

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE *prnp* EM RAÇAS BOVINAS NO  
BRASIL**

**Cristiane Camargo Sanches**

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

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE *prnp* EM RAÇAS BOVINAS NO  
BRASIL**

**POLYMORPHISMS OF PRNP GENE IN CATTLE BREEDS IN BRAZIL**

**Cristiane Camargo Sanches**

**Orientador: Cleber Oliveira Soares**

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

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

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

**2014**

**Dedico este trabalho aos meus pais João Batista Lopes Sanches e Sandra Regina Camargo Sanches, pela dádiva da vida, por sempre estarem ao meu lado e serem meus exemplos de força, coragem e superação. A eles todo o meu amor, respeito e eterna gratidão.**

**O importante é isso: estar pronto para, a qualquer momento, sacrificar o que somos pelo que poderíamos vir a ser.**

**Charles Du Bois**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus Pai, por ter me dado o dom da vida e por possibilitar a minha evolução tanto em minha vida particular quanto profissional, utilizando pessoas especiais, em momentos especiais que contribuíram para o meu crescimento. Aos meus pais Sandra e João, que não me deixaram um minuto sequer sem amparo, foram minha fonte de força e apoio, para que todos os obstáculos fossem vencidos e meus objetivos alcançados. Agradeço e sou grata à minha irmã Simone Sanches que me presenteia todos os dias com seu amor fraterno e verdadeiro e por dividir comigo, momentos e sentimentos que somente nós duas sentimos, me orgulho de ser sua irmã. À minha mana do coração, Nádia Lopes, por sua fidelidade, amor, prontidão e companheirismo, por meio de sua contribuição e apoio me senti fortalecida para realização deste trabalho. Agradeço a amizade e cumplicidade do meu grande amigo Cleber Galvão que juntamente com toda sua família sempre me acolheram como parte da família e sempre me apoiaram em todos os momentos desta jornada. Agradeço meus orientadores, Grácia Maria Soares Rosinha e Cleber Oliveira Soares, pela oportunidade de realizar este trabalho na Embrapa Gado de Corte, oferecerem suporte e principalmente por terem confiado em minha capacidade de desenvolver este projeto. Agradeço os colegas de laboratório pelo companheirismo e as agências de fomento CAPES, CNPq, FUNDECT e Finep, sem este trabalho jamais seria realizado. A todos meu muito obrigada!

## RESUMO

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, são enfermidades causadas pela proteína priônica alterada (PrP<sup>Sc</sup>), caracterizadas por desenvolvimento neurodegenerativo progressivo fatal e que podem acometer diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem. A principal representante nos animais é a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB). A partir de 2003, a encefalopatia espongiforme dos bovinos passou a ser subdividida em dois grupos, a EEB clássica e a EEB atípica. Juntamente com os casos da doença ocorridos em bovinos, houve um aumento nos casos da doença de Creutzfeldt–Jakob (DCJ), o que torna a doença uma preocupação, sobre a possibilidade do rompimento da barreira interespecífica da proteína infecciosa e a mesma atingir humanos e que pode vir a comprometer a segurança alimentar, além da preocupação com prejuízos econômicos causados na cadeia produtiva da carne, derivados e o estabelecimento de barreiras sanitárias. Trabalhos investigam o gene *prnp* em que alterações na codificação deste gene podem alterar aminoácidos que compõem a proteína, conferindo a ela dificuldade de metabolização e conseqüente acúmulo no tecido nervoso. Desta forma, por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de Sanger, este trabalho objetivou analisar a variabilidade de nucleotídeos do gene *prnp*, inserções e/ou deleções (indels) de 12 pb do íntron 1 e/ou de 23 pb na região promotora e a alteração de nucleotídeos únicos que pode ocorrer no códon 211 do gene *prnp* em bovinos das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchim e Simental no Brasil, para identificar os perfis genotípicos, sendo que estes podem estar associados à resistência e/ou suscetibilidade à EEB clássica e atípica. Neste estudo, quanto aos polimorfismos associados a EEB clássica, a maioria das raças, com exceção da raça Angus, apresentaram maiores frequências do alelo de deleção tanto para 12pb como 23pb, em comparação aos seus respectivos alelos de inserção, para as duas regiões. Quanto a polimorfismos possivelmente associados à EEB atípica, foi possível observar a ausência do polimorfismo do códon 211 em todos os animais estudados, ressaltando o caráter raro deste polimorfismo. Outras investigações envolvendo bovinos brasileiros de raças que compõem o plantel no país se fazem necessárias, para conhecer o comportamento da enfermidade no Brasil.

**Palavras-chave:** Encefalopatia Espongiforme Bovina; Príon; *prnp*; Polimorfismos

## ABSTRACT

The Transmissible Spongiform Encephalopathies are diseases caused by abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>), characterized by progressive fatal neurodegenerative and development that may affect different species of mammals, including man. The main representative in animals is Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). Since 2003, BSE became divided into two groups, classical and atypical. Along with cases of the disease occurring in cattle, an increase in cases of Creutzfeldt-Jakob disease, which makes the disease a concern about possible disruption of interspecific barrier infectious protein and food security, beyond the concern with economic losses caused in production chain of meat products and the generation of sanitary barrier. Work investigating the structure of PRNP in which changes in the coding of this gene can alter amino acids that make up protein, causing difficulty metabolization impairment accumulation in nervous tissue. Thus, by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sanger sequencing, this work aimed to analyze the variability of the PRNP gene nucleotide insertions and / or deletions (indels) of 12 bp of intron 1 and/or 23 bp in the promoter region and a single nucleotide change that can occur in codon 211 of the PRNP gene in cattle from Nelore, Caracu, Angus, Simmental and Canchim in Brazil breeds to identify genotypic profiles that may be associated with resistance and / or susceptibility to classical and atypical BSE. Regarding, as the polymorphisms associated with classical BSE our results show that breeds except Angus, had higher frequencies of allele deletion at both 23pb and 12pb as compared to their respective insertion alleles for the two regions. Also, it was possible to observe the absence of polymorphism at codon 211 in all animals studied, highlighting the rare nature of this polymorphism possibly associated with atypical BSE. Further investigation involving Brazilian cattle breeds who make up the squad in the country is mandataray necessary to understand the behavior of the disease in Brazil.

**Keywords:** Bovine Spongiform Encephalopathy; prion; PRNP; polymorphisms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura e regiões importantes do gene <i>prnp</i> correlacionadas à expressão do gene e desenvolvimento das EEBs atípica ou clássica.....	29
<b>Figura 2.</b> Localização do gene <i>prnp</i> dentro do cromossomo.....	31
<b>Figura 3.</b> Estrutura genética do gene <i>prnp</i> em bovinos.....	32
<b>Figura 4.</b> Esquema representando as variações genéticas do gene <i>prnp</i> .....	33
<b>Figura 5.</b> Estrutural dos membros da família das proteínas priônicas.....	34
<b>Figura 6.</b> Topologia, estrutura primária da PrP <sup>C</sup> e adesão à membrana plasmática, em camundongos.....	35
<b>Figura 7.</b> Estrutura tridimensional completa da bPrP (23-230).....	36
<b>Figura 8.</b> Apresentação de função <i>spline</i> entre as posições do C <sup>α</sup> .....	37
<b>Figura 9.</b> Expressão de PrP <sup>C</sup> em tecidos neurais bovino.....	40
<b>Figura 10.</b> PrP <sup>C</sup> como componente dos desmossomos nas células epiteliais do intestino.....	42
<b>Figura 11.</b> Comparação entre a PrP <sup>C</sup> e PrP <sup>Sc</sup> .....	45
<b>Figura 12.</b> Inter-relações que já são conhecidas e inter-relações especuláveis em relação à transmissão das encefalopatias espongiformes transmissíveis entre animais e/ou humanos.....	47
<b>Figura 13.</b> Quadros para comparação entre as principais características da EEB Clássica e EEB Atípica.....	48
<b>Figura 14.</b> Distribuição geográfica de países que registraram casos confirmados de EEB desde 1989.....	51
<b>Figura 15.</b> Distribuição geográfica de países referente às possibilidades de ocorrência e controle de novos casos de EEB.....	52

<b>Figura 16.</b> Possíveis formas de passagem por meio do epitélio intestinal e posterior invasão do sistema nervoso.....	54
<b>Figura 17.</b> Processo de degeneração neuronal com acúmulo de PrP <sup>Sc</sup> .....	57
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografias de uma seção do bulbo de um animal com a EEB.....	58
<b>Figura 19.</b> Diagrama da iqPCR.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.....	26
<b>Tabela 2.</b> Localizações e Funções da proteína priônica em conjunto com diferentes moléculas.....	44
<b>Tabela 3.</b> Países de acordo com o risco/possibilidade de identificar animais com a doença.....	52

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AHVL - *Health and Veterinary Laboratories Agency*

APP-BP1 - *Amyloid precursor protein binding protein*

BSE – *Bovine spongiform encephalopathy*

bPrP – Proteína Priônica recombinante dos bovinos

EEB – Encefalopatia Espongiforme Bovina

EUA – Estados Unidos da América

cDNA - DNA complementar

CHO – Sítios de glicosilação

Cu – Cobre

CWD - Doença Debilitante Crônica

DCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob

DCs - Células Dendríticas Mielóides

DEC - Doença do Emagrecimento Crônico

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DP – Proteína Desmossomal Desmoplaquina

eDCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica

EEB - Encefalopatia Espongiforme Bovina

EEF - Encefalopatia Espongiforme Felina

EETs - Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção enzimática

ETM - Encefalopatia Transmissível da Marta

EUG - Encefalopatia dos Ungulados Exóticos

FAE - Epitélio Associado a Folículos

fCDJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar

FCO - Farinha de Carne e Ossos

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial

GDFN - Fator Neurotrófico Derivado de Célula Glial

GL - Camada Granulosa do Cerebelo

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

GSS - Síndrome de Gerstmann–Straüssler–Sheinker

HDAC - Histona-deacetilase

hPrP – Proteína Priônica recombinante de seres humanos

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEF - Insônia Esporádica Fatal

IFF - Insônia Familiar Fatal

iDCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob iatrogênica

iqPCR - Reação em Cadeia de Imuno-polimerase

Kb – Quilobase

Ker - Queratina

Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ML - Camada Molecular do Cérebro

MP – Membrana Plasmática

mPrP – Proteína Priônica recombinante de camundongo

NEDD8 - Precursor de Células Neurais

NK - Células Natural Killer

NMDA - Receptor N-metil-D-aspartato

NMR - Ressonância Nuclear Magnética

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

ORF – Janela de Leitura Aberta

Pb – Pares de Base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Pg - Proteína placoglobina/ $\gamma$ -catenina

PKP - Proteína placofilina-2

PM - Camada Molecular do Cerebelo

PMCA – Amplificação cíclica de proteína

PrP<sup>C</sup> - Proteína Priônica Celular

PrP<sup>res</sup> - Proteína Priônica Resistente

PrP<sup>Sc</sup> - Proteína Priônica alterada

RE - Retículo endoplasmático

RMN – Ressonância Nuclear Magnética

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR – Reação em cadeia da Polimerase da transcriptase reversa

SAF – *Scrapie* associado à fibrilas

SNP – Polimorfismo de único Nucleotídeo

SNC – Sistema Nervoso Central

shPrP – Proteína Priônica recombinante de hamster Sírio

TLRs – Receptores *toll-like*

UPS - sistema ubiquitina-proteassomo

UK – Reino Unido

UV – Ultravioleta

vDCJ – Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob

VLA – Agência de Laboratório Veterinário

Zn - Zinco

WM - Massa Branca do Cérebro

nm - Nanômetros

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2.0 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1.    Objetivos Gerais.....	21
2.2.    Objetivos específicos.....	21
<b>3.0 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
3.1.Histórico da Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.....	21
3.2.Encefalopatia Espongiforme Bovina.....	26
3.2.1.Estrutura e regulação da expressão do gene <i>prnp</i> .....	29
3.2.1.1 A proteína priônica normal.....	33
3.2.1.2 Localização e Função da PrP <sup>Sc</sup> .....	38
3.2.1.3A proteína priônica anormal e cofatores.....	44
3.2.2.Encefalopatia Espongiforme Bovina clássica e atípica.....	47
<b>4.0 INCIDÊNCIA DE CASOS DE EEB</b> .....	50
<b>5.0 PATOGENIA E IMUNOLOGIA DA EEB</b> .....	53
<b>6.0 DIAGNÓSTICO, ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
<b>Artigo 1.</b> Polimorfismos no gene da proteína priônica em raças bovinas no Brasil.....	74
<b>Abstract</b> .....	74
<b>Resumo</b> .....	74
<b>Introdução</b> .....	75
<b>Materiais e Métodos</b> .....	74
<b>Resultados</b> .....	77
<b>Discussão</b> .....	81
<b>Referências</b> .....	83
<b>Artigo 2.</b> Análise de Polimorfismos no gene <i>prnp</i> , códon 211, em raças bovinas no Brasil.....	86

<b>Resumo.....</b>	<b>86</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>87</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>89</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>91</b>
<b>Referências.....</b>	<b>94</b>

## INTRODUÇÃO

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs), são enfermidades causadas pela proteína priônica alterada, também conhecida como proteína *Scrapie* (Sc) ou PrP<sup>Sc</sup>, estas enfermidades são caracterizadas principalmente por desenvolvimento neurodegenerativo progressivo fatal e que podem acometer diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem. As principais representantes nos animais são a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) também conhecida popularmente como doença da vaca louca, *scrapie* dos ovinos, Doença crônica de veados e alces e a encefalopatia espongiforme das martas. No homem, as mais importantes são a Kuru, Insônia Fatal Familiar, Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e a Doença de Creutzfeldt-Jakob que possui formas esporádica, iatrogênica e variante (JOHNSON, 2005).

Em 1982 Stanley Prusiner atribuiu a causa destas doenças à uma partícula proteica denominada prion, com características particulares, entre elas a capacidade de se auto replicar, ser desprovida de ácidos nucleicos, ser resistente à ribonucleases e desoxirribonucleases, à irradiação UV de 254 nm, à hidrólise catalisada por Zn<sup>2+</sup> e principalmente resistência à clivagem pela proteinase K, fatores estes que dificultam a metabolização da proteína e que podem gerar seu acúmulo no tecido nervoso e consequente toxicidade ao organismo (PRUSINER, 1982). Mais tarde, o gene responsável pela codificação desta partícula foi descrito, *prnp*, localizado no cromossomo 20 em humanos e cromossomo 13 em bovinos. A partir desta descrição uma infinidade de investigações foram geradas com o objetivo de conhecer o caráter infeccioso e possíveis mecanismos de transmissão genética destas enfermidades (MCKINLEY; PRUSINER, 1984; WESTAWAY et al., 1994; BOLTON et al. 1984; CZARNIK et al., 2007).

A partir de 2003, a encefalopatia espongiforme dos bovinos passou a ser subdividida em dois grupos, a EEB Clássica e a EEB Atípica. A doença foi classificada desta maneira, a partir do momento em que no Japão, um bovino da raça Holstein que não foi exposto por via alimentar à proteína priônica alterada, foi diagnosticado como positivo para EEB. O animal apresentou características proteicas de PrP<sup>Sc</sup> diferentes dos quadros de EEB até então relatados e correlacionados com a ingestão de farinha de

carne e ossos (FCO) contaminados com a proteína priônica infecciosa. Assim, a primeira forma de EEB relatada passou a ser denominada de EEB Clássica e a segunda chamada de EEB Atípica (YAMAKAWA et al., 2003).

Desde o primeiro relato da EEB em 1986 até o ano de 2014 aproximadamente, 188 mil casos da EEB Clássica e 67 casos de EEB Atípica foram confirmados e, milhões de bovinos foram abatidos no mundo todo com o objetivo de controlar surtos da doença. Países do Reino Unido, Canadá e EUA, atingidos pela enfermidade, juntamente com a OIE, pesquisadores e autoridades responsáveis estabeleceram planos de controle e erradicação da doença (OIE, 2014).

Com isto, uma gama de pesquisas e estudos envolvendo a proteína estão sendo desenvolvidos com o desafio de compreender pontos cruciais e ainda não totalmente esclarecidos tais como, processos de produção, regulação e conversão da proteína priônica celular em proteína priônica causadora de doenças neurodegenerativas, sua função, mecanismos de infecção, como a proteína pode romper as barreiras interespecies, tratamento, controle e possível erradicação da EEB (VIVIANA et al., 2008).

Por serem potencialmente doenças causadas por uma proteína infecciosa e cujo mecanismo de ação diferenciar de conceitos já estabelecidos de infecção por microrganismos como vírus e bactérias, uma série de aspectos e questionamentos envolvendo estas doenças são importantes pontos de debate, desde a “Hipótese da prion” postulada por Prusiner e que lhe conferiu o prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 1997 (ZAITSEV et al., 2013), até o questionamento realizado por Holmes e colaboradores em 2007 com o experimento que identificou partículas semelhantes à vírus, presentes em células inoculadas com *scrapie* e material proveniente de humanos com a doença de Creutzfeldt–Jakob.

Outro ponto chave no entendimento destas enfermidades e que ainda hoje geram dúvidas são quais os mecanismos de infecção utilizados por uma partícula desprovida de ácidos nucleicos pode se propagar e principalmente, conseguir alterar a forma normalmente sintetizada pelo organismo (PrP<sup>C</sup>), tornando-se infecciosa (SOTO, 2012).

Juntamente com os casos da doença ocorridos em bovinos, inicialmente no Reino Unido no ano de 1986, um aumento nos casos da doença de Creutzfeldt–Jakob também ocorreu nos anos seguintes (SCOTT et al.; 2005; COLLINGE, 2014).

Desde então há uma preocupação sobre possível rompimento da barreira interespecífica da proteína infecciosa e segurança alimentar, já que a administração de farinha de carne e ossos contaminados com PrP<sup>Sc</sup> à bovinos saudáveis foi correlacionado com o desenvolvimento da doença, além da preocupação com prejuízos econômicos causados na cadeia produtiva da carne e derivados e a geração de barreiras sanitárias conferidas a países onde animais positivos foram identificados (SCOTT et al., 2005; COLLINGE, 2014).

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas nas áreas da proteômica e principalmente da genômica, possibilitaram investigações mais adequadas e específicas sobre a proteína priônica. A análise do gene codificante da proteína em diferentes espécies de mamíferos, identificação e análise de diferentes estirpes do agente por meio de espectrometria de massa, ressonância nuclear magnética (NMR) e inoculações experimentais em camundongos, hamsters e primatas, vem auxiliando a compreensão das EETs (GAVIER-WIDÉN et al., 2005; BLOKLAND et al., 2013; LEE et al., 2013;).

Diversos trabalhos que investigam o comportamento do gene *prnp* e de outros genes que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença, são considerados de extrema importância, já que alterações na codificação destes genes podem alterar aminoácidos que compõem a proteína, conferindo a ela dificuldade de metabolização e consequente acúmulo no tecido nervoso, o que se torna extremamente tóxico ao organismo. Existem evidências de resistência genética às encefalopatias esporádicas transmissíveis em mamíferos (STEWART et al., 2012) e quanto à EEB, alguns polimorfismos já foram descritos e associados a genótipos resistentes ou suscetíveis à doença (SANDER et al., 2004; GALVÃO et al., 2012).

O Brasil é atualmente um dos maiores exportadores de carne do mundo. O agronegócio da cadeia produtiva da carne, couro e pele bovina tem crescido anualmente, ao mesmo tempo em que o país se estruturou de forma competitiva. No primeiro trimestre de 2014, foram abatidas aproximadamente 8 milhões de cabeças e cerca de 300 mil toneladas de carcaça “*in natura*” foram exportadas. O crescimento médio de

abates em relação ao primeiro trimestre de 2013 foi de aproximadamente 2,9%, enquanto o crescimento das exportações foi superior a 20% (IBGE, 2014).

De acordo com a Portaria N° 516, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 9 de dezembro de 1997, o Brasil se auto declarou livre da EEB, pois até então não haviam registros dessa doença no país (BRASIL, 1997). Porém, de acordo com a Nota Técnica DAS 159/ 2012 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em 14 de dezembro de 2012, foi confirmada pelo Laboratório de referência mundial da OIE para EET, *Animal Health and Veterinary Laboratories Agency - AHVL* a presença da proteína priônica alterada (tipo H), compatível com a forma atípica da doença, em amostras de um bovino com cerca de 13 anos de idade, proveniente de um sistema de criação extensiva, que veio a óbito com suspeita clínica de raiva (ALESSI, 2012). Em maio de 2014, outro caso da doença do tipo H, foi identificado no Estado de Mato Grosso (OIE, 2014). Atualmente o Brasil é classificado como uma área de “risco insignificante”, ou seja, o nível mais baixo de desenvolvimento da doença que pode ser atribuído a um território (BRASIL, 2013).

Considerando a importância das cadeias produtivas da carne bovina, do couro, do leite e a relevância dos indicadores econômicos e sociais igualmente expressivos que envolvem as possibilidades de expansão dessas cadeias, é que se verifica a necessidade de induzir ações estratégicas como a genotipagem e o monitoramento de encefalopatias espongiformes transmissíveis no Brasil. Estas ações são particularmente importantes quanto à EEB, que se constitui importante barreira sanitária aos países exportadores de carne, além de representar um risco à saúde pública.

Desta forma, análises da possível variabilidade genética do gene *prnp* por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de Sanger em bovinos brasileiros de raças que compõem o plantel no país se fazem necessárias, para conhecimento do comportamento da enfermidade no Brasil, cujas informações geradas poderão futuramente dar suporte ao Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias (PNCRH), além de prospecção de sua importância ao longo dos próximos anos.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivos Gerais

Analisar a variabilidade de nucleotídeos do gene *prnp*, em bovinos das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchim e Simental no Brasil, para identificar os perfis genotípicos que podem estar associados à resistência e/ou suscetibilidade à EEB clássica e atípica de cada animal.

### 1.2. Objetivos específicos

- Analisar a variabilidade de nucleotídeos nas regiões em que podem ocorrer inserções e/ou deleções (indels) de 12 pb do íntron 1 e/ou de 23 pb na região promotora do gene *prnp* de cada animal;
- Analisar a alteração de nucleotídeos únicos que pode ocorrer no códon 211 do gene *prnp*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

Segundo relatos na literatura, a primeira referência feita às Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) ocorreu por volta do ano de 1730, quando foram identificados casos de Tremor Enzoótico dos Ovinos (*scrapie*) em ovelhas Merino, provavelmente importadas da Espanha para países do Reino Unido (MACGOWAN, et al. 1922) e Alemanha (LEOPOLDT; NÜTZLICHE, 1959).

Charles Besnoit e Charles Morel, médicos veterinários em Toulouse na França, identificaram a presença de uma encefalopatia que se propagava para a medula espinhal e nervos periféricos de ovinos, mas considerando serem características comuns a diversas neuropatias, a classificaram como sendo uma neuropatia periférica tóxica (Besnoit e Morel 1898). Mais tarde Besnoit realizou uma série de experimentos de

transmissão do agente em ovinos, porém obteve poucas informações devido ao pequeno período de observação da progressão da doença (BESNOIT, 1899).

Em 1920, o médico patologista alemão Hans Gerhard Creutzfeldt relatou o primeiro caso humano ocorrido em uma paciente de aproximadamente 22 anos que apresentou um quadro de doença neurológica, caracterizado por demência e dificuldades de coordenação motora. Com curso progressivo fatal, a paciente apresentava lesões de encefalopatia difusa e neurodegeneração (CREUTZFELDT, 1920). Segundo Triarhou em 2009, Alfons Jakob também descreve uma síndrome em pacientes que apresentaram sintomas semelhantes. No ano de 1924 é descrito o primeiro caso de transmissão hereditária da doença e Spielmeyer atribuiu a estas enfermidades o nome de Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) (SPIELMEYER, 1922).

Em 1936, outra enfermidade que foi classificada entre as EETs é a Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, relatada pela primeira vez na Áustria em 1936 e que recebeu o nome dos seus descobridores. A descrição original da doença reporta uma síndrome de manifestação lenta, progressiva, caracterizada por declínio cognitivo que foi identificada em diferentes gerações de uma mesma família, o que demonstra uma possível herança autossômica e transmissão vertical da doença herdável (BRAUNMUYH, 1954). Atualmente, a síndrome que provoca lesões espino-cerebelares, acomete uma em cada 100 milhões de pessoas no mundo todo, sendo encontrada em linhagens familiares, o que ressalta o potencial hereditário da enfermidade (ERMIAS, 1999; IMRAN; MAHMOOD, 2011).

Nos anos de 1936 e 1938, Jean Cuillé e Paul-Louis Chelle reconheceram a necessidade de observação por um longo período de estudos envolvendo infecções experimentais com a *scrapie*, assim, um conjunto de informações acerca da transmissibilidade desta doença foram relatadas (BARRAIRON, 1990).

Em 1946, durante a investigação de um surto de *scrapie*, foi identificado um lote de vacinas contendo partículas provenientes de cordeiros nascidos de ovelhas Cheviot e que posteriormente também desenvolveram *scrapie*; a partir daí uma série de pesquisas experimentais durante os próximos 30 anos foram conduzidas na Grã-Bretanha e Islândia. Países como EUA e Canadá também demonstraram preocupação com a doença a partir do seu diagnóstico em animais Suffolk importados da Grã-Bretanha (GORDON,

1946). Atualmente, a *scrapie*, também conhecida como paraplexia enzoótica dos ovinos está difundida em diversos países da Europa. Países como Austrália e Nova Zelândia são considerados livres da doença segundo a OIE (BRASIL, 2014; OIE 2014).

No Brasil, a doença foi introduzida por meio da importação de ovinos Hampshire Down de rebanhos ingleses. O primeiro caso foi identificado em 1978 no Rio Grande do Sul (FERNANDES et al., 1978), seguindo-se de um segundo episódio em 1985, no Paraná (RIBEIRO, 1993). No Mato Grosso do Sul, até 2006 dois casos da doença foram diagnosticados (MARTINS et al., 2012).

Entre os anos de 1950 a 1960, o Dr. Carlton Gajdusek relata surtos de uma doença neurodegenerativa, restrita à indivíduos da tribo Foré Papua, da Nova Guiné, denominada de Kuru. Mais tarde foi descoberto que a causa mais provável do distúrbio tenha sido a prática de ritual de canibalismo praticado entre os membros da tribo (GAJDUSEK; ZIGAS, 1957). GAJDUSEK e colaboradores em 1966 relataram a infecciosidade da DCJ e do Kuru em experimentos de inoculação destas estirpes em chipanzés. Foi possível observar longo tempo de incubação e como até então o agente não tinha sido atribuído à uma partícula proteica com características infecciosas, a infecção desenvolvida por estes animais foi atribuída a um vírus não convencional, de incubação lenta e resistente aos métodos utilizados para inativação, tais como o álcool, formol e radiação ultravioleta.

Daniel Carleton Gajdusek recebeu em 1976 o prêmio Nobel de medicina e fisiologia pela descoberta do "vírus lento" que agora é conhecida como uma proteína responsável por causar doenças priônicas (LYCKE, 1976).

Stanley Prusiner, é responsável por conduzir experimentos envolvendo o agente causador das TSEs (Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis), em 1982 publicou o trabalho "Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie". Neste artigo, Prusiner aponta características peculiares relativas à biologia química do agente causador da *scrapie*, com as quais ele sugere um novo agente infeccioso. Segundo estas características, o agente se assemelha a uma proteína, resistente a procedimentos que modificam os ácidos nucleicos e resistência à inativação pelo calor, com isso ao invés de se utilizar os termos "vírus não convencional" ou "agente viral de ação lenta", o

termo “príon” também chamado de PrP, foi introduzido para classificar as pequenas partículas infecciosas responsáveis por desencadear a *scrapie* (PRUSINER, 1982).

A proteína priônica na época, também foi atribuída à causa de outras EETs. Em outros estudos, materiais provenientes de indivíduos acometidos por DCJ e Kuru foram inoculados em camundongos e macacos. Os animais testados desenvolveram uma enfermidade com tempo de incubação, sintomatologia clínica e lesões similares à doença dos indivíduos do material proveniente (PRUSINER, 1982). Este fato fez com que Prusiner descrevesse a “Hipótese da príon”, que mais tarde, em 1997, lhe conferiu o prêmio Nobel de medicina e fisiologia (ZAITSEV et al., 2013). Logo em seguida, por meio da análise de uma sequência obtida de uma PrP<sup>Sc</sup> contendo cerca de 27-30 kDa, foi possível em 1984, identificar o gene responsável por codificar as proteínas priônicas (BOLTON; MCKINLEY; PRUSINER, 1984).

Lugaresi e colaboradores em 1986 descreveram o caso de um homem com aproximadamente 56 anos que apresentava um quadro de insônia progressiva e disautonomia, seguido de coma e morte após nove meses ao apresentar os sintomas iniciais. A disautonomia é caracterizada por disfunção do sistema nervoso autônomo, até então as causas desta síndrome estavam vinculadas a fatores genéticos e hereditários, doenças virais e autoimunes e principalmente doenças neurodegenerativas como mal de Parkinson. No caso descrito, o paciente possuía histórico familiar da doença, em que uma síndrome similar acometeu três gerações de familiares que evoluiu para morte. Análises histopatológicas realizadas no cérebro do paciente e em uma de suas irmãs revelaram alterações difusas no núcleo talâmico de ambos. Com estas informações a síndrome foi incluída no grupo das EETs e chamada de Insônia Familiar Fatal (LUGARESI et al., 1986).

Também no ano de 1986, Wells e colaboradores relataram uma enfermidade de caráter neurológico progressivo, em bovinos do condado de West Sussex, localizado no sudeste da Inglaterra. As amostras destes animais foram encaminhadas ao Centro de Investigação Veterinária localizado no sul da Inglaterra e para o Departamento de Patologia do Laboratório Veterinário Central atualmente chamado de Veterinary Laboratories Agency – VLA. Os tecidos apresentaram lesões histopatológicas espongiiformes semelhantes às observadas em casos de *scrapie*. Até aquele momento, a

doença não tinha sido descrita em bovinos e recebeu o nome de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) (WELLS et al., 1987).

Desde sua descoberta até hoje, aproximadamente 188 mil casos de EEB foram confirmados no mundo todo, em países como o Canadá e Estados Unidos e em maior número no Reino Unido. Só nos Países do Reino Unido de 1984 até junho de 2014, 160 mil bovinos foram diagnosticados positivos para a doença (OIE, 2014).

Yamakawa e colaboradores em 2003 e Casalone e colaboradores em 2004 identificaram outra variação da EEB, também causada pela PrP<sup>Sc</sup>, porém com características diferentes da EEB inicialmente relatada por Wells e colaboradores em 1987. A partir deste momento, a forma de EEB descrita em 1986 foi denominada de forma Clássica da doença e a descrita por Casalone, denominada de forma Atípica da doença, por apresentar diferenças nos pesos moleculares, nos níveis de glicosilação, na propensão à proteólise frente à proteinase K e padrões de deposição de PrP<sup>Sc</sup> em áreas diferenciadas no sistema nervoso do bovino em comparação à forma clássica (WELLS et al., 1987; CASALONE et al., 2004). Até o momento, no Brasil dois casos da forma atípica da doença em animais sem raça definida foram confirmados (ALESSI, 2013; BRASIL, 2014).

Desde a descrição da primeira EET até os dias atuais, diversos estudos e experimentos estão sendo realizados com o objetivo de conhecer melhor a proteína priônica e as doenças provocadas por sua forma alterada. Com auxílio da Ressonância Nuclear Magnética foi possível determinar as estruturas tridimensionais de diversas proteínas e ácidos nucleicos, inclusive as das proteínas priônicas. Por tal descoberta, Kurt Wüthrich recebeu em 2002 o prêmio Nobel de Química (WÜTHRICH, 2002).

Ainda assim, alguns pontos relacionados à sua patobiologia ainda não são totalmente claros. Testes de inoculação do agente em camundongos e primatas cada vez mais vêm sendo cruciais para compreensão destas enfermidades. Em algumas doenças priônicas já é possível identificar formas diferenciadas de mecanismos de transmissão, infecção e como mutações no gene *prnp* e sua segregação podem influenciar o desenvolvimento destas doenças (BOLTON; MCKINLEY; PRUSINER, 1984; CHOI et al., 2006) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

<b>EETs</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Mecanismos de transmissão</b>
<b>Kuru</b>	Humanos	Infecção através de rituais de canibalismo
<b>iDCJ</b>	Humanos	Infecção por PrP <sup>Sc</sup> pelo uso de materiais ou instrumentos cirúrgicos contaminados, enxertos de dura-máter, dentre outros procedimentos
<b>vDCJ</b>	Humanos	Infecção por ingestão de produtos derivados de bovinos com EEB
<b>fDCJ</b>	Humanos	Mutações no gene <i>prnp</i>
<b>eDCJ</b>	Humanos	Mutação somática ou espontânea conversão de PrP <sup>C</sup> em PrP <sup>Sc</sup>
<b>GSS</b>	Humanos	Mutação no gene <i>prnp</i>
<b>IFF</b>	Humanos	Mutações no gene <i>prnp</i>
<b>IEF</b>	Humanos	Mutação somática ou espontânea conversão de PrP <sup>C</sup> em PrP <sup>Sc</sup>
<b>Scrapie</b>	Ovinos e Caprinos	Infecção em ovinos geneticamente suscetíveis
<b>EEB</b>	Bovinos	Infecção por farinha de carne e ossos contaminada com PrP <sup>Sc</sup>
<b>ETM</b>	Marta	Infecção por PrP <sup>Sc</sup> de ovinos ou gado
<b>DEC</b>	Cervídeos	Desconhecido
<b>EEF</b>	Felinos	Infecção por PrP <sup>Sc</sup> de ovinos ou gado com farinha de carne e ossos na ração
<b>EUG</b>	Cudu, Nyala, Oryx	Infecção por farinha de carne e ossos contaminada com PrP <sup>Sc</sup>

iDCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob iatrogênica; vDCJ - Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob ; fDCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar; eDCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica; GSS - Síndrome de Gerstmann–Straüssler–Sheinker; IFF - Insônia Familiar Fatal; IEF - Insônia Esporádica Fatal; EEB - Encefalopatia Espongiforme Bovina; ETM - Encefalopatia Transmissível da Marta; DEC - Doença do Emagrecimento Crônico; EEF - Encefalopatia Espongiforme Felina; EUG - Encefalopatia dos Ungulados Exóticos. Adaptado de: Bolton; Mckinley; Prusiner, 1984.

## 2.2. Encefalopatia Espongiforme Bovina

A encefalopatia espongiforme bovina foi descrita pela primeira vez por Wells e colaboradores em 1987, como sendo uma enfermidade de caráter neurológico progressivo identificada em bovinos do condado de West Sussex, localizado no sudeste da Inglaterra. Inicialmente, três fêmeas leiteiras, de aproximadamente cinco anos apresentavam quadro clínico com distúrbios neurológicos, similares aos identificados em ovinos com *scrapie*, incluindo dificuldade locomotora, resistência ao manejo na sala de ordenha, perda de peso e queda na produção de leite.

No ano seguinte, iniciou-se o processo de investigação epidemiológica da doença por meio de um questionário com o objetivo de conhecer a incidência desta, informações genéticas, frequências, aspectos clínicos, duração e o agente etiológico da doença. Ao final das análises, foi sugerido que a EEB não tenha sido propagada, apenas, por meio de herança mendeliana simples e que não havia nenhuma evidência de que a doença tenha sido introduzida na Grã-Bretanha por bovinos ou sêmen importados (WILESMITH et al., 1988).

O estudo confirmou, principalmente, semelhanças entre o agente etiológico da *scrapie* e da EEB. Os resultados apontaram a exposição de bovinos a um agente “*scrapie-like*”, ou seja, por meio de ração que continha proteína priônica alterada derivada de ruminantes. Foi sugerido que a exposição tenha se iniciado em 1981/1982, e que a maioria dos animais foram infectados quando se alimentavam (WILESMITH et al., 1988).

Após a confirmação dos primeiros casos, nos anos seguintes um aumento no número de casos precedeu o reconhecimento de que a EEB se tornaria uma epidemia entre bovinos, principalmente entre rebanhos leiteiros quando comparado aos de corte, já que em maioria rebanhos leiteiros são alimentados com rações concentradas com farinha de carne e ossos durante o desmame e período inicial de crescimento. Na época, a FCO era constituída de resíduos provenientes de diversas espécies: aves, ovinos e bovinos e até mesmo animais que morriam na própria fazenda. Estes resíduos passavam por um processo de concentração para evaporação da água e separação de gordura e proteínas (SMITH; BRADLEY, 2003).

A hipótese mais provável é que o agente causador da EEB tenha sido introduzido em algum momento no processo de produção da FCO, que infectaria o gado, que posteriormente seria abatido e seus resíduos incorporados a um novo processo de produção de FCO. Um quadro que se tornaria um ciclo de infecção e consequente epidemia, já que esta forma de alimentação foi praticada durante décadas. O Reino Unido foi o primeiro país a iniciar este tipo de alimentação em bezerros já na década de 1970 (SMITH; BRADLEY, 2003).

A origem da epidemia pôde ser explicada, mas até o presente, a origem exata da EEB ainda não pode ser determinada com precisão, principalmente de acordo com

alguns aspectos, por exemplo, comparação da sequência de aminoácidos da PrP<sup>Sc</sup> encontradas em bovinos e em ovinos. Sequências de aminoácidos da PrP<sup>Sc</sup> de bovinos diferem em sete ou oito posições da PrP<sup>Sc</sup> de ovinos, o que dificultaria a transmissão da proteína alterada dos ovinos aos bovinos. No entanto, tecidos de ovinos infectados com a proteína priônica alterada, podem ter sido a origem da infecção bovina, já que tecidos de animais doentes foram utilizados na fabricação de FCO (SMITH; BRADLEY, 2003).

Outra explicação plausível seria a doença acontecer esporadicamente em bovinos, porém, o hábito da utilização de resíduos destes animais serem incorporados à FCO com objetivo de alimentar animais da mesma espécie poderia ter gerado a epidemia. Por este e os outros motivos descritos, em 1988 a utilização de FCO na alimentação de ruminantes foi proibida na Europa (SMITH; BRADLEY, 2003a).

No Brasil, após a comprovação que uma das formas de transmissão da EEB poderia ocorrer entre bovinos por meio da alimentação contendo proteína animal, o Governo Brasileiro proibiu a utilização de FCO na fabricação de rações para herbívoros e proibiu também a importação do produto de países que diagnosticaram a doença, a única e eventual fonte de risco para disseminação da doença no país por meio de bovinos que foram importados desses países, nos quais não foram detectados sinais de EEB (BRASIL, 2003).

Considerando que as importações ocorreram entre 10 e 23 anos atrás (tempo consideravelmente mais longo do que o período médio de incubação da doença), a possibilidade que esses bovinos venham a desenvolver EEB é remota. Não obstante, todos os bovinos importados, assim como seus descendentes, vêm sendo acompanhados, inclusive com análises laboratoriais (BRASIL, 2003).

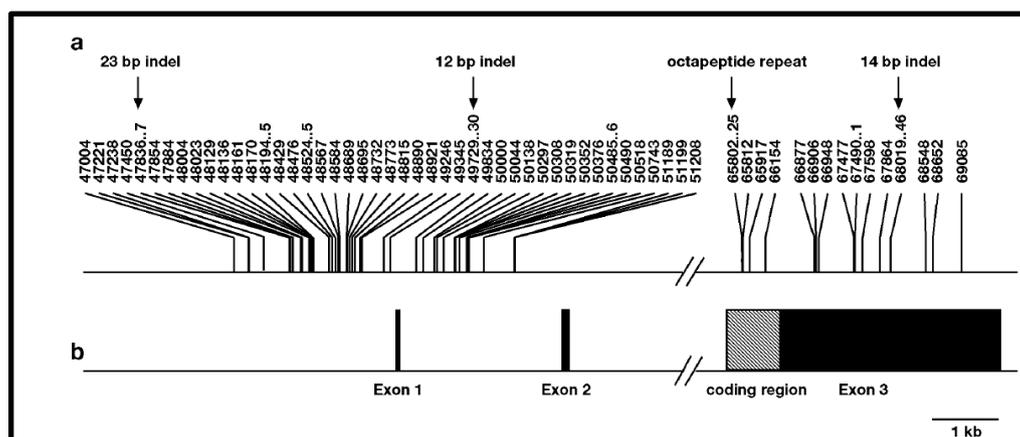
Desde a descoberta da EEB, uma série de investigações vem sendo realizadas tendo como foco o gene *prnp*, codificador tanto da PrP<sup>C</sup> quanto da PrP<sup>Sc</sup>, com intuito de explicar as formas de ocorrência da doença e a possível associação entre a propensão genética de desenvolver a enfermidade e o contato com a proteína priônica alterada.

### 2.2.1. Estrutura e regulação da expressão do gene *prnp*

A proteína priônica celular, também chamada de PrP<sup>C</sup> recebeu destaque quando sua isoforma alterada, denominada PrP<sup>Sc</sup> foi considerada responsável por causar as encefalopatias espongiformes transmissíveis em diversos mamíferos (PRUSINER, 1982).

Tanto a proteína celular quanto sua forma alterada (ambas podem ser chamadas de PrP) são codificadas pelo gene *prnp* (BOLTON; MCKINLEY; PRUSINER, 1984). Em humanos o gene codificador da proteína se localiza no cromossomo 20 (braço p) (PUCKETT et al., 1991) em ovinos no cromossomo 13 e em camundongos no cromossomo 2 (LEE et al., 1998).

Em bovinos, o gene *prnp* encontra-se no cromossomo BTA 13 na posição q17, sendo um gene de cópia única com cerca de 2,5 quilobases (kb) contendo três exóons dos quais apenas o último exon codifica a ORF (*open reading frame*) (Figura 1), o que indica que os outros exóons podem ter uma outra função. Além disso, o intron 1 é descrito por dar suporte à ação da região promotora, em contrapartida o éxon 1 pode estar associado a atividade supressora em relação a região promotora, localizada a montante dele (HAIGH; WRIGHT; BROWN, 2007).



**Figura 1.** Diagrama que ilustra a estrutura genética do gene *prnp* em bovinos. (a) Descrição de quatro grandes polimorfismos de in/del indicados pela setas. (b) Representação dos três exóons ilustrados por barras pretas e região codificante ilustrada pela barra cinza. Adaptado de Sander et al., 2004.

Regiões promotoras de todos os genes *prnp* identificados até o momento, são caracterizadas pela falta de uma região TATA, porém possuem locais ricos em nucleotídeos GC, considerados como potenciais sítios de ligação para os fatores de transcrição SP-1 (BAYBUTT; MANSON, 1997; MAHAL et al., 2001). É importante ressaltar que a repressão da transcrição do gene pode ser mediada pela histona-deacetilase (HDAC) uma enzima que possui sítios de direcionamento para Sp-1 (DOETZLHOFER et al., 1999).

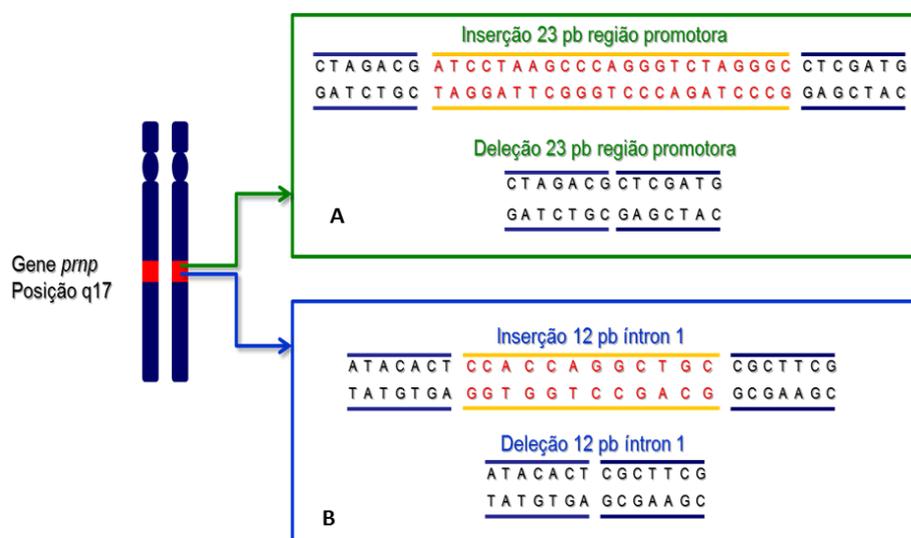
O processo de regulação da expressão gênica da proteína priônica e a integridade estrutural das regiões responsáveis por essa expressão são de extrema importância, pois a presença, ausência ou diferentes níveis de expressão do gene podem exercer influência sobre a patogênese das doenças provocadas pela proteína alterada (SAKUDO et al., 2006; SAKUDO; IKUTA, 2009).

Diferenças no período de incubação após infecções experimentais com príons em hamster sírio, camundongos e análise da patologia em humanos, demonstraram ser inversamente proporcional ao nível de expressão do *prnp*, logo bovinos com maiores níveis de expressão do gene, seja por exposição oral à PrP<sup>Sc</sup> ou exposição ambiental, podem apresentar períodos mais curtos de incubação da doença (XUE et al., 2012).

Desde a descoberta do gene *prnp* até o momento, pesquisas direcionadas às mudanças pós traducionais deste vem sendo realizadas na tentativa de entender os mecanismos pelos quais acontece a conversão da PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup> (CAMMAROTA et al., 2008). Diversos trabalhos envolvem o sequenciamento de regiões específicas do gene *prnp* na tentativa de identificar polimorfismos nas bases nitrogenadas que o constituem, para explicar a alteração que ocorre na conformação da proteína priônica celular (THOMSON et al., 2012). Em ovinos, polimorfismos dos códons 136, 154 e 171 do gene foram correlacionados à resistência e/ou suscetibilidade à *scrapie* (HARRINGTON et al., 2010) e em humanos, polimorfismos no códon 129 já foram identificados em indivíduos que desenvolveram a forma variante da DCJ (KOBAYASHI et al., 2013).

Estudos realizados em bovinos sobre a resistência ou suscetibilidade à EEB, concentraram-se em investigar a estrutura do gene *prnp* uma vez que modificações estruturais na composição da proteína priônica têm sido identificadas em bovinos que

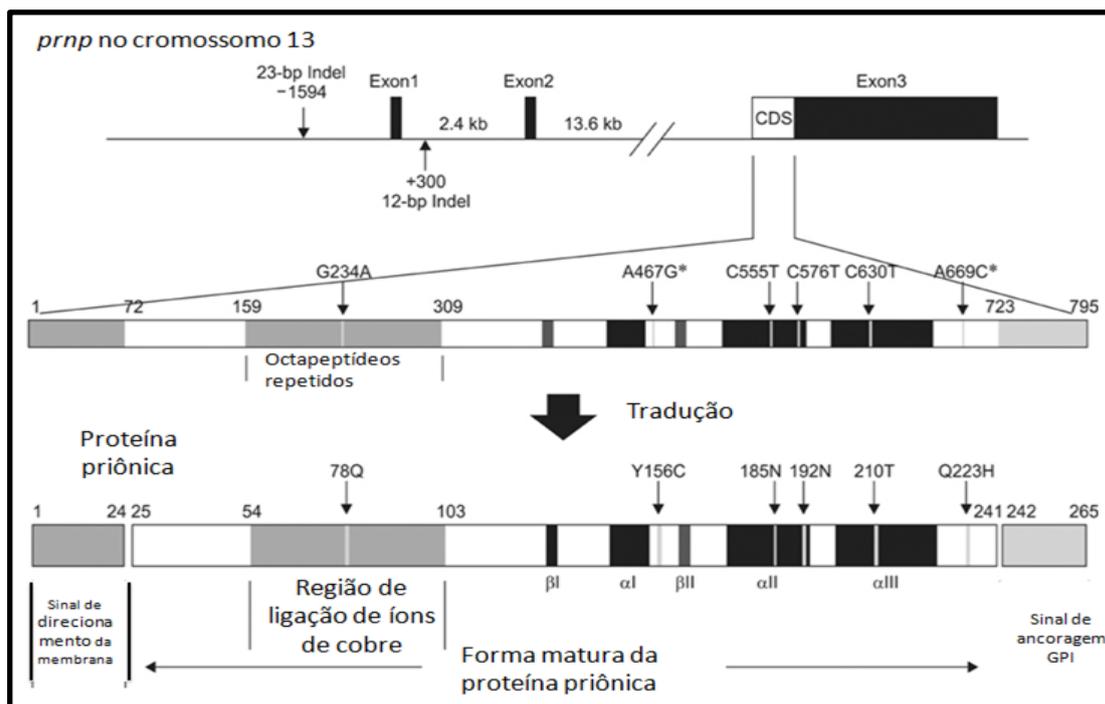
desenvolveram a EEB. Inserção e/ou deleção (indel) de sequências de 12 pares de bases no íntron 1, 23 pb na região promotora, 14 pb na região 3' não traduzida (3' UTR) e 24 pb na região de octapeptídeos repetidos do gene já foram observadas em bovinos que desenvolveram a chamada forma clássica da doença (Figura 2) ou, modificações de um único nucleotídeo (SNP) no gene, como acontece no códon E211k, já foram observadas em indivíduos que desenvolveram a forma atípica da doença (BIACABE et al., 2004; SANDER et al., 2004; SIMMONS et al., 2011).



**Figura 2.** Localização do gene *prnp* dentro do cromossomo. Em A, é possível observar a região de inserção de 23 pb na região promotora. Em B, é possível observar a região de inserção de 12 pb no íntron 1. Ambas podem estar relacionadas com o desenvolvimento da EEB clássica

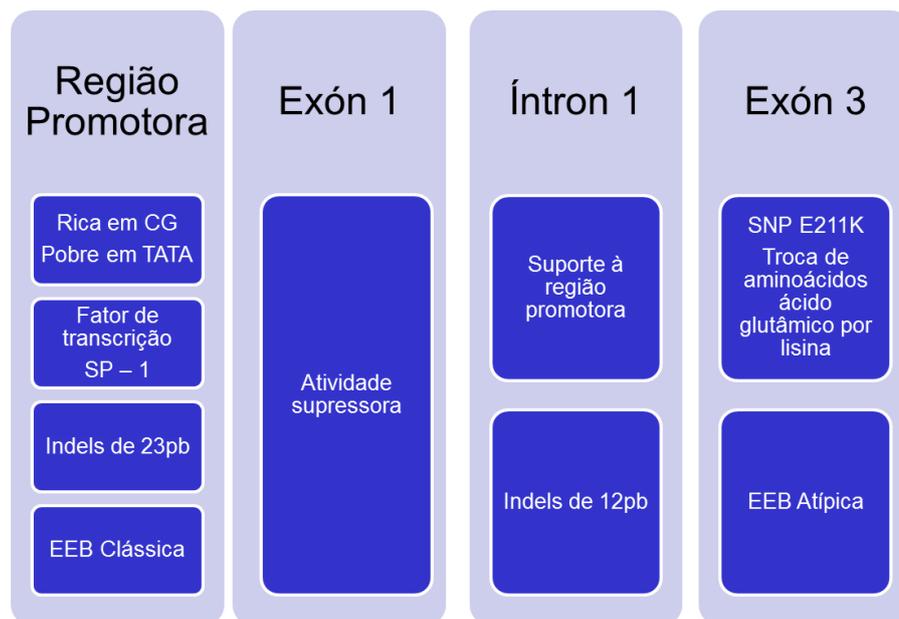
No mundo todo, inúmeros trabalhos utilizando uma série de raças de bovinos tanto acometidos pela EEB quanto considerados saudáveis, já tiveram o gene *prnp* sequenciado para análise destas regiões com o objetivo de correlacionar polimorfismos com a suscetibilidade ou resistência genética à doença. Como exemplo, amostras de bovinos alemães foram utilizadas no sequenciamento das regiões dos três exóons e região promotora do gene, locais considerados importantes por influenciar o nível de expressão do gene e período de incubação da EEB (SANDER et al., 2004) (Figura 2).

Outro trabalho que pode exemplificar a estrutura do gene *prnp* e detalha alterações polimórficas encontradas no gene *prnp* de bovinos nativos coreanos foi o realizado por Thomson e colaboradores em 2012 (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama esquemático representando as variações genéticas do gene *prnp*. Polimorfismos de indel 23 pb na posição 1594 e indel pb na posição 300, estas alterações estão localizadas na região não codificante do gene. Seis SNPs foram descritos, sendo duas mutações não sinônimas (indicadas por asterisco) e quatro mutações sinônimas, ambas localizadas na região codificante do gene. Os papéis funcionais de cada domínio também são detalhados. Descrição do gene a partir do acesso n° AJ298878 Adaptado de: Thomson et al., 2012.

Alterações relacionadas a polimorfismos no gene *prnp*, como as que ocorrem na região promotora de indel de 23pb e no intron 1 de 12 pb, podem afetar a ligação correta do fator de transcrição Sp-1 à região promotora do gene, levando a alterações da atividade desta região e conseqüente diferenças no nível de expressão da proteína priônica (XUE et al., 2012) A figura 4 resume a função, atuação e polimorfismos encontrados em cada região específica do gene.



**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura e regiões importantes do gene *prnp* correlacionadas à expressão do gene e desenvolvimento das EEBs atípica ou clássica.

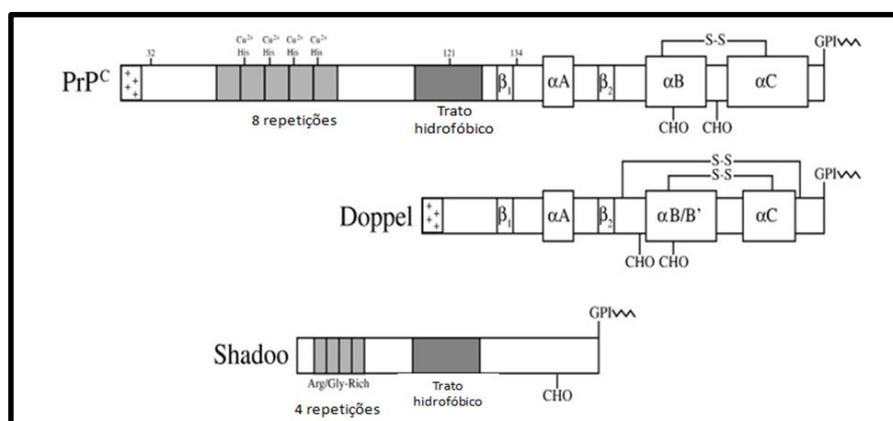
#### 2.2.1.1. A proteína priônica normal

A família da PrP<sup>C</sup> (Figura 5) é composta por outras proteínas, entre elas a proteína Doppel, esta considerada similar à PrP<sup>C</sup>, contém em torno de 179 resíduos, sendo codificada pelo gene *prnD* que fica localizado aproximadamente 16Kb a jusante do gene *prnp*, sendo uma região de nucleotídeos altamente conservados em humanos, ovinos e bovinos (MOORE et al., 1999). A Doppel é uma proteína ausente no cérebro, presente nos testículos e está envolvida no funcionamento adequado do sistema reprodutor masculino, em que camundongos *knockout* para o gene apresentaram diversas alterações, entre elas, a esterilidade (BEHRENS et al., 2002).

Outra proteína que faz parte da mesma família da PrP<sup>Sc</sup> é a proteína Shadoo, que possui de 130 a 150 aminoácidos e é codificada pelo gene *sprn*, considerado altamente conservado em peixes e mamíferos (PREMZL et al., 2003). A proteína Shadoo é uma glicoproteína, ligada à membrana plasmática (MP) por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) PrP<sup>C</sup> (PREMZL et al., 2004; POLAK; ZMUDZINSKI, 2012).

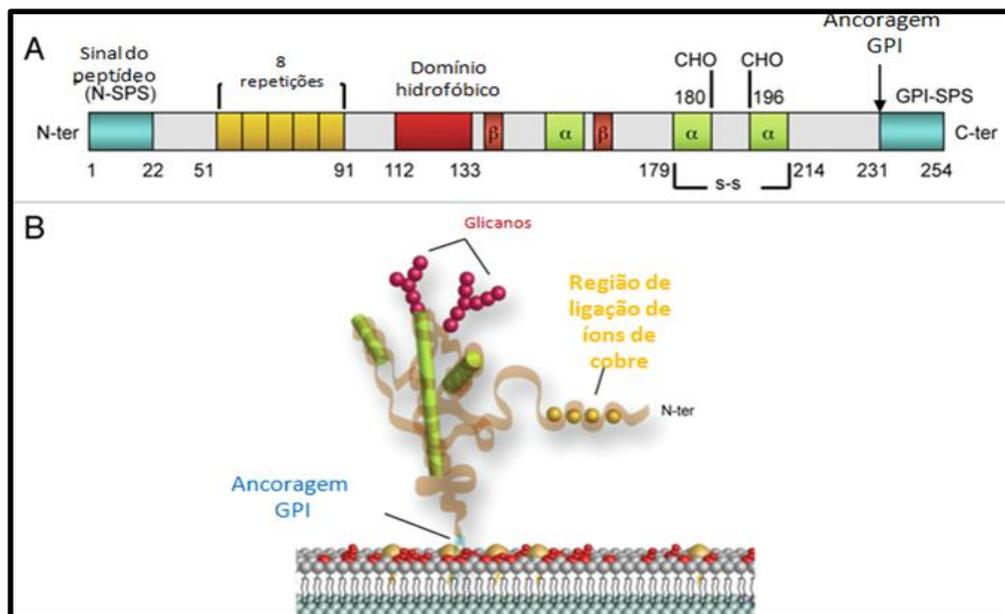
A Shadoo pode ser encontrada no Sistema Nervoso Central (SNC), local que apresenta função neuroprotetora e pode ser encontrada, também, nos estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central, ou seja, a Sho possui funções fisiológicas parecidas com as atividades desempenhadas pela PrP<sup>C</sup> (PREMZL et al., 2004; POLAK; ZMUDZINSKI, 2012).

Em comparação à proteína priônica, a Shadoo possui homologia parcial em seus domínios hidrofóbicos e ambas recentemente, tiveram expressão detectada em tecidos embrionários e células trofoblásticas da placenta, o que pode resultar em retardamento do crescimento intrauterino e diminuição dos trofoblastos (PASSET et al., 2013).



**Figura 5.** Representação esquemática estrutural dos membros da família das proteínas priônicas. Tanto a proteína Doppel quanto PrP<sup>C</sup> são constituídas de domínios C-Terminal, 3 fitas  $\alpha$ -hélices e 2 fitas  $\beta$ -pregueadas, bem como regiões N-Terminal com cargas neutras. As pontes dissulfeto (-S-S-) estão representadas acima das proteínas e os locais de N-glicosilação, abaixo. Estão presentes tanto na PrP<sup>C</sup> quanto na Shadoo regiões octarepetitivas e tetrarepetitivas, ricas em resíduos de arginina e glicina, respectivamente. Adaptado de: Watts; Westaway, 2007.

A PrP<sup>C</sup> é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática. Em camundongos (Figura 6), animais de eleição para serem utilizados em testes com inoculações do agente das TSEs, ela é constituída por uma âncora de GPI, contendo 209 resíduos e dois locais de glicosilação. A proteína possui uma longa e flexível N-terminal, que compreende séries de quatro ou cinco repetições de oito aminoácidos (PHGGGWGQ), um domínio central que possui uma região hidrofóbica, três estruturas  $\alpha$ -hélices e duas  $\beta$  (YUSA et al., 2012; PETIT et al., 2013).

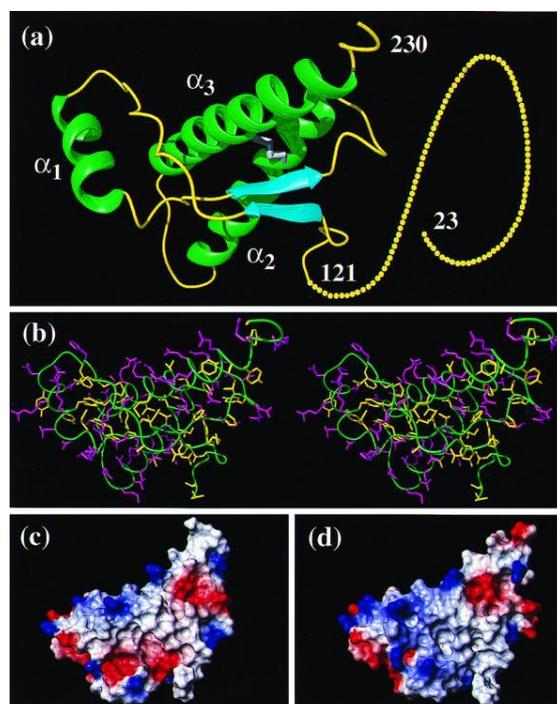


**Figura 6.** Esquema representativo da topologia, estrutura primária e adesão à membrana plasmática da PrP<sup>C</sup>, em camundongos. (A) Os principais domínios são identificados por diferentes cores. As estruturas das duas folhas  $\beta$ , das três hélices  $\alpha$  estão representadas bem como a presença dos locais de glicosilação (CHO). É possível observar a presença de um domínio hidrofóbico, sequências repetidas de octapeptídeos e uma região N-Terminal (N-SPS). A remoção da região C-Terminal- GPI permite a fixação da proteína na âncora GPI. (B) A proteína fica ligada ao folheto exterior da membrana plasmática por meio da âncora GPI, sendo possível visualizar regiões de repetições de octapeptídeos (PETIT et al., 2013)

Algumas PrPs já foram analisadas pela técnica de Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética (NMR), que consiste em uma técnica avançada para se obter informações sobre estrutura e dinâmica de proteínas, ácidos nucleicos entre outros, sob o ponto de vista atômico (WÜTHRICH, 2002). Com esta técnica, proteínas recombinantes de camundongos (mPrP), hamster sírio (shPrP) e seres humanos (hPrP) já foram analisadas. As três proteínas possuem características semelhantes entre si, apresentando dobramentos dos domínios globulares semelhantes, caracterizados pela presença de uma estrutura de resíduos não estruturados na região N-terminal ligado a um domínio globular quase idêntico entre elas, mas que possui variações estruturais específicas à cada uma, o que pode também estar ligado à barreira que acontece entre as espécies para a transmissão infecciosa das encefalopatias espongiformes transmissíveis (OHEN et al., 1997; RIEK et al., 1997; ZAHN et al., 2000).

Sob análise da RMN, a PrP recombinante de humanos (hPrP) (23-230), possui um domínio globular que parte do resíduo 125 até o 228, sua cauda N-terminal se prolonga flexivelmente do resíduo 23 até o 124, possuindo também uma cadeia flexível na extremidade dos resíduos 229 a 230 (ZAHN et al., 2000). Esta estrutura descrita é semelhante às estruturas encontradas nas mPrP (RIEK et al., 1997) e shPrP (OHEN et al., 1997).

A proteína recombinante dos bovinos (bPrP), também foi analisada por NMR. Em bovinos a PrP<sup>C</sup>, possui algumas diferenças entre as proteínas produzidas pelos camundongos e também por humanos. Embora a hPrP e a bPrP sejam muito parecidas, a diferença consiste principalmente, na distribuição superficial das cargas eletrostáticas, característica atribuída principalmente às formas de PrP “saudáveis”. Estas alterações podem influenciar no rompimento da barreira entre espécies, no caso de infecções cruzadas, como pode ocorrer entre humanos e bovinos (LÓPEZ GARCIA et al., 2000) (Figura 7).

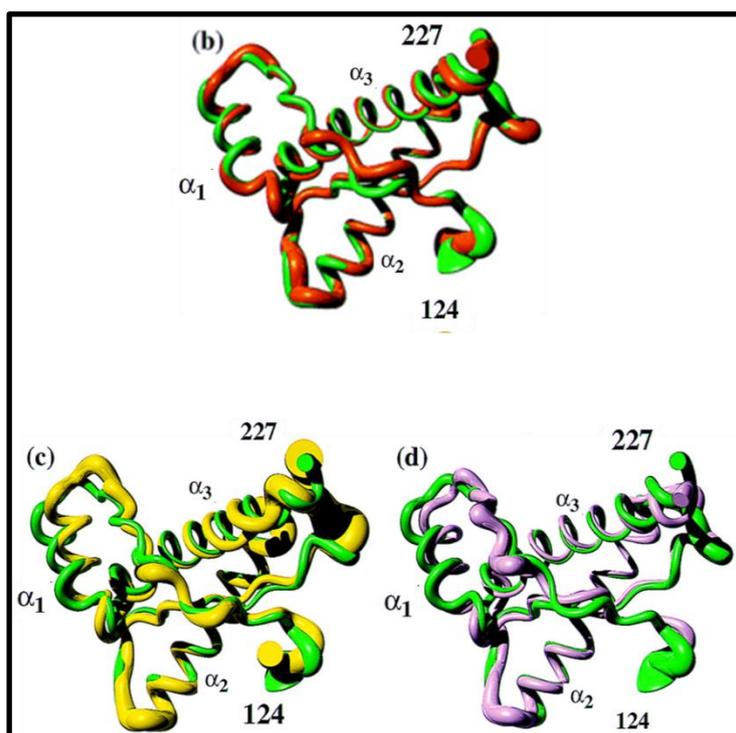


**Figura 7.** Estrutura tridimensional completa da bPrP (23-230). (A) As estruturas  $\alpha$ -hélices são representadas na cor verde, as  $\beta$ -pregueadas estão representadas em azul, demonstrando os segmentos das estruturas secundária irregulares dentro do domínio C-terminal que estão na cor amarela, a "cauda"

flexível desordenada referente aos resíduos 23-121 está representado por 108 pontos amarelos, cada um dos quais representa um resíduo da cauda.

(B) *Stereoview* apresentando todos os átomos pesados do domínio globular da bPrP (23-230), em que os resíduos 121-230 estão na mesma orientação como na figura A. A “espinha dorsal” é mostrada em função *spline* na cor verde passando pelas posições do C<sup>α</sup>, as cadeias laterais hidrofóbicas estão na cor amarela e as cadeias laterais polares estão em violeta. Dados elaborados com auxílio do programa molmol. (C e D) Representação dos domínios globulares das proteínas bPrP e hPrP, respectivamente. A orientação das moléculas está ligeiramente alterada em relação à figura A, de modo que o resíduo 186 está aproximadamente no centro da imagem. O potencial das cargas eletrostáticas da superfície proteica estão indicadas em vermelho (carga negativa), branco (neutro) e azul (carga positiva) (LÓPEZ GARCIA et al., 2000).

Fazendo a comparação estrutural tridimensional dos domínios C-terminal das bPrP, hPrP, mPrP e shPrP é possível observar que suas estruturas são muito semelhantes, principalmente a hPrP (121-230) em comparação a bPrP (Figura 8) (LÓPEZ GARCIA et al., 2000).



**Figura 8.** Apresentação de função *spline* entre as posições do C<sup>α</sup>. O raio variável entre as hastes cilíndricas é proporcional ao deslocamento médio da “espinha dorsal” por resíduo. A sobreposição foi melhor avaliada ajustando os átomos N, C<sup>α</sup>, C<sup>γ</sup> dos resíduos 125-227. (B-D) Representação da sobreposição dos segmentos dos resíduos 125-227 da bPrP (121-230) verde), com os resíduos correspondentes na hPrP (121-230) (b; laranja), mPrP (121-231) (c; amarelo) , e shPrP (90-231) (d; rosa), respectivamente. Adaptado de: López Garcia et al., 2000.

Algumas regiões de segmentos polipeptídicos têm sido consideradas críticas no mecanismo de transformação da PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup>, estas regiões encontram-se no domínio globular da proteína, em particular na  $\alpha$ -hélice 1, no *loop* dos resíduos 166-171 e na  $\alpha$ -hélice 3, estes locais são propostos como regiões em que podem ocorrer interações intermoleculares e que também podem contribuir para a barreira interespecífica. No caso de bPrP e hPrP, a “espinha dorsal” e a  $\alpha$ -hélice 1 de ambas, são quase idênticas. Porém, adjacente à  $\alpha$ -hélice 1 e resíduos 143, 145, e 155 demonstram regiões não conservadas, em que podem haver troca de aminoácidos (Ser / Asn, Tyr / Trp, e Ser / Tyr ou ASN) entre bPrP, hPrP, mPrP ou shPrP. Estas substituições podem interferir na constituição da superfície proteica e alterar interações intermoleculares (LÓPEZ GARCIA et al., 2000; ZAHN et al., 2000).

Como exposto, o conjunto de comparações realizadas, principalmente em relação a  $\alpha$ -hélice 1, ressalta que esta estrutura pode contribuir para a barreira entre as espécies, inclusive que esta barreira entre humanos e bovinos, seria muito pequena ou até mesmo ausente. Analisando os resíduos 166-172, 186 e região C-terminal da  $\alpha$ -hélice 3 estes podem contribuir também para barreira entre seres humanos e bovinos e que esta barreira pode ocorrer devido à diferença na distribuições na carga elétrica na superfície proteica (LÓPEZ GARCIA et al., 2000; ZAHN et al., 2000).

#### **2.2.1.2. Localização e Função da PrP<sup>C</sup>**

A PrP é uma glicoproteína e estas são classificadas como moléculas de proteínas ligadas a cadeias de oligossacarídeos, estes também são conhecidos como glicanos e as moléculas proteicas podem ser constituídas de grupos fosfatos ou sulfatos sendo que o número de carboidratos em uma glicoproteína pode variar de 1% a 60% de sua constituição. As glicoproteínas estão ligadas diretamente ao metabolismo celular e são caracterizadas principalmente por filtrar nutrientes necessários para o funcionamento da célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2010).

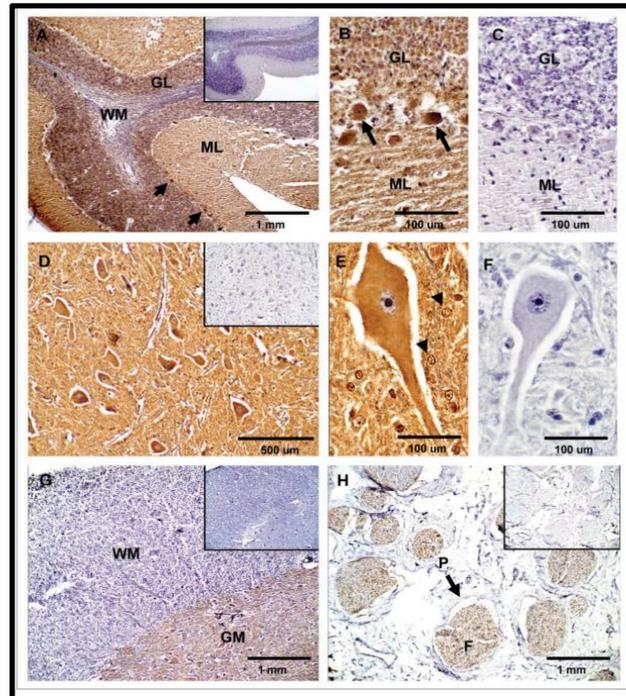
A PrP<sup>C</sup> é particularmente abundante no cérebro, porém pode ser encontrada em músculos, coração, tecidos linfóides, rim, trato digestivo, pele, glândula mamária, endotélio (DIDIER et al., 2006; PETIT et al., 2013) e até mesmo em leucócitos

humanos (DODELET; CASHMAN, 1998). Salès e colaboradores em 1998 realizaram testes em hamster sírio, primatas e humanos para detectar por meio de imunohistoquímica em que locais do tecido nervoso a PrP<sup>C</sup> pode ser detectada. Em hamsters sírio, a proteína pode ser encontrada no córtex cerebral, hipocampo, corpo estriado e em menores níveis no bulbo olfatório, hipotálamo, mesencéfalo, tronco cerebral e cerebelo, sendo que pequenos níveis protéicos foram detectados na hipófise.

Em bovinos Angus saudáveis, por meio de *Western Blotting* e imunohistoquímica foi avaliado o nível de expressão do gene *prnp* em 15 tecidos somáticos de 3 animais diferentes. Por *Western Blotting*, foram detectadas formas diglicosiladas (35KDa), monoglicosiladas (28KDa) e não glicosiladas (25KDa) de PrP<sup>C</sup>. A forma diglicosilada (35KDa) foi encontrada na maioria dos tecidos do SNC (óbex, cerebelo e medula espinhal), timo, em menor quantidade no pâncreas e fígado e também foi detectada no nervo periférico, intestino, pulmão e coração. A forma não glicosilada (25KDa) foi encontrada no nervo periférico e tecidos linfáticos (linfonodos e timo) (PERALTA; EYESTONE, 2009).

Por meio da imunohistoquímica (Figura 9) foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-PrP SAF-32, a fim de detectar o nível de expressão da PrP celular no interior dos tecidos. Entre todos os tecidos analisados, o que apresentou maior nível de expressão de PrP<sup>C</sup>, foi o tecido nervoso. No cerebelo, a proteína foi detectada na massa cinzenta, de forma homogênea e difusa nos neurônios e neurópilo (área formada por dendritos compactados, células da glia e ramos de axônios). Em nível celular a PrP<sup>C</sup> estava em fibras não mielinizadas, em células da camada granular, células estreladas e camada molecular. Células de purkinje apresentaram a proteína em toda sua extensão, da mesma forma que em corpos neuronais e óbex. As células da glia, astrócitos e oligodendrócitos presentes ao redor dos neurônios apresentaram níveis moderados de PrP<sup>C</sup> (PERALTA; EYESTONE, 2009).

A porção torácica da medula espinhal (*Pars thoracalis*) também foi analisada e maior quantidade da proteína foi encontrada na substância cinzenta da medula. Os nervos periféricos também foram analisados e a presença de PrP<sup>C</sup> ficou limitada às fibras neurais e fascículos, enquanto nenhuma quantidade foi observada no tecido conjuntivo do perineuro (PERALTA; EYESTONE, 2009).



**Figura 9.** Expressão de PrP<sup>C</sup> em tecido nervoso bovino. Secção transversal do tecido incubadas com SAF-32 e coradas utilizando anticorpo peroxidase. (A) A PrP<sup>C</sup> na coloração castanho está intensamente presente nas células de Purkinje (setas) e células da camada molecular (PM) e da camada granulosa (GL) do cerebelo. Menor imunoreatividade é observada na massa branca (WM). (B) Em tamanho ampliado é possível observar coloração intensa em fibras das células camada molecular (ML), células de Purkinje (setas) e nos neurônios da GL. (D) No núcleo do trato solitário do obex, a PrP<sup>C</sup> está associada aos corpos neuronais, neurópilo e neuroglia. (E) Em maior ampliação é possível observar marcação de PrP<sup>C</sup> em corpos neuronais, apêndices e células da glia (setas). (G) É possível ver imunoreatividade na medula espinhal em que a PrP<sup>C</sup> está restrita à massa cinzenta (GM) da medula, com baixa intensidade na substância branca (WM). (H) Análise do nervo ciático, em que a PrP<sup>C</sup> está restrita às fibras neurais associadas aos fascículos (F). Nenhuma presença de PrP<sup>C</sup> foi observada no perineuro (P). As figuras C (Cerebelo) e F (Obex) representam cortes seriados que foram incubados com soro de cavalo não imune, ao invés de anticorpos SAF-32 para serem utilizados como controle negativo) (PERALTA; EYESTONE, 2009).

Os tecidos linforreticulares analisados apresentaram marcações intensas para PrP<sup>C</sup> no córtex do timo, principalmente nos timócitos da área cortical e menores marcações nas células epiteliais na área medular. O baço, apresentou marcações difusas, demonstrando a proteína celular em células dendríticas mielóides (DCs) localizadas nas zonas perilinfóides da polpa vermelha. Nos linfonodos mesentéricos a PrP<sup>C</sup> foi identificada nos centros germinativos, coroa de linfócitos e folículos linfóides secundários da área cortical, sendo que os linfócitos marcados, provavelmente tratam-se das linhagens B e células dendríticas foliculares (PERALTA; EYESTONE, 2009).

Ainda sob análise de imuno-histoquímica para detecção da PrP<sup>C</sup>, tecidos do sistema digestivo também foram analisados, para tanto, secções do íleo foram realizadas para facilitar a análise. Nele, uma maior quantidade de PrP<sup>C</sup> foi marcada nas células neurais presentes nas lâminas contidas entre as criptas intestinais, camadas interiores e exteriores da camada muscular e paralelo aos da camada muscular interna. Células ganglionares do sistema parassimpático associadas ao plexo mesentérico, ilhotas de células de Langerhans do pâncreas também apresentaram marcação intensa para a proteína celular, o fígado não apresentou presença de PrP<sup>C</sup> (PERALTA; EYESTONE, 2009).

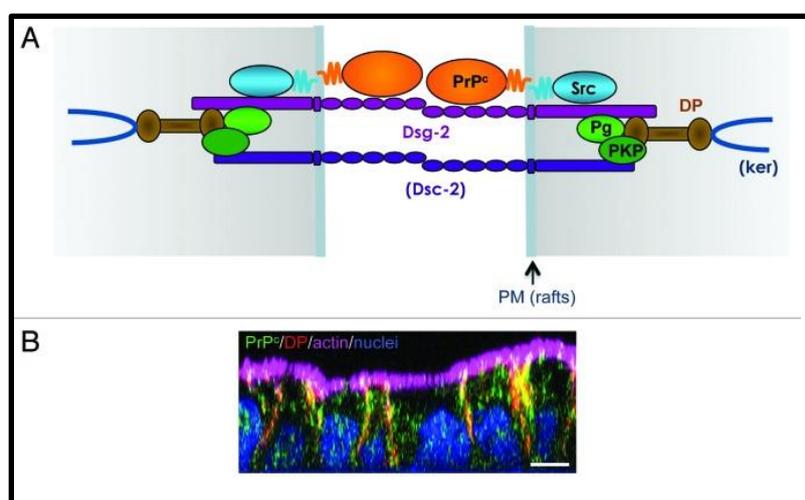
No músculo cardíaco a PrP<sup>C</sup> não foi observada em secções do músculo esquelético, somente em estruturas que não foram identificadas e que estão localizadas adjacentes aos cardiomiócitos. Nos pulmões, a proteína foi identificada na parede alveolar. Nos rins, em túbulos contorcidos proximais e ductos medulares coletores, bem como nos glomérulos renais. Na pele, foi detectada em queratinócitos da epiderme e bainhas exteriores do folículo bem como nas glândulas sebáceas (PERALTA; EYESTONE, 2009).

De acordo com a descrição de locais onde a PrP<sup>C</sup> está presente, pode-se considerá-la como uma molécula central e uma gama de funções podem ser atribuídas a ela. No entanto, estudos realizados em camundongos *knockout* para o gene *prnp*, demonstraram que a falta da PrP<sup>C</sup> pode ser compensada por outras proteínas, como ocorre por exemplo, quanto ao papel da PrP<sup>C</sup> no desenvolvimento axonal, a falta dela pode ser compensada pela regulação positiva de integrinas (HAJJ et al., 2002).

Por outro lado, os primeiros fenótipos analisados resultantes da deleção da PrP<sup>C</sup> foram observados em peixes-zebra, em que a ausência da proteína gera perda de células embrionárias responsáveis pela aderência e gastrulação, o que se torna letal para estes animais. A análise destas células embrionárias revelou que PrP<sup>C</sup> pode ser necessária para a sinalização adequada dos complexos de adesão de E-caderina na membrana, o que indica o papel importante da proteína priônicas no processo de adesão celular (MÁLAGA-TRILLO et al., 2009).

Antes de sua importância no SNC a PrP<sup>C</sup> desempenha uma função crucial no processo de regulação da adesão celular; a proteína priônica pode ser encontrada em diversos tecidos e fica localizada nas junções célula-célula (PETIT et al., 2012).

Dentro do processo de adesão celular, a PrP<sup>C</sup> desempenha papel importante no epitélio intestinal, ela é responsável por regular o funcionamento dos desmossomos presentes neste tecido (Figura 10). O mau funcionamento desta barreira, no cólon, pode ocasionar o transtorno chamado doença inflamatória intestinal (PETIT et al., 2012).



**Figura 10:** PrP<sup>C</sup> como componente dos desmossomos nas células epiteliais do intestino. (A) Modelo proposto para representar a interação da PrP<sup>C</sup> e Scr no complexo desmossomal dentro dos microdomínios das vesículas da membrana plasmática. A PrP<sup>C</sup> interage com a Src quinase e com as proteínas desmossomais: desmogleína-2 (DSG-2), placoglobina/γ-catenina (Pg), placofilina-2 (PKP) e desmoplaquina (DP). Os outros componentes desmossômicos: desmocolina-2 (DSC-2) e queratina (ker), que não foram detectados em imunoprecipitados junto com a PrP<sup>C</sup>, são mostrados entre parênteses. (B) Imagem confocal, mostrando uma co-localização de PrP<sup>C</sup> com a proteína desmossomal desmoplaquina (DP) ao longo da membrana lateral enterocítica, altamente polarizadas Caco-2/TC7. Actina foi corado com faloidina e os núcleos por DAPI. Barra de escala: 10 μm (PETIT et al., 2012)

Em paralelo, uma série de estudos realizados em organismos *knockout* e completos para o gene *prnp* foram realizados para conhecer as demais funções da PrP<sup>C</sup>. A proteína participa de processos biológicos importantes para homeostase, entre eles, a sinalização celular, podendo participar de processos regulatórios de proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular com auxílio da proteína Bcl-2 (reguladora da permeabilidade celular e pró-apoptose). A proteína priônica interage com

moléculas envolvidas na tradução de sinais tais como a Fyn (Proto-oncogene de tirosina-proteína-quinase) e Grb2 (Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2) (KURSCHNER; MORGAN, 1995; LIANG et al., 2007; WESTERGARD; CHRISTENSEN; HARRIS, 2007).

No neurônio, a proteína priônica interage com moléculas como a sinapsina Ib que está presente na região terminal de axônios, nervos e principalmente nas vesículas pré-sinápticas. A proteína priônica também interage com a GFAP (Proteína ácida fibrilar glial), cujo gene é expresso principalmente nos astrócitos. A GFAP e a príon também atuam na intercomunicação celular e funcionamento da barreira hematoencefálica (LIANG et al., 2007)

Diversos estudos relatam a interação da PrP<sup>C</sup> com metais e observações realizadas com a PrP recombinante demonstraram que a proteína se liga a cátions divalentes, incluindo cobre, ferro, zinco, manganês e níquel e que sua região de repetição de octapeptídeos (altamente conservada em diferentes espécies) é o principal local de ligação destes metais (SINGH et al., 2013).

Um dos metais que desempenha um papel fundamental na bioquímica do sistema nervoso e que possui metabolismo correlacionado com a PrP<sup>C</sup> é o Zinco (Zn), que tem função neurotransmissora e age na fenda sináptica, modulando fatores de transcrição e inibindo a ação da proteína tirosina fosfatase. Porém, os mecanismos relacionados à sua recaptação pelos neurônios ainda não foram totalmente esclarecidos (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005; WATT et al., 2012).

Por meio de análises auxiliadas pela bioinformática foi possível observar uma sequência de aminoácidos do domínio N-terminal da PrP<sup>C</sup>, idênticos aos encontrados em um sub-ramo da família de proteínas que inclui ZIP1 ZIP5, ZIP6 e ZIP10, proteínas responsáveis pelo transporte transmembrana de cátions bivalentes, incluindo o Zn. Logo a PrP pode estar correlacionada com a internalização celular do metal (SCHMITT-ULMS et al., 2009).

O Cobre (Cu) é um outro metal considerado importante para o metabolismo do sistema nervoso, pois possui atividade antioxidante e contribui significativamente para o funcionamento equilibrado do tecido nervoso (BROWN; CLIVE; HASWELL, 2001). A

análise de células de neuroblastoma indicam que a proteína priônica é responsável por se ligar a íons de cobre e internalizá-lo por vias endocíticas aos compartimentos celulares, funcionando como uma proteína de absorção de Cu (HARRIS; TRUE, 2006; MIURA et al., 2005).

Analisando a internalização do Cu, existe uma forte associação da PrP<sup>C</sup> com este metal e a interação entre a PrP<sup>C</sup> e as moléculas de Cu pode acontecer em quatro locais da região de octapeptídeos repetidos da proteína. A PrP<sup>C</sup> também é responsável pela captação do ferro, componente essencial na constituição de enzimas e proteínas que atuam na função e crescimento neuronal (HARRIS; TRUE, 2006; MIURA et al., 2005).

Uma infinidade de outras funções e processos podem ser associados à proteína PrP<sup>C</sup> (Tabela 2), porém, muitas de suas funções, principalmente relacionadas ao desenvolvimento e atividade neuronal precisam ser esclarecidas (CAZAUBON; VIEGAS; COURAUD, 2007; LINDEN et al., 2008; WATT et al., 2012).

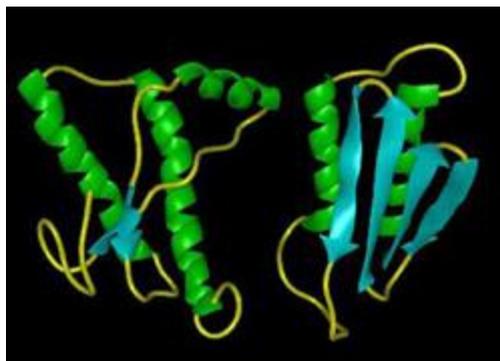
**Tabela 2.** Localizações e Funções da proteína priônicas em conjunto com diferentes moléculas.

<b>Molécula</b>	<b>Função Fisiológica</b>
Bcl - 2	Anti apoptose
Caveolina 1	Ativação e sinalização Fyn
CK2	Atividade fosfotransferase
GAG	Transporte biomolecular
GFAP	Reparação celular
Grb2	Adaptação proteica
Cobre	SOD atividade antioxidante
Hsp60	Chaperona
Laminina	Adesão, neurogênese
Receptor para laminina	Ligação para laminina
N-CAM	Adesão
Nrf2	Inibidor apoptótico
Pint 1	Desconhecido
STI 1	Neurogênese e neuroproteção
Sinapsina 1b	Regulaçã do neurotransmissor
Tubulina	Transposição intracelular

Adaptado de: Onodera et al., 2006

### 2.2.1.3. A proteína priônica anormal e cofatores

O agente causador da EEB é a proteína priônica alterada ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) que difere estruturalmente e bioquimicamente em comparação à proteína priônica normal dos bovinos (COHEN; PRUSINER, 2010) (Figura 11).



**Figura 11.** Comparação entre a  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . À esquerda apresentando domínio globular contendo três estruturas  $\alpha$ -hélices e uma folha  $\beta$  – pregueada. À direita a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  alterada, causadora de EETs, apresentando domínio globular com apenas duas estruturas  $\alpha$ -hélices. Adaptada de: Cohen; Prusiner, 2010.

Desde a descoberta do agente causador da doença, uma infinidade de pesquisas tem sido realizadas com o intuito de comprovar a “hipótese da proteína”, ou seja, como a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , pode alterar bioquimicamente uma  $\text{PrP}^{\text{C}}$  em uma proteína priônica resistente ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) (ABID; SOTO, 2006; SOTO; ESTRADA; CASTILLA, 2006).

Até o momento, o mecanismo preciso de como esta conversão ocorre ainda não é totalmente claro, porém existe um modelo que sustenta a hipótese da  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  possuir estruturas oligoméricas que podem se ligar a  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e catalisar uma reação em que polímeros são incorporados às proteína priônicas normais (CAUGHEY, 2003). Em algum momento, os polímeros da  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  são quebrados em tamanhos menores por força mecânica ou reação catalizadora, ainda desconhecidas, porém esta fragmentação aumenta o número de núcleos da  $\text{PrP}^{\text{C}}$  capazes de continuar o processo de conversão (ABID; SOTO, 2006; SOTO; ESTRADA; CASTILLA, 2006).

Uma questão importante relativa à replicação da prion é a atividade de co-fatores neste processo (ABID; SOTO, 2006). A identificação de cofatores endógenos que possam facilitar a modificação estrutural da  $\text{PrP}^{\text{C}}$  em  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nos diferentes tipos celulares

também é de extrema importância para o conhecimento do desenvolvimento das doenças priônicas esporádicas, principalmente. Com a utilização de modelos experimentais e testes de inoculação do agente em camundongos, alguns cofatores puderam ser caracterizados por potencialmente dar suporte aos mecanismos de infecção destas doenças (LIN; ZHAO; YANG, 2013).

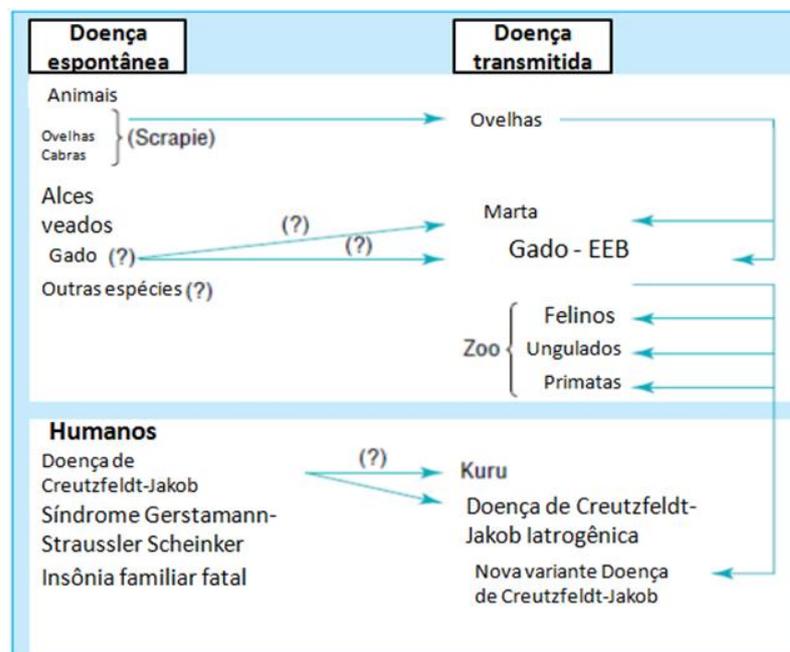
Com o desenvolvimento da técnica “*Protein Misfolding Cyclic Amplification*” (PMCA) algumas evidências contribuíram para a comprovação de que co-fatores atuam no processo de conversão de PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup>. A PMCA consiste numa técnica de amplificação parecida com a PCR, automatizada, que consiste na incubação de pequenas quantidades de príon anormal com quantidades maiores de príon normais, de modo que com o aumento cinético da reação, aconteça a conversão progressiva das moléculas mal formadas e a quantificação destas moléculas (BARRIA; GONZALEZ-ROMERO; SOTO, 2012).

O sistema ubiquitina-proteassomo, também chamado de UPS é encontrado em células eucarióticas e, é a principal via proteolítica não lisossomal conhecida por desempenhar papel importante em processos celulares fundamentais, tais como a regulação do ciclo celular, divisão celular, a diferenciação, apoptose celular, tráfico de células e modulação das respostas imunes e inflamatórias. A ubiquitina é responsável por marcar proteínas defeituosas para que estas sejam degradadas pelo proteassomo 26S, logo o sistema é responsável pela degradação de aproximadamente 80% de proteínas anormais ou deformadas potencialmente responsáveis por formar agregados tóxicos ao organismo (CIECHANOVER; BRUNDIN, 2003).

Modificações ocorridas nesta via podem gerar alteração na homeostase e desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica e também doenças causadas por príons (CIECHANOVER; BRUNDIN, 2003).

Uma grande preocupação em relação à EEB, refere-se à possibilidade da doença ser transmitida a humanos. O sequenciamento de aminoácidos e testes bioquímicos já forneceram fortes evidências de que uma única estirpe de príon proveniente de bovinos doentes tenha infectado humanos, causando uma variante da Doença de Creutzfeldt Jacob (vDCJ), além de possivelmente, ter acometido outras espécies (COLLINGE,

2014). Abaixo a Figura 12, ilustra potenciais rompimentos de barreiras interespecíficas, incluindo a que pode ocorrer em humanos.



**Figura 12.** Inter-relações que já são conhecidas e inter-relações especuláveis em relação à transmissão das encefalopatias espongiformes transmissíveis entre animais e/ou humanos. Adaptado de: Collinge, 2014.

### 2.2.2. Encefalopatia espongiforme bovina Clássica e Atípica

Atualmente a encefalopatia espongiforme bovina pode ser classificada como clássica ou atípica. Esta classificação é realizada basicamente, de acordo com características particulares a cada estirpe proteica, tais como propriedades bioquímicas, moleculares e padrões de deposição amilóide no sistema nervoso (Figura 13) (BIACABE et al., 2004; CASALONE et al., 2004; JACOBS et al., 2007).

EEB CLÁSSICA	EEB ATÍPICA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Correlação com a ingestão da FCO contendo PrP</li> <li>• Peso molecular maior em comparação a Atípica</li> <li>• Diglicosilada</li> <li>• Maior deposição no óbex</li> <li>• Correlação com indels de 23pb e 12pb do gene <i>prnp</i></li> <li>• Maioria dos casos (maior prevalência e menor incidência)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecção após período de proibição de utilização de FCO</li> <li>• Peso molecular maior (Forma H) ou menor (Forma L) em relação à EEB Clássica</li> <li>• Mono ou não glicosiladas</li> <li>• Maior deposição no tronco cerebral e cerebelo</li> <li>• Correlação com SNP no códon E211K</li> <li>• 60 casos detectados até 2011 (menor prevalência e maior incidência)</li> </ul>

**Figura 13.** Quadros para comparação entre as principais características da EEB Clássica e EEB Atípica.

A EEB atípica foi inicialmente detectada, após o período da proibição da utilização de FCO na alimentação de herbívoros, ou seja, em animais que não tiveram contato com a proteína priônica alterada por via alimentar, diferente de como ocorre a infecção de animais com a forma clássica da doença (BIACABE et al., 2004; CASALONE et al., 2004; JACOBS et al., 2007; HOLZNAGEL et al., 2013).

Quanto à caracterização por meio de *Western blotting*, a PrP<sup>Sc</sup> encontrada na EEB clássica possui peso molecular superior, em comparação à proteína alterada encontrada na EEB atípica. Proteínas encontradas na EEB atípica, também podem apresentar pesos moleculares distintos, maiores (Forma H) ou menores (Forma L). Níveis de glicosilação podem variar entre as estirpes proteicas, proteínas diglicosiladas são encontradas em maior proporção na EEB clássica, enquanto proteínas mono ou não glicosiladas são encontradas em maior proporção na EEB atípica (POLAK; ZMUDZINSKI, 2012; POLAK et al., 2008). Semelhanças moleculares já foram observadas entre a encefalopatia atípica e a doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica (CASALONE et al., 2004).

Diferenças no padrão de deposição no sistema nervoso central e resistência à digestão pela proteína K, também podem ser observadas entre a EEB clássica e atípica. Maior deposição de proteína alterada encontrada na forma clássica da doença pode ser

detectada na região do óbex, enquanto formas H e L são detectadas em maior quantidade no tronco encefálico e cerebelo, sendo que as formas H e L são mais sensíveis à degradação pela proteínase K quando comparadas à proteínas da EEB clássica (POLAK; ZMUDZINSKI, 2012; POLAK et al., 2008).

Atualmente, a busca de alterações nos genes dos bovinos tem sido realizada com o propósito de associar alterações genéticas e o estabelecimento das formas clássica e atípicas de EEB, ou a identificação de animais ou raças que tenham propensão genética a desenvolver ou não as formas da doença (CLAWSON et al., 2008; GALVÃO et al., 2012; IMRAN et al., 2012).

Uma série de genes responsáveis por codificar proteínas importantes na patobiologia da doença já foram identificados e são alvo de análises, tais como os codificadores das proteínas NEDD8 (Precursor de células neurais), APP-BP1 (“*Amyloid precursor protein binding protein-1*”) e GDFN (Fator Neurotrófico Derivado de Célula Glial) (THOMSON et al., 2012), porém mutações em regiões importantes do gene *prnp* já foram descritas tanto em animais saudáveis como em animais que desenvolveram a doença (SANDER et al., 2004).

No gene *prnp*, alterações, inserções e/ou deleções (indels), já foram observadas. As principais alterações desta ordem são as indels de 23 pb na região promotora do gene, 12 pb no íntron 1 e 14 pb na região 3’ não traduzida que são associadas com o desenvolvimento da EEB clássica. A frequência destas alterações foi descrita em animais saudáveis, como no gado Japonês Marrom, gado Japonês nativo e animais Holandês (MSALYA et al., 2009), na raça Holandesa da Polônia em animais saudáveis e com EEB (GURGUL et al., 2012), na raça Caracu, em animais saudáveis (GALVÃO et al., 2012) e em oito diferentes raças de gado alemão, incluindo animais saudáveis e diagnosticados com EEB clássica (SANDER et al., 2004).

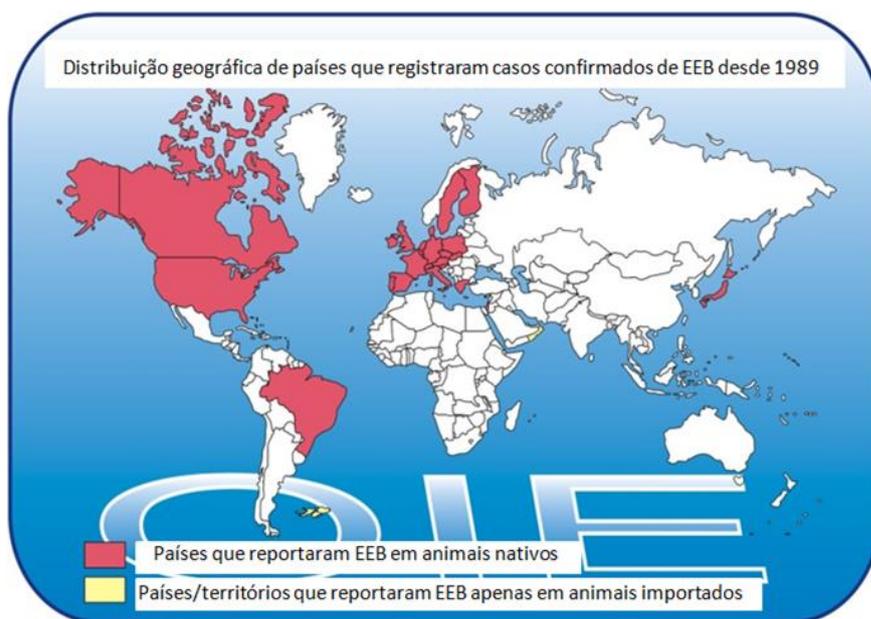
Alterações em outras regiões no gene *prnp* também já foram observadas, como as que ocorrem no códon 211 do exon 3, em que um polimorfismo pontual (GAA/AAA) (E211K) leva a troca na codificação do aminoácido ácido glutâmico por lisina. Esta alteração pode ter contribuído para a tradução das chamadas formas L e H da proteína, responsáveis pelo desenvolvimento da forma atípica da EEB (JACOBS et al., 2007).

Até o ano de 2011, cerca de 60 casos de EEB atípica foram registrados em 13 países (SALA et al., 2012). Seuberlich; Heim; Zurbriggen e colaboradores em 2010 ressaltaram a natureza esporádica da doença, com prevalência muito baixa (cerca de 1 caso por milhão de animais testados) no mundo todo, incluindo países que hoje são considerados livres da EEB clássica.

Nos EUA, em 2006, dois bovinos foram diagnosticado com a EEB atípica porém apenas um apresentou alterações no códon 211, com a troca do aminoácido ácido glutâmico por lisina (E211K) (BIACABE et al., 2008; CLAWSON et al., 2008). Na França quatro bovinos e dois no Canadá foram diagnosticados com as forma H e L da EEB atípica, porém em nenhum foi observado alteração no códon 211 (CLAWSON et al., 2008). Apesar da natureza esporádica da doença, o estudo destas mutações é de interesse significativo, já que alterações parecidas ocorridas no códon 210 de humanos e correlacionadas com a forma esporádica da doença de DCJ já foram encontradas (TAJIMA et al., 2014).

### **3. PREVALÊNCIA DE CASOS DE EEB**

A figura 14 ilustra os países que tiveram ao menos um caso de EEB que foi confirmado e notificado à OIE. Nestes países, foi possível identificar se os animais que desenvolveram a doença tinham origem no próprio país ou foram importados de regiões em que a doença é endêmica (OIE, 2014).



**Figura 14.** Distribuição geográfica de países que registraram casos confirmados de EEB desde 1989. Fonte: OIE, 2014.

Com auxílio de programas estabelecidos para controle e erradicação das EETs, como ocorre, por exemplo no Brasil, com o Programa Nacional de Controle de Raiva dos Herbívoros e EETs, outros países, independentemente de possuírem casos identificados ou não, também desenvolvem planos de controle e vigilância epidemiológica, com o objetivo de identificar possíveis casos da doença. Estes planos que realizam o monitoramento, principalmente para controle da EEB, permitem que a OIE identifique, classifique e liste países do mundo todo quanto ao risco/possibilidade de identificar animais com a doença (Tabela 2).

**Tabela 3.** Lista dos países de acordo com o risco/possibilidade de identificar animais com a doença (OIE, 2014).

<b>LISTA DE PAÍSES DE ACORDO COM O ESTATUS DE RISCO SOBRE EEB</b>		
<b>Risco negligenciável de EEB</b>		
Argentina	Hungria	Noruega
Austrália	Islândia	Panamá
Áustria	Índia	Paraguai
Bélgica	Israel	Peru
Brasil	Itália	Portugal
Bulgária	Japão	Romênia
Chile	Coréia (Rep.)	Cingapura
Colômbia	Letônia	Eslováquia
Croácia	Luxemburgo	Eslovênia
Dinamarca	Malta	Suécia
Estônia	Holanda	Estados Unidos da América
Finlândia	Nova Zelândia	Uruguai
<b>Risco controlado de EEB</b>		
Canadá	Alemanha	Nicarágua
República da China	Grécia	Polônia
Costa Rica	Irlanda	Espanha
Chipre	Lichtenstein	Suíça
República Tcheca	Lituânia	Reino Unido
França	México	-

Países membros reconhecidos como tendo risco negligenciável/ou controlado de EEB, em conformidade com o capítulo 11.4 do Código Terrestre. Fonte: OIE, 2014.

Existe também uma escala de classificação que enquadra países da seguinte forma: países em que a EEB foi identificada, porém a doença não é endêmica, países em que a EEB foi identificada, porém a ocorrência de casos estão sob controle e, países em que a EEB foi identificada e o risco da ocorrência de novos casos ainda é eminente (Figura 15) (OIE, 2014; BRASIL 2014).



**Figura 15.** Distribuição geográfica de países referente às possibilidades de ocorrência e controle de novos casos de EEB. Fonte: OIE, 2014.

Como citado anteriormente, o Brasil possui o PNCRH, que mediante a Portaria n° 516, de 9 de dezembro de 1997, a EEB, a *scrapie* e doenças nervosas de caráter progressivo em ruminantes foram incorporadas ao sistema de vigilância da raiva dos herbívoros domésticos, sendo também de notificação obrigatória a ocorrência ou a suspeita dessas enfermidades (BRASIL, 2014).

Desta forma, o país possui métodos de controle e identificação de animais que possam apresentar a doença. Hoje, o Brasil também conta com o Sistema Brasileiro de Identificação e Certificação de Bovinos e Bubalinos – SISBOV, um sistema que é utilizado para a identificação individual de bovinos e bubalinos em propriedades rurais que têm interesse em vender animais que serão utilizados para produção de carne para atender mercados que exigem identificação individual. Este sistema possibilita identificar e monitorar o animal, desde o seu nascimento até o momento do abate, e graças à este sistema foi possível identificar os únicos dois casos de EEB atípica ocorridos no Brasil, um no ano de 2012 e outro no ano de 2014 (OIE, 2014; BRASIL, 2014).

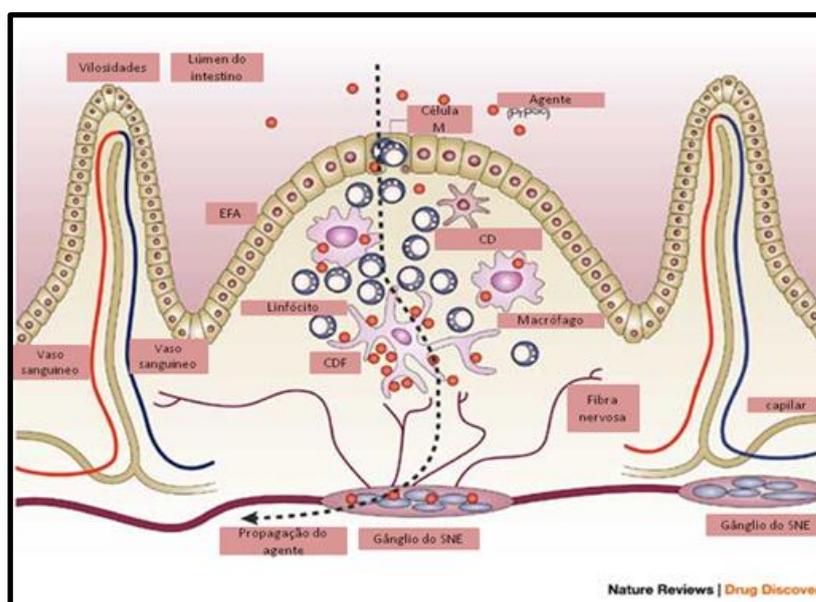
O fato de o país possuir um programa que permite o rastreamento de animais que morreram com quadros de sintomatologia nervosa e que exige a realização de testes para EETs junto com o SISBOV, permite que o Governo brasileiro por meio do MAPA, possua as informações necessárias, até o momento, para identificar casos da doença, o que garante a manutenção do status sanitário brasileiro de “risco insignificante” de apresentar casos da doença (BRASIL, 2014).

#### **4. PATOGENIA E IMUNOLOGIA DA EEB**

O processo imune que modula a resposta frente às infecções ocasionadas por príons é objeto de estudos, principalmente pela importância do papel da proteína PrP<sup>C</sup> no sistema imunológico. Tal função pode esclarecer mecanismos moleculares e a patogenia da príon (LINDEN et al., 2008). Ainda que o processo de resposta imune contra a príon não seja totalmente claro é sabido que a relação do sistema imune e a patogenia é definido, já que a príon tem capacidade de escapar do mecanismo de contenção e ainda, colonizar as células protetoras e conseqüentemente atingir o sistema nervoso central (AGUZZI; NUVOLONE; ZHU, 2013).

A principal forma de exposição é o contato oral com a proteína priônica. Uma vez ingerida, a proteína é capaz de resistir à ação de enzimas gástricas e assim atravessar a parede do trato digestivo.

Estudos realizados com a inoculação intragástrica de príons em camundongos sugerem o epitélio associado a folículos (FAE) de placas de Peyer como um sítio de entrada plausível, resultado de uma rápida acumulação da proteína nessas placas antes da colonização no baço (KIMBERLIN; WALKER, 1989; PRINZ et al., 2003) (Figura 16).



**Figura 16.** Representação esquemática das possíveis formas de passagem por meio do epitélio intestinal e posterior invasão do sistema nervoso (van KEULEN, 2008).

EFA – Epitélio Folicular Associado  
 CDF – Células Dendríticas Foliculares  
 SNE – Sistema Nervoso Entérico  
 CD - Células Dendríticas

As células M são utilizadas pela príon como carreadoras para invadir a mucosa intestinal (DONALDSON et al., 2012). Outro mecanismo de invasão relevante utilizado são transcitoses por meio de enterócitos (KUJALA et al., 2011). Após atravessar os folículos associados ao epitélio, a príon é disseminada no organismo por meio de um mecanismo mediado por células. Linfócitos associados ao epitélio não fazem parte desse processo e os macrófagos limitam a proliferação, porém, mais estudos são necessários (BERINGUE et al., 2000; PRINZ et al., 2003).

As doenças priônicas, aparentemente, não estimulam resposta imune adaptativa devido à imunogenicidade similar entre PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>. Tal tolerância, inibe o sistema de produzir fortes respostas e também a produção de anticorpos específicos contra a PrP<sup>Sc</sup> (PORTER; PORTER; COX, 1973). Entretanto, estudo realizado com anticorpos específicos anti-PrP<sup>Sc</sup> (anticorpos monoclonal 6H4 e fragmentos de anticorpo monovalente D13, D18, R1 e R2) suprimiram eficientemente a replicação priônica em neuroblastoma de camundongos infectados (ENARI; FLECHSIG; WEISSMANN, 2001; PERETZ et al., 2001).

As células Natural Killer (NK) e células T parecem ter um papel pequeno no controle da patogênese da doença priônica. Células NK são responsáveis por destruir células infectadas por meio da expressão de perforina e granzima. Camundongos *knockout* para o gene da perforina revelaram a patogênese da doença inalterada, o que leva a entender que existem falhas na captura por monócitos e ativação das células NK (LANIER, 2008).

A transmissão por meio de sangue e derivados foi constatada quando, ocasionalmente, vCJD foi transmitida de doadores de sangue, que posteriormente desenvolveram a doença. A doença debilitante crônica (CWD) também foi transmitida entre veados por meio de transfusão sanguínea (BISHOP et al., 2013; LLEWELYN et al., 2004). As transmissões pela pele e aerossóis vêm sendo estudadas como potenciais fontes de disseminação (DENKERS et al., 2013; GLAYSHER; MABBOTT, 2007). O que tem sido afirmado é que na transmissão por aerossóis as células M e células epiteliais da mucosa nasal têm papel importante da internalização da príon e, a colonização nos linfonodos ocorre logo após o contato (KINCAID et al., 2012; NICHOLS et al., 2013).

As células dendríticas capturam a proteína priônica e as carregam até os linfonodos por meio da circulação linfática e então as apresenta às células T e B (HUANG et al., 2002). A disseminação é ocasionada pelas células dendríticas e isso pode ser confirmado quando a depleção dessas células foi realizada em animais que receberam doses de príons. O resultado foi um acúmulo prejudicado e susceptibilidade à doença reduzida (RAYMOND; AUCOUTURIER; MABBOTT, 2007).

A inflamação linfocítica crônica resultante do acúmulo de células dendríticas foliculares no parênquima de órgãos afetados, pode acarretar em eliminação da proteína e risco de exposição a outros indivíduos (replicação de proteína ectópica). Quando o órgão afetado é o rim a príon ectópica é secretada pela urina (prionúria) (SEEGER et al., 2005).

Em ovelhas, a deposição da PrP<sup>Sc</sup> em glândulas mamárias, associada à mastite, resultou em eliminação da proteína no colostro e representou uma fonte de transmissão vertical em potencial. Tal forma de transmissão, ainda não elucidada na EEB, pode representar um grave problema de saúde pública (KONOLD et al., 2013; LACROUX et al., 2008; LIGIOS et al., 2011). A replicação da proteína priônica ectopicamente pode representar uma nova maneira de distribuição da PrP<sup>Sc</sup> no organismo do indivíduo infectado (AGUZZI; NUVOLONE; ZHU, 2013).

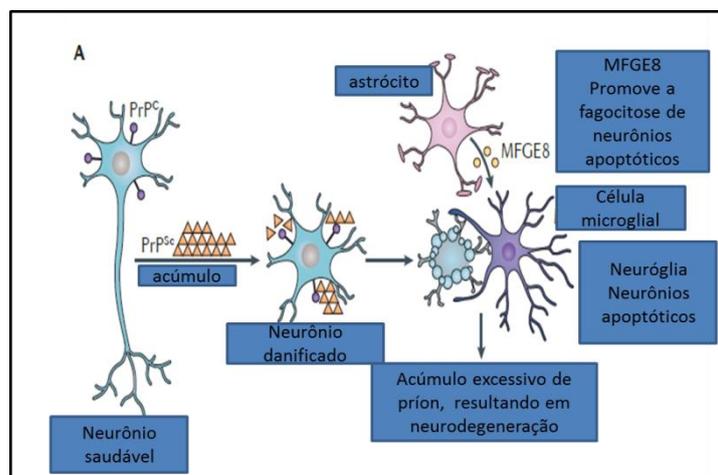
Dessa maneira, pode-se dizer que os componentes da resposta imune têm contribuição na disseminação da PrP<sup>Sc</sup> no organismo hospedeiro (AGUZZI; NUVOLONE; ZHU, 2013). No entanto, receptores Toll-like (TLRs) parecem ter papel importante na contenção dessa disseminação. Em um estudo em que camundongos foram submetidos à supressão de TLRs a patogenia da doença se mostrou mais rápida quando comparada a animais que não foram submetidos à tal supressão (PRINZ et al., 2003).

Na maioria das doenças priônicas a proteína modificada e acumulada nos órgãos secundários linfáticos antes de ocorrer a neuroinvasão (AGUZZI; NUVOLONE; ZHU, 2013). Essas doenças são consideradas linfotrópicas, já as doenças que atingem o SNC sem passar pelo processo nos linfonodos são conhecidas como doenças neurotróficas. Tal nomenclatura está relacionada à estirpe da príon, via de inoculação, as espécies hospedeiras e a sequência do gene que codifica a proteína (BERINGUE et al., 2000).

O período que a proteína leva para se replicar em órgãos periféricos é considerado o período de incubação e pode ser bastante longo, chegando a durar 56 anos em humanos que ingeriram a proteína PrP<sup>Sc</sup> por meio de práticas canibalistas (COLLINGE et al., 2006). Os órgãos linfáticos, como o baço, amígdalas, gânglios linfáticos ou do tecido linfóide associado ao intestino, contêm concentrações elevadas de PrP<sup>Sc</sup> antes da replicação se iniciar no cérebro (BEEKES; MCBRIDE, 2007).

Após a replicação e acúmulo em órgãos linfáticos secundários a proteína priônica atinge o sistema nervoso central. Estudos indicam que o sistema nervoso autônomo é responsável pelo transporte da proteína até o sistema nervoso central. Em modelo experimental, animais que receberam doses da príon, e que tiveram seu sistema simpático retirado, foi constatada a patogênese retardada. A hiperinervação resultou em um menor tempo de incubação da doença. (BONDILOTTI et al., 2010). Uma vez nos nervos atingidos, as partículas proteicas migram, por meio da medula espinhal, até atingir o sistema nervoso central (BARTZ; KINCAID; BESSEN, 2002).

A neuroinvasão permite que a proteína se deposite progressivamente no cérebro o que causa a encefalopatia espongiforme fatal (Figura 17). A manifestação é caracterizada por perda neural e sináptica, vacuolização e neuroinflamação. A neuroinflamação está relacionada à ativação de células imunes do SNC: astrócitos e microglia (AGUZZI; BARRES; BENNETT, 2013). A função da microglia pode ser confirmada quando a depleção dessas células resultou em acúmulo intensificado e aumentado nos tecidos cerebrais (FALSIG et al., 2008). A microglia não é estimulada pela presença da PrP<sup>Sc</sup>, mas sim por neurônios e astrócitos que responderam aos estímulos da proteína (MARELLA; CHABRY, 2004). Uma vez ativada, a população microglial se expande e regula positivamente marcadores e receptores de uma resposta imune não-clássica (LUNNON et al., 2011). Porém a ação da microglia é insuficiente, mesmo após a estimulação do sistema imune com doses de lipopolissacarídeos (HUGHES et al., 2010).



**Figura 17.** Representação esquemática do processo de degeneração neuronal com acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> (AGUZZI et al., 2013).

Os últimos estudos sugerem que os componentes da resposta do sistema imune inato têm maior relevância clínica tanto na resposta periférica quanto na central e, portanto, continuam sendo alvos de novos estudos. A imunoterapia, tanto com anticorpos quanto com componentes da resposta imune inata, representam novas possibilidades de avanço nos estudos relacionados com a imunomodulação e controle imunológico de doenças priônicas (BRADFORD; MABBOTT, 2012).

## **5. DIAGNÓSTICO, ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO**

As EETs em animais, em particular, a dos bovinos, não são passíveis de tratamento, os focos principais relacionados à doença restringem-se a métodos de diagnósticos precoce e precisos, prevenção e controle (BRASIL, 2014).

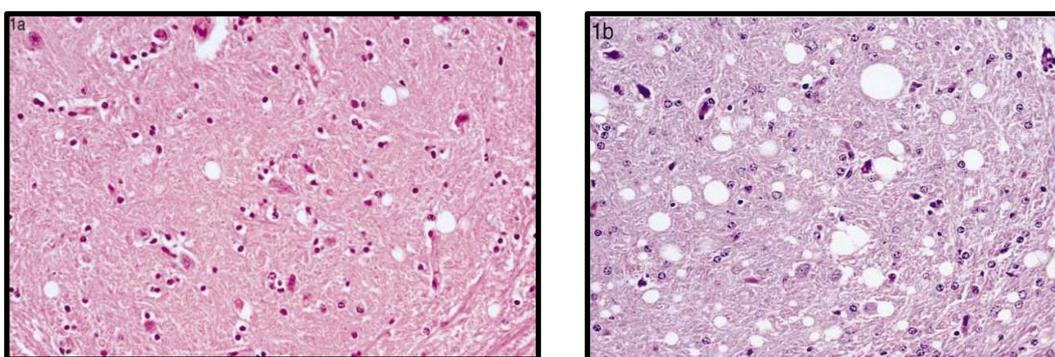
Quanto ao diagnóstico da doença, inicialmente se faz necessário a observação dos sinais clínicos apresentados pelo animal, porém estas análises são de difícil realização, já que animais acometidos pela EEB apresentam quadros comportamentais e sintomatologia muito semelhantes com os que ocorrem em outras enfermidades que acometem o sistema nervoso como a raiva ou intoxicações, como a causada pela toxina do fungo *Claviceps paspali* (BRASIL, 2003).

Animais acometidos pela EEB, inicialmente podem apresentar mudanças de comportamento, apreensão, hiperatividade incluindo dificuldade ao manejo não antes observado, incoordenação de membros posteriores caracterizada por fraqueza, alterações de postura e movimento. Outros sinais clínicos correlacionados à alteração do sistema nervoso são ataxia dos membros posteriores, e especialmente hiperestesia ao toque e ao som. Com a evolução da doença os animais podem apresentar cabeça baixa, pescoço estendido com ouvidos dirigidos caudalmente, ataxia de membros anteriores e ataxia generalizada, o que leva o animal à decúbito, ruminação reduzida, bradicardia e consequente perda de condição corporal com diminuição do peso vivo, fatores que levam à queda da produção (BRASIL, 2003).

Quanto ao diagnóstico laboratorial, são utilizadas técnicas de análises histopatológicas, que identificam lesões característica às EETs e testes confirmatórios

como a imunohistoquímica, ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), *Western Blotting* e, a detecção de fibrilas formadas pela deposição proteica da PrP<sup>Sc</sup> com auxílio da microscopia eletrônica (ARSAC et al., 2007).

As análises histopatológicas consistem na avaliação histológica direta de regiões do sistema nervoso onde pode ocorrer acúmulo da proteína alterada e, geralmente as lesões encontradas são consideradas patognomônicas para EEB. Podem ser visualizados padrões de neurodegeneração, caracterizadas por vacúolos no citoplasma de neurônios em que, no neurópilo, podem ser identificados vacúolos de até 20 micrômetros de diâmetro nos neuritos, estas alterações podem conferir ao tecido, aspecto esponjiforme (Figura 18). Já na região do pericário é possível visualizar vacúolos maiores, que chegam a 30-40 micrômetros de diâmetro. A presença de vacúolos no neurópilo da substância cinzenta e no pericário dos neurônios são os critérios para o diagnóstico positivo de EEB (BRASIL, 2003; GAVIER-WIDÉN et al., 2005).

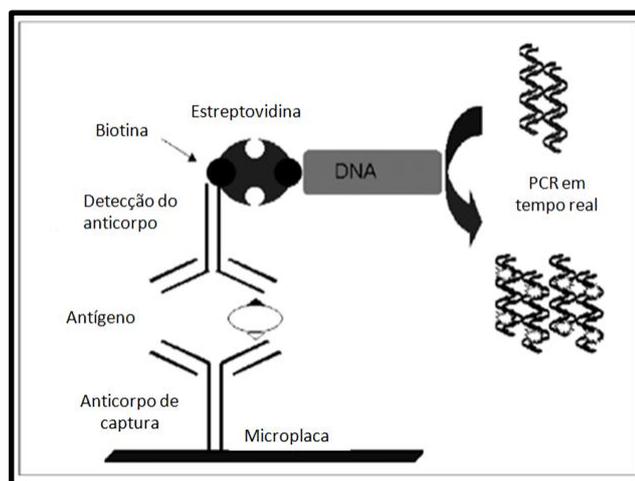


**Figura 18.** Fotomicrografias de uma seção do bulbo olfatório de um animal com EEB. A presença de vacuolização típica no neurópilo no núcleo (Hematoxilina e eosina; 4003). 1a. Vacuolização leve no neurópilo (lesões mínimas). 1b. Vacuolização severa no neurópilo (lesões avançadas). Adaptado de Gavier-Widén et al., 2005.

Quanto à identificação bioquímica da EEB, estão disponíveis testes comerciais como o TeSeE<sup>®</sup> Wb e o AFSSA-Wb, testes de *Western Blotting* e os testes TeSeE<sup>®</sup> ELISA e HerdCheck<sup>®</sup> BSE ambos teste de ELISA, considerados rápidos e de alta sensibilidade, sendo que o teste TeSeE<sup>®</sup> ELISA é considerado importante por possibilitar a distinção dos fenótipos da EEB, fenótipo atribuído à forma clássica da doença, e fenótipos H e L, atribuídos à forma atípica da doença (ARSAC et al., 2007).

Atualmente, uma série de outros testes vem sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar com maior rapidez, sensibilidade e especificidade a proteína priônica alterada, sendo a maioria desses, testes de ELISA e *Western Blotting* (LUKAN; VRANAC; ČURIN ŠERBEC, 2013).

Um método provado ser mais sensível que *Western Blotting* e a Imuno-histoquímica, é a reação em cadeia de imuno-polimerase (iqPCR). O protocolo original explora os benefícios de ambos, o reconhecimento do antígeno específico em ELISA e a amplificação exponencial de DNA na PCR. O antígeno é capturado como no ELISA, seguido pela adição de DNA biotilado. O DNA ligado é então amplificado por PCR. A iqPCR já foi aplicada ao teste de ELISA clássico para detecção da PrP<sup>res</sup> de hamster e em tecidos cerebrais humanos (Figura 19) (GOFFLOT et al., 2005).



**Figura 19.** Diagrama da iqPCR. Adaptado de: Gofflot et al., 2005.

Outro desafio atual frente às EETs, incluindo a EEB, é a inexistência de um diagnóstico *ante-mortem* para a doença (GREENLEE; HAMIR; WEST GREENLEE, 2006). Neste sentido, a análise de animais geneticamente resistentes ou suscetíveis para a doença por meio de PCR e sequenciamento de Sanger, a partir de amostras de sangue, vem auxiliando no sentido de identificar estes animais e utilizá-los ou não em programas de melhoramento genético (GALVÃO et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

- ALESSI, A. C. Atypical BSE in Brazil and world wide. **Brazilian Journal Veterinary**, v. 6(1), n. 1-2, 2013
- ABID, K.; SOTO, C. The intriguing prion disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 63, n. 19-20, p. 2342–51, out. 2006.
- AGUZZI, A.; BARRES, B. A.; BENNETT, M. L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, p. 156–61, 2013.
- AGUZZI, A.; NUVOLONE, M.; ZHU, C. The immunobiology of prion diseases. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 12, p. 888–902, dez. 2013.
- ARSAC, J.-N. et al. Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 5, p. 509–16, nov. 2007.
- BARRIA, M. A.; GONZALEZ-ROMERO, D.; SOTO, C. Cyclic amplification of prion protein misfolding. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 849, p. 199–212, jan. 2012.
- BARTZ, J. C.; KINCAID, A. E.; BESSEN, R. A. Retrograde transport of transmissible mink encephalopathy within descending motor tracts. **Journal of Virology**, v. 76, p. 5759–5768, 2002.
- BAYBUTT, H.; MANSON, J. Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. **Gene**, v. 184, p. 125–131, 1997.
- BEEKES, M.; MCBRIDE, P. A. The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. **FEBS Journal**, v. 23, p. 588-605, 2007.
- BEHRENS, A. et al. Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. **The EMBO journal**, v. 21, n. 14, p. 3652–8, 15 jul. 2002.
- BERINGUE, V. et al. Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 495–502, 2000.
- BIACABE, A.G. et al. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. **EMBO reports**, v. 5, n. 1, p. 110–5, jan. 2004.
- BIACABE, A.G. et al. Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 298–300, fev. 2008.
- BISHOP, M. T. et al. Prion infectivity in the spleen of a PRNP heterozygous individual with subclinical variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Brain**, v. 136, p. 1139–1145, 2013.

BLOKLAND, M. et al. Current trends in mass spectrometry of peptides and proteins : application to veterinary and sports-doping control. **Mass Spectrometry Review**, p. 1-7, 2013.

BOLTON, D. C.; MCKINLEY, M. P.; PRUSINER, S. B. Molecular Characteristics of the Major Scrapie Prion Protein. **Biochemistry**, p. 5898–5906, v. 23, p. 5898-5906, 1984.

BONDILOTTI, G. et al. Changes in sympathetic activity in prion neuroinvasion. **Neurobiology of Disease**, v. 37, p. 114–117, 2010.

BRADFORD, B.; MABBOTT, N. Prion Disease and the Innate Immune System. **Viruses**, v. 4, p. 3389–3419, 2012.

BRAUNMUYH, A. V. ber eine eigenartige heredit/ir-fainili/ire Erkrankung des Zentralnervensystems. **Arch. f. Psychiatr**, v. 191, 419-449, 1954.

BRASIL. Sistema Brasileiro de Certificação Animal. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF, 28 ago. 2014. Disponível em [http://extranet.agricultura.gov.br/primeira\\_pagina/extranet/SISBOV.htm](http://extranet.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/SISBOV.htm)

BRASIL. Nota Número 178. Manutenção do status sanitário brasileiro relativo à Encefalopatia Espongiforme Bovina. **Ministério das Relações Exteriores**. Brasília, DF, 28 mai. 2013. Disponível em <http://www.itamaraty.gov.br/sala-de-imprensa/notas-a-imprensa/manutencao-do-status-sanitario-brasileiro-relativo-a-encefalopatia-espongiforme-bovina>. Acesso em 20 jun. 2013.

BRASIL. Nota Técnica DSA. Encefalopatia Espongiforme no Brasil. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF, 19 dez. 2012. Disponível em: <[http://www.sbm.org.br/docs/nota\\_tecnica\\_dsa\\_159\\_19122012\\_bse\\_no\\_brasil\\_port.pdf](http://www.sbm.org.br/docs/nota_tecnica_dsa_159_19122012_bse_no_brasil_port.pdf)>. Acesso em 20 jun. 2013.

BRASIL. Portaria nº 519, de 9 de dezembro de 1997. Declara o Brasil livre da encefalopatia espongiforme bovina. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF, 9 dez. 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?me>>. Acesso em 20 jun. 2013.

BROWN, D. R.; CLIVE, C.; HASWELL, S. J. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 1, p. 69–76, 2001.

BRUCE, M. E. et al. Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. **Nature**, v. 389, n. 6650, p. 498–501, 1997.

CAMMAROTA, N. et al. Physiology of the Prion Protein. **American Physiological Society**, v.674 p. 673–728, 2008.

- CASALONE, C. et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 3065–70, 2004.
- CAUGHEY, B. Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. **British medical bulletin**, v. 66, p. 109–20, 2003.
- CAZAUBON, S.; VIEGAS, P.; COURAUD, P. Fonctions de la protéine prion PrP<sup>c</sup>. **Medecine/Sciences**, v. 23, p. 741-745, 2007.
- COHEN, F. E. et al. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29 – 231 ): The N terminus is highly flexible. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. December, p. 13452–13457, 1997.
- CHOI, A. H. et al. Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus. **Genomics**, v. 87, n. 5, p. 598–607, 2006.
- CIECHANOVER, A.; BRUNDIN, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. **Neuron**, v. 40, n. 2, p. 427–46, 2003.
- CLAWSON, M. L. et al. Association of a bovine prion gene haplotype with atypical BSE. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1830, 2008.
- COLLINGE, J. et al. Kuru in the 21st century-an acquired human prion disease with very long incubation periods. **Lancet**, v. 367, p. 2068–2074, 2006.
- COLLINGE, J. The Risk of Prion Zoonoses. **Cell Biology**. v. 411, n. 2012, 2014.
- CREUTZFELDT, H. G. Uber eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. **Neut. u. Psych. O.**, p. 1-18, 1920.
- CZARNIK, U. et al. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish Holstein-Friesian cattle. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 1, p. 69–71, 2007.
- DENKERS, N. D. et al. Aerosol transmission of chronic wasting disease in white-tailed deer. **Journal of Virology**, v. 87, p. 1890–2, 2013.
- DIDIER, A. et al. Cellular prion protein in the bovine mammary gland is selectively expressed in active lactocytes. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 54, n. 11, p. 1255–61, 2006.
- DODELET, V. C.; CASHMAN, N. R. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. **Blood**, v. 91, n. 5, p. 1556–61, 1998.

DOETZLHOFER, A. et al. Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 5504–5511, 1999.

DONALDSON, D. S. et al. M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. **Mucosal Immunology**, p. 216–225, 2012.

E, B. J. CUIILLÉ and P.L. CHELLE discover during the thirties the slow virus diseases. **Revue de Médecine Veterinária**, v. 7, p. 575–579, 1990.

ENARI, M.; FLECHSIG, E.; WEISSMANN, C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 9295–9299, 2001.

ERMIAS, D. B. Transmissible spongiform encephalopathies in humans. **Annual Review of Microbiology**, p. 283–314, 1999.

FALSIG, J. et al. A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. **Nature Neuroscience**, v. 11, p. 109–117, 2008.

FREDERICKSON, C. J.; KOH, J.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Neuroscience**, v. 6, p. 449–462, 2005.

GAJDUSEK, D. C.; GIBBS, C. J.; ALPERS, M. Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. **Nature**, v. 209, n. 5025, p. 794–796, 1966.

GAJDUSEK, D. C.; ZIGAS, V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. **The New England Journal of Medicine**, v. 257, n. 20, p. 974–8, 1957.

GALVÃO, C. E. et al. Polymorphisms of intron 1 and the promoter region at the PRNP gene in BSE-free Caracu cattle. **Biochemical Genetics**, v. 50, n. 9–10, p. 657–69, 2012.

GAVIER-WIDÉN, D. et al. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 17, n. 6, p. 509–27, 2005.

GLAYSHER, B. R.; MABBOTT, N. A. Role of the draining lymph node in scrapie agent transmission from the skin. **Immunology Letters**, v. 109, p. 64–71, 2007.

GOFFLOT, S. et al. Immunoquantitative PCR for prion protein detection in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1605–11, 2005.

GREENLEE, J. J. et al. Clinical and pathologic features of H-type bovine spongiform encephalopathy associated with E211K prion protein polymorphism. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38678, 2012.

- GREENLEE, J. J.; HAMIR, A. N.; WEST GREENLEE, M. H. Abnormal prion accumulation associated with retinal pathology in experimentally inoculated scrapie-affected sheep. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 5, p. 733–9, 2006.
- GURGUL, A. et al. Polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish cattle affected by classical bovine spongiform encephalopathy. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 5211–7, 2012.
- HAIGH, C. L.; WRIGHT, J. A; BROWN, D. R. Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the PRNP gene. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 4, p. 915–27, 2007.
- HAIJ, G. N. M. et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **Journal of Cell Science**, v. 120, p.1915-1926 , 2002.
- HARRINGTON, N. P. et al. Prion genotypes of scrapie-infected Canadian sheep 1998-2008. **Canadian journal of veterinary research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v. 74, n. 3, p. 228–32, 2010.
- HARRIS, D. A.; TRUE, H. L. New Insights into Prion Structure and Toxicity. **Neuron**, v. 50, p. 353-357 2006.
- HEATON, M. P. et al. Prevalence of the prion protein gene E211K variant in U.S. cattle. **BMC veterinary research**, v. 4, p. 25, 2008.
- HOLMES, M. C. et al. Cells infected with scrapie and Creutzfeldt – Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** ,v. 104, n. 14, 2007.
- HOLZNAGEL, E. et al. Foodborne transmission of bovine spongiform encephalopathy to nonhuman primates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 712–20, 2013.
- HUANG, F.-P. et al. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. **The Journal of General Virology**, v. 83, p. 267–271, 2002.
- HUGHES, M. M. et al. Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. **Glia**, v. 58, n. 16, p. 2017–30, 2010.
- IMRAN, M. et al. PRNP gene variation in Pakistani cattle and buffaloes. **Gene**, v. 505, n. 1, p. 180–5, 15 ago. 2012.
- IMRAN, M.; MAHMOOD, S. An overview of human prion diseases. **Virology Journal**, v. 8, p. 1–9, 2011.
- JACOBS, J. G. et al. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1821–9, 2007.

- JOHNSON, R. T. Prion diseases. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 10, p. 635–42, 2005.
- JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Basica Junqueira, Carneiro 10ed.pdf**, 2010.
- KIMBERLIN, R. H.; WALKER, C. A. Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. **Virus Research**, v. 12, p. 213–220, 1989.
- KINCAID, A. E. et al. Rapid Transepithelial Transport of Prions following Inhalation. **Journal of Virology**, p. 12731-12740, 2012.
- KOBAYASHI, A. et al. Deciphering the pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 M / V and type 2 abnormal prion protein. **Acta Neuropathologica Communications**, 2013, v. 1, n. 1, p. 1, 2013.
- KONOLD, T. et al. Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. **BMC veterinary research**, v. 9, p. 99, 2013.
- KOVÁCS, G. G. et al. Genetic prion disease: the EURO-CJD experience. **Human Genetics**, v. 118, n. 2, p. 166–74, nov. 2005.
- KÜBLER, E.; OESCH, B.; RAEBER, A. J. Diagnosis of prion diseases. **British Medical Bulletin**, v. 66, p. 267–279, 2003.
- KUJALA, P. et al. Prion uptake in the gut: Identification of the first uptake and replication sites. **PLoS Pathogens**, v. 7, 2011.
- KUMAR, R.; MURALI, P. Modeling and analysis of prion dynamics in the presence of a chaperone. **Mathematical Biosciences**, v. 213, n. 1, p. 50–5, 2008.
- KURSCHNER, C.; MORGAN, J. I. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. **Molecular Brain Research**, v. 30, p. 165–168, 1995.
- LACROUX, C. et al. Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. **PLoS Pathogens**, v. 4, 2008.
- LANIER, L. L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, p. 259–268, 2008.
- LEE, I. Y. et al. Gene Region from Three Mammalian Species Complete Genomic Sequence and Analysis of the Prion Protein Gene Region from Three Mammalian Species. **Genome Research**, v. 8, p. 1022–1037, 1998.
- LEE, J.-H. et al. Discriminant analysis of prion sequences for prediction of susceptibility. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 10, p. e48, 2013.
- LIANG, J. et al. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. **FASEB journal : official publication**

of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 21, n. 9, p. 2247–56, 2007.

LIGIOS, C. et al. Sheep with scrapie and mastitis transmit infectious prions through the milk. **Journal of Virology**, v. 85, p. 1136–1139, 2011.

LIN, Z.; ZHAO, D.; YANG, L. Interaction between misfolded PrP and the ubiquitin-proteasome system in prion-mediated neurodegeneration. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n. 6, p. 477–484, 2013.

LINDEN, R. et al. Physiology of the prion protein. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 673–728, 2008.

LLEWELYN, C. A. et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. **Lancet**, v. 363, p. 417–421, 2004.

LÓPEZ GARCIA, F. et al. NMR structure of the bovine prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8334–9, 2000.

LUGARESI, E. et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 16, p. 997–1003, 1986.

LUKAN, A.; VRANAC, T.; ČURIN ŠERBEC, V. TSE diagnostics: Recent advances in immunoassaying prions. **Clinical and Developmental Immunology**, p. 1-8, 2013.

LUNNON, K. et al. Systemic inflammation modulates Fc receptor expression on microglia during chronic neurodegeneration. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, p. 7215–7224, 2011.

LYCKE, E. 1976 Nobel prize winner in physiology or medicine: Discoveries of new factors for etiology and distribution of infectious diseases. **Läkartidningen**, v. 73, n. 44, p. 3743–6, 1976.

MAHAL, S. P. et al. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. **Gene**, v. 268, p. 105–114, 2001.

MÁLAGA-TRILLO, E. et al. Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. **PLoS biology**, v. 7, n. 3, p. e55, 2009.

MARELLA, M.; CHABRY, J. Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, p. 620–627, 2004.

MARTINS, H. M. et al. Scrapie e seu diagnóstico diferencial em ovinos no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1230–1238, 2012.

MEAD, S. et al. Sporadic--but not variant--Creutzfeldt-Jakob disease is associated with polymorphisms upstream of PRNP exon 1. **American journal of Human Genetics**, v. 69, n. 6, p. 1225–35, 2001.

MIURA, T. et al. Copper reduction by the octapeptide repeat region of prion protein: pH dependence and implications in cellular copper uptake. **Biochemistry**, v. 44, n. 24, p. 8712–20, 2005.

MOORE, R. C. et al. Ataxia in Prion Protein ( PrP ) -deficient Mice is Associated with Upregulation of the Novel PrP-like Protein Doppel. **Journal Molecular Biology**, v. 292, p. 797-817, 1999.

MSALYA, G. et al. Gene and haplotype polymorphisms of the Prion gene (PRNP) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle. **Animal Science Journal = Nihon chikusan Gakkaiho**, v. 80, n. 5, p. 520–7, 2009.

NICHOLS, T. A. et al. Intranasal Inoculation of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) with Lyophilized Chronic Wasting Disease Prion Particulate Complexed to Montmorillonite Clay. **PLoS one**, v. 8, 2013.

NICHOLSON, E. M. et al. Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE. **PloS one**, v. 3, p. 2292, 2008.

OESCH, B. et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, v. 40, p. 735–746, 1985.

OIE. Scrapie. **The World Organisation for Animal Health**. França, Paris, 28 dez. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2010/en\\_chapitre\\_scrapie.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_scrapie.htm). Acesso em 28 ago. de 2014.

OIE. BSE. **immadiate notification repor**. França, Paris, 02 may. REF: OIE 15148. Acesso em 02 mai. de 2014.

OIE. Número de casos notificados de EEB. **The World Organisation for Animal Health**. França, Paris, 28 dez. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-situation-in-the-world-and-annual-incidence-rate/10-13-number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom-copy-1/>. Acesso em 28 ago. de 2014.

OIE. BSE situation in the world and annual incidence rate. **The World Organisation for Animal Health**. França, Paris, 28 dez. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/>. Acesso em 28 ago. de 2014.

OIE. OIE Members Countries´official BSE risk status map. **The World Organisation for Animal Health**. França, Paris, 28 dez. Disponível em:

<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/en-bse-carte/>. Acesso em 28 ago. de 2014.

OIE. List of Bovine Spongiform Encephalopathy Risk Status of Member Countries. **The World Organisation for Animal Health**. França, Paris, 28 dez. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/list-of-bse-risk-status/>. Acesso em 28 ago. de 2014.

PASSET, B. et al. Looking outside the central nervous system. **Landes Bioscience**, v. 7, p. 127–130, 2013.

PERALTA, O. A; EYESTONE, W. H. Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP(C)) expression in bovine somatic tissues. **Prion**, v. 3, n. 3, p. 161–70, 2009.

PERETZ, D. et al. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. **Nature**, v. 412, p. 739–743, 2001.

PETIT, C. S. et al. Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 143, p. 122–32 e15, 2012.

PETIT, C. S. V et al. Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. **Landes Bioscience**, v. 1, p. 1–10, 2013.

POLAK, M. P. et al. Atypical status of bovine spongiform encephalopathy in Poland: a molecular typing study. **Archives of Virology**, v. 153, n. 1, p. 69–79, 2008.

POLAK, M. P.; ZMUDZINSKI, J. F. Distribution of a pathological form of prion protein in the brainstem and cerebellum in classical and atypical cases of bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Journal (London, England : 1997)**, v. 191, n. 1, p. 128–30, 2012.

PREMZL, M. et al. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. **Gene**, v. 314, p. 89–102, 2003.

PREMZL, M. et al. Evolution of Vertebrate Genes Related to Prion and Shadoo Proteins — Clues from Comparative Genomic Analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 2210–2231, 2004.

PRIEMER, G. et al. Biochemical Characteristics and PrP(Sc) Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67599, 2013.

PRINZ, M. et al. Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. **The American Journal of Pathology**, v. 162, p. 1103–1111, 2003.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science (New York, N.Y.)**, v. 216, n. 4542, p. 136–44, 1982.

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M. R. Genetics of prions. **Annual Review of Genetics**, v. 31, p. 139–75, 1997.

PUCKETT, C. et al. Genomic structure of the human prion protein gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 2, p. 320–9, 1991.

RAYMOND, C. R.; AUCOUTURIER, P.; MABBOTT, N. A. In vivo depletion of CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, p. 7758–7766, 2007.

RICHT, J. A; HALL, S. M. BSE case associated with prion protein gene mutation. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000156, 2008.

RIEK, R. et al. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein , raPrP ( 23-231 ). **FEBS Letters**, v. 413, p. 282–288, 1997.

RONGA, L. et al. NMR structure and CD titration with metal cations of human prion alpha2-helix-related peptides. **Bioinorgani Chemistry and Applications**, v. 2007, p. 10720, 2007.

RONGYAN, Z. et al. Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species. **The Journal of Heredity**, v. 99, n. 6, p. 647–52, 2008.

SAEKI, K.; MATSUMOTO, Y.; ONODERA, T. Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 219, p. 47–52, 1996.

SAKUDO, A. et al. Recent Advances in Clarifying Prion Protein Functions Using Knockout Mice and Derived Cell Lines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n. 4, p. 589–601, 2006.

SAKUDO, A.; IKUTA, K. Fundamentals of Prion Diseases and Their Involvement in the Loss of Function of Cellular Prion Protein. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, p. 217–229, 2009.

SALA, C. et al. Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform encephalopathy in France. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 74, jan. 2012.

SALÈS, N. et al. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. **The European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 2464–71, jul. 1998.

SANDER, P. et al. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. **Neurogenetics**, v. 5, n. 1, p. 19–25, 2004.

SCHMITT-ULMS, G. et al. Evolutionary Descent of Prion Genes from the ZIP Family of Metal Ion Transporters. **Plos One**, v. 4, n. 9, 2009.

SCOTT, M. R. et al. Transmission Barriers for Bovine , Ovine , and Human Prions in Transgenic Mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5259–5271, 2005.

SEEGER, H. et al. Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. **Science (New York, N.Y.)**, v. 310, p. 324–326, 2005.

SEUBERLICH, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical Transmissible Spongiform Encephalopathies in Ruminants: A Challenge for Disease Surveillance and Control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 6, p. 823–842, 2010.

SIMMONS, M. M. et al. Experimental classical bovine spongiform encephalopathy: definition and progression of neural PrP immunolabeling in relation to diagnosis and disease controls. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 5, p. 948–63, 2011.

SINGH, N. et al. Prion Protein and Metal Interaction : Physiological and Pathological Implications. **Molecular Biology**, v. 12, p. 99–108, 2013.

SMITH, P. G.; BRADLEY, R. Bovine spongiform encephalopathy ( BSE ) and its epidemiology. **British Medical Bulletin**, v. 66, p. 185–198, 2003.

SOTO, C. Prion Hypothesis : The end of the Controversy ? **Trends Biochemical Science**, v. 36, n. 3, p. 151–158, 2012.

SOTO, C.; ESTRADA, L.; CASTILLA, J. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. **Trends in biochemical sciences**, v. 31, n. 3, p. 150–5, 2006.

STEELE, A. D. All quiet on the neuronal front: NMDA receptor inhibition by prion protein. **The Journal of cell biology**, v. 181, n. 3, p. 407–9, 2008.

SPIELMEYER, W. Die histopathologische forschung in der psychiatrie. *Klinische wochenschrift*, v. 37, n 120-123, 1922.

STEWART, P. et al. Genetic predictions of prion disease susceptibility in carnivore species based on variability of the prion gene coding region. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50623, 2012.

TAJIMA, Y. et al. Creutzfeldt-Jakob Disease with a Codon 210 Mutation: First Pathological Observation in a Japanese Patient. **Internal Medicine**, v. 53, n. 5, p. 483–487, 2014.

THOMSON, J. M. et al. The identification of candidate genes and SNP markers for classical bovine spongiform encephalopathy susceptibility. **Prion**, v. 6, n. 5, p. 461–9, 2012.

TRIHARHOU, L. C. Alfons Maria Jakob ( 1884 – 1931 ), Neuropathologist par Excellence. **Scientific Endeavors in Europe and the Americas**, v. 61, p. 52–58, 2009.

VACCARI, G. et al. State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. **Veterinary research**, v. 40, n. 5, p. 48, 2009.

VIVIANA, Z. et al. Review article Physiological role of the cellular prion protein. **Veterinary Research**, v. 39, p. 1-169, 2008.

WATT, N. T. et al. Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. **Nature communications**, v. 3, p. 1134, 2012.

WATTS, J. C.; WESTAWAY, D. The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1772, n. 6, p. 654–72, jun. 2007.

WELLS, G. et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Veterinary Record**, v. 121, n. 18, p. 419–420, 1987.

WESTAWAY, D. et al. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 14, p. 6418–22, 1994.

WESTERGARD, L.; CHRISTENSEN, H. M.; HARRIS, D. A. Role in Disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 6, p. 629–644, 2007.

WILESMITH, J. W. et al. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. **The Veterinary Record**, v. 638-644, 1988.

WÜTHRICH, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules. **Nobel Lecture**, p. 235–267, 2002.

XANTHOPOULOS, K. et al. Species and strain glycosylation patterns of PrPSc. **PLoS one**, v. 4, n. 5, p. 5633, 2009.

XUE, G. et al. The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (PRNP) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. **PLoS one**, v. 7, n. 3, p. e32870, 2012.

YAMAKAWA, Y. et al. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 56, n. 5-6, p. 221–2, 2003.

YU, G. et al. Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats. **The Journal of general virology**, v. 87, p. 1019–27, 2006.

YUSA, S. et al. Cellular prion protein: from physiology to pathology. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 3109–31, 2012.

ZAHN, R. et al. NMR solution structure of the human prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 145–50, 2000.

ZAITSEV, I. V et al. The prion dilemma confounding science educators.  
**F1000Research**, v. 2, p. 4, 2013.

**ARTIGO 1: Re Submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira com correções exigidas pela revista. (Texto redigido conforme exigências de formatação da revista Pesquisa Veterinária Brasileira)**

**Polymorphisms in the Prion Protein Gene of Cattle Breeds from Brazil**

**Cristiane C. Sanches<sup>1</sup>, Grácia M. S. Rosinha<sup>2</sup>, Cleber E. Galvão<sup>1</sup>, Gelson L. D. Feijó<sup>2</sup>, Flávio R. Araújo<sup>2</sup> & Cleber O. Soares<sup>2</sup>**

**ABSTRACT** Sanches C. C., Rosinha G. M. S., Galvão C. E., Araújo F. R. & Soares C. O. 2014 [Polymorphisms in the Prion Protein Gene of Cattle Breeds from Brazil] One of the alterations that occur in the *PRNP* gene in bovines is the insertion and/or deletion (indel) of base sequences in specific regions, such as indels of 12 base pairs (bp) in intron 1 and of 23 bp in the promoter region. The deletion allele of 23 bp is associated with susceptibility to BSE as well as the presence of the deletion allele of 12 bp. In the present study, the variability of nucleotides in the promoter region and intron 1 of the *PRNP* gene was genotyped for the Angus, Canchim, Nelore and Simmental bovine breeds to identify the genotype profiles of resistance and/or susceptibility to BSE in each animal. Genomic DNA was extracted for amplification of the target regions of the *PRNP* gene using polymerase chain reaction (PCR) and specific primers. The PCR products were submitted to electrophoresis in agarose gel 3% and sequencing for genotyping. With the exception of the Angus breed, most breeds exhibited a higher frequency of deletion alleles for 12 bp and 23 bp in comparison to their respective insertion alleles for both regions. These results represent an important contribution to understanding the formation process of the Brazilian herd in relation to bovine *PRNP* gene polymorphisms.

**INDEX TERMS:** Bovine spongiform encephalopathy, *PRNP*, prion, indel, Brazilian bovine

**RESUMO** – [ Polimorfismos no gene da proteína príônica em raças bovinas no Brasil.] Uma das mudanças que ocorrem no gene *prnp* em bovinos é a inserção e/ou deleção de sequências de bases, em determinadas regiões como, por exemplo, as indels de 12 pares de bases (pb) no íntron 1 e 23pb na região promotora. O alelo de deleção de 23pb está relacionado com a suscetibilidade à EEB, assim como a presença do alelo de deleção de 12pb. Neste estudo genotipou-se a variabilidade de nucleotídeos da região promotora e íntron 1 do gene *prnp* em bovinos das raças Angus, Canchim, Nelore e Simental para identificar os perfis genotípicos de resistência e/ou suscetibilidade à EEB de cada animal. Realizou-se a extração de DNA genômico para amplificação das regiões alvo do gene *prnp* por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando-se primers específicos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% para a realização da genotipagem. Neste estudo, a maioria das raças, com exceção da raça Angus, apresentaram maiores frequências do alelo de deleção tanto para 12 como 23pb, em comparação com seus respectivos alelos de inserção, para as duas regiões. Esses resultados abrem caminhos para o conhecimento de como o rebanho brasileiro está sendo formado com relação aos polimorfismos do gene *prnp* bovino.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Encefalopatia espongiforme bovina, PRNP, príon, indel, Bovinos brasileiros.

## INTRODUCTION

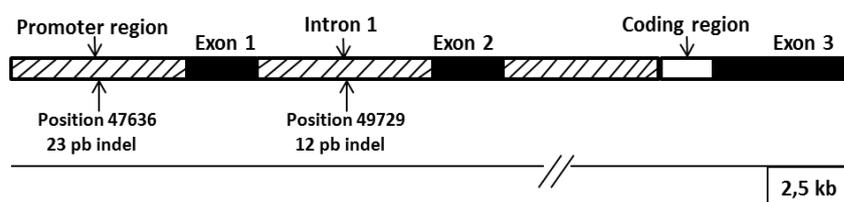
Bovine spongiform encephalopathy (BSE), also known as mad cow disease, is a zoonosis that is part of the transmissible spongiform encephalopathy group (TSEs) (Czarnik et al. 2007). The first cases of BSE occurred in 1985 in dairy cattle supplemented with animal origin protein (Wells et al. 1987).

Spongiform encephalopathy remains an issue of great importance to public health due to the discovery of a variant of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). Efforts have been made to understand the epidemiology of BSE and discover whether this disease breaks through the inter-species barrier and can affect humans, since BSE is capable of causing illness resembling vCJD in primates (Holznagel et al. 2013).

PrP<sup>Sc</sup> is an infectious protein and causal agent of several TSEs, such as CJD in humans, BSE in bovines and Scrapie in sheep and goats (Prusiner 1998). The modified protein is toxic to the nervous system and may gradually deposit in the brain causing a fatal spongiform encephalopathies, nervous tissue it causes neuronal loss, abnormal synapse evolving to vacuolization, neuroinflammation and deposition of amyloid fibrils (Aguzzi, Nuvolone & Zhu 2013)

PrP<sup>C</sup> is a normal protein that synthesized from the *PRNP* gene. In cattle, the *PRNP* gene is on chromosome 13 in the position Q17 BTA, being a single copy gene with about 2,5 kilobases (kb) containing three exons, the exon encoding the last ORF (open reading frame). The first intron is described for supporting the action of the promoter region and exon 1 contrast can be associated with suppressive activity than the promoter region (Haigh, Wright & Brown 2007).

There is evidence of polymorphic changes in the *PRNP* gene and the risk of the development of transmissible encephalopathies in sheep, humans, deer and mice (Moreno et al. 2003). Such evidence is currently being studied in bovines. A number of polymorphisms have been described and are associated with genotypes in which animals have a lower risk of developing BSE (Sander et al. 2004). The structure of the gene and the major polymorphisms in / del shown in Figure 1.



**Figure. 1.** Diagram illustrating the structure of the gene *PRNP* gene in cattle with approximately 2.5 kb. Description of two major polymorphisms in / del indicated by arrows. Representation of the three exons illustrated by black bars and the coding region shown by the white bar.

BSE is divided into the classic and atypical types. The development of classic BSE may be associated with the incorporation of meat and bone meal containing PrP<sup>Sc</sup> into the bovine diet (Konold et al. 2012).

One of the alterations that occur in the *PRNP* gene in bovines is the indel of base sequences in determined regions, such as the indels of 12 base pairs (bp) in intron 1, 23 bp in the promoter region, 14 bp in the 3' non-translated region (3' UTR) and 24 bp in the region of repeated octapeptides.

The most relevant are indels of 23 bp and 12 bp (Sander et al. 2004). The deletion allele of 23 bp in the promoter region, localized in the region 47636 pb of gene, is associated with a greater risk of the development of susceptibility to BSE. Another genetic factor that may be associated with the possible development of classic BSE is the presence of the deletion allele of 12 bp in intron 1, localized in the region 49729 pb of gene (Sander et al. 2005, Juling et al. 2006).

The aim of the present study was to genotype the variability of the nucleotides (indels) in the promoter region and intron 1 of the *PRNP* gene in the Angus, Canchim, Nelore and Simmental bovine breeds to identify the genotype profiles of resistance and/or susceptibility to BSE in each animal.

## MATERIALS AND METHODS

**Samples.** For the analyzes of 102 animal breeds of Zebu, European and Brazilian origin were genotyped. Through the Embrapa Beef Cattle breeding program (GENEPLUS) (<http://www.geneplus.com.br/>) were selected and used 34 breeders Nellore, Zebu breed of Indian origin (*Bos indicus taurus*), 26 Angus breeders, European breed of Scottish origin (*Bos taurus taurus*), 25 Simmental animals, European breed of Swiss origin (*Bos taurus taurus*) and 17 animals Canchim breed in Brazil formed by breeding Charolais breed with zebu breeds (Nellore, Guzera and Indubrasil). Samples of animals from different farms were used in the experiment. These animals have a low degree of kinship ie, coefficient of inbreeding (Fi) between 0% and 9%, obtained by routines developed in MATLAB.

**DNA Extraction.**The method described by Olerup & Zetterquist (1992) was used to extract genomic DNA from leucocytes of animals breeds Angus, Simmental, Canchin and nine animals Nellore. The method described by Zadworny & Kuhnlein (1990) was used to extract genomic DNA from semen samples from 25 animals Nellore.

**Integridade do DNA extraído.**The purity of the total DNA from the samples was verified by electrophoresis in agarose gel 0.8% (Promega®) stained with SYBR Gold (Invitrogen®) before being analyzed under ultraviolet light in a transluminator (Transluminator Loccus Biotecnologia®) and photographed with a digital camera using the L. PIX software program (Loccus Biotecnologia®). The concentration was determined in a spectrophotometer (NanoDrop®).

**Design of primers and amplification of target regions.** Specific primers previously described by (Galvão et al., 2012) were used for the detection of the 12-bp indel (prnpBovin12F: 5' – GGT AAA TAG CCG CGT AGT CCT T – 3'; prnpBovin12R: 5' – TCG CCC TTG TTC TTC TGA GC – 3'), amplifying a sequence of 400 bp, and for the detection of the 23-bp indel (prnpBovin23F: 5' – TCC TCT TGG GAC TTC TTA AGC CAG GTA – 3'; prnpBovin23R: 5' – AAG GCA ATA TAG TTC GTG AGG GTT TGA G – 3'), amplifying a sequence of 393 bp.

The target regions of the *PRNP* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using from 40 to 60 ng of DNA per reaction of 22 µL, containing buffer 10X, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM of dNTPs, 5 pmol of each primer and one unit of *Taq* DNA polymerase (CenBiot®). This was done using specific primers for the analyses of mutations (insertion/deletion) that occurred in the bovine *PRNP* gene in association with 12 bp and 23 bp. Amplification was performed at 94 °C for 5 minutes for the initial denaturation, 34 cycles of 45 seconds at 94 °C for denaturation, 58 °C and 60 °C for 45 seconds for primer annealing associated with indel 12 and indel 23, respectively, 72 °C for 2 minutes for extension, as well as 72 °C for 5 minutes for the final extension.

**Genotyping.**The PCR products were submitted to electrophoresis in agarose gel (Promega®) at a concentration of 3%. The standard base pair used was 1 Kb plus Ladder (Invitrogen®) to aid in the visualization of the height of the bands that resulted from the PCR amplification of the target areas. The gels were submitted to ultraviolet light in a transluminator (Transluminator Loccus Biotecnologia®) to visualize the amplification and then photographed with a digital camera with the aid of L. PIX software program (Loccus Biotecnologia®). In the analyses of the gels, animals were classified as homozygous animals with bp insertion bp, homozygous with bp deletion and heterozygous for the indel 12 and indel 23 regions. Once the genotypes of each animal had been obtained, haplotypes and diplotypes were determined.

**DNA Sequencing.** The amplification products were purified with Qiaex II (Qiagen®) kit .The amplicons were sequenced in a ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), using 2 µl of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (RR-100, Applied Biosystems®), 30 to 45 ng of template DNA and 3,2 pmol of each primer for a final volume of 10 µl.

**Statistical Analysis.**With the results of the agarose gel analysis, the genotype and allele frequencies were calculated and submitted to the Hardy-Weinberg equilibrium test to determine if the allele frequency remained constant over a number of generations. The chi-square and Fisher's test was used to compare the degree of significance between the genotype and allele frequencies of the breeds. were determined for diplotypes and haplotypes. Haplotypes were compared using the

linkage disequilibrium test ( $D'$ ) (Lewontin, 1988) to analyze the degree of dependency between haplotypes and the correlation test ( $r$ ) to assess the degree of mutual relation between the two polymorphic regions that formed the haplotypes.

At times, the quantity of diplotypes from the Simmental, Canchim and Angus breeds had to be estimated to enable the calculation of their frequencies. These diplotypes came from animals that had double heterozygote genotypes, which means ins/del in both polymorphic regions consecutively. The estimates were obtained using conditional probability ( $P$ ) and the concrete numbers of each haplotype to assign the respective frequencies, as follows:  $P(12ins.23del) = n/N$ , in which "n" is the concrete value of the number of animals with this haplotype and "N" is the concrete sum of all haplotypes. The same calculation was made for other haplotypes:  $P(12del.23ins)$ ;  $P(12del.23del)$ ;  $P(12ins.23ins)$ . With the results from the haplotype frequencies, the estimated diplotype values were obtained for the animals conditioned to the double heterozygote genotype, as follows:

$$P(12ins.23ins/12del.23del) = \frac{(P(12ins.23ins) \times P(12del.23del)) \times 2}{P(12ins.23del) \times P(12del.23del) \times 2 + (P(12ins.23del) \times P(12del.23ins)) \times 2}$$

From this point forward, it was possible to calculate the conditional probability of diplotype 12ins.23del/12del.23ins by subtracting the value found in  $P(12ins.23ins/12del.23del)$  from 100. With the principle of chromosome distribution ( $n+n=2n$ ), it was possible to estimate how many haplotypes came from the diplotypes of these double heterozygote animals.

All calculations were performed with the aid of an electronic calculation spreadsheet *in silico*.

## RESULTS

Figure 2 illustrates the agarose gel electrophoresis (Promega®) 0.8% gel, stained with SYBR Gold (Invitrogen), analyzed under UV light transilluminator (Transluminator Loccus Biotecnologia®) to check the purity and integrity of the genetic material. The extracted DNA obtained showed satisfactory integrity, with concentrations 40-60 ng of DNA and 260/280 absorbance values 260/280 ranging between 1.8 and 2.0 recorded by spectrophotometer (NanoDrop®).

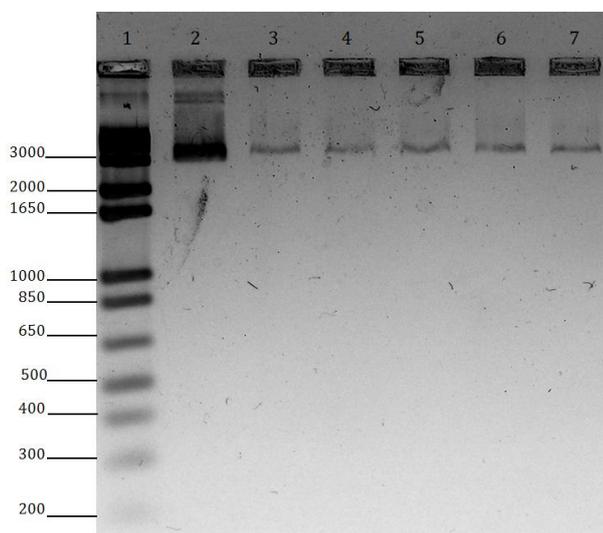


Figure 2 - Representative gel. Electrophoretic profile in 0.8% agarose gel to visualize the integrity of DNA extracted and used in PCR. 1 = 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen, molecular weight standard; Sample 2 = 100 ng Lambda DNA, standard molecular concentration; 3 to 7 Samples of bovine DNA.

The pairs of primers used in the PCR to amplify the polymorphic regions performed well. Therefore, it was possible to distinguish homozygous animals with insertion, homozygous animals with deletion and heterozygous animals for intron 1 (12-bp indel) and the promoter region (23-bp indel). Figure 3 displays the electrophoresis profile in agarose gel 3% of the PCR quality where the formation of bands per fragments occurred, which were amplified by 400 and 393, respectively, for

the 12-bp and 23-bp regions. The bands formed at a height of about 400 bp, depending on the base pair marker. The presentation of the bands formed in the agarose gel was applied to the 12-bp indel and 23-bp indel, figure 3 displays the genotype differences in both regions.

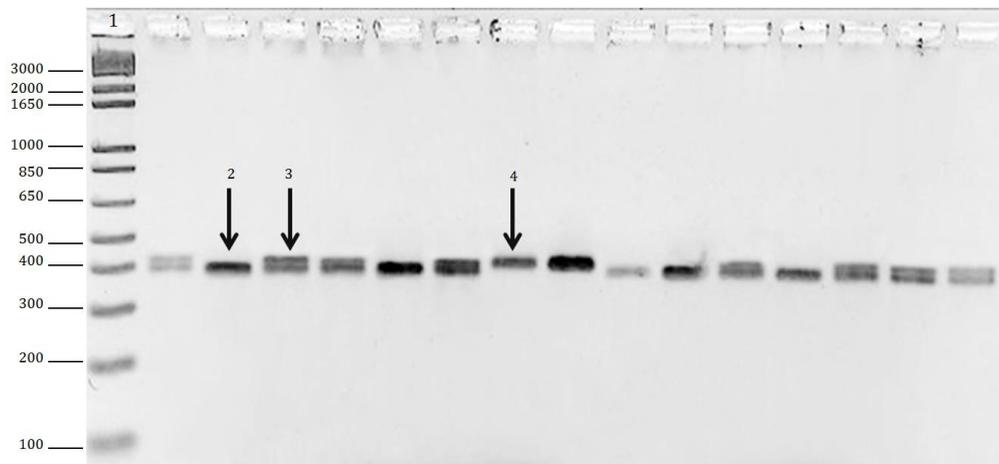


Figure 3 - Electrophoresis profile in agarose gel 3% of PCR of the bovine PRNP gene; 1 = base pair standard; 2 = characteristic band of homozygous animal with bp deletion; 3 = characteristic band of heterozygous animal; 4 = characteristic band of homozygous animal with bp insertion.

Through sequencing, it was possible to confirm the genotypic profile observed in each animal by detecting regions of the PRNP gene in which there were indels in intron 1 (12 bp indel) and in the promoter region (23-bp indel) (Figure 4 and Figure 5).

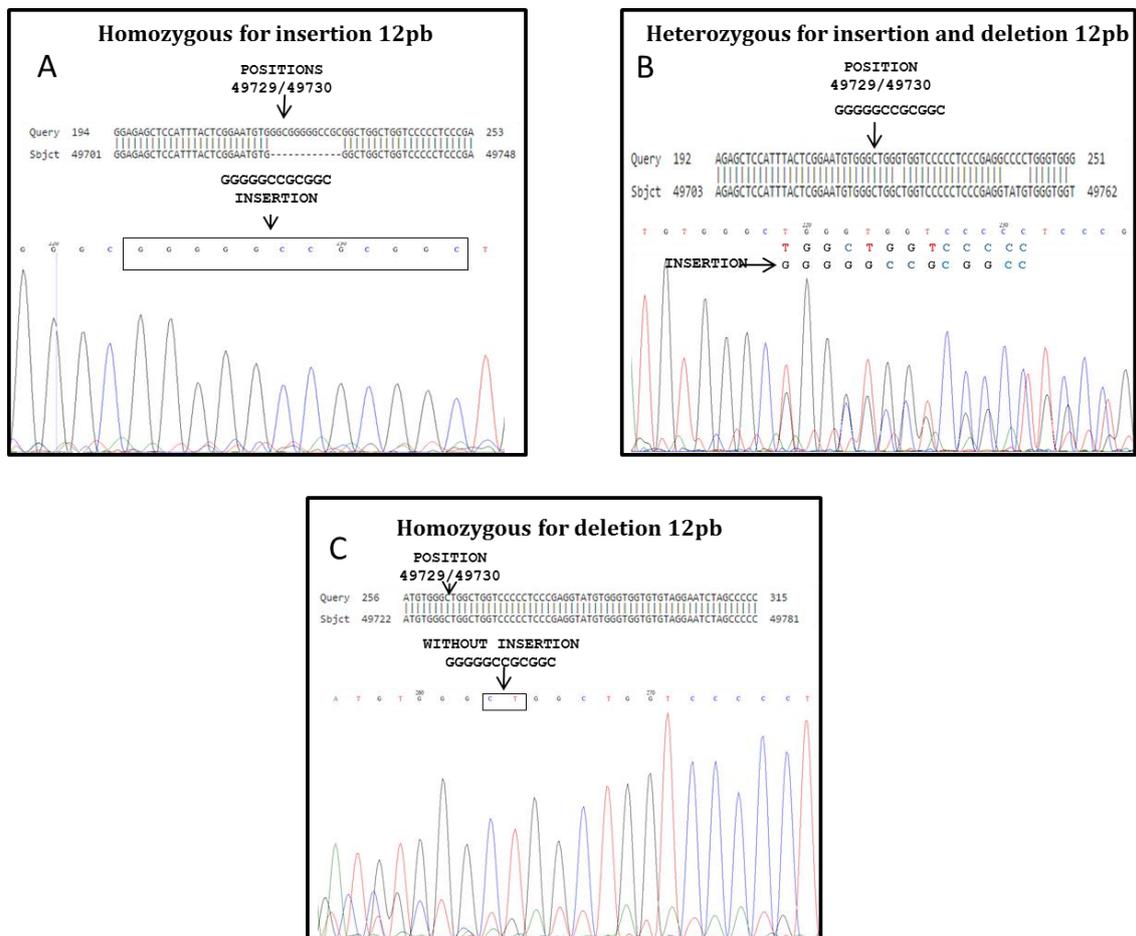


Figure 4 – Representative electropherogram. Comparison between polymorphisms in a specific region of the PRNP gene. Alignments made from the PRNP gene AJ298878 access of cattle and deposited in GenBank under electropherograms representing the same region. A) Bovine homozygote, with insertion of 12 bp for both alleles. B) Bovine heterozygote, with the arrows indicating the position of the 12 bp deletion in one allele sequence and insertion of 12 bp on the other allele. C) Bovine homozygous with 12 bp deletion in both alleles.

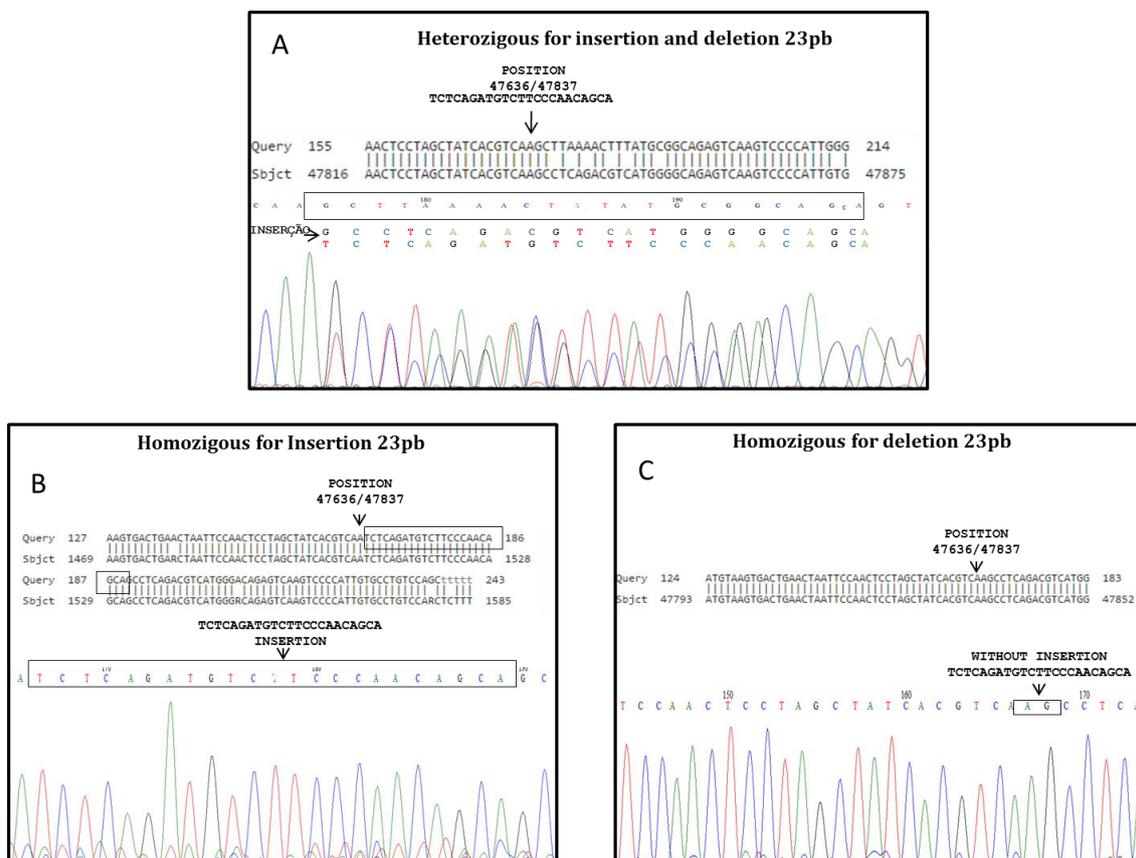


Figure 5 - Representative electropherogram. Comparison between polymorphisms in a specific region of the PRNP gene. Alignments made from the PRNP gene AJ298878 access of cattle and deposited in GenBank under electropherograms representing the same region. A) Bovine homozygote, with insertion of 23 bp for both alleles. B) Bovine heterozygote, with the arrows indicating the position of the 23 bp deletion in one allele sequence and insertion of 23 bp on the other allele. C) Bovine homozygous with 23 bp deletion in both alleles.

The genotype and allele frequencies were calculated using the analysis of the electrophoresis profile of each animal in agarose gel and sequencing for both polymorphic regions (Table 1). No significant differences among breeds were found regarding intron 1 (12-bp indel;  $P > 0.01$ , chi-square test), whereas significant differences among breeds were found in the promoter region ( $P < 0.01$ ). All breeds were in Hardy-Weinberg equilibrium for both regions ( $P > 0.05$ ). Likewise, no significant differences among breeds were found regarding alleles of intron 1 ( $P > 0.01$ ), whereas significant differences among breeds were found regarding alleles of the promoter region ( $P < 0.01$ ).

Genotype frequencies of 97.06% were found for haplotype 23 del/del in the Nellore breed. Allele frequencies of 79.41% were found for the 12 del in the Canchim Breed and frequencies of 80.77%, 79.41% and 98.53% were found for the 23 del in the Angus, Canchim and Nellore breeds, respectively (Table 1).

**Table 1: Genotype and allele frequencies of the indel PRNP of 12 and 23 bp**

Breeds (n) <sup>a</sup>	Angus (26)	Canchim (17)	Nellore (34)	Simental (25)
<b>Genotype Frequencies</b>				
12 bp (400/412 bp) <sup>b</sup>				
ins/ins	26.92%	0%	11.76%	12%
del/del	19.23%	58.82%	35.29%	28%
ins/del	53.85%	41.18%	52.94%	60%
H-WE <sup>d</sup> (P) <sup>f</sup>	0.18 (> 0.05)	1.14 (> 0.05)	0.50 (> 0.05)	3.12 (> 0.05)
X <sup>2</sup> e (P)	11.58 (> 0.05)	P $\cong$ 1	P=0,71	P=0,42
23bp (393/416bp) <sup>c</sup>				
ins/ins	7.69%	5.88%	0%	8%
del/del	69.23%	64.71%	97.06%	40%
ins/del	23.08%	29.41%	2.49%	52%
H-WE (P)	1.72 (> 0.05)	0.17 (> 0.05)	0.01 (> 0.05)	0.63 (> 0.05)
X <sup>2</sup> (P)	23.73 (< 0.05)	P=0,20	P $\cong$ 1	P=0,66
<b>Allele Frequencies</b>				
12bp				
Ins	53.85%	20.59%	38.24%	42%
Del	46.15%	79.41%	61.76%	58%
X <sup>2</sup> (P)	9.64 (> 0.01)			
23bp				
ins	19.23%	20.59%	1.47%	34%
del	80.77%	79.41%	98.53%	66%
X <sup>2</sup> (P)	22.19 (< 0.01)			

<sup>a</sup> Number of animals from each breed; <sup>b</sup> size of fragment amplified in intron 1 (400 are fragments with deletion of nucleotides and 412 are fragments with insertion of nucleotides), <sup>c</sup> size of fragment amplified in promoter region (393 are fragments with deletion of nucleotides and 416 are fragments with insertion of nucleotides), <sup>d</sup> Hardy-Weinberg equilibrium test, <sup>e</sup> chi-square test, <sup>f</sup> significance level.

With the genotype data for each animal, it was possible to understand the formation of diplotypes and calculate the respective frequencies (Table 2). The numbers of estimated diplotypes from animals with double-heterozygote genotypes are displayed in Table 2.

**Table 2: Frequency of diplotypes of indel PRNP of 12 and 23 bp**

Breeds (2n) <sup>a</sup>	Angus (26)			Canchim (17)			Nelore (34)			Simental (25)		
	O <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>	F% <sup>d</sup>	O	E	F%	O	E	F%	O	E	F%
12del.23del/12del.23del	3	0	12	5	0	29	12	0	35.29	5	0	20
12ins.23del/12ins.23del	4	0	15	0	0	0	3	0	8.82	1	0	4
12ins.23ins/12ins.23del	2	0	8	0	0	0	1	0	2.94	1	0	4
12ins.23del/12del.23del	11	0	42	9	0	53	18	0	52.94	4	0	16
12ins.23ins/12ins.23ins	1	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	4
12del.23ins/12del.23ins	1	0	4	1	0	5.9	0	0	0	1	0	4

12del.23ins/12del.23del	1	0	4	1	0	5.9	0	0	0	1	0	4
12ins.23ins/12del.23del	0	2	8	0	0	0	0	0	0	0	7.5	30
12ins.23del/12del.23ins	0	1	4	0	1	5.9	0	0	0	0	3.5	14

<sup>a</sup> Chromosome pairs with diplotypes; <sup>b</sup> Observed chromosome pairs; <sup>c</sup> chromosome pairs estimated based on conditional probability test for animals with double heterozygous genotypes; <sup>d</sup> percentage frequency

Table 3 displays the data obtained from the frequency of haplotypes for each breed and the estimated number of haplotypes. The estimates came from the diplotypes of double-heterozygous animals.

**Table 3: Frequency of haplotypes of indel PRNP of 12 and 23 bp**

Breeds (n) <sup>a</sup>	Angus (52)			Canchim (34)			Nelore (68)			Simental (50)		
	O <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>	F% <sup>d</sup>	O	E	F%	O	E	F%	O	E	F%
12del.23del	18	2	38.5	20	0	58.8	42	0	61.76	15	7.5	45
12ins.23del	21	1	42.3	6	1	20.6	26	0	38.24	7	3.5	21
12ins.23ins	4	2	11.5	0	0	0	0	0	0	3	7.5	21
12del.23ins	3	1	7.7	6	1	20.6	0	0	0	3	3.5	13
D <sup>e</sup>	0.1319			1			0			0.3408		
r <sup>f</sup>	0.0596			0,260			0			0.2874		

<sup>a</sup> Number of chromosomes with haplotypes; <sup>b</sup> observed chromosomes; <sup>c</sup> chromosomes estimated from pairs of chromosomes for animals with double-heterozygous genotype, <sup>d</sup> percentage frequency, <sup>e</sup> linkage disequilibrium, <sup>f</sup> correlation.

**Table 4: Comparison between the genotype frequencies observed the PRNP 12 and PRNP 23 between breeds**

	PRNP 12	Angus	Canchin	Nellore	Simental
PRNP 23					
Angus		-	10,95*	4,99	5,36
Canchin		0,77	-	6,23*	6,59*
Nellore		15,57**	11,78**	-	0,64
Simental		14,30**	11,79**	23,00**	-

\*Genotypic frequencies differ (P<0,05)

\*\*Genotypic frequencies differ (P<0,01)

## DISCUSSION

The electrophoresis in 3% agarose gel of the PCR amplification product of the target regions studied is an important tool for the detection of genotypes of interest. Through visualization the difference in molecular weight of the fragments in agarose gel 3% was possible to identify the insertion and / or deletion of 12 or 23pb and the determination of homozygous genotypes correlated with resistance and BSE (ins / ins), homozygous correlated with susceptibility susceptible to BSE (del / del) and heterozygous (ins / del (Figure 3). Identical information about the genotypic profile of the samples were observed in electropherograms obtained by sequencing, which highlights the efficiency and reliability of PCR and electrophoresis on 3% agarose gel for genotyping and analysis of polymorphisms in these regions of the PRNP gene (Figure 4 e Figure 5). Genotyping can also be performed by real-time PCR (Jor, Myrmel & Jonassen 2010) or even by means of mass spectrometry (Nakamitsu et al. 2006, French et al. 2007), however these methods show is expensive when compared to conventional PCR coupled with agarose gel electrophoresis and these techniques have equivalent efficiency to conventional PCR and Sanger sequencing.

The insertion genotypes for 12b p in intron 1 and 23 bp in the promoter region are of considerable importance. The Angus breed had the highest frequency of the insertion genotype for 12 bp. The Canchim breed exhibited a high frequency of the deletion genotype of 12 bp. Regarding the indel region of 23 bp, the Angus, Canchim and Nellore breeds exhibited high frequencies of the deletion genotype (Table 1).

Tests with the gene containing the indels of 12 bp and 23 bp were performed *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* test showed that the cells containing the deletion genotype, particularly 23 bp, expressed PrP<sup>Sc</sup> in high quantities. In the *in vivo* test performed with calves, high expression of the protein was found in the intestinal lymph nodes (Sander et al. 2005).

Dairy cattle from Vietnam have exhibited a high frequency of the homozygous genotype of deletion for 23 bp in the promoter region. This country imports meat and bone meal for feeding dairy cattle (Muramatsu et al. 2008). Konold et al. (2012) demonstrated that cattle exposed to meal containing the brain stem of animals infected with BSE develop the disease. Bovines from Turkey have a high frequency of the heterozygous 23-bp genotype and the 12-bp insertion genotype (Un et al. 2008). The heterozygous genotypes for 23 bp and 12 bp were the most frequent in a study with Holstein-Friesian bovines from Poland (Czarnik et al. 2011). Thus, 23-bp alterations in the promoter region of the gene and 12-bp alterations in intron 1 may be important, as these are considered regulatory sites responsible for the negative feedback of the expression of the prion protein in cattle (Xue et al. 2012)

The deletion alleles of 12 bp and 23 bp are in the intron 1 and promoter region, respectively, and are associated with susceptibility to the development of BSE. This was proven when a study was made with bovine breeds from Germany and Switzerland comparing healthy and sick animals with BSE (Haase et al. 2007).

In the present study, only the Angus breed had a higher frequency for the 12ins allele (53.85%) than 12del allele (46.15%) (Table 1). The opposite occurred in another study with the Angus breed, in which a higher frequency was found for the 12del allele (56%) and a lower frequency was found for the 12ins allele (44%) (Kerber et al. 2008). In the analysis of the promoter region, the four breeds exhibited higher frequencies for the 23del allele in comparison to the 23ins allele. A frequency of 98.53% was found for the 23del allele in the Nellore breed (Table 1).

The Kuchinoshima breed of Japanese origin, has exhibited a frequency of 100% for the 12del and 23del alleles (Msalya et al. 2009). The Holstein-Friesian breed from Poland has exhibited a frequency of 53.3% for the 12del allele and 63.6% for the 23del allele (Strychalski et al. 2012). A number of bovines from Slovakia affected by BSE were compared to healthy animals, but no significant differences were found between the frequencies for the deletion alleles in intron 1 and the promoter region: healthy animals exhibited 63.6% for 23del and 56.5% for 12del; animals stricken by the disease exhibited 70.8% for 23del and 64.6% for 12del. High frequencies of heterozygous genotypes were found for both regions in this particular study (Hreško et al. 2009). Bovines of Pakistani breeds have exhibited a high frequency of the 12ins allele (94.07%) (Imran et al. 2012). Another bovine representative, the mithun (*Bos frontalis*), which is the domesticated form of the Asian gaur, has exhibited high allele frequencies of 12ins (77%) and 23ins (82%) (Shimogiri et al. 2010). The Anatolian buffalo (*Bubalus bubalis*) has also exhibited high allele insertion frequencies: 86% for and 92% for 23ins (Oztabak et al. 2009).

The Nellore breed is of Indian origin (*Bos indicus*) and differs from the Angus and Simmental breeds, which that have a European origin (*Bos taurus*). A comparative study of these polymorphisms in the *PRNP* gene revealed that *Bos indicus* exhibits a higher frequency of the 23del allele (88%) than *Bos taurus* (62%) (Brunelle et al. 2008). According to Brunelle et al. (2008), the origin of these polymorphisms may be Indian cattle, since these animals enter the training or breeding programs of some European breeds. However, a study has demonstrated that the European Bison (*Bison bonasus*), which also belongs to the *Bovidae* family, exhibited a frequency of 100% for 23del and 100% for the 12ins allele (Czarnik et al. 2009). It is important to obtain results from other members of the bovine family to raise other hypotheses that seek to explain the origin of these polymorphisms, whether they involve insertion or deletion in the bovine *PRNP* gene.

Bovines of mixed breeds, that is, those that are formed by a combination of *Bos taurus* and *Bos indicus*, have exhibited frequencies of 47% and 53% for the 12ins and 12del alleles, respectively, and 20% and 80% for the 23ins and 23del alleles, respectively (Brunelle et al. 2008). The Canchim breed is reared in Brazil and contains breeds of European and Indian origin. The frequencies recorded for this breed were equal: 20.59% for 12ins and 23ins and 79.41% for 12del

and 23del (Table 1). A probable contribution of *Bos indicus* deletion alleles may be acting on these representatives of the Canchim breed.

Knowledge of common breeds or ancestors who contributed to the genetic constitution of genotyped races are important as they may direct the use of these animals for future breeding. This knowledge also helps in understanding the genotypic frequencies of indels 23pb and 12pb identified in these animals, especially taking into consideration the coefficient of relationship between them. Currently, strains bull Kavardi along with their descendants (Chumak, Gim de Garça e Ludy de Garça) and families of bulls Taj Mahal I demonstrate strong influence on the population of Nelore crossbred (including Canchin) animals and in Brazil which may have contributed to the genotypic constitution presented by these animals and that may be correlated with increased genetic susceptibility to BSE.

Polymorphisms in chromosome pairs were analyzed in the diplotypes. The Angus and Simental breeds each exhibited a frequency of 4% for the 12ins.23ins/12ins.23ins diplotype, demonstrating 12 and 23bp insertions in both alleles or both chromosomes (Table 2). The Aberdeen Angus, Charolais and Franqueiro breeds exhibited frequencies of 3%, 10% and 16%, respectively, for the diplotype (Kerber et al. 2008). In Holstein breeds from the United Kingdom and Germany, as well as the German Brown and Fleckvieh breeds, the frequencies recorded in healthy animals were 5%, 15%, 46% and 11%, respectively (Juling et al. 2006).

Japanese cattle in which the messenger RNA transcription rate was evaluated and which exhibited the 12del.23del/12del.23del diplotype demonstrated higher PrP expression in comparison to diplotypes consisting of 12-bp and 23-bp insertions in the promoter region and intron 1, respectively (Msalya et al. 2011). In the present study, the Nelore breed exhibited a higher frequency of the 12del.23del/12del.23del diplotype (35.39%) and genotype frequencies in the indel 12 region, but no statistically significant differences were found among the breeds analyzed ( $p > 0.05\%$ ). The 12ins.23del/12del.23del diplotype was found at greater frequencies in all breeds in comparison to the 12del.23del/12del.23del diplotype and was highest in the Canchim breed (53%). Genotype frequencies of the indel 23 region differed significantly among the breeds ( $p < 0.05\%$ ).

The haplotypes found in the present study indicate two changes that may occur simultaneously in the same allele (indel 12 and indel 23). Knowledge on the frequencies and linkage disequilibrium that occurs between these two changes may be important to the understanding of how these haplotypes are segregated in future generations. In the present study, only the Angus and Simental breeds exhibited the 12ins.23ins haplotype, demonstrating the possibility of simultaneous segregation (Table 3).

The same haplotype has appeared in Korean cattle with a frequency that corresponded to the frequency of healthy cattle in Germany (Kim et al. 2009). In another study with Korean cattle of the Hanwoo breed, the frequency for healthy animals was 42% (Choi et al. 2012), whereas cattle from Poland exhibited a frequency of 36.3% (Gurgul et al. 2012). The Turkish Gray breed exhibited a haplotype frequency (12ins.23ins) of 62%, which was higher than the frequency of healthy Korean and German cattle (Un et al. 2008).

Further studies on the indels in intron 1 and the promoter region of the *PRNP* gene in cattle are currently underway. The understanding of how these indels influence PrP synthesis in cattle may help clarify the mechanism that triggers the synthesis of the infectious protein.

From the detailing of the main polymorphisms in intron 1 and the promoter region in representatives of cattle breeds reared in Brazil, it was possible to determine the profile of the *PRNP* gene in these animals. Further studies are required to enable a better understanding of the genotype profile of the gene in these and other breeds, which currently make up breeding programs and contribute significantly to the development of the meat production chain.

**Acknowledgements:** The authors would like to thank Embrapa Beef Cattle for the allowing the use of the laboratories, doctors Luciana Regitano and Fabiane Siqueira for providing the DNA samples and the Brazilian fostering agencies CNPq and Finep for the study grant and project financing.

## REFERENCES

Aguzzi A., Nuvolone M. & Zhu, C. 2013. The immunobiology of prion diseases. *Nature Reviews Immunology*. 13(12) 888–902.

- Brunelle B.W., Greenlee J.J., Seabury C.M., Brown C.E. & Nicholson E.M. 2008. Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *bos taurus*, *bos indicus*, and composite cattle. *BMC Vet. Res.* 4: 36.
- Choi S., Woo H.J., Lee J. 2012. Sequence variations of the bovine prion protein gene (PRNP) in native Korean Hanwoo cattle. *J. Vet. Sci.* 13:127-37.
- Czarnik U., Strychalski J., Zabolewicz T., Pareek C.S. 2011. Population wide investigation of two indel polymorphisms at the prion protein gene in Polish Holstein–Friesian cattle. *Biochem. Genet.* 49:303–312.
- Czarnik U., Grzybowski G., Zabolewicz T., Strychalski J. & Kaminski S. 2009. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish red cattle, Polish White-backed cattle and European bison (*Bison bonasus* L., 1758). *Genetika* 45:519-525.
- Czarnik U., Zabolewicz T., Strychalski J., Grzybowski G., Bogusz M. & Walawski K. 2007. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in polish holstein-friesian cattle. *J. Appl. Genet.* 48: 69-71.
- Dias A. C., Torres Junior, R. A. de A., Nieto, L. M., Silva, L. O. C. da, Faria, F. J. C. & Vilela, Y. C. 2011. Identificação de animais influentes na população de touros da raça Nelore padrão com sêmen em central de inseminação. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE,5., 2009, Campo Grande, MS. [Anais da ...]. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. Retrieved from <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/872475>
- Galvão C. E., Rosinha G. M. S., Sanches C. C., Elisei C., Araújo F. R., Feijó G. L. D., Soares C. O. 2012. Polymorphisms of intron 1 and the promoter region at the PRNP gene in BSE-free Caracu cattle. *Biochemical Genetics.* 50:657–69.
- Gurgul A., Czarnik U., Larska M., Polak M.P., Strychalski J., Slota E. 2012. Polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish cattle affected by classical bovine spongiform encephalopathy. *Mol. Biol. Rep.* 39: 5211-7.
- Haase B., Doherr M.G., Seuberlich T., Drogemuller C., Dolf G., Nicken P., Schiebel K., Ziegler U., Groschup M.H., Zurbriggen A. & Leeb T. 2007. PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 8: 15.
- Haigh C. L., Wright J. & Brown D. R. 2007. Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the Prnp gene. *Journal Mol Biol.* 368(4):915–27.
- Holznapel E., Yutzy B., Schulz-Schaeffer W., Kruip C., Hahmann U., Bierke P., Loewer J. 2013. Foodborne transmission of bovine spongiform encephalopathy to nonhuman primates. *Emerging Infectious Diseases* 19:712–20.
- Imran M., Mahmood S., Babar M.E., Hussain R., Yousaf M.Z., Abid N.B., Lone K.P. 2012. PRNP gene variation in Pakistani cattle and buffaloes. *Gene* 505:180-185.
- Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, and Fries R (2006) A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol.* 4:33.
- Jor E., Myrmet, M. & Jonassen, C. M. 2010. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *J. Virol. Methods.* 169:1–7.
- Konold T., Bone G. E., Clifford D., Chaplin M. J., Cawthraw S., Stack M. J. & Simmons M. M. 2012. Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. *BMC Veterinary Research.* 8(1): 22.

- Msalya G., Shimogiri T., Ohno S., Okamoto S., Kawabe K., Minezawa M. & Maeda Y. 2011. Evaluation of PRNP expression based on genotypes and alleles of two indel loci in the medulla oblongata of Japanese Black and Japanese Brown cattle. *PLoS One*. 6(5):18787.
- Un C., Oztabak K., Ozdemir N., Tesfaye D., Mengi A. & Schellander K. 2008. Detection of bovine spongiform encephalopathy-related prion protein gene promoter polymorphisms in local Turkish cattle. *Biochem. Genet.* 46:820-827.
- Xue G., Aida Y., Onodera, T. & Sakudo, A. 2012. The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (PRNP) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. *PLoS One* 7:32870.
- Xue G., Sakudo A., Kim C.K. & Onodera T. 2012. Coordinate regulation of bovine prion protein gene promoter activity by two Sp1 binding site polymorphisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372:530-535.
- Wells G.A., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M. & Bradley R. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121:419-420.
- Zadworny D. & Kuhnlein U. 1990. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 80:631-634.

**ARTIGO 2** : A ser submetido à revista Biochemical Genetics. (Texto redigido conforme normas de formatação da ABNT).

**Análise de Polimorfismos no gene *prnp*, códon 211, em raças bovinas no Brasil.**

**RESUMO**

A encefalopatia espongiforme bovina (EEB) é uma enfermidade caracterizada por neurodegeneração progressiva fatal e está inserida no grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), causadas pela proteína infecciosa *prion* (PrP<sup>Sc</sup>). Esta proteína possui conformação alterada possivelmente por mutações ocorridas no gene *prnp*. Alterações que podem ocorrer no gene *prnp* tais como a inserção e/ou deleção (indel) ou modificações pontuais (SNPs) podem estar relacionadas com o desenvolvimento das formas clássicas e atípicas da EEB respectivamente. Assim, objetivou-se neste estudo genotipar o códon 211 do gene *prnp* em animais das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchin e Simental do Brasil. Foi realizada a extração de DNA genômico de sangue ou sêmen de 150 amostras distribuídas entre as raças e amplificadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com oligonucleotídeos específicos para regiões alvo do gene *prnp* na região do códon 211. Os produtos amplificados foram sequenciados para determinação dos genótipos. As sequências obtidas foram submetidas à anotação funcional usando-se o programa Blast para busca de homologias em bancos de dados. Conclui-se que por meio da genotipagem foi possível observar a ausência do polimorfismo do códon 211 em todos os animais estudados, ressaltando o caráter raro do polimorfismo. Um total de 25% (ACC/ACT) e 9,65% (ACT/ACT) de animais da raça Nelore apresentaram polimorfismos sinônimos no códon 210.

## INTRODUÇÃO

A encefalopatia espongiforme bovina (EEB) foi descrita pela primeira vez em 1986 (WILESMITH et al., 1988; WELLS et al. 1987) e está inserida no grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Neste grupo estão as formas variante e esporádica da Doença de Creutzfeldt-Jakob conhecidas como vDCJ e sDCJ que acometem humanos (MEAD et al., 2001) e a *scrapie* que atinge ovinos e caprinos (PRUSINER, 1982).

São enfermidades caracterizadas por neurodegeneração progressiva e principalmente pelo acúmulo da proteína priônica alterada (PrP<sup>Sc</sup>), diferente da príon celular PrP<sup>C</sup> codificada em condições normais pelo hospedeiro. Para a distinção das isoformas de PrP<sup>Sc</sup> encontradas nas TSEs, são levadas em consideração propriedades específicas como peso molecular, nível de glicosilação, proteólise frente à proteinase K, padrões de deposição no sistema nervoso e hospedeiro preferencial (BIACABE et al., 2004; PRUSINER; SCOTT, 1997).

O gene *prnp* é responsável por codificar a PrP<sup>C</sup>; em bovinos este fica localizado no cromossomo BTA 13 na posição q17 (CZARNIK et al., 2007). Mutações neste gene, podem alterar a codificação da PrP<sup>C</sup> (SANDER et al., 2004b).

Existem dois tipos de EEB, denominadas de EEB clássica e EEB atípica. O desenvolvimento da EEB clássica (tipo “C”) pode ter relação com a incorporação à dieta de bovinos de farinha de carne e ossos (FCO) contendo a PrP<sup>Sc</sup>; existem evidências de que a vDCJ seja causada pela mesma estirpe causadora da EEB. Alterações que podem ocorrer no gene *prnp* tais como a inserção e/ou deleção (indel) de seqüências de 12 pares de bases (pb) no íntron 1, 23 pb na região promotora, 14 pb na região 3' não traduzida (3' UTR) e 24 pb na região de octapeptídeos repetidos, podem

também contribuir para o desenvolvimento da forma clássica da doença (BIACABE et al., 2004; CASALONE et al., 2004; SIMMONS et al., 2011).

Dados epidemiológicos demonstram que a ocorrência da EEB atípica é considerada esporádica. Com auxílio de *Western Blot* é possível subdividi-la em formas H e L, que apresentam massas moleculares e níveis de glicosilação distintas em comparação ao tipo C (JACOBS et al., 2007). A modificação pontual, descrita no gene *prnp* dos bovinos, no códon 211 (GAA/AAA) (E211K), também pode ser relacionada ao desenvolvimento da EEB atípica (CLAWSON et al., 2008; KOVÁCS et al., 2005). Estudos destas mutações são de interesse significativo, já que alterações parecidas ocorridas no códon 210 são correlacionadas com o desenvolvimento da forma esporádica da doença de CJD em humanos (TAJIMA et al., 2014).

Até 2014 aproximadamente, 188 mil casos de EEB foram confirmados no mundo todo, deles 67 casos foram classificados como EEB atípica (OIE, 2014). Até o ano de 2013 o Brasil se reconheceu como livre da EEB (BRASIL, 2013). Porém, dois casos da forma atípica da doença, provenientes de amostras de bovinos com aproximadamente 12 anos de idade, foram confirmados pelo Laboratório de referência mundial da OIE, *Animal Health and Veterinary Laboratories Agency – AHVL* (ALESSI, 2013; BRASIL, 2014).

Considerando a importância da cadeia produtiva da carne, o potencial zoonótico da doença e a necessidade do monitoramento da encefalopatia espongiforme bovina, objetivou-se neste estudo genotipar o códon 211 do gene *prnp* em bovinos das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchin e Simental.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção das Amostras

Para genotipagem foram utilizadas 150 amostras de sêmem e sangue de bovinos sendo 48 da raça Nelore, 40 da raça Caracu, 21 da raça Angus, 17 da raça Canchin e 24 da raça Simental, não testados para TSEs. Os bovinos da raça Nelore foram selecionados por meio do programa de melhoramento genético (GENEPLUS) (<http://www.geneplus.com.br/>) da Embrapa Gado de Corte com grau de consanguinidade (ou coeficiente de endogamia, Fi) de 0,015% e grau de parentesco de 0,036%. Cada amostra de animais da raça Caracu foi obtida de um criador diferente no Brasil, o grau de consanguinidade foi 0%-9 % e do grau de parentesco foi 0%-7 % para a raça. Amostras de animais das raças Angus, Canchin e Simental foram obtidas de diferentes propriedades. O material genético foi extraído de amostras de sangue e de sêmem. Os coeficientes de endogamia e grau de parentesco foram obtidos utilizando o *software* Matlab®.

### Genotipagem

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de sêmem conforme metodologia descrita por Zadworny & Kuhnlein (1990) e o DNA genômico isolado de sangue foi extraído por meio do Kit DNA Easy (Invitrogen®). A pureza e a qualidade do DNA obtido foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 0,8% corados com Syber Gold (Invitrogen®), visualizado por iluminação ultravioleta em transluminador (Transluminator Loccus Biotecnologia®, fotografados com câmera digital utilizando o *software* LPIX (Loccus Biotecnologia®). A quantificação deste foi realizada por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®). A partir do DNA genômico extraído foi

realizada a reação em cadeia da polimerase para amplificação da região de interesse do gene *prnp*; para isto foram utilizados os oligonucleotídeos 5'- GAA GTG CCA TGA GCA GGC - 3' e 5'- CTC CCC CAA CCT GGT AAA - 3', obtidos a partir da sequência completa do gene *prnp* de *Bos taurus* depositada no GenBank (National Center for Biotechnology Information; acesso número: AJ298878; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A região foi amplificada contendo 50 ng a 80 ng de DNA genômico, buffer 10X, 1.5mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM of dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo e uma unidade de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen®). O protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 3 min a 94°C, seguidos por 30 ciclos para desnaturação de 30 s a 94°C, 45 s a 60°C para anelamento, e 60 s a 72°C para elongação e uma elongação final de 72°C por 10 min. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 0,8%, corados com Sybr Gold (Invitrogen®), visualizados por iluminação ultravioleta em transluminador (Transluminator Loccus Biotecnologia®), fotografados com câmera digital utilizando o *software* LPIX (Loccus Biotecnologia®). Cada amostra foi purificada com Qiaex II kit (Qiagen®) e em seguida submetidas ao sequenciamento de Sanger em sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), utilizando 2 µl de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (RR-100, Applied Biosystems®), 40 ng a 60ng do DNA molde e 3,2 pmol do oligonucleotídeo específico 5'- CACATGGTGGTGGAGGCTGG-3' para um volume final de 10 µl.

As sequências foram submetidas à busca por homologias com auxílio do BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas por meio do programa BioEdit®. As frequências alélicas e genotípicas do códon 211 do gene *prnp* foram determinadas e comparadas entre as raças.

### **Análise estatística**

Diferenças entre as frequências alélicas/genotípicas foram calculadas entre as raças por meio do teste de qui-quadrado ao nível de 1% de significância. Desvios de frequências foram analisados com auxílio do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi analisado o códon 211 do gene *prnp* da proteína priônica em 150 animais das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchin e Simental. A população de animais encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número de alelos e genótipos

observados nas raças estudadas estão apresentados no Quadro 1.

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS												
RAÇAS (n) <sup>a</sup>	Nelore (48)		Caracu (40)		Angus (21)		Canchin (17)		Simental (24)		Total (150)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Alelos</b>												
E(GAA)	96	100	80	100	42	100	34	100	48	100	300	100
K(AAA)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	96	100	80	100	42	100	34	100	48	100	300	100

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS												
RAÇAS (n)	Nelore		Caracu		Angus		Canchin		Simental		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Genótipos</b>												
E (GAA) / E (GAA) <sup>b</sup>	48	100	40	100	21	100	17	100	24	100	150	100
E (GAA) / K (AAA) <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	48	100	40	100	21	100	17	100	24	100	150	100

Quadro 1 - Frequências Alélicas e genotípicas referentes ao códon 211 do gene *prnp* em bovinos das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchin e Simental.

- a – Número de animais por raça  
 b - Aminoácido Ácido Glutâmico  
 c - Aminoácido Lisina

A genotipagem revelou a ausência do polimorfismo do códon 211 em todos os animais estudados. Em bovinos, o códon 211 do gene *prnp* em homozigose (GAA/GAA) é responsável por codificar o ácido glutâmico (NICHOLSON et al., 2008) sendo que foi possível observar que a sequência destes nucleotídeos do gene *prnp*, foi altamente conservada nos animais das raças estudadas. Estados Unidos, Paquistão e China em levantamentos de genótipos já observaram a ausência do genótipo heretozigoto para este códon em bovinos cruzados, de origem zebu e européia como os descritos em nosso trabalho (HEATON et al., 2008; IMRAN et al., 2012b).

Genótipos heterozigotos do códon E211K(GAA/AAA) foram observados em bovinos que desenvolveram a forma atípica da doença (forma H), porém estes animais são provenientes de testes com inoculações experimentais ou de amostras de surtos isolados da doença (GREENLEE et al., 2012; NICHOLSON et al., 2008; RICHT; HALL, 2008). Levantamentos epidemiológicos denotam o perfil esporádico da doença, pois até 2013 67 casos foram confirmados no mundo todo (OIE, 2013). Na França, no período de 2001 a 2007, aproximadamente 17,1 milhões de bovinos com mais 24 meses de idade foram testados para EEB clássica e atípica. 645 casos de EEB foram confirmados por *western blotting*, destes 13 foram classificados como EEB atípica, sendo que 7 classificados como o tipo H e 6 como do tipo L (BIACABE et al., 2008).

Esta forma da enfermidade foi descrita pela primeira vez na Europa em 3 bovinos com mais de 24 meses de idade, positivos para EEB em *western blot* que apresentaram principalmente massa molecular di, mono ou não glicosilada em comparação aos casos até então diagnosticados. Padrões diferenciados de deposição cerebral de placas amilóides e de PrP<sup>Sc</sup> podem ser encontrados no mesencéfalo, medula e tálamo nos tipo H e L da forma atípica e em maior quantidade no tálamo nos casos da EEB clássica (CASALONE et al., 2004; PRIEMER et al., 2013).

Outro fator interessante é a similaridade entre o padrão molecular proteico encontrado na EEB atípica e o encontrado na forma esporádica da doença de Creutzfeldt-Jakob (CASALONE et al., 2004). Em humanos, algumas alterações em diferentes códon já foram descritas na tentativa de explicar a variação de nucleotídeos e o desenvolvimento da doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica. Variações nos códon 129 e 210 de indivíduos que desenvolveram a doença já foram relatadas (KOBAYASHI et al., 2013; TAJIMA et al., 2014).

Um total de 27,08% (ACC/ACT) e 10,42% (ACT/ACT) dos animais da raça Nelore neste estudo apresentaram polimorfismos no códon 210 (Quadro 2). Em bovinos, alteração neste códon pode não interferir na constituição da proteína priônica, já que esta troca nucleica não altera a codificação do aminoácido treonina. Diferente do que pode ocorrer em humanos, em que a alteração no mesmo códon conduz a modificação na produção de valina por isoleucina (FURUKAWA et al., 1996). Nos animais das raças Caracu, Angus, Canchin e Simental estes polimorfismos não foram observados.

<b>RAÇA</b>	<b>NELORE</b>	<b>%</b>
<b>GENÓTIPO</b>		
<b>ACT/ACT<sup>a</sup></b>	5	10,42
<b>ACC/ACC<sup>a</sup></b>	30	62,50
<b>ACC/ACT<sup>a</sup></b>	13	27,08
<b>TOTAL</b>	48	100

a - Aminoácido Treonina (T)

Quadro 2 - Frequências genóticas referentes ao códon 210 do gene *prnp* em bovinos da raça Nelore.

No presente estudo conclui-se que, animais das raças Nelore, Caracu, Angus, Canchin e Simental não apresentaram alteração no códon E211K. No âmbito do surgimento da EEB atípica e visto sua relevância epidemiológica e necessidade de

monitoramento, o conhecimento de frequências do códon 211 do gene *prnp* em bovinos auxiliam na compreensão desta nova forma de EEB.

## REFERÊNCIAS

BIACABE, A.-G. et al. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. **EMBO reports**, v. 5, n. 1, p. 110–5, 2004.

BIACABE, A.-G. et al. Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 298–300, 2008.

BRASIL. Nota Número 178. Manutenção do status sanitário brasileiro relativo à Encefalopatia Espongiforme Bovina. **Ministério das Relações Exteriores**. Brasília, DF, 28 mai. 2013. Disponível em <http://www.itamaraty.gov.br/sala-de-imprensa/notas-a-imprensa/manutencao-do-status-sanitario-brasileiro-relativo-a-encefalopatia-espongiforme-bovina>. Acesso em 20 jun. 2014.

BRASIL. Nota Técnica DSA. Encefalopatia Espongiforme no Brasil. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF, 19 dex. 2012. Disponível em: <[http://www.sbm.org.br/docs/nota\\_tecnica\\_dsa\\_159\\_19122012\\_bse\\_no\\_brasil\\_port.pdf](http://www.sbm.org.br/docs/nota_tecnica_dsa_159_19122012_bse_no_brasil_port.pdf)>. Acesso em 20 jun. 2014.

CASALONE, C. et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 3065–70, 2004.

CLAWSON, M. L. et al. Association of a bovine prion gene haplotype with atypical BSE. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1830, 2008.

CZARNIK, U. et al. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish Holstein-Friesian cattle. **Journal of applied genetics**, v. 48, n. 1, p. 69–71, 2007.

GREENLEE, J. J. et al. Clinical and pathologic features of H-type bovine spongiform encephalopathy associated with E211K prion protein polymorphism. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38678, 2012.

HEATON, M. P. et al. Prevalence of the prion protein gene E211K variant in U.S. cattle. **BMC veterinary research**, v. 4, p. 25, 2008.

IMRAN, M. et al. PRNP gene variation in Pakistani cattle and buffaloes. **Gene**, v. 505, n. 1, p. 180–5, 2012.

JACOBS, J. G. et al. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1821–9, 2007.

KOBAYASHI, A. et al. Deciphering the pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 M / V and type 2 abnormal prion protein. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 1, n. 1, p. 1, 2013.

KOVÁCS, G. G. et al. Genetic prion disease: the EUROOCJD experience. **Human genetics**, v. 118, n. 2, p. 166–74, 2005.

MEAD, S. et al. Sporadic--but not variant--Creutzfeldt-Jakob disease is associated with polymorphisms upstream of PRNP exon 1. **American journal of human genetics**, v. 69, n. 6, p. 1225–35, 2001.

NICHOLSON, E. M. et al. **Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE.** **PloS one**, jan. 2008. Disponível em:  
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2488391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

PRIEMER, G. et al. Biochemical Characteristics and PrP<sup>(Sc)</sup> Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67599, 2013.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science (New York, N.Y.)**, v. 216, n. 4542, p. 136–44, 1982.

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M. R. Genetics of prions. **Annual review of genetics**, v. 31, p. 139–75, 1997.

RICHT, J. A; HALL, S. M. BSE case associated with prion protein gene mutation. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000156, 2008.

SANDER, P. et al. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. **Neurogenetics**, v. 5, n. 1, p. 19–25, 2004.

SIMMONS, M. M. et al. Experimental classical bovine spongiform encephalopathy: definition and progression of neural PrP immunolabeling in relation to diagnosis and disease controls. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 5, p. 948–63, 2011.

TAJIMA, Y. et al. Creutzfeldt-Jakob Disease with a Codon 210 Mutation: First Pathological Observation in a Japanese Patient. **Internal Medicine**, v. 53, n. 5, p. 483–487, 2014.

WILESMITH, J. W. et al. **Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies.** **The Veterinary record**, 17 dez. 1988. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729514>>