras.

Foram utilizados primers e sondas de acordo com os alelos selvagens de cada códon estudado. Nos quadros 8 e 9 estão relacionadas as sequencias de nucleotídeos e das sondas respectivamente. Para todas as sondas foi utilizado como *Quencher* a química TAMRA.

Quadro 9 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados no q-PCR

Códon	Primers
136	F: CTGCAGCTGCAGCAGTGGTA R:GATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGC
154	F:CATCAGCAGGCCTCTTATACATTTT R:GATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGG
171	F:GTTACCCCAACCAAGTGTACTACTACAGA R:TGTTGACACAGTCATGCACAAAG

Quadro 10 – Sequências das sondas utilizadas no q-PCR

Códon	Sondas
136 - A	Fam: TCATGgCACTTCC TAMRA
154 - R	Fam: CCGTTACTATCgTGAAAA TAMRA
171 - Q	Vic: ACCAGTGGATCagTATA TAMRA

Os componentes da reação de q-PCR estão listados no quadro 10, para o controle negativo utilizou-se água deionizada no lugar do DNA. O volume final de cada reação foi de 20 ul.

Quadro 11 – Componentes utilizados na reação de q-PCR

Reagente	Concentração / Volume
TaqMan Universal PCR Master Mix [®]	10µl
Primer F	5 µM / 1µl
Primer R	5 µM / 1µl
Sonda	100 ng
DNA	1ng
H2O ultrapura	9,5µl

5.7 Categorização dos Animais

Os resultados foram analisados e tabulados, classificando os animais quanto ao grau de resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento de scrapie, de acordo com os critérios estabelecidos e segundo o genótipo apresentado.

A classificação foi baseada na frequência alélica dos códons 136, 154 e 171, obtidas através das genotipagens do gene PRNP e comparadas com os critérios estabelecidos por DAWSON et al., 1998, onde os genótipos são divididos em cinco grupos (R1 – R5), sendo o R1 o grupo mais resistente e o R5 o mais susceptível ao desenvolvimento do scrapie. Quadro 11.

Quadro 12 – Categorização dos animais quanto ao genótipo.

<i>Categorização</i>	<i>Grau de Susceptibilidade</i>	<i>Genótipos</i>
R1	Extremamente Resistente	ARR/ARR
R2	Resistente	ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ
R3	Leve Resistência	ARQ/ARQ ARQ/ARH ARQ/AHQ AHQ/AHQ, ARH/ARH AHQ/ARH
R4	Susceptível	ARR/VRQ
R5	Altamente Susceptível	VRQ/VRQ ARQ/VRQ ARH/VRQ AHQ/VRQ

Fonte: (DAWSON et al., 1998)

6 RESULTADOS

6.1 Animais

Todas as 147 amostras de sangue colhidas foram amplificadas por PCR, purificadas e sequenciadas conforme descrito no capítulo 5 de material e métodos. Em 118 amostras foi possível a identificação de nucleotídeos referentes aos códons 136, 154 e 171 do exon 3 do gene PRNP. O número nucleotídeos identificados variou entre 450 e 610 unidades. Nas demais 29 amostras não foi possível realizar a genotipagem devido à não identificação das regiões alvo pelo sequenciador.

6.2 Extração e Verificação da Integridade Genética

A integridade do material genético obtido foi analisada através do método de eletroforese em gel de agarose 2%; os géis foram revelados por Brometo de Etideo e visualizados através de luz ultravioleta (UV), figura 10. Já a quantificação foi realizada em espectrofotômetro, sendo que o aparelho utilizado foi o BioPhotometer plus (Eppendorf). Os valores obtidos pela análise em espectrofotômetro estão listados no quadro 11 e as imagens do gel na figura 10.

Quadro 13 – Valores obtidos após quantificação do material genético em espectrofotômetro

<i>Animal</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>[] ng/ul</i>
1	1,55	0,74	193
2	1,61	0,94	349
3	0,8	0,14	40
4	5,91	0,14	288
5	1,12	0,34	166

6	1,16	0,26	70
7	1,21	0,45	185
<i>Animal</i>	A260/280	A260/230	[] ng/ul
8	0,62	0,15	50
9	1,33	0,58	286
10	0,99	0,33	70
11	1,37	0,53	358
12	1,11	0,36	175
13	1,03	0,31	97
14	1,08	0,34	109
15	0,99	0,31	80
16	0,98	0,22	185
17	1,15	0,37	254
18	1,25	0,48	215
19	1,33	0,46	170
20	0,99	0,3	109
21	1,14	0,33	135
22	1,54	0,75	473
23	1,23	0,42	151
24	1,48	0,72	355
25	1,24	0,46	267
26	1,28	0,47	144
27	1,37	0,62	282
28	1,37	0,55	188
29	1,21	0,4	115
30	1,43	0,53	296
31	1,19	0,33	155
32	1,15	0,29	274
33	1,36	0,48	343
34	1,36	0,47	248
35	1,44	0,63	351
36	1,46	0,8	382
37	1,38	0,52	164
38	1,33	0,46	190
39	1,34	0,4	180
40	1,49	0,53	255
41	1,52	0,75	398
42	1,33	0,43	139
43	1,52	0,67	265
44	1,51	0,69	287
45	1,48	0,55	170
46	1,21	0,43	176

<i>Animal</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>[] ng/ul</i>
47	1,33	0,68	235
48	1,4	0,71	282
49	1,36	0,6	250
50	1,53	0,86	499
51	1,43	0,67	386
52	1,27	0,46	233
53	1,42	0,65	300
54	1,44	0,7	271
55	1,27	0,48	217
56	1,29	0,44	207
57	1,5	0,31	156
58	1,29	0,28	164
59	1,18	0,29	187
60	1,34	0,41	237
61	1,14	0,32	205
62	1,22	0,37	210
63	1,18	0,29	170
64	1,09	0,27	153
65	1,14	0,28	161
66	1,29	0,38	256
67	1,14	0,29	269
68	1,31	0,45	294
69	0,85	0,16	231
70	1,14	0,32	255
71	1,05	0,27	420
72	1,07	0,25	223
73	0,92	0,23	379
74	0,92	0,23	269
75	0,96	0,24	224
76	0,88	0,2	375
77	0,8	0,14	124
78	0,82	0,18	249
79	1,02	0,21	275
80	1,15	0,35	164
81	1,03	0,14	116
82	1,2	0,35	323
83	0,94	0,17	133
84	0,88	0,22	365
85	0,96	0,23	213

<i>Animal</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>[] ng/ul</i>
86	1,18	0,32	450
87	1,36	0,26	137
88	1,37	0,6	233
89	1,3	0,34	182
90	1,48	0,68	319
91	1,41	0,71	377
92	1,37	0,81	355
93	1,53	0,77	581
94	1,24	0,23	137
95	1,08	0,48	158
96	1,48	0,45	164
97	1,7	0,7	275
98	1,04	0,28	219
99	1,4	0,63	380
100	1,58	0,83	419
101	1,4	0,62	242
102	1,48	0,78	370
103	1,5	0,95	523
104	2,3	0,36	70
105	1,51	0,87	358
106	1,4	0,83	500
107	1,45	0,75	420
108	1,53	0,8	434
109	1,61	0,62	301
110	1,52	0,7	377
111	1,45	0,49	221
112	1,24	0,44	230
113	1,57	0,71	187
114	1,55	0,66	269
115	1,47	0,41	148
116	1,34	0,41	88
117	1,55	0,62	214
118	1,57	0,74	231
119	1,49	0,48	90
120	1,62	0,95	205
121	1,58	0,69	306
122	1,59	0,65	145
123	1,88	1,07	206
124	1,74	0,98	196

125	1,64	0,71	141
126	1,74	1,1	222
<i>Animal</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>[] ng/ul</i>
127	1,66	0,76	120
128	1,64	0,95	192
129	1,7	0,98	219
130	1,7	1,63	261
131	1,48	0,56	546
132	1,68	1,08	259
133	1,5	0,83	168
134	1,71	0,84	172
135	1,5	0,72	307
136	1,41	0,72	334
137	1,59	0,82	329
138	1,48	0,43	187
139	1,17	0,23	130
140	1,32	0,37	253
141	1,22	0,29	205
142	1,13	0,38	217
143	1,33	0,31	151
144	1,49	0,5	313
145	1,45	0,49	278
146	1,23	0,32	169
147	1,42	0,56	349

Figura 10 – Gel representativo para a análise da integridade do material genético após extração

6.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Neste procedimento não foi observada qualquer reação inespecífica. As bandas obtidas após a amplificação eram únicas, com 771 pares de base. Para auxiliar a determinação da altura e do peso molecular das bandas foi utilizado o padrão de 1kb de pares de bases Plus Ladder – Invitrogen; o gel pode ser observado na figura 11.

Figura 11 – Gel representativo para a análise da amplificação do material genético após a PCR

6.4 Sequenciamento Genômico

Ao todo foram sequenciadas 17 amostras referentes à propriedade A, 10 referentes à B, 41 referentes à C e 50 amostras à propriedade D, totalizando 118 amostras. Foi possível sequenciar em média 450 nucleotídeos em cada reação.

Após as reações de sequenciamento genômico foram gerados arquivos com a extensão *.abi (*= nome do arquivo), os quais foram analisados pelo software BioEdit (HALL, 2011). Através deste software também foi possível a confecção dos eletroferogramas de cada reação, figura 12.

Figura 12 – Eletroferograma representativo de uma reação de sequenciamento. Em destaque o códon 154 com genótipo homozigótico para R/R

6.4.1 Análise Geral dos genótipos obtidos

Após a análise dos produtos gerados pelas reações de sequenciamento foram encontrados 6 alelos, os quais formaram 11 diferentes genótipos: ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/VRQ, ARQ/TRQ, AHQ/AHQ, ARR/ARR, ARR/AHQ, VRQ/VRQ, ARQ/TRQ, TRR/TRR e TRQ/TRQ. A ocorrência de cada genótipo encontrado esta relacionada no quadro 12 e no gráfico 1.

Quadro 14 – Genótipos obtidos com as reações de sequenciamento

Genótipo	Número de Ocorrências	Porcentagem
ARQ/ARQ	67	56,7%
ARR/ARQ	12	10,1%
ARQ/AHQ	11	9,3%
ARQ/VRQ	10	8,4%
ARQ/TRQ	07	4,2%
AHQ/AHQ	04	3,3%
ARR/ARR	02	1,7%
ARR/AHQ	02	1,7%
VRQ/VRQ	01	0,8%
TRR/TRR	01	0,8%
TRQ/TRQ	01	0,8%

Gráfico 1 – Categorização genotípica observada após análise de todas as reações de sequenciamento

Com a análise dos genótipos obtidos, foi possível determinar que 78,7% dos animais analisados são considerados susceptíveis ao desenvolvimento do scrapie, destes 69,4% pertencentes ao grupo R3 e 9,3% ao grupo R5. Apenas 21,3% dos animais podem ser considerados potencialmente resistentes. A categorização dos animais pode ser vista no gráfico 2.

Gráfico 2 – Categorização quanto a susceptibilidade, observada após análise de todas as reações de sequenciamento

6.4.2 Propriedade A

Foram realizadas 17 reações de sequenciamento referentes à amostras oriundas da Propriedade A. O genótipo ARQ/ARQ pôde detectado em sete amostras (41,1%), seguido dos genótipos ARR/ ARQ presentes em quatro (23,5%), o AHQ/AHQ em duas (11,7%), o ARQ/AHQ em duas (11,7%) e o ARQ/VRQ em duas (11,7%), gráfico 3.

Gráfico 3 – Categorização genotípica observada após análise de todas as reações de sequenciamento proveniente dos animais da propriedade A

Estes resultados demonstram que 23,5% dos animais desta propriedade pertencem ao grupo R2, considerados resistentes, 64,7% pertencem ao grupo R3, considerados animais com baixa resistência e 11,7% pertencem ao grupo R5 representado por animais altamente susceptíveis, como pode ser visto no gráfico 4.

Gráfico 4 – Categorização quanto a susceptibilidade, observada após análise de todas as reações de sequenciamento provenientes dos animais da propriedade A

6.4.3 Propriedade B

Referente a propriedade B foram sequenciadas 10 amostras. Dentre as quais o genótipo ARQ/ARQ esteve presente em sete amostras (70%), o genótipo ARR/ARQ presente em duas (20%) e ARQ/AHQ em uma (10%) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Categorização genotípica observada após análise de todas as reações de sequenciamento proveniente dos animais da propriedade B

Estes resultados indicam que 20% dos animais desta propriedade pertencem ao grupo R2, considerados resistentes e a maioria, 80%, constituída por animais com baixa resistência, que pertencem ao grupo R3 (Gráfico 6) .

Gráfico 6 – Categorização quanto a susceptibilidade, observada após análise de todas as reações de sequenciamento provenientes dos animais da propriedade B

6.4.4 Propriedade C

Nas amostras referentes à Propriedade C foram realizadas 41 reações de sequenciamento. O genótipo ARQ/ARQ esteve presente em 29 amostras (70,7%), seguido do genótipo ARR/ARQ presente em duas (4,8%) e do ARR/ARR em duas (4,8%). Já os genótipos ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARQ/VRQ e VRQ/VRQ estavam presentes em uma amostra cada um (2,4% cada). Em quatro amostras foi possível verificar a genotipagem de um polimorfismo raro, a presença da Treonina no códon 136, correspondendo uma amostra TRR/TRR (2,4%), uma amostra TRQ/TRQ (2,4%), e duas amostras ARQ/TRQ (4,8%)(Gráfico 7).

Gráfico 7 – Categorização genotípica observada após análise de todas as reações de sequenciamento proveniente dos animais da propriedade A

Estes resultados mostram que 4,9% dos animais desta propriedade pertencem ao grupo R1, considerados extremamente resistentes e 4,9% pertencem ao grupo R2 representado por animais resistentes. Já 75,5% pertencem ao grupo R3, composto por animais com baixa resistência e 4,9% do grupo R5, composto por animais altamente susceptíveis. Em 9,8% das amostras analisadas não foi possível determinar a categorização, pois se tratavam-se de genótipos raros(Gráfico 8).

Gráfico 8 – Categorização quanto a susceptibilidade, observada após análise de todas as reações de sequenciamento provenientes dos animais da propriedade C

C

6.4.5 Propriedade D

Na Propriedade D foram sequenciadas 50 amostras. O genótipo ARQ/ARQ estava presente em 24 amostras (48%), os genótipos ARQ/VRQ em sete (14%), e o ARQ/AHQ também sete (14%). O ARR/ARQ estava em quatro amostras (8%), o ARR/AHQ em duas (4%), e o AHQ/AHQ em uma (2%). A treonina no códon 136 também pôde ser observada nesta propriedade, sendo que o genótipo ARQ/TRQ foi detectado em cinco amostras (10%)(Gráfico 9).

Gráfico 9 – Categorização genotípica observada após análise de todas as reações de sequenciamento proveniente dos animais da propriedade D

Estes resultados indicam que 12% dos animais desta propriedade pertencem ao grupo R2, considerados resistentes, 64% são do grupo R3, considerados animais com baixa resistência e 14% ao grupo R5 representado por animais altamente susceptíveis. Em 10% das amostras analisadas não foi possível à categorização, pois tratavam-se de genótipos considerados raros(Gráfico 10).

Gráfico 10 – Categorização quanto a susceptibilidade, observada após análise de todas as reações de sequenciamento provenientes dos animais da propriedade D

6.4.6 Análise dos Polimorfismos

Como descrito em material e métodos, as análises de polimorfismos foram feitas utilizando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990), de forma individual as sequencias obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas no GenBank. Na figuras 13 o alinhamento de duas amostras, uma já depositada no GenBank com o genótipo ARQ/ARQ e a outra oriunda deste trabalho, confirmando o mesmo genótipo ARQ/ARQ.

Figura 13 – Comparação genotípica entre sequencias ARQ/ARQ

```

CTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGA
CTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGA
GCAGGCCTCTTATA-CATTTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATG
GCAGG-C-CTTA-AGCATTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATG
TACCGTTACCCCAACCAAGGTACTACAGACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAAAC
TACCGTTACCCCAACCAAGGTACTACAGACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAAAC
TTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAG
TTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAG
GGGGAGAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAG
GGGGAGAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAG

```

6.5 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

As reações de q-PCR foram realizadas nas amostras com os genótipos conhecidos, para a validação dos primers e sondas propostos, o genótipo utilizado para a amplificação foram de animais homozigotos para o alelo selvagem ARQ/ARQ.

Em todas as reações pode ser observado a amplificação das amostras selecionadas as quais forma idênticas aos resultados obtidos nas reações de sequenciamento genômico. As diferenças entre as duas técnicas serão discutidas no capítulo 7 discussão.

7 DISCUSSÃO

7.1 Alelos

Neste estudo foi possível a identificação de 6 alelos, levando em consideração a sequência dos códons 136, 154 e 171, respectivamente as variações ARQ, ARR, AHQ, VRQ, TRR e TRQ. Os quatro primeiros são alelos já comumente encontrados em estudos envolvendo o gene PRNP.

Foram verificados dois alelos que até o presente momento não haviam sido descritos em estudos envolvendo rebanhos ovinos nacionais, o TRR e TRQ. A identificação destes alelos reforça a teoria de que os cruzamentos entre raças nacionais e importadas (LIMA et al., 2007) estão se tornando cada vez mais frequentes. Pelo fato de se constituírem ocorrências extremamente baixas ainda não é possível determinar de uma forma exata as manifestações relacionadas ao scrapie em animais portadores. Os relatos existentes até agora sugerem que a presença destes alelos não alteram a susceptibilidade ao scrapie (BILLINIS et al., 2004; GUAN et al., 2011).

Em estudos nacionais semelhantes o número de alelos identificados teve pequenas variações e os resultados mostraram-se semelhantes aos encontrados neste estudo. SOTOMAIOR et al, 2008, identificou 4 alelos, sendo que na ocasião foram analisadas diversas raças nacionais e internacionais. Em seu estudo envolvendo animais da raça Santa Inês LIMA et al, 2007, identificou 9 alelos, resultado que demonstra grande variabilidade alélica na raça. Em contrapartida PACHECO et al, 2007, analisando ovinos da raça nativa Morada Nova, identificou apenas 3 alelos, resultado que difere deste e de outros estudos com raças também nativas.

Estudos internacionais semelhantes demonstram que o alelo ARQ é o mais frequente nos rebanhos analisados (BILLINIS et al., 2004; GAMA et al., 2006; MOLINA; JUAREZ; RODERO, 2006). Estes resultados indicam que ainda não foram implementados programas de melhoramento genético envolvendo Osrebanhos

ovinos estudados, pois que o alelo ARQ, considerado o alelo selvagem, é observado em uma frequência maior que os demais alelos descritos.

Em contrapartida existem trabalhos internacionais onde o alelo ARR é o mais frequente (ROELS et al., 2004). Por ser considerado mais resistente, os programas de melhoramento genético voltados a aumentar a resistência dos rebanhos ao scrapie têm utilizado como estratégia a introdução do alelo ARR. Como decorrência, em estudos envolvendo rebanhos que já contam com programas de cruzamentos é natural esperar-se uma maior frequência do alelo considerado resistente, no caso ARR.

Existe uma classificação de raças de acordo com o alelo presente no códon 136 (DAWSON et al., 1998), pela qual as variações são designadas como raças valina ou raças alanina. Esta categorização é feita de acordo com a frequência alélica encontrada. No caso da raça Santa Inês os estudos realizados até agora (LIMA et al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2008) indicam uma frequência muito baixa do alelo V₁₃₆ e uma frequência muito alta do alelo ARQ₁₃₆. Perante este fato, podemos considerar e classificar a raça Santa Inês como raça alanina.

7.2 Genótipos

Foram identificados ao todo 11 genótipos: ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/VRQ, AHQ/AHQ, ARR/ARR, ARR/AHQ, VRQ/VRQ, ARQ/TRQ, TRR/TRR e TRQ/TRQ. Essa grande quantidade de genótipos formados permitiu considerar os rebanhos analisados como portadores de grande variabilidade genética.

Dentre os animais analisados foi possível identificar desde o genótipo ARR/ARR, considerado como o mais resistente ao scrapie, até o genótipo VRQ/VRQ, considerado extremamente susceptível ao scrapie.

Note-se que o estudo presente constituiu o primeiro relato do genótipo VRQ/VRQ em ovinos da raça Santa Inês, mesmo que em baixa frequência, sendo importante ressaltar que esta combinação genotípica é a mais susceptível ao scrapie. Do fato decorre a recomendação para uma acentuada preocupação com o

manejo e alimentação destes animais, afim de evitar eventuais contatos com o agente infeccioso. Apesar de animais homozigotos para o genótipo VRQ/VRQ não terem sido ainda relatados na raça Santa Inês, o alelo VRQ em animais heterozigotos já foi relatado na raça Santa Inês por outros grupos de pesquisadores (SOTOMAIOR et al., 2008).

Com presença de 56,7% das amostras analisadas, o genótipo ARQ/ARQ revelou-se o mais frequente. Levando em consideração que essa combinação não é considerada resistente fica claro que mais da metade do rebanho ovino analisado tem susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. De maneira semelhante Sotomaior et al. (2008) e Lima et al. (2007) em seus estudos verificaram a predominância do genótipo ARQ/ARQ nos animais analisados, sendo que nestas ocasiões foram analisadas amostras de animais criados no Brasil. Os resultados semelhantes demonstram que a raça nativa Santa Inês é potencialmente susceptível ao scrapie. Ainda que nenhum relato da doença na raça tenha sido reportado até o presente momento, ou seja os relatos de scrapie no Brasil não relacionam a raça Santa Inês.

Outro estudo nacional, no caso envolvendo a raça nativa Morada Nova, demonstrou um resultado menos expressivo em relação ao genótipo ARQ/ARQ, com somente 34,72% dos animais analisados sendo portadores deste genótipo (PACHECO et al., 2007).

Diversos trabalhos internacionais foram realizados por outros grupos e mostraram resultados variados (SIPOS et al., 2002; ACIN et al., 2004; GAMA et al., 2006; MOLINA; JUAREZ; RODERO, 2006). Esses estudos indicaram o genótipo ARQ/ARQ como o mais frequente nas populações analisadas, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. Em contrapartida Dawson et al. (1998); e Roels et al. (2004) descreveram que a maioria dos animais analisados em seus trabalhos é resistente ou extremamente resistente ao desenvolvimento da doença.

O genótipo considerado extremamente resistente ARR/ARR foi detectado em apenas 0,84% das amostras analisadas. Em outros estudos realizados envolvendo a raça nacional Santa Inês este genótipo não foi detectado (LIMA et al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2008). Em contrapartida Pacheco et al. (2007) em seu trabalho

identificou o genótipo ARR/ARR em 31,94% de um total de 72 animais analisados, resultado que difere totalmente dos trabalhos envolvendo a raça Santa Inês.

Em nove amostras pode ser observada a presença dos genótipos A/T e T/T. Até o presente momento estes polimorfismos só foram descritos em publicações internacionais e mesmo assim são considerados como observações raras (BILLINIS et al., 2004; GUAN et al., 2011), sendo este, portanto, o primeiro relato nacional concluindo pela presença dos genótipos citados e o único relato envolvendo a raça Santa Inês. O efeito na susceptibilidade ou resistência nos animais portadores da homozigose T/T no códon 136 ainda não está totalmente elucidado (GUAN et al., 2011), já a heterozigose A/T não altera a susceptibilidade a doença (BILLINIS et al., 2004).

7.3 Categorização quanto a susceptibilidade e resistência

A categorização dos animais foi baseada na classificação proposta por Dawson et al. (1998), sendo que os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se semelhantes àqueles obtidos em estudos nacionais já realizados envolvendo a raça Santa Inês. Em contrapartida, foram observadas diferenças significantes quando comparado com estudos nacionais e internacionais envolvendo outras raças.

7.3.1 Grupo R5

Dentro da classificação proposta por Dawson et al. (1998), as amostras em que o alelo VRQ está presente enquadram-se no grupo R5. Foram detectados dois genótipos com a presença do alelo VRQ, a heterozigose ARQ/VRQ, presente em 8,7% das amostras, e a homozigose VRQ/VRQ, presente em 0,84% das amostras. Portanto, de acordo com este critério, podemos considerar que 9,3% dos animais analisados são altamente susceptíveis ao desenvolvimento da doença. Sotomaior et al. (2008) e Lima et al. (2007), analisando animais da raça Santa Inês, não

detectaram a heterozigose VRQ/VRQ, considerado o genótipo mais susceptível. Já a heterozigose ARQ/VRQ pode ser detectada em 11% de um total de 28 animais da raça Santa Inês analisados (SOTOMAIOR et al., 2008). Por outro lado, Lima et al. (2007) detectou em seu estudo a heterozigose ARR/VRQ.

Alguns estudos internacionais relatam a presença da homozigose VRQ/VRQ, como por exemplo (ROELS et al., 2004). Neste estudo o grupo trabalhou com rebanhos pertencentes à Bélgica, sendo analisados 3103 animais de diferentes raças, incluindo a raças Sulffolk, Hampshire Down e Ile de France, as quais são comuns no território Brasileiro, principalmente do Estado do Paraná (SOTOMAIOR et al., 2008). Estes dados são importantes para enfatizar a importancia da realização de programas de vigilancia ativa para animais importados. Ao contrário do grupo belga, estudo envolvendo rebanhos ovinos criados na Alemanha (LUHKEN et al., 2004) e o mais recente, envolvendo rebanhos Chineses (WANG et al., 2008), demonstraram a ausencia da homozigose VRQ/VRQ.

7.3.2 Grupo R4

Não foram observados animais com o genótipo ARR/VRQ, o qual se enquadra no grupo R4, representado por animais susceptíveis. Dawson et al. (1998), Lima, et al. (2007) e Sotomaior, et al. (2008) em seus estudos também não observaram este genótipo e, consequentemente, animais que se enquadram no grupo R4. Relatos internacionais deste genótipo são frequentes. Renard et al. (2005) pode observar em seu estudo que em um grupo de 187 animais genotipados 13 apresentaram o genótipo ARR/VRQ. Na ocasião foram genotipados animais da raça Croisé, pertencentes a rebanhos belgas.

7.3.3 Grupo R3

Após a análise genotípica pode ser constatado que 69,3% dos animais analisados neste estudo se enquadraram no grupo R3, considerado susceptível ao scrapie.

O genótipo com maior expressão detectada foi a homozigose ARQ/ARQ. Este resultado já era esperado, pois trata-se do genótipo selvagem e sabe-se que até o presente momento nenhum programa de melhoramento genético foi implementado no território brasileiro.

O genótipo ARQ/ARQ foi observado em 56,7% dos animais analisados, tendo outros estudos nacionais envolvendo a raça Santa Inês chegado a resultados semelhantes. Sotomaior et al. (2008) em seu estudo envolvendo rebanhos do estado do Paraná verificou que 43% dos animais da raça Santa Inês analisados possuem o genótipo ARQ/ARQ; já Lima et al. (2007) verificou que 37,5% dos animais analisados possuem o genótipo ARQ/ARQ, sendo que na ocasião os animais eram originados de rebanhos criados no estado do Ceará.

Estudos internacionais também demonstram que o genótipo ARQ/ARQ está presente na maioria dos animais analisados (HURTADO et al., 2002; ACIN et al., 2004; GAMA et al., 2006; MOLINA; JUAREZ; RODERO, 2006), levando em consideração que nestes trabalhos foram utilizadas diversas raças de ovino, reforça a ideia do predomínio do genótipo ARQ/ARQ em rebanhos onde não há programas de melhoramento genético.

Outros genótipos observados neste trabalho também se enquadram no grupo R3, porém com uma frequência menor, casos do genótipo ARQ/AHQ, presente em 9,3% dos animais analisados, e do genótipo AHQ/AHQ, em 3,3%. A heterozigose ARQ/AHQ pode ser observada em outros estudos nacionais (LIMA et al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2008) todos em frequências semelhantes às detectadas neste estudo.

Já quanto à homozigose AHQ/AHQ este constitui o primeiro relato que identifica sua presença na raça Santa Inês, ainda que em uma frequência reduzida.

Em estudos internacionais os dois genótipos, ARQ/AHQ e AHQ/AHQ, foram observados, com o ARQ/AHQ apresentando uma maior frequência (RENARD C., 2005), resultados próximos aos obtidos no presente estudo.

7.3.4 Grupo R2

Genótipos compartilháveis com o grupo R2 foram observados em 11,8% dos animais analisados neste estudo. Nesta ocasião foi observado o genótipo ARR/ARQ em 10,1% dos animais analisados e o genótipo ARR/AHQ em 1,7%. Estes resultados demonstram que, ainda que em baixa frequência, o alelo ARR está presente nos rebanhos analisados. Mesmo considerada a baixa frequência, a informação sobre a presença deste alelo é de extrema importância para a adoção de medidas preventivas, pois está relacionado diretamente com a resistência do animal portador ao desenvolvimento do scrapie. Estes dois genótipos foram também observados em estudo envolvendo rebanhos paranaenses. Na ocasião Sotomaior et al. (2008) observou o genótipo ARR/ARQ em 8 animais e o genótipo ARR/AHQ em 1 animal de um total de 28 ovinos da raça Santa Inês genotipados.

7.3.5 Grupo R1

Caracterizado como grupo com maior resistência ao desenvolvimento do scrapie, o grupo R1 é representado apenas pelo genótipo ARR/ARR (DAWSON et al., 1998). Neste estudo foi possível observar o genótipo ARR/ARR em apenas 0,84% dos animais analisados, resultado importante por ser o primeiro relato desta homozigose em animais da raça Santa Inês. Em outros estudos nacionais (LIMA et al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2008) não observaram o genótipo ARR/ARR.

A baixa frequência do genótipo ARR/ARR no rebanho ovino nacional é fato importante a ser levado em consideração, pois, a partir dessa informação, programas de melhoramento genético poderão propiciar cruzamentos direcionados à

obtenção de um expressivo aumento da frequência deste genótipo nos rebanhos ativos de ovinos criados no Brasil. ~~XX~~Neste sentido, alguns países europeus propuseram programas de melhoramento genético nos rebanhos ovinos. Trabalhos científicos foram realizados para estimar a frequência genotípica nestes rebanhos (ROELS et al., 2004), o que permitiu constatar a predominância da frequência do alelo ARR e, conseqüentemente, do genótipo ARR/ARR nos rebanhos analisados (ROELS et al., 2004; EGLIN et al., 2005).

A baixa frequência do alelo ARR e do genótipo ARR/ARR, observada neste e em outros estudos nacionais, reforça a potencial susceptibilidade de ovinos da raça Santa Inês quanto ao desenvolvimento do scrapie.

7.4 Métodos Utilizados

Diversos métodos de genotipagem podem ser utilizados como ferramentas para estudos genotípicos do gene PRNP. As ferramentas mais comumente utilizadas são: eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (ROELS et al., 2004), reações em cadeia da polimerase por enzimas de restrição (PCR-RFLP) (SOTOMAIOR et al., 2008), sequenciamento genômico (PACHECO et al., 2007), cromatografia líquida de alta performance desnaturante (DHPLC) (CASTRO et al., 2004) e por q-PCR (RENARD C., 2005; MCKAY et al., 2008).

Para a realização deste trabalho foi utilizada como ferramenta de genotipagem o método de sequenciamento genômico e como método comparativo de confirmação de resultados obtidos foi utilizada a ferramenta de q-PCR.

7.4.1 Sequenciamento Genômico

Diversas etapas anteriores à reação foram necessárias para a utilização deste método: extração do material genético, na qual utilizou-se kit comercial, com duração em torno de 40 minutos; quantificação do material obtido; reação de

amplificação por PCR convencional, com duração de 4 horas; purificação do material amplificado e, por fim, reação de sequenciamento. Ao todo foram realizadas 5 etapas.

Apesar do expressivo número de etapas, o custo final de uma reação de sequenciamento não ultrapassa o custo das demais técnicas de genotipagens. Por ser considerada uma técnica moderna, confiável (STABENTHEINER et al., 2011) e atualmente de baixo custo, a reação de sequenciamento genômico pode ser considerada uma ótima ferramenta para a genotipagem de polimorfismos do gene PRNP.

7.4.2 q-PCR

Ao contrário do sequenciamento genômico, para a realização de reações utilizando a q-PCR não foram necessário tantas etapas, apenas extração, quantificação e a amplificação. Com a aplicação desse método pôde-se notar uma importante redução no tempo de realização do experimento, se o compararmos com o sequenciamento. Além de ser um método mais rápido, o q-PCR não necessita grandes quantidades de amostras e enzimas.

Apesar das vantagens descritas acima, a ferramenta de q-PCR necessita de uma grande quantidade de componentes, entre eles as sondas, que são responsáveis pela emissão da fluorescência. Estes componentes tornam o custo da reação de q-PCR relativamente alto se o compararmos com o sequenciamento genômico. Caso o experimento envolva uma grande quantidade de animais e amostras este custo tende a se reduzir, o que o torna, nessa condição, uma ótima ferramenta de genotipagem.

7.5 Perspectivas

Diversos países, inclusive o Brasil (BRASIL, 2008), já contam com programas de vigilância ativa, para tanto utilizando-se de barreiras sanitárias, rastreabilidade e estudos epidemiológicos dos rebanhos ovinos.

Além de programas de controle de EETs, estudos genotípicos mais efetivos dos rebanhos nacionais são necessários para o mapeamento e categorização dos animais efetivos. Estes estudos permitem, a partir de análises genotípicas, identificar rebanhos que necessitam de medidas preventivas mais eficazes.

Programas de melhoramento genético, através de cruzamentos direcionados podem também fazer parte de estratégias profiláticas contra o scrapie. A introdução do alelo ARR nos rebanhos é um ótimo exemplo de cruzamento direcionado, uma vez que este alelo é considerado o mais resistente ao desenvolvimento do scrapie.

Chama-se a atenção, no entanto, que pesquisas subsequentes deverão evidenciar se esse tipo de programa de melhoramento genético poderá para amento da resistência ao scrapie poderá contribuir para o aparecimento de outros tipos de doença ou problemas de consanguinidade. Existem trabalhos que destacam possíveis riscos com programas de melhoramento (ROUGHSEGE; VILLANUEVA; WOOLLIAMS, 2006), como o eventual surgimento de uma nova EETs e perda de características produtivas.

Com os dados obtidos neste trabalho e com base em outros estudos nacionais pode-se considerar que a raça Santa Inês é potencialmente susceptível ao desenvolvimento do scrapie, mesmo considerando que os relatos nacionais da doença tenham somente se reportado a animais da raça Suffolk e Hampshire Down (LIMA et al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2008).

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A ferramenta de sequenciamento genômico mostrou-se eficiente na genotipagem do gene PRNP, além de apresentar baixo custo se comparado a outras técnicas.
- A ferramenta de q-PCR demonstrou ser eficiente, pelo fato de ter um custo alto relacionado a enzimas e equipamentos, recomenda-se o uso desta técnica somente quando se tratar de experimento de grande escala.
- Podemos concluir com os resultados deste trabalho que a raça Santa Inês pode ser considerada potencialmente susceptível ao desenvolvimento do scrapie.
- Apenas 13,49% dos animais analisados podem ser considerados potencialmente resistentes ao scrapie.
- 86,51% dos animais analisados são considerados susceptíveis ou fracamente resistentes ao scrapie.

REFERÊNCIAS

ACIN, C.; MARTIN-BURRIEL, I.; GOLDMANN, W.; LYAHYAI, J.; MONZON, M.; BOLEA, R.; SMITH, A.; RODELLAR, C.; BADIOLA, J. J.; ZARAGOZA, P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. **Journal of General Virology**, v. 85, n., p. 2103-2110, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

APHIS. **Animal disease eradication programs and control and certification programs**: secondary title, 2003.

BALKEMA-BUSCHMANN, A.; FAST, C.; KAATZ, M.; EIDEN, M.; ZIEGLER, U.; MCINTYRE, L.; KELLER, M.; HILLS, B.; GROSCHUP, M. H. Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 112-117, 2011.

BASLER, K.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D. F.; MCKINLEY, M. P.; PRUSINER, S. B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, v. 46, n. 3, p. 417-428, 1986.

BECK, E.; DANIEL, P. Kuru. **Psychological medicine**, v. 6, n. 3, p. 343-345, 1976.

BILLINIS, C.; PSYCHAS, V.; LEONTIDES, L.; SPYROU, V.; ARGYROUDIS, S.; VLEMMAS, I.; LEONTIDES, S.; SKLAVIADIS, T.; PAPADOPOULOS, O. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 2, p. 547-554, 2004.

BOLTON, D. C.; MCKINLEY, M. P.; PRUSINER, S. B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science**, v. 218, n. 4579, p. 1309-1311, 1982.

BOUNHAR, Y.; ZHANG, Y.; GOODYER, C. G.; LEBLANC, A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. **J Biol Chem**, v. 276, n. 42, p. 39145-39149, 2001.

BRASIL, M. D. A. E. A. **Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias - Scrapie**: secondary title. Brasília, 2008.

BUGIANI, O.; GIACCONE, G.; PICCARDO, P.; MORBIN, M.; TAGLIAVINI, F.; GHETTI, B. Neuropathology of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Microscopy research and technique**, v. 50, n. 1, p. 10-15, 2000.

BYTES, M. **Prion Protein**: secondary title. 2012.

CASTRO, R. M.; LANDEMBERGER, M. C.; WALZ, R.; CARLOTTI, C. G., JR.; HUANG, N.; CUNHA, D. R.; MOURA, R.; CABALLERO, O. L.; SAKAMOTO, A. C.; NITRINI, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. **Journal of neuroscience methods**, v. 139, n. 2, p. 263-269, 2004.

CAUGHEY, B. W.; DONG, A.; BHAT, K. S.; ERNST, D.; HAYES, S. F.; CAUGHEY, W. S. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. **Biochemistry**, v. 30, n. 31, p. 7672-7680, 1991.

COLLING, S. B.; COLLINGE, J.; JEFFERYS, J. G. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. **Neurosci Lett**, v. 209, n. 1, p. 49-52, 1996.

DAWSON, M.; HOINVILLE, L. J.; HOSIE, B. D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. **Veterinary Record**, v. 142, n. 23, p. 623-625, 1998.

DE SILVA, R. N. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: an update. **Hospital medicine**, v. 61, n. 2, p. 82-83, 2000.

DELEAULT, N. R.; LUCASSEN, R. W.; SUPATTAPONE, S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 717-720, 2003.

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

DONNELLY, C. A. BSE in France: epidemiological analysis and predictions. **Comptes rendus biologies**, v. 325, n. 7, p. 793-806, 2002.

EGLIN, R. D.; WARNER, R.; GUBBINS, S.; SIVAM, S. K.; DAWSON, M. Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. **Vet Rec**, v. 156, n. 14, p. 433-437, 2005.

EUROPEAN, C. Amending Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards the eradication of transmissible spongiform encephalopathies in ovine and caprine animals and rules for the trade in live ovine and caprine animals and bovine embryos. **Official Journal of the European Union**, v. 41, n. L 37, p. 7-11, 2003.

EUROPEAN, C. Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2010. **Office for Official Publications of the European Communities**, v., n., p. 144, 2011.

FERNANDES, R. E.; C.M., R.; J.C., F. "Scrapie"em Ovinos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 6, n., p. 139-143, 1978.

FOSTER, J. D.; HOPE, J.; FRASER, H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. **Vet Rec**, v. 133, n. 14, p. 339-341, 1993.

GAMA, L. T.; CAROLINO, M. I.; SANTOS-SILVA, M. F.; PIMENTA, J. A.; COSTA, M. S. Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. **Livestock Science**, v. 99, n. 2-3, p. 175-184, 2006.

GHANI, A. C.; DONNELLY, C. A.; FERGUSON, N. M.; ANDERSON, R. M. The transmission dynamics of BSE and vCJD. **Comptes rendus biologies**, v. 325, n. 1, p. 37-47, 2002.

GOING, J. J.; GUSTERSON, B. A. Molecular pathology and future developments. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 14, p. 1895-1904, 1999.

GUAN, F.; PAN, L.; LI, J.; TANG, H.; ZHU, C.; SHI, G. Polymorphisms of the prion protein gene and their effects on litter size and risk evaluation for scrapie in Chinese Hu sheep. **Virus Genes**, v. 43, n. 1, p. 147-152, 2011.

HALL, T. **BioEdit**: secondary title. Carlsbad, Ca, 2011. 2012.

HOFFMANN, C.; EIDEN, M.; KAATZ, M.; KELLER, M.; ZIEGLER, U.; ROGERS, R.; HILLS, B.; BALKEMA-BUSCHMANN, A.; VAN KEULEN, L.; JACOBS, J. G.; GROSCHUP, M. H. BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. **Veterinary research**, v. 42, n. 1, p. 21, 2011.

HUNTER, N. Scrapie and experimental BSE in sheep. **Br Med Bull**, v. 66, n., p. 171-183, 2003.

HURTADO, A.; GARCIA-PEREZ, A. L.; DE HEREDIA, I. B.; BARANDIKA, J.; SANZ-PARRA, A.; BERRIATUA, E.; JUSTE, R. A. Genetic susceptibility to scrapie in a population of Latxa breed sheep in the Basque Country, Spain. **Small Ruminant Research**, v. 45, n. 3, p. 255-259, 2002.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2010**: secondary title, 2010.

IMRAN, M.; MAHMOOD, S. An overview of animal prion diseases. **Virology journal**, v. 8, n., p. 493, 2011.

JEFFREY, M.; GONZALEZ, L. Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 284, n., p. 65-97, 2004.

KRETLOW, A.; WANG, Q.; BEEKES, M.; NAUMANN, D.; MILLER, L. M. Changes in protein structure and distribution observed at pre-clinical stages of scrapie pathogenesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1782, n. 10, p. 559-565, 2008.

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

LEE, I. Y.; WESTAWAY, D.; SMIT, A. F.; WANG, K.; SETO, J.; CHEN, L.; ACHARYA, C.; ANKENER, M.; BASKIN, D.; COOPER, C.; YAO, H.; PRUSINER, S. B.; HOOD, L. E. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genome Res**, v. 8, n. 10, p. 1022-1037, 1998.

LIMA, A. C.; BOSSERS, A.; SOUZA, C. E.; OLIVEIRA, S. M.; OLIVEIRA, D. M. PrP genotypes in a pedigree flock of Santa Ines sheep. **Vet Rec**, v. 160, n. 10, p. 336-337, 2007.

LLOYD, S.; MEAD, S.; COLLINGE, J. Genetics of prion disease. **Topics in current chemistry**, v. 305, n., p. 1-22, 2011.

LUHKEN, G.; BUSCHMANN, A.; GROSCHUP, M. H.; ERHARDT, G. Prion protein allele A(136)H(154)Q(171) is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. **Archives of Virology**, v. 149, n. 8, p. 1571-1580, 2004.

- MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**: Mosby, 2006
- MCKAY, J. T.; BRIGNER, T. A.; CAPLIN, B. E.; MCCURDY, K. S.; FORDE, R. L. A real-time polymerase chain reaction assay to detect single nucleotide polymorphisms at codon 171 in the prion gene for the genotyping of scrapie susceptibility in sheep. **J Vet Diagn Invest**, v. 20, n. 2, p. 209-212, 2008.
- MELCHIOR, M. B.; WINDIG, J. J.; HAGENAARS, T. J.; BOSSERS, A.; DAVIDSE, A.; VAN ZIJDERVELD, F. G. Eradication of scrapie with selective breeding: are we nearly there? **BMC Vet Res**, v. 6, n., p. 24, 2010.
- MOLINA, A.; JUAREZ, M.; RODERO, A. Merino sheep breed's genetic resistance to Scrapie: Genetic structure and comparison of five eradication strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, n. 3-4, p. 239-250, 2006.
- OIE. **Terrestrial Animal Health Code. Scrapie.**: secondary title, 2010.
- PACHECO, A. C. L.; OLIVEIRA, S. M. P.; GOUVEIA, J. J. S.; DINIZ, M. C.; VASCONCELOS, E. J. R.; VIANA, D. A.; ROSINHA, G. M. S.; MAGGIONI, R.; COSTA, B.; OLIVEIRA, D. M. Analysis of prion protein gene (PRNP) polymorphisms in healthy Morada Nova sheep reveals the presence of genotypes susceptible to scrapie **Ciência Animal**, v. 17, n. 1, p. 27-36, 2007.
- PRIOLA, S. A. Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 1, p. 27-33, 1999.
- PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, n. 4542, p. 136-144, 1982.
- PRUSINER, S. B.; GROTH, D. F.; BOLTON, D. C.; KENT, S. B.; HOOD, L. E. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. **Cell**, v. 38, n. 1, p. 127-134, 1984.
- PRUSINER, S. B.; SCOTT, M.; FOSTER, D.; PAN, K. M.; GROTH, D.; MIRENDA, C.; TORCHIA, M.; YANG, S. L.; SERBAN, D.; CARLSON, G. A.; ET AL. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. **Cell**, v. 63, n. 4, p. 673-686, 1990.
- RENARD C., F. S., CUVELIER P., MULLENDER C., ROELS S. Mise en évidence par technique de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel de polymorphismes au niveau du gène PrP dans deux exploitations ovines belges déclarées positives aux encéphalopathies spongiformes transmissibles. **Ann. Méd. Vét**, v. 149, n., p. 166-172, 2005.

ROELS, S.; RENARD, C.; DE BOSSCHERE, H.; GEEROMS, R.; VAN POUCKE, M.; PEELMAN, L.; VANOPDENBOSCH, E. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in the Belgian sheep population: some preliminary data. **Vet Q**, v. 26, n. 1, p. 3-11, 2004.

ROUGHSEGE, T.; VILLANUEVA, B.; WOOLLIAMS, J. A. Determining the relationship between restorative potential and size of a gene bank to alleviate the risks inherent in a scrapie eradication breeding programme. **Livestock Science**, v. 100, n. 2-3, p. 231-241, 2006.

SANTOS, C. R.; MORI, E.; LEÃO, D. A.; MAIORKA, P. C. Genotipagem de polimorfismos no gene prnp em ovinos da raça Santa Inês no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 03, p., 2012.

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

SOTOMAIOR, C. S.; SOTOMAIOR, V. S.; MADEIRA, H. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the state of Parana, Brazil. **Anim Genet**, v. 39, n. 6, p. 659-661, 2008.

STABENTHEINER, S.; DANZER, M.; NIKLAS, N.; ATZMULLER, S.; PROLL, J.; HACKL, C.; POLIN, H.; HOFER, K.; GABRIEL, C. Overcoming methodical limits of standard RHD genotyping by next-generation sequencing. **Vox sanguinis**, v. 100, n. 4, p. 381-388, 2011.

VACCARI, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U.; ELEN, C.; PERFETTI, M. G.; DI BARI, M. A.; MORELLI, L.; LIGIOS, C.; BUSANI, L.; NONNO, R.; DI GUARDO, G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report. **Archives of virology**, v. 146, n. 10, p. 2029-2037, 2001.

WAHID. **World Animal Health Information Database**: secondary title, 2011.

WANG, Y.; QIN, Z.; QIAO, J.; ZHAO, D. Polymorphisms of the prion protein gene in sheep of Inner Mongolia, China. **Virus Genes**, v. 37, n. 1, p. 128-130, 2008.

WARNER, R. G.; MORRIS, D.; DAWSON, M. PrP genotype progression in flocks participating in the National Scrapie Plan for Great Britain. **The Veterinary record**, v. 159, n. 15, p. 473-479, 2006.

WELLS, G. A.; SCOTT, A. C.; JOHNSON, C. T.; GUNNING, R. F.; HANCOCK, R. D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M.; BRADLEY, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Vet Rec**, v. 121, n. 18, p. 419-420, 1987.

WILL, R. G.; IRONSIDE, J. W.; ZEIDLER, M.; COUSENS, S. N.; ESTIBEIRO, K.; ALPEROVITCH, A.; POSER, S.; POCCHIARI, M.; HOFMAN, A.; SMITH, P. G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. **Lancet**, v. 347, n. 9006, p. 921-925, 1996.

ANEXOS

Abaixo se encontram os anexos referentes ao a legislação vigente na Republica Federativa do Brasil.

Anexo A – Portaria Nº 37, 13 de Fevereiro de 2007

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
PORTARIA Nº 37, DE 13 DE FEVEREIRO DE 2007

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts. 9º e 42, do Anexo I, do Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005, e tendo em vista o que consta do Processo nº 21000.014191/2006-61, resolve:

Art. 1º Submeter à consulta pública, pelo prazo de 30 (trinta) dias, a contar da data da publicação desta

Portaria, o Projeto de Instrução Normativa e seus anexos, que aprova os procedimentos para atuação em

caso de suspeitas ou ocorrências de Paraplexia Enzoótica dos Ovinos (Scrapie).

Art. 2º O objetivo da presente consulta pública é permitir a ampla divulgação da proposta de Instrução

Normativa, para receber sugestões de órgãos, entidades ou pessoas interessadas, a serem analisadas pela

Secretaria de Defesa Agropecuária.

Art. 3º As sugestões de que trata o art. 2º , tecnicamente fundamentadas, deverão ser encaminhadas para a

CRHE/CGCD/DSA/SDA/MAPA, situada na Esplanada dos Ministérios, bloco D, Anexo A, sala 324,

CEP 70.043-900, Brasília-DF ou para o endereço eletrônico

pncrh@agricultura.gov.br.

Art. 4º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

GABRIEL ALVES MACIEL

ANEXO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº , DE DE DE 2007.

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO,
no uso das

atribuições que lhe confere o art. 2º do Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006,
tendo em vista o disposto no art. 61 do Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, e
na Portaria nº 516, de 9 de dezembro de 1997, considerando a necessidade de
definir os aspectos relacionados ao controle e à vigilância da Paraplexia Enzoótica
dos Ovinos (Scrapie), e o que consta do Processo nº 21000.014191/2006-61,
resolve:

Art. 1º Aprovar os Procedimentos para Atuação em Caso de Suspeitas ou
Ocorrências de Paraplexia

Enzoótica dos Ovinos (Scrapie), na forma dos seus anexos.

Art. 2º Esta Instrução entra em vigor na data de sua publicação.

LUÍS CARLOS GUEDES PINTO

ANEXO I

PROCEDIMENTOS PARA ATUAÇÃO EM CASO DE SUSPEITAS OU
OCORRÊNCIA DE

PARAPLEXIA

ENZOÓTICA DOS OVINOS (SCRAPIE)

CAPÍTULO I

DOS OBJETIVOS E DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 1º A atuação em casos de suspeita ou ocorrência de Paraplexia Enzoótica dos
Ovinos - Scrapie tem

como objetivo controlar a enfermidade.

§ 1º Considera-se Scrapie uma enfermidade neurodegenerativa, transmissível e fatal
que acomete ovinos e

caprinos, pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis -
EET.

§ 2º A Scrapie é de notificação compulsória e sua ocorrência ou suspeição deve ser
imediatamente

informada ao representante de quaisquer das instâncias (Central e Superior, Intermediárias e Locais) do

Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Art. 2º A Coordenação da Raiva dos Herbívoros e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis -

CRHE, do Departamento de Saúde Animal - DSA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento - MAPA, é responsável pelos procedimentos estabelecidos nessa Instrução.

Art. 3º Todos os proprietários ou detentores de animais positivos, suspeitos ou expostos são responsáveis

pela guarda desses animais, devendo comunicar imediatamente à competente instância do Sistema

Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, a ocorrência de qualquer evento que ocorra com os

mesmos, tais como parição, aborto, morte, entre outros.

Art. 4º Não caberá indenização por animais destruídos em que venham a se confirmar, laboratorialmente,

casos de enfermidades nervosas incuráveis.

Art. 5º São considerados animais com suspeita clínica de Scrapie os ovinos e caprinos, maiores de 12

(doze) meses de idade, que apresentem ou apresentaram sinais nervosos tais como: mudanças no

comportamento ou na locomoção ou na postura, com apresentação isolada ou conjunta, e com

sintomatologia persistente por mais de 15 (quinze) dias, associadas ou não a prurido e a movimentos

anormais.

Parágrafo Único. Considera-se como suspeita clínica fundamentada de Scrapie aquela que persiste após

investigação clínica, epidemiológica e diferencial para outras doenças (como por exemplo: sarna e outros

ectoparasitos, fotossensibilização, raiva, pseudo-raiva, listeriose encefálica, pneumonia ovina progressiva

maedi-visna, toxemia da gestação, hipomagnesemia e intoxicação por substâncias químicas ou por plantas).

Art. 6º São considerados animais com diagnóstico para Scrapie os ovinos ou caprinos com resultado positivo à prova de imunoistoquímica (IHQ), ou por meio de outras técnicas diagnósticas e metodologias aprovadas pelo MAPA, como Instância Central e Superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

CAPÍTULO II

DO ATENDIMENTO ÀS SUSPEITAS CLÍNICAS

Art. 7º Diante da suspeita clínica de Scrapie, as seguintes medidas deverão ser adotadas pelas instâncias

intermediárias ou locais do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária:

I - Visita à propriedade e fundamentação da suspeita;

II- Em caso de suspeita fundamentada, devem ser realizadas as seguintes ações:

a. Interdição do estabelecimento, que é a proibição do ingresso e egresso de ovinos e caprinos, seus

produtos e subprodutos desse estabelecimento, bem como qualquer outro material que venha a constituir

via de transmissão ou propagação da Scrapie, a critério da competente instância do Sistema Unificado de

Atenção à Sanidade Agropecuária;

b. Colheita e acondicionamento de amostras conforme disposto no Anexo II desta Instrução Normativa,

sendo que todas as amostras devem ser enviadas ao laboratório credenciado pelo MAPA para o

diagnóstico das EET, competente pela região de origem da amostra.

No caso de animal suspeito morto, ou quando o proprietário optar pelo sacrifício do animal enfermo,

deve-se proceder a colheita de tecido nervoso, incluindo o tronco encefálico, e de tecidos linfóides,

incluindo a terceira pálpebra, e de outros tecidos julgados necessários durante a

necropsia. No caso de animal suspeito vivo deve-se proceder à colheita de terceira pálpebra, que é a dobra da membrana da conjuntiva que pode estender-se para cobrir parte ou toda a córnea, repousando oculta no canto medial do olho;

c. Notificação da suspeita ao Serviço de Sanidade Agropecuária - SEDESA da Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - SFA competente pela Unidade Federativa de origem da suspeita, por intermédio do Formulário de Investigação de Doença Inicial (Form-In), que deverá encaminhar o mesmo ao DSA;

d. Educação sanitária visando sensibilizar o proprietário ou detentor a notificar as competentes instâncias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária quando da eventual ocorrência de novas suspeitas de Scrapie;

Parágrafo único. No caso de não haver condições técnicas de colheita em animal suspeito morto as ações devem restringir-se aos itens c e d desse artigo, com o preenchimento do Form-Com encerrando o caso como síndrome neurológica não confirmada, apontando a suspeita de scrapie, e justificando as razões para ausência de diagnóstico.

Art 8º Os animais suspeitos submetidos ao teste de terceira pálpebra deverão permanecer em observação, e em isolamento, no caso de fêmeas, até a conclusão dos resultados laboratoriais.

Art. 9º No caso de resultados laboratoriais negativos em testes realizados apenas em terceira pálpebra, os animais enfermos deverão ser mantidos em isolamento e observação por mais 15 (quinze) dias. Ao fim desse período, não havendo regressão dos sinais clínicos, o animal deverá ser avaliado pela Comissão de

Avaliação e sacrificado para colheita de tecido nervoso, como descrito no Anexo II.

§ 1º A Comissão de Avaliação será designada pela SFA competente para avaliar os animais sujeitos à

indenização, sendo composta por um representante, e seu respectivo suplente, das seguintes entidades:

instância intermediária ou local do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária; SFA, como

unidade descentralizada da instância superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária;

e associações representativas de criadores da espécie animal envolvida ou de produtores rurais.

§ 2º Em caso de regressão dos sintomas os estabelecimentos deverão ser imediatamente desinterditados,

sendo a suspeita encerrada por intermédio de Formulário de Investigação de Doenças Complementar

(Form-Com), a ser remetido ao SEDESA.

Art. 10. No caso de resultados laboratoriais negativos realizados em amostras de tecido nervoso, os

estabelecimentos deverão ser imediatamente desinterditados, sendo a suspeita encerrada por intermédio

de Form-Com, a ser remetido ao SEDESA.

Art.11. Caberá ao proprietário ou detentor, a aplicação de identificação individual nos animais citados nos

arts. 8º e 9º desse Anexo, sendo vedada qualquer movimentação desses animais do estabelecimento onde

se encontram.

Parágrafo único. O detentor ou proprietário dos animais citados no caput desse artigo deverá assinar um

termo de depositário, conforme o Anexo IV dessa Instrução, e comunicar imediatamente qualquer evento

que envolva esses animais à competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade

Agropecuária.

Art. 12. Os animais suspeitos mortos ou sacrificados deverão ser destruídos sob

supervisão da competente

instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

CAPÍTULO III

DA ATUAÇÃO QUANDO DA CONFIRMAÇÃO LABORATORIAL DE CASOS DE SCRAPIE

Art. 13. Diante da confirmação de um caso de Scrapie as seguintes medidas deverão ser adotadas pelas

instâncias intermediárias ou locais do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária:

I - aplicação do Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III dessa Instrução;

II - no caso dos animais positivos estarem vivos, estes devem ser submetidos ao processo de destruição ou

de sacrifício sanitário; a destruição é a eliminação dos animais, sem aproveitamento de produtos e

subprodutos, com posterior incineração, queima e enterrio, ou enterrio das carcaças no próprio

estabelecimento de criação ou outro indicado pela competente instância do Sistema Unificado de Atenção

à Sanidade Agropecuária, e executado sob supervisão desse mesmo Sistema; o sacrifício sanitário é o

abate de animais, sem aproveitamento da carcaça e dos produtos, realizado em um estabelecimento de

abate, sob supervisão da competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade

Agropecuária;

III - identificação individual e isolamento dos animais de alto risco, que são: a avó, a mãe, as irmãs

maternas e as fêmeas descendentes de uma fêmea com resultado laboratorial positivo para Scrapie; a avó,

a mãe e as irmãs maternas de um macho com resultado laboratorial positivo para Scrapie;

IV - avaliação dos animais de alto risco pela Comissão de Avaliação;

V - sacrifício sanitário, colheita de amostras conforme o Anexo II dessa Instrução, e

posterior destruição

dos animais de alto risco;

VI - identificação dos animais expostos, por meio de um dispositivo previamente aprovado pela

competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

São considerados

animais expostos todos aqueles que possam ter entrado em contato com as secreções do parto no

nascimento, parição ou aborto de animal positivo para Scrapie, de acordo com o manejo reprodutivo da

propriedade;

VII - colheita de amostra de terceira pálpebra dos animais expostos com mais de 12 meses de idade;

VIII - avaliação e sacrifício dos animais expostos com menos de 12 meses de idade.

§ 1º A pedido do proprietário ou detentor, e à critério da competente instância do Sistema Unificado de

Atenção à Sanidade Agropecuária, os animais expostos com menos de 12 meses de idade poderão ser

mantidos no estabelecimento em que se encontram até que essa idade seja alcançada, quando deverão ser

submetidos ao procedimento estabelecido no item VII. O proprietário ou detentor deverá assinar um

termo de depositário, conforme o Anexo IV dessa Instrução, e promover a aplicação de identificação

individual permanente, sendo vedada qualquer movimentação desses animais sem autorização da

competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, que deverá ser

imediatamente comunicada de qualquer evento que ocorra com esses animais.

§ 2º Os animais expostos que resultarem positivos ao exame de terceira pálpebra serão submetidos aos

procedimentos descritos no inciso II desse artigo.

§ 3º Os animais expostos que resultarem negativos ao exame de terceira pálpebra deverão ser alvo de

vigilância rotineira da competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Art. 14. As propriedades expostas devem ser interditadas e os animais de alto risco ou expostos que lá se encontrem devem ser submetidos aos procedimentos estabelecidos nos itens III à VIII do art. 13 desta Instrução.

§ 1º Propriedades expostas são aquelas que possuam animais de alto risco ou expostos, e que, em caso de

confirmação laboratorial de Scrapie, passa a ser considerada Propriedade Foco;

§ 2º Propriedade Foco é toda propriedade onde foi constatado pelo menos um caso positivo de Scrapie aos exames laboratoriais;

§ 3º As propriedades expostas nas quais não seja possível a identificação dos animais de alto risco ou expostos devem ser submetidas ao Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução, à educação sanitária visando sensibilizar proprietário ou detentor a comunicar à competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária quando da eventual ocorrência de novas suspeitas de Scrapie.

Art. 15. Durante a interdição do estabelecimento somente será permitido o trânsito de egresso de animais destinados ao abate sanitário, desde que esses animais não estejam envolvidos na investigação epidemiológica como positivos, de alto risco ou expostos.

Parágrafo único. Considera-se abate sanitário o abate de animais devido à ação de controle da Scrapie, em estabelecimento inspecionado e devidamente registrado no órgão competente municipal, estadual ou federal, com aproveitamento de carcaça e com remoção e destruição dos materiais de risco específico (cérebro, medula espinhal, olhos, tonsila, baço e intestino desde o duodeno até o

reto)

Art. 16. Após a conclusão das ações estabelecidas no capítulo III desse Anexo, o estabelecimento poderá ser desinterditado, à critério da competente instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Parágrafo Único. As ações descritas no art. 13 desse Anexo são necessárias para o controle da enfermidade e não são suficientes para que o estabelecimento seja considerado oficialmente livre de Scrapie. Para tanto, o estabelecimento deverá ser habilitado em um Programa de Certificação de Propriedades Livres ou Monitoradas para a Scrapie, a ser regulamentado pelo MAPA, como Instância Central e Superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

CAPÍTULO IV

DOS LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DE SCRAPIE

Do Credenciamento de Laboratórios para o Diagnóstico de Scrapie

Art. 17. O MAPA, como Instância Central e Superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, designará os laboratórios para o diagnóstico de Scrapie, cabendo-lhe determinar quais os testes de diagnóstico que serão realizados nesses laboratórios e quais os requisitos necessários para obter o credenciamento, conforme disposto em normas complementares.

Parágrafo Único. Os laboratórios citados no caput deste artigo serão aqueles pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, tanto os oficiais como os públicos e privados, credenciados pelo MAPA para o diagnóstico da Scrapie.

Art. 18. O diagnóstico confirmatório para Scrapie será realizado somente em um dos laboratórios enquadrados no parágrafo único do artigo anterior desta Instrução Normativa, e se

dará pelo resultado

positivo à técnica da IHQ em tecidos linfóides ou tecidos nervosos, ou outras técnicas que venham a ser determinadas pelo MAPA.

CAPÍTULO V

DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 19. A qualquer momento, poderá ser convocado o Comitê Científico Consultivo das EET, para fornecer subsídios técnico-científico ao DSA.

ANEXO II

PROCEDIMENTOS PARA COLHEITA E ENVIO DE AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO DA SCRAPIE

1. Colheita de amostras no animal morto:

Depois do animal morto, executar a necropsia do cadáver o mais imediatamente possível e em toda sua plenitude. O sistema nervoso central (SNC) deve ser examinado depois da avaliação dos demais sistemas orgânicos e higienização dos instrumentos utilizados na necropsia.

Geralmente as doenças com manifestação neurológica não apresentam alterações macroscópicas. Caso sejam observadas lesões nos diversos órgãos, estas devem ser anotadas no relatório de necropsia, e deve-se realizar a colheita de materiais para outros exames laboratoriais complementares, que devem ser acondicionados e conservados de acordo com a recomendação pertinente ao tipo de exame a ser solicitado.

1.1. Retirada do encéfalo

- Depois de desarticulada a cabeça do animal, retirar a pele, os músculos das regiões frontal e occipitais, e os chifres, se for o caso.
- Traçar uma linha imaginária iniciando imediatamente acima das apófises supra-orbitárias do osso

frontal, terminando superiormente no côndilo do occipital.

- Seccionar profundamente os ossos temporal e occipital, até desaparecimento da resistência ao corte,

atingindo o forame Mágno.

Repetir a operação no lado oposto.

- Seccionar o osso frontal até o desaparecimento da resistência ao corte unindo as extremidades rostrais dos dois cortes anteriores.

- Rebater a calota craniana.

- Expor o encéfalo ainda envolvido pela dura-máter.

- Pinçar, cortar e rebater a dura-máter.

- Seccionar a foice do cérebro e o tentório do cerebelo.

- Conferir se o encéfalo está totalmente liberado da duramater

- Introduzir o dedo médio e o indicador frontalmente ao bulbo olfatório e tracionar com cuidado os dois

hemisférios telencefálicos em direção caudal.

- Cortar o quiasma óptico.

- Liberar o encéfalo cortando ou rompendo por tração as raízes dos demais nervos cranianos.

- Retirar o encéfalo, o mais inteiro possível.

1.2. Retirada da medula espinhal

- Depois de retirado o arco costal, cortar a coluna vertebral lateralmente até atingir o canal medular.

- Expor a medula espinhal.

- Cortá-la em uma das extremidades expostas e pinçá-la fortemente tracionando-a para fora do canal

medular.

- Seccionar as raízes dos nervos medulares - Retirar o segmento medular exposto.

1.3. Separação dos segmentos encefálicos

- Dispor o cérebro em posição dorsal.

- Efetuar um corte oblíquo profundo, em ambos os lados, na extremidade cranial do tronco encefálico, até

atingir o ventrículo lateral.

- Retirar o tronco encefálico juntamente com o cerebelo.

- Separar o cerebelo do tronco encefálico cortando os pedúnculos cerebelares, de

ambos os lados.

Depois desses procedimentos, o encéfalo estará dividido em dois hemisférios telencefálicos, tronco

encefálico incluindo parte da medula cervical e cerebelo.

1.4. Amostras do córtex telencefálico

No caso de ovinos ou caprinos o encéfalo é pequeno, deve-se tomar os dois córtex telencefálicos e realizar,

utilizando faca bem afiada, 3 (três) cortes paralelos, completos e perpendiculares à superfície cortical,

dividindo ambas as estruturas em 4 (quatro) fragmentos. Durante estes cortes, prestar atenção à simetria

morfológica das superfícies de corte dos fragmentos, comparando um lado com o outro. A simetria das

estruturas encefálicas é um parâmetro de grande importância na avaliação anátomo-patológica do

encéfalo, pois, em muitas doenças que comprometem o SNC, as lesões são unilaterais, causando alguma

alteração que pode ser percebida ao exame macroscópico.

a) Destinar o 2º e o 4º fragmentos ao diagnóstico de raiva

b) Reservar o 1º e o 3º fragmentos para histopatologia e imunoistoquímica (IHQ) para Scrapie.

1.5. Amostras do cerebelo Tomar o cerebelo, localizar o Vérnis cerebelar correspondente a uma porção

ímpar, mediana. Realizar dois cortes paralelos, separando este segmento anatômico das duas grandes

massas laterais denominadas hemisférios cerebelares.

a) Destinar os dois hemisférios cerebelares ao diagnóstico da raiva

b) Reservar o Vermis cerebelar para histopatologia e imunoistoquímica para Scrapie.

1.6. Amostras do tronco encefálico Para se obter amostras deste segmento, realiza-se dois cortes oblíquos

na porção cranial e um corte transversal na porção caudal do tronco encefálico.

a) Destinar os dois fragmentos craniais, correspondentes ao tálamo e ao fragmento caudal, correspondente

à medula espinhal cervical, ao diagnóstico de raiva.

b) Reservar o restante do tronco encefálico inteiro para histopatologia e imunoistoquímica para Scrapie.

1.7. Amostras de medula espinhal torácica e lombar A colheita desses segmentos medulares se torna

obrigatória quando o animal com sintomatologia nervosa A colheita de medula espinhal é imprescindível

para diagnóstico diferencial de outras encefalopatias.

Para se obter as amostras de medula espinhal, tomar o segmento tóraco-lombar retirado e realizar dois

cortes transversais na extremidade torácica e dois na lombar. Os cortes devem ser de forma a obter quatro

cilindros de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm de comprimento

a) Destinar os dois cilindros extremos ao diagnóstico da raiva

b) Reservar os outros dois adjacentes para histopatologia e imunoistoquímica para Scrapie.

c) Descartar o restante.

1.8. Acondicionamento de amostras para diagnóstico de raiva O material colhido para exame de raiva

constitui-se de:

- 1º e o 3º fragmentos de ambos os córtex telencefálicos;
- Os dois hemisférios cerebelares;
- Os dois fragmentos craniais do tronco encefálico, correspondentes ao tálamo;
- O fragmento caudal do tronco encefálico, correspondente à medula espinhal cervical;
- Os dois cilindros de medula espinhal torácica e lombar.

As amostras acima relacionadas deverão ser acondicionadas em frasco plástico rígido com tampa ou saco

plástico duplo, hermeticamente fechado, identificadas e colocadas em uma caixa isotérmica, que deverá

conter gelo reciclável para manter a temperatura entre 2º C a 4º C.

1.9. Amostras para diagnóstico imunoistoquímico do SNC para Scrapie

O material nervoso destinado à histopatologia e imunoistoquímica (IHQ) deve conter:

- O 2º e 4º fragmentos de ambos os córtex telencefálicos;
- O Vermis do cerebelo.

- O tronco encefálico INTEIRO.
- Os dois cilindros de medula espinhal torácica e lombar.

A estas devem ser incluídas as seguintes amostras destinadas unicamente à IHQ:

- As duas membranas nictitantes (3ª pálpebra) - As duas tonsilas palatinas.
- A metade de cada um dos linfonodos retrofaríngeos
- Metade de cada um dos linfonodos poplíteos
- Dois fragmentos de língua
- Timo
- Baço
- Linfonodos mesentéricos
- Final do íleo (2,5 cm antes da válvula íliocecal)
- Mucosa do reto (no limite mucocutâneo).

Esse material relacionado anteriormente deverá ser acondicionado em frasco de boca larga contendo

formol a 10% obtido com a mistura de 1(uma) parte de formoldeído comercial 37-40% e 9 (nove) partes

de água limpa. A quantidade de formol a 10% deverá ser 5 a 10 vezes o volume de amostras a serem

fixadas. Identificar o frasco com os dados em fita adesiva. Nunca congelar essas amostras, pois o

congelamento as inutilizam para histopatologia.

Os materiais para diagnóstico da raiva e de Scrapie (descritos nos itens 1.8 e 1.9) deverão ser remetidos

ao laboratório credenciado pelo MAPA para o diagnóstico das EET, acompanhados do formulário único

de requisição de exames para síndrome neurológica.

2.Colheita de amostra da terceira pálpebra (membrana nictante) em animal vivo

Para realização de biópsia

da terceira pálpebra de ovinos é necessário de que o animal seja fortemente contido.

Em seguida, 8-10

minutos antes de proceder a biópsia, aplicar colírio anestésico local em um dos olhos, associado a uma

gota de histamina a 1%, o que promove uma forte evidenciação dos folículos linfóides e permite uma

colheita mais completa.

Na seqüência, executar os seguintes procedimentos:

- Com auxílio de um assistente, abrir o olho do animal expondo a terceira pálpebra e, com auxílio de uma pinça cirúrgica dente-de-rato, pinçar a sua borda livre e tracioná-la delicadamente;
- Localizar o tecido linfóide que se apresenta como protuberâncias de coloração rósea ou avermelhada dispostas na superfície bulbar da terceira ;
- Utilizando-se uma tesoura cirúrgica curva (Metzemberaum, 15 cm), colher um fragmento do tecido linfóide;
- Depositar o espécime colhido sobre um retalho de papel de filtro, no interior de cassete plástico. Fechar e identificar o cassete, depositando-o em um frasco plástico rígido de boca larga contendo formol a 10%, neutro e tamponado. (H₂O DD = 900 ml; Formoldeido comercial 37-40% = 100 ml; Fosfato de Na dibásico anidro = 6,5g; Fosfato de Na monobásico 4,0g);
- Encaminhar a amostra ao laboratório credenciado pelo MAPA para o diagnóstico das EET, juntamente com o formulário único de requisição de exames para síndrome neurológica, informando os dados dos animais.

Quando a colheita é realizada em animais com possibilidade de estarem contaminados, devem ser tomadas medidas de biossegurança rigorosas. Recomenda-se a utilização do material uma única vez e depois descartá-lo. Alternativamente, pode-se estabelecer que as pinças e tesouras utilizadas em um animal sejam depositadas em um saco plástico resistente, o qual deverá ser fechado, identificado com o número correspondente ao animal submetido à colheita. Depois do resultado, se houver casos positivos o

material cirúrgico utilizado depois de limpo e desinfetado com Hidróxido de Sódio a 2N por duas horas e bem enxaguado, deve ser autoclavado a 134° C (cento e trinta e quatro graus Celsius), por uma hora. Na ausência de casos positivos o material pode ser esterilizado pelo método convencional.

D.O.U., 15/02/2007 - Seção 1

Anexo B – Instrução Normativa Nº 15, de 2 de abril de 2008

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 2 DE ABRIL DE 2008

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, no Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, na Portaria nº 516, de 9 de dezembro de 1997, e o que consta do Processo nº 21000.014191/2006-61, resolve:

Art. 1º Aprovar os Procedimentos para a Atuação em Caso de Suspeita ou Ocorrência de Paraplexia

Enzoótica dos Ovinos (scrapie), Anexo I, o Termo de Responsabilidade, Anexo II, e o Questionário de

Investigação Epidemiológica, Anexo III.

.Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

REINHOLD STEPHANES

ANEXO I

PROCEDIMENTOS PARA A ATUAÇÃO EM CASO DE SUSPEITA OU OCORRÊNCIA DE

PARAPLEXIA ENZOÓTICA DOS OVINOS (SCRAPIE)

CAPÍTULO I

DOS OBJETIVOS E DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 1º Estabelecer os procedimentos para a atuação em caso de suspeita ou ocorrência de Paraplexia

Enzoótica dos Ovinos (scrapie) nas espécies ovina e caprina.

Art. 2º Considera-se scrapie uma enfermidade neurodegenerativa, transmissível e fatal que acomete

ovinos e caprinos, pertencente ao grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis EET.

Art. 3º A scrapie é de notificação compulsória e sua suspeita ou ocorrência devem ser imediatamente

informadas à autoridade de defesa sanitária animal de quaisquer das instâncias (Central e Superior,

Intermediárias e Locais) do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Art. 4º 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.

Parágrafo único. Considera-se como suspeita clínica fundamentada de scrapie aquela que persiste após

investigação clínica, epidemiológica e diferencial para outras doenças, tais como sarna e outros

ectoparasitos, cenurose, raiva, pseudo-raiva, pneumonia ovina progressiva (maedi-visna), listeriose

encefálica, polioencefalomalacia, toxemia da prenhez, fotossensibilização, hipomagnesemia, intoxicação

por substâncias químicas ou por plantas, entre outras.

Art. 5º São considerados animais com diagnóstico para scrapie os ovinos e caprinos com resultado

positivo à prova de imunoistoquímica (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.

Parágrafo único. As amostras colhidas para o diagnóstico da scrapie deverão ser encaminhadas aos

laboratórios de diagnóstico das EET pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do

Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, acompanhadas do Formulário Único de

Requisição de Exame para Síndrome Neurológica de que trata a Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005.

Art. 6º Todos os proprietários ou detentores de ovinos e caprinos suspeitos, positivos, de alto risco ou

expostos à scrapie são responsáveis por sua guarda, devendo assinar o Termo de Responsabilidade

constante do Anexo II desta Instrução Normativa.

Art. 7º A Comissão de Avaliação dos animais sujeitos à indenização será designada pela Superintendência

Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - SFA da Unidade Federativa, na forma da Lei nº 569, de 21 de dezembro de 1948.

Parágrafo único. Não caberá qualquer indenização por animais sacrificados e que venham a se confirmar,

laboratorialmente, casos de scrapie.

CAPÍTULO II

DA ATUAÇÃO EM CASO DE SUSPEITA CLÍNICA DE SCRAPIE

Art. 8º Diante da suspeita clínica de scrapie, as seguintes medidas deverão ser adotadas pelas Instâncias

Intermediárias ou Locais do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária:

I - visita ao estabelecimento e fundamentação da suspeita, a partir da investigação clínica-epidemiológica

do rebanho;

II - em caso de suspeita clínica fundamentada, deverão ser realizadas as seguintes ações:

a) interdição do estabelecimento, que consiste na proibição do ingresso e egresso

de ovinos e caprinos,
bem como produtos, subprodutos e materiais que venham a constituir via de transmissão ou propagação

da scrapie;

b) aplicação do Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução

Normativa;

c) colheita de amostras de animais suspeitos e notificação à Instância Central e Superior do Sistema

Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária competente pela Unidade Federativa de origem da

suspeita, por meio do formulário de atendimento inicial estipulado pelo Departamento de Saúde Animal -

DSA/SDA/MAPA.

1. no caso de animal suspeito vivo, deve-se proceder à colheita de terceira pálpebra e de outro tecido

linfóide julgado necessário;

2. no caso de animal suspeito morto, ou quando o proprietário optar pelo sacrifício sanitário do animal

enfermo, deve-se proceder à colheita de tecido nervoso, incluindo o tronco encefálico, de tecido linfóide,

incluindo a terceira pálpebra, e de outros tecidos julgados necessários durante a necropsia;

Art. 9º Os animais suspeitos submetidos ao teste em tecido linfóide deverão permanecer em observação, e

em isolamento no caso de fêmeas, até a conclusão dos resultados laboratoriais.

Art. 10 No caso de resultados laboratoriais negativos em testes realizados apenas em tecido linfóide, os

animais suspeitos deverão ser mantidos em observação, e em isolamento no caso de fêmeas, por mais 15

(quinze) dias.

§ 1º Ao fim do período citado no caput deste artigo, não havendo regressão dos sinais clínicos, os animais

suspeitos deverão ser avaliados pela Comissão de Avaliação e submetidos ao

sacrifício sanitário para
colheita de amostras de tecido nervoso.

§ 2º Em caso de regressão dos sintomas ao fim do período citado no caput deste artigo, o estabelecimento deverá ser imediatamente desinterditado, sendo a suspeita encerrada por meio do formulário de atendimento complementar, estipulado pelo Departamento de Saúde Animal - DSA/SDA/MAPA.

Art. 11 No caso de resultados laboratoriais negativos em testes realizados em amostras de tecido nervoso, o estabelecimento deverá ser imediatamente desinterditado, sendo a suspeita encerrada por meio do formulário de atendimento complementar.

Art.12 No caso de não haver condições técnicas de colheita de amostras em animal suspeito morto, registros adequados e auditáveis sobre o atendimento deverão ser mantidos pela competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e, a critério desta, o estabelecimento poderá ser desinterditado e ser alvo de vigilância rotineira.

Art. 13 Caberá ao proprietário ou detentor a aplicação de identificação individual nos animais citados nos arts. 9º e 10 deste Anexo.

Parágrafo único. O dispositivo para a identificação individual citada no caput deste artigo será proposto pela Instância Intermediária do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e aprovado pela competente SFA.

Art. 14 Os animais suspeitos mortos ou submetidos ao sacrifício sanitário deverão ser destruídos sob a supervisão da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

CAPÍTULO III

DA ATUAÇÃO EM CASO DE OCORRÊNCIA DE SCRAPIE

Art. 15 Diante de resultados laboratoriais positivos para scrapie, o estabelecimento será considerado como

Propriedade Foco e as seguintes medidas deverão ser adotadas pelas Instâncias Intermediárias ou Locais

do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária:

I - interdição do estabelecimento;

II - aplicação do Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução

Normativa;

III - notificação à Instância Central e Superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária

competente pela Unidade Federativa de origem da ocorrência;

IV - no caso dos animais positivos estarem vivos, estes devem ser submetidos ao processo de sacrifício

sanitário:

a) o sacrifício sanitário consiste na eliminação dos animais seguida da destruição das carcaças por

incineração, enterramento ou qualquer outro procedimento aprovado pelo MAPA, realizado sob

supervisão da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária no

próprio estabelecimento de criação ou em outro estabelecimento por ela indicado;

V - identificação individual e isolamento dos animais de alto risco, que são: a avó, a mãe, as irmãs

maternas e as fêmeas descendentes de uma fêmea com resultado laboratorial positivo para scrapie; a avó,

a mãe e as irmãs maternas de um macho com resultado laboratorial positivo para scrapie; e outros

animais, a critério da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária;

VI - avaliação pela Comissão de Avaliação, sacrifício sanitário e colheita de amostras dos animais de alto risco;

VII - identificação individual e isolamento, a critério da competente Instância do

Sistema Unificado de

Atenção à Sanidade Agropecuária, dos animais expostos, que são todos aqueles que possam ter entrado

em contato com os materiais expelidos pelo parto quando do nascimento, na parição ou no aborto de

animal positivo para scrapie, de acordo com o manejo reprodutivo da propriedade;

VIII - colheita de amostra de tecido linfóide dos animais expostos com mais de 12 (doze) meses de idade;

IX - avaliação pela Comissão de Avaliação e sacrifício sanitário dos animais expostos com menos de 12

(doze) meses de idade.

§ 1º A pedido do proprietário ou detentor e a critério da competente Instância do Sistema Unificado de

Atenção à Sanidade Agropecuária, os animais expostos com menos de 12 (doze) meses de idade poderão

ser mantidos no estabelecimento em que se encontram até que essa idade seja alcançada, quando deverão

ser submetidos ao procedimento estabelecido no inciso VIII deste artigo.

§ 2º Os animais expostos que resultarem positivos ao exame de tecido linfóide serão submetidos aos

procedimentos descritos no inciso IV deste artigo.

§ 3º Os animais expostos que resultarem negativos ao exame de tecido linfóide deverão ser alvo de

vigilância pela competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

§ 4º Caberá ao proprietário ou detentor a aplicação de identificação individual nos animais citados nos

incisos V e VII deste artigo, mediante dispositivo de identificação proposto pela Instância Intermediária

do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e aprovado pela competente SFA.

Art. 16 Durante a interdição do estabelecimento somente será permitido o trânsito de egresso de animais

destinados ao abate sanitário, desde que esses animais não estejam envolvidos na

investigação

epidemiológica como positivos, de alto risco ou expostos.

Parágrafo único. O abate sanitário citado no caput deste artigo será realizado em estabelecimento

inspecionado e devidamente registrado no órgão competente municipal, estadual ou federal, com

aproveitamento de carcaça e com remoção e destruição dos materiais de risco específico (cérebro, medula

espinhal, olhos, tonsilas, baço e intestino desde o duodeno até o reto).

Art. 17 Após a conclusão das ações estabelecidas no art. 15 deste Anexo e a critério da competente

Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, o estabelecimento poderá ser

desinterditado e o foco encerrado por meio do formulário de atendimento complementar.

CAPÍTULO IV

DAS PROPRIEDADES EXPOSTAS

Art. 18 Propriedades expostas são aquelas que possuem animais de alto risco ou expostos, e que, em caso

de confirmação laboratorial de scrapie, passam a ser consideradas Propriedades Foco.

§ 1º As propriedades expostas devem ser interditadas e submetidas ao Questionário de Investigação

Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução Normativa.

§ 2º Os animais de alto risco ou expostos que se encontram nas propriedades expostas deverão ser

submetidos aos procedimentos estabelecidos nos incisos V a IX do art. 15 deste Anexo.

ANEXO II

TERMO DE RESPONSABILIDADE

Declaro que possuo sob minha responsabilidade ovinos ou caprinos considerados suspeitos, positivos, de

alto risco ou expostos à paraplexia enzoótica dos ovinos - scrapie e, visando evitar a difusão da doença no

País, comprometo-me a não comercializar ou transferir da propriedade os animais em questão, bem como
informar à competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, qualquer
alteração na situação dos mesmos, tais como:

- Doença;
- Morte;
- Fuga;
- Roubo ou furto.

Declaro, ainda, que tenho ciência de que o descumprimento parcial ou integral do presente termo,

acarretará sanções conforme legislação vigente.

Proprietário: _____ CPF/CGC: _____ Propriedade: _____

Telefone (____) _____ Município: _____

Estado: _____ Número total de animais: _____
(_____).

Identificação dos animais:

Espécie Identificação

individual (*)

Nome Sexo Data de nascimento Raça

(*) Aprovado pela competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade

D.O.U., 04/04/2008 - Seção 1