



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POLIMORFISMOS DO GENE DA PROTEÍNA PRION EM OVINOS  
DESLANADOS DA RAÇA MORADA NOVA**

*AUTORA: ANA CAROLINA LANDIM PACHECO*

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> SÔNIA MARIA PINHEIRO DE OLIVEIRA, DR<sup>a</sup>

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Programa de Pós-graduação em Zootecnia,  
como requisito parcial para a obtenção do  
Grau de Mestre em Zootecnia – Área de  
Concentração: Produção e Melhoramento  
Animal.

FORTALEZA – CE  
Abril de 2004

**P117<sub>P</sub> Pacheco, Ana Carolina Landim**

Polimorfismos do Gene da Proteína Prion em Ovinos da raça Morada Nova. / Ana Carolina Landim Pacheco – Fortaleza, 2004.

x, 89f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Pinheiro de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Zootecnia.

1. Polimorfismos 2. Proteína Prion 3. Ovinos Morada Nova. I. Título.

CDD 636.0821

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação  
e Classificação da Biblioteca central da UFC.**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho da dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

**ANA CAROLINA LANDIM PACHECO**

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/ 04/ 2004**

---

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SÔNIA MARIA PINHEIRO DE OLIVEIRA**  
**ORIENTADORA**

---

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> DIANA MAGALHÃES DE OLIVEIRA**  
**CONSELHEIRA (UECE)**

---

**PROF DR RAIMUNDO BEZERRA DA COSTA**

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer principalmente a DEUS, pela oportunidade de viver e de poder realizar mais um grande sonho!

Aos meus pais Raimundo Correia Pacheco e Zenilde Landim Pacheco, pela criação, apoio e incentivo que sempre me deram e continuam dando.

Às minhas queridas irmãs Aninha e Pet pela companhia, amizade, apoio conselhos, “carões”, exemplos de vida e pelos lindos sobrinhos que me deram: Gabriela, Igor, Gabriel, Rafael e quem mais chegar...

À minha tia-mãe Maria Rosário Correia Pacheco (Tia Neném) pelo exemplo de pessoa íntegra, firme, persistente, batalhadora, responsável, amiga (até de farras); pelo carinho, conforto, apoio prestados a mim em todos os momentos; pela casa sempre aberta e pelos maravilhosos primos-irmãos e amigos que tenho: Pedro, Davi, Lucas e Sara. Tia é impossível não te admirar e te amar TANTO!

A todos meus familiares que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

Aos colegas do NUGEN - UECE: Nilo, João José, Daniel, Elton, Michelly, Thiago, Marianna, Allan muito obrigada pelo suporte, ajuda, dicas, e pela amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFC, que contribuíram para a realização deste momento, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni e Raimundo Bezerra da Costa e a pesquisadora PD. Grácia Maria Soares Rosinha pelos conhecimentos, conselhos e ajuda, valeu mesmo!

Ao NUGEN/ UECE, UFC, EMBRAPA Caprinos/ CNPC, FUNCAP por tornar possível a realização deste Mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Sônia Maria Pinheiro de Oliveira pela orientação e amizade, muito obrigada!

À Profª Drª Diana Magalhães de Oliveira a quem devo agradecer todo o conhecimento, orientação, colaboração, exemplo, amizade; É impossível não admirá-la depois de conhecê-la e compreendê-la, a você serei eternamente grata!

## RESUMO

Morada Nova é uma raça de ovinos deslanados do Brasil, sendo explorada para carne e pele, e constituindo importante fonte de proteína na alimentação humana, principalmente no Nordeste. Neste estudo foi realizada a genotipagem de 72 animais da raça Morada Nova (variedades vermelha e branca) para o gene PrP (proteína prion), o qual codifica a proteína cuja conversão para uma isoforma resistente a proteases tem sido associada ao *scrapie* em ovinos e a outras encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) em varias espécies, incluindo o homem. Polimorfismos no quadro aberto de leitura (*open reading frame*, ORF) do gene PrP têm sido associados a suscetibilidade, ocorrência e lesões de TSEs, enquanto a incidência natural do *scrapie* parece ser influenciada por alterações no gene PrP. Em ovinos, vários polimorfismos de único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs) foram relacionados com diferenças na expressão de fenótipos das TSEs, porém os SNPs dos códons 136, 154 e 171 são os mais importantes. O presente estudo constou na detecção de SNPs e análise dos haplótipos apresentados na raça Morada Nova, avaliados em relação aos códons polimórficos (136, 154 e 171) do gene PrP através de reações de PCR, sequenciamento da ORF do éxon 1 do gene PrP e posterior análise bioinformática. Os resultados revelaram 3 variantes alélicas (ARQ, ARR e VRR) e 4 genótipos (ARQ/ARQ; ARQ/ARR; ARR/ARR e VRR/VRR), um dos quais (VRR/VRR) presente em apenas 2 animais, enquanto outro (ARQ/ARQ) foi o mais freqüente (34,72%). Houve diferenças significativas nas freqüências genótípicas entre as duas variedades da raça, onde a branca apresentou maior freqüência para o genótipo ARR/ARR (44,19%) e a vermelha para o ARQ/ARQ (65,52%). Houve baixa prevalência do alelo V136 (considerado de alta suscetibilidade) e uma relativa prevalência do alelo resistente R171, entretanto, deve-se ressaltar a presença de genótipos potencialmente suscetíveis para o *scrapie* na raça Morada Nova. Mesmo sendo área livre de *scrapie*, o Brasil precisa investir na caracterização genotípica sua população ovina, procurando manter rebanhos geneticamente resistentes e assegurando, assim, a não introdução da doença em rebanhos nacionais.

## ABSTRACT

Morada Nova is a major hair breed of sheep in Brazil, as a meat and fur type, being an important source of protein for human feeding in Northeastern region of the country. In this study, a total of 72 local Morada Nova sheep from 2 different flocks and fur colors (red and white) were analyzed for scrapie-linked polymorphisms in the prion protein (PrP) gene. This gene encodes the PrP that has had its conversion to a protease resistant isoform as the pivotal element in ovine *scrapie* and in other transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) affecting several species, including man. Polymorphisms within the open reading frame (ORF) of the PrP gene are associated with the susceptibility, occurrence and the pathological lesions of TSEs, while the incidence of natural scrapie is strongly influenced by alterations in the host gene that encodes the PrP. In sheep, several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with differences in the phenotypic expression of prion diseases, but the SNPs at codons 136, 154 and 171 are the most important as related to scrapie resistance/susceptibility. Here, SNPs at codons 136, 154 and 171 were determined by PCR amplification followed by DNA sequencing and bioinformatics analysis of nucleotide differences and genotyping. In this survey, the SNPs detected in the PrP gene make up three allelic variants (ARQ, ARR and VRR) resulting in four different genotypes (ARQ/ARQ; ARQ/ARR; ARR/ARR and VRR/VRR), one of which (VRR/VRR) appeared in only two animals. In general, the most frequent genotype was ARQ/ARQ (34,72%), but there were significant differences on genotype frequencies between fur colors. White fur had highest frequency of ARR/ARR (44,19%), while red fur of ARQ/ARQ (65,52%). All together, data presented here demonstrated the extremely low prevalence of the susceptibility V136 allele ( \_ %) and a variable prevalence of the resistant R171 allele, which was present mostly in heterozygous form. However, we detected potential scrapie susceptible genotypes. Regardless of the status of a scrapie-free country, Brazil needs to have its sheeo population genotyped for PrP in order to avoid disease dissemination among flocks with high frequencies of susceptible genotypes.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Comparação clássica entre Vírus e Prion                                                                                                 | 20 |
| <b>Tabela 2:</b> Propriedades do agente causador do <i>scrapie</i> .                                                                                      | 20 |
| <b>Tabela 3:</b> Comparação entre PrP <sup>C</sup> e PrP <sup>Sc</sup> .                                                                                  | 23 |
| <b>Tabela 4:</b> As Doenças Priônicas.                                                                                                                    | 28 |
| <b>Tabela 5:</b> Possíveis genótipos para proteína prion em ovinos nos códons 136, 154, 171 e índice de resistência ao <i>scrapie</i> para cada genótipo. | 35 |
| <b>Tabela 6.</b> Quantificação do DNA genômico total das amostras de ovinos Morada Nova da variedade vermelha.                                            | 50 |
| <b>Tabela 7.</b> Quantificação de DNA genômico total das amostras de ovinos Morada Nova da variedade branca                                               | 51 |
| <b>Tabela 8:</b> Frequência genotípica encontrada nos ovinos Morada Nova                                                                                  | 56 |
| <b>Tabela 9.</b> Comparação dos polimorfismos nos códons 136 e 171 em ovinos Morada Nova variedade branca e vermelha.                                     | 60 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Ovino Morada Nova Variedade Vermelha.                                                                                                                                  | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Ovino Morada Nova Variedade Branca.                                                                                                                                    | 18 |
| <b>Figura 3.</b> Modelos tridimensionais da Proteína Prion.                                                                                                                             | 23 |
| <b>Figura 4.</b> Replicação de PrP <sup>Sc</sup> a partir de PrP <sup>C</sup> .                                                                                                         | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Dano no cérebro de cobaias.                                                                                                                                            | 29 |
| <b>Figura 6.</b> Coleta de sangue por punção da veia jugular externa realizada em tubos <i>Vacutainer</i> contendo EDTA.                                                                | 41 |
| <b>Figura 7.</b> Seqüenciador automático de DNA ABI Prism <sup>®</sup> 3100 (Applied Biosystems)                                                                                        | 45 |
| <b>Figura 8:</b> Ausência de picos simultâneos com códon 171 caracterizando um indivíduo homozigoto (Q/Q).                                                                              | 48 |
| <b>Figura 9:</b> Presença de picos simultâneos com códon 171 caracterizando um indivíduo heterozigoto (Q/R).                                                                            | 48 |
| <b>Figura 10.</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando 7 (sete) canaletas contendo amostras de DNA genômico total de diferentes exemplares da raça Morada Nova | 49 |
| <b>Figura 11.</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando 8 (oito) canaletas contendo amostras de DNA genômico total de diferentes exemplares da raça Morada Nova | 49 |
| <b>Figura 12.</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose para visualização de bandas contendo os produtos de PCR                                                                  | 52 |
| <b>Figura 13.</b> Exemplo de um eletroferograma.                                                                                                                                        | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Comparação das seqüências obtidas pelo seqüenciador automático de DNA antes (1) e depois (2) de analisadas pelo software PHRED                                        | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Trecho do gene PrP de ovino Morada Nova                                                                                                                               | 55 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1:</b> Freqüência genotípica encontrada em ovinos morada nova.                    | 56 |
| <b>Gráfico 2:</b> Freqüência genotípica em ovinos morada nova variedade vermelha.            | 57 |
| <b>Gráfico 3:</b> Freqüência genotípica em ovinos morada nova variedade branca.              | 57 |
| <b>Gráfico 4:</b> Freqüência genotípica do alelo 1 em ovinos morada nova variedade vermelha. | 58 |
| <b>Gráfico 5:</b> Freqüência genotípica do alelo 2 em ovinos morada nova variedade vermelha. | 59 |
| <b>Gráfico 6:</b> Freqüência genotípica do alelo 1 em ovinos morada nova variedade branca.   | 59 |
| <b>Gráfico 7:</b> Freqüência genotípica do alelo 2 em ovinos morada nova variedade branca.   | 59 |

## ABREVIATURAS

PrP<sup>C</sup> – Proteína Prion Celular

PrP<sup>Sc</sup> – Proteína Prion associada à Scrapie

PrPres – Proteína Prion resistente à ação da proteinase K

PrP\* – Proteína Prion ligada a proteína X

TSE – Encefalopatia Espongiforme Transmissível (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*)

BSE - Encefalopatia Espongiforme Bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathies*)

iCJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob iatrogênica

vCJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob variante

fCJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar

sCJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica

GSS – Doença Gerstmann-Sträussler-Sheinker

FFI – Insônia Familiar Fatal

FSI – Insônia Esporádica Fatal

TME – Encefalopatia Transmissível de Marta

CWD – Doença Degenerativa Crônica (*Chronic Wasting Disease*)

FSE - Encefalopatia Espongiforme Felina (*Feline Spongiform Encephalopathies*)

MBM – Carne e refeição derivada de osso (*meat and bone meal*)

GPI – Glicofosfoinositol

SOD – Superóxido Dismutase

CLD – Domínios Membranares Caveolares

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

# SUMÁRIO

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>RESUMO</b>                                                                          | V   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                        | VI  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                                                | VII |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                                | VII |
| <b>LISTA DE GRÁFICOS</b>                                                               | IX  |
| <b>ABREVIATURAS</b>                                                                    | X   |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                   | 13  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                        | 17  |
| 2.1 Ovinos Morada Nova                                                                 | 17  |
| 2.2 A proteína PRION                                                                   | 18  |
| 2.2.1 A descoberta da proteína prion                                                   | 19  |
| 2.2.2 A função e estrutura da proteína prion                                           | 19  |
| 2.2.3 Prions transmitem infecção                                                       | 26  |
| 2.3 Doenças priônicas                                                                  | 27  |
| 2.3.1 Diagnóstico e terapia de doença priônicas                                        | 29  |
| 2.3.2 Saúde publica                                                                    | 30  |
| 2.4 <i>Scrapie</i>                                                                     | 31  |
| 2.4.1 Estratégias de melhoramento animal                                               | 34  |
| 2.5 Polimorfismo de nucleotídeo único – SNP: ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ) | 38  |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                           | 40  |
| 3.1 Realização do experimento                                                          | 40  |
| 3.2. Ovinos                                                                            | 40  |
| 3.3 <i>Wet lab</i>                                                                     | 41  |
| 3.3.1 Extração e amplificação de DNA                                                   | 41  |
| 3.3.2 Sequenciamento do produto de PCR                                                 | 44  |
| 3.3.3 Condições da corrida de sequenciamento                                           | 45  |
| 3.4 <i>Dry Lab</i>                                                                     | 46  |

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.1 Análise de bioinformática                                                                                                          | 46 |
| 3.4.2 Análise estatística                                                                                                                | 48 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                         | 49 |
| 4.1. Extração e visualização do DNA genômico total dos ovinos Morada Nova                                                                | 49 |
| 4.2. Reação de amplificação da ORF do exon 1 do gene PrP e visualização dos fragmentos produtos do PCR do gene PrP de ovinos Morada Nova | 52 |
| 4.3. Reação de seqüenciamento dos produtos de PCR do gene PrP de ovinos Morada Nova e visualização dos eletroferogramas.                 | 52 |
| 4.4. Análise da qualidade das seqüências do gene PrP de ovinos Morada Nova                                                               | 53 |
| 4.5. Busca e análise de polimorfismos nas seqüências do gene PrP de ovinos Morada Nova.                                                  | 54 |
| 4.5.1. Determinação de homozigossidade / heterozigossidade para o gene PrP                                                               | 55 |
| 4.5.2. Análise quantitativa dos genótipos ovinos para o gene PrP                                                                         | 55 |
| 4.5.3. Análise e distribuição da freqüência alélica do gene PrP por variedade da raça Morada Nova                                        | 58 |
| 4.5.4. Análise e distribuição da freqüência alélica do gene PrP por sexo, na raça Morada Nova                                            | 60 |
| 4.5.5. Análise estatística e comparação geral dos polimorfismos genéticos apresentados pela raça Morada Nova em relação ao gene PrP      | 60 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                                                                                      | 64 |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                     | 66 |
| <b>7. ANEXO 1</b>                                                                                                                        | 76 |
| <b>8. ANEXO 2</b>                                                                                                                        | 77 |

## **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é o 13º produtor mundial de ovinos, com efetivo de 18,3 milhões de cabeças (cerca de 130.000 toneladas), sendo que a região Nordeste possui um rebanho ovino bastante expressivo dentro do cenário nacional, da ordem de mais de 50% do total (IBGE, 2000). O Estado do Ceará representa 20% do rebanho nordestino, onde a região do Sertão Central é a mais expressiva. No entanto, dentro do cenário mundial a produção de carne ovina/ caprina brasileira representa apenas cerca de 1,15% do montante mundial, que está estimada em 11.309.471 toneladas, sendo a Austrália, Nova Zelândia e Europa os principais produtores (FAO, 2002).

O rebanho de ovinos da região Nordeste é formado, principalmente, de animais das raças deslanadas e seus mestiços. Os ovinos Morada Nova constituem uma das principais raças de ovinos deslanados do Nordeste do Brasil. São explorados para carne e pele, sendo esta altamente apreciada no mercado internacional. Por serem animais de pequeno porte e bem adaptados às condições climáticas do semi-árido, são importantes nas pequenas propriedades, onde constituem fonte de proteína na alimentação da população rural (FERNANDES et al. 2001). Apresentando baixa produtividade em decorrência do baixo nível tecnológico que ainda não atingiu estágio compatível com sua importância sócio-econômica (IBGE, 2000). Todavia, sabe-se que, nos últimos anos, o expressivo aumento da demanda com conseqüente elevação do valor de comercialização da carne ovina pelo mercado, tornaram esta atividade em uma excelente alternativa para as propriedades rurais dessa região.

Apesar desse potencial, a oferta de carne ovina é muito pequena e a produção baseia-se ainda no abate de animais com idade avançada, o que resulta na oferta de uma carne de qualidade inferior e de pouca aceitação no mercado. Conseqüentemente, o criador terá que, obrigatoriamente, investir no sistema criatório, principalmente em tecnologia, visando à produção de um

cordeiro mais precoce e com uma carcaça e uma carne de melhor qualidade. Entretanto, alguns sistemas usados para melhoria da produtividade trazem consigo o surgimento de doenças que, até então, não se constituíam em prejuízo econômico (FERNANDES et al. 2001).

O *scrapie* faz parte do grupo de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs). As TSEs ou doenças prion incluem, além do *scrapie* de ovinos e caprinos, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) ou doença da vaca louca, encefalopatia de ungulados exóticos, encefalopatia transmissível em martas, encefalopatia espongiforme felina (FSE) e a doença da debilidade crônica em cervídeos. No homem, as doenças prion abrangem o Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), CJD variante (vCJD), a doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker e a insônia familiar fatal (KUBOSAKI et al., 2000).

As doenças prion são patologias neurodegenerativas fatais e incuráveis que ocorrem nos Sistemas Nervoso Central (SNC) e Linfático e que podem apresentar-se como desordens genéticas, infecciosas ou esporádicas a partir da modificação da proteína prion (PrP<sup>C</sup>) (PRUSINER, 1997, 1998; WOOLHOUSE et al., 2001). Prions mutantes se acumulam em células cerebrais que morrem e abrem vacúolos espongiformes no cérebro, causando perda de coordenação motora, confusão e declínio mental seguida de morte.

O *scrapie* acomete ovinos com 1 a 4 anos de idade, apresentando períodos de incubação variáveis. Observaram-se duas formas clínicas da doença: a forma pruriginosa e a forma nervosa, de acordo com a predominância de sinais sensitivos ou motores.

A ocorrência de casos de *scrapie* no Brasil, em particular no Paraná (SOUZA, 2001), seja em animais nativos (forma natural da doença) ou importados, alerta para a necessidade de estudos e informações sobre o gene PrP em raças de ovinos deslanados do Brasil como a Morada Nova na tentativa de identificar genótipos resistentes e susceptíveis, facilitando dessa forma o acasalamento

orientado em raças nativas e seus cruzamentos e, assim, dificultar a ocorrência e/ou disseminação desta doença na região Nordeste do Brasil.

Com o surgimento de epidemias que comprometem a produção, a ciência busca meios de combate às doenças associadas ao desenvolvimento biotecnológico. Uma destas ferramentas largamente utilizadas tem sido a biologia molecular. A biologia molecular atualmente é uma das principais ferramentas no combate às doenças em virtude da sua confiabilidade. Países com larga tradição na pecuária leiteira e de corte vêm utilizando esta técnica com sucesso absoluto. A análise genômica em animais de produção tem sido utilizada para determinação dos valores de acasalamentos, para mapeamento genético e como meio de acelerar o progresso genético, traduzindo-se em maior produtividade e, portanto, maior competitividade nos rebanhos comerciais. Em busca de informações acerca da estrutura molecular dos genes bem como sua regulação e expressão foram criados programas de mapeamento genético, como o BOVMAP (INRA, 2004) para bovinos e PIGMAP (RIE, 2004) para suínos. Dados obtidos a partir desses programas mostram que aproximadamente 400 genes foram mapeados e seqüenciados em bovinos. A importância do sequenciamento do DNA reflete-se no desenvolvimento de técnicas que permitam o monitoramento dessas seqüências no indivíduo através de diagnósticos por DNA, e dessa forma permitir novas estratégias de acasalamento, ou ainda, eliminar desordens genéticas (SMIDT & NIEMANN, 1999).

A suscetibilidade genética desempenha um papel importante na ocorrência do *scrapie* natural em ovinos porque este é fortemente influenciado pelo polimorfismo do gene do hospedeiro que codifica a proteína prion (GOLDMANN et al. 1990; HUNTER et al. 1997). Vários polimorfismos nas ORFs (*open reading frame* ou quadros abertos de leitura do gene PrP) estão associados com diferença na expressão fenotípica das doenças priônicas como período de incubação, sinais clínicos e patologia (BOSSERS et al, 2000). Os polimorfismos nos códons 136, 171 e em menor extensão no 154, ocorrem freqüentemente e são considerados parâmetros determinantes para a classificação de suscetibilidade ao *scrapie* (BELT et al. 1995, HUNTER et al. 1996).

O objetivo deste trabalho é a identificação dos genótipos do gene PrP dos ovinos deslanados da raça Morada Nova, em ambas as variedades, permitindo assim a comparação do comportamento do gene PrP na raça deslanada Morada Nova em relação as demais raças já estudadas, bem como em relação aos países onde a doença tem sido relatada. A ocorrência de casos de *scrapie* no Paraná, e a carência de relatos técnicos científicos nessa área no Brasil, fortalece-se a necessidade de produção de conhecimentos referentes genotipagem para o gene PrP dos animais nativos e naturalizados do Brasil, em especial o nordeste brasileiro, onde a ovinocaprinocultura é utilizada como subsistência para grande número de famílias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ovinos Morada Nova

A raça de ovinos Morada Nova é primitiva de arietinos (ovinos descendentes do "*Ovis aries*") de formação mestiça como o BORDALEIRO de Portugal, que veio ao Brasil, na época do povoamento dos sertões, onde sofreu um processo de adaptação, por variação genética e seleção natural. Dessa maneira, tanto a variação genética, como a ação seletiva do ambiente quente e seco do Nordeste, agiram no sentido desfavorável de lã, e favoráveis à multiplicação destes carneiros. Os ovinos Morada Nova são deslanados, mochos, de pelagem vermelha ou branca; as fêmeas adultas pesam em média 30/50 Kg, enquanto os machos podem chegar a 40/60 Kg. A superioridade no peso corporal dos machos é devida ao dimorfismo sexual comum a todas as espécies mamíferas na fase de desenvolvimento e na idade adulta (FERNANDES, 1985; PEREIRA et al., 1987; OLIVEIRA, 1992). Os ovinos Morada Nova constituem uma das principais raças de ovinos deslanados do Nordeste do Brasil. São explorados para carne e pele, sendo esta altamente apreciada no mercado internacional. Por serem animais de pequeno porte e bem adaptados às condições climáticas do semi-árido, são importantes nas pequenas propriedades, onde constituem fonte de proteína na alimentação da população rural (FERNANDES et al, 2001)

A Morada Nova é a raça de ovinos deslanados mais prolífica, tendo duas variedades: vermelha (**Figura 1**) e branca (**Figura 2**). Atualmente, os ovinos deslanados da raça Morada Nova variedade branca têm sofrido uma drástica redução no seu efetivo, com apreciável perigo de extinção. Os principais fatores que têm contribuído para isto são, essencialmente, a despigmentação das mucosas (devido aos problemas de fotossensibilização), e a preferência dos produtores pôr outras raças melhoradas geneticamente, de maior porte e/ou mais produtivas (PEREIRA, 1987). No Estado do Ceará, os ovinos Morada Nova

variedade branca, encontram-se restritos a três (3) núcleos, aproximadamente 30-80 animais cada, dando uma maior importância ao estudo de caracterização do gene PrP nesta variedade para se conhecer melhor o perfil genético da variedade em relação a um importante doença ovina, o *scrapie*. Estudos como esse, de caracterização e comparação genética, podem fornecer subsídios aos programas de seleção e melhoramento animal.



**Figura 1.** Ovino Morada Nova  
Variedade Vermelha



**Figura 2.** Ovino Morada Nova  
Variedade Branca

## 2.2. A proteína prion

A proteína prion é uma glicoproteína normal encontrada em todos os mamíferos que foram até hoje examinados e consiste de aproximadamente 250 aminoácidos (o comprimento exato depende da espécie). A proteína é glicosilada em um ou dois dos sítios possíveis de glicosilação e é fixada por fora da membrana da célula neuronal por uma âncora de glicofosfoinositol (GPI) (COHEN e PRUSINER, 1999). Os prions existem normalmente como proteínas celulares inócuas; mas eles parecem possuir uma capacidade inata de converter suas estruturas e alterar assim, suas conformações, o que resulta na formação de

partículas potencialmente perigosas, resistentes à degradação e causadoras de diversas doenças neurodegenerativas em humanos e animais (ELBOURN, 1999).

### 2.2.1. A descoberta da proteína prion

Em 1982 PRUSINER publicou um artigo na revista *Science* afirmando ter identificado o agente causador do *scrapie* e de doenças associadas ao *scrapie* como uma 'nova partícula proteinácea e infecciosa' ('*novel proteinaceous infectious particle*'). Para descrever o agente, Prusiner propôs o termo **Prion** representativo de sua natureza **proteinácea** e **infecciosa** (**proteinaceous and infectious**). Anteriormente, acreditava-se que essas doenças fossem causadas por vírus de ação muito lenta. No entanto, a radiação ultravioleta, que destrói ácidos nucleicos, não inativava os extratos, que continuavam infecciosos. Isso sugeria uma coisa muito estranha: se o agente da infecção não continha ácido nucleico, não poderia ser um vírus. Contudo a idéia de uma proteína infecciosa só foi possível com o isolamento e co-purificação da proteína prion a partir de hamster infectado com *scrapie*. A proteína do "*scrapie*" foi então chamada de **PrP**, que vem de "**Prion Protein**". Com o experimento Prusiner também descobriu que o agente era resistente a procedimentos que destruíam ácidos nucleicos (como baixo pH, ribonucleases, desoxiribunucleases, UV a 254nm, hidrólise catiônica bivalente, e modificação química por hidroxilamina). Daí, Prusiner foi capaz de distinguir o prion de vírus, viroídes e plasmídios (**Tabela 1**) por diferença das propriedades moleculares do agente da *scrapie*. Ademais, ao usar métodos de desnaturação, que modificam a conformação das proteínas, Prusiner demonstrou que a capacidade infecciosa do extrato diminuía muito.

### 2.2.2 A função e estrutura da proteína Prion

A proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) foi detectada como produto de gene de mamíferos constituída por aproximadamente 256 aminoácidos, altamente conservada em vertebrados, e expressa na maioria dos tipos celulares, embora

**Tabela 1** - Comparação clássica entre vírus e prion

|                                                | <b>Vírus</b>     | <b>Prion</b> |
|------------------------------------------------|------------------|--------------|
| Agente Infeccioso, Filtrável                   | Sim              | Sim          |
| Presença de ácido nucléico                     | Sim              | Não          |
| Morfologia definida por microscopia eletrônica | Sim              | Não          |
| Presença de proteína                           | Sim              | Sim          |
| <b>Desinfecção por:</b>                        |                  |              |
| Formaldeído                                    | Sim              | Não          |
| Proteases                                      | Alguns           | Não          |
| Aquecimento (80°C)                             | Maioria          | Não          |
| Ionização e radiação UV                        | Sim              | Não          |
| <b>DOENÇA</b>                                  |                  |              |
| Efeito citopatológico                          | Sim              | Não          |
| Período de Incubação                           | Depende do vírus | Longo        |
| Resposta Imune                                 | Sim              | Não          |
| Produção de Interferon                         | Sim              | Não          |
| Resposta Inflamatória                          | Sim              | Não          |

Fonte: ELBOURN, 1999.

As propriedades do agente causador da *scrapie*, a proteína prion, podem ser resumidas na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Propriedades do agente causador do *scrapie*

1. Estável a 90°C por 30 minutos
2. Partícula Infecciosa de baixo peso molecular
3. Proteína hidrofóbica é requerida para a infecção
4. Resistente a ribonucleases e desoxiribonucleases
5. Resistente a radiação UV a 254nm
6. Resistente a hidrólise catalítica com  $Zn^{2+}$
7. Resistente a modificação química com  $NH_2OH$

Fonte: PRUSINER, 1982

predominantemente nas células nervosas (BROWN et al, 1998; MANSON, 1999; GABUST et al, 2001). Os prions também podem ser identificados em muitos órgãos do sistema imune, como tonsilas e baço, sendo o último o mais provável sítio de replicação periférica. Acredita-se que as células dendríticas sejam as responsáveis pelo suporte deste processo (PRUSINER, 1998).

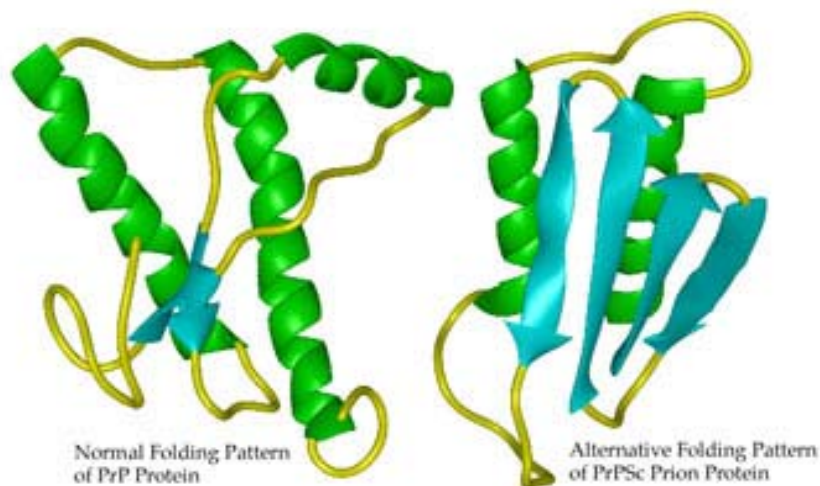
O gene PrP, que codifica a proteína PrP<sup>C</sup>, foi seqüenciado utilizando material de ovinos Suffolk susceptíveis ao *scrapie*. O sequenciamento mostrou que o gene é descontínuo, possuindo três éxons intercalados por dois íntrons. Os éxons podem ser definidos como regiões que expressam a informação genética, enquanto que os íntrons são regiões silenciosas ou não-expressas de um gene. Experimentos mostraram que os éxons do gene PrP apresentaram tamanhos variáveis de 52, 98 e 4028 nucleotídeos de comprimento. Os íntrons, quando comparados aos éxons, mostraram-se maiores, tendo 2421 e 14031 nucleotídeos cada um. Em roedores, a PrP<sup>C</sup> é codificada por um único éxon. De forma semelhante, o gene PrP de outros mamíferos possui um ou dois éxons não codificantes, além daquele que codifica a proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) (LEE et al., 1998).

Ainda não se conhece a função exata da PrP<sup>C</sup>, mas há fortes evidências de que seja uma proteína importante para a atividade sináptica dos neurônios, sendo sensível à ação de proteases (COLLING et al. 1996) e estando associada com ritmo circadiano.

A PrP<sup>C</sup> também tem função no metabolismo do cobre, pois estando ligada a este metal, demonstrou-se que a PrP<sup>C</sup> tem atividade antioxidante semelhante à superóxido dismutase (SOD). Isto foi sugerido a partir de estudos com camundongos, no quais constatou-se que animais deficientes em PrP<sup>C</sup> apresentaram uma redução de dez vezes na fração microsomal de cobre para o cérebro, havendo redução também na atividade da Cu-Zn superóxido dismutase. Estes animais apresentaram-se mais sensíveis à toxidez por Cu e ao estresse oxidativo (VILES et al., 1999; HOPE, 2000). Estudos com células em que a expressão do gene PrP havia sido abolida, por nocaute genético (*knock out genes*), demonstraram que as células nocauteadas pareciam ser

mais sensíveis ao estresse oxidativo do que aquelas em que ocorria expressão normal. A partir destas observações, foi postulado que a isoforma PrP<sup>C</sup> ligada ao Cu tem um papel importante na proteção celular aos danos causados por radicais livres (WONG et al., 1999). Foi relatado também, que a ablação do gene PrP em camundongos levou a ciclos anormais de sono-despertar, assim como ritmos circadianos alterados (PRUSINER, 1996).

A proteína prion existe sob duas formas, uma patogênica e a outra não. À forma normal, não causadora de doença, chamou-se PrP<sup>C</sup> (PrP Celular); a forma patogênica foi chamada de PrP<sup>Sc</sup> (PrP Scrapie), demonstradas na **Figura 3**, que encontra-se na forma de agregados no sistema endossomo-lisossomo. A conversão da proteína da forma normal (PrP<sup>C</sup>) para a forma anormal (PrP<sup>Sc</sup>) é um processo fundamental para a transmissão e instalação das doenças priônicas. A alteração ocorre após a síntese de PrP<sup>C</sup> no retículo endoplasmático. A proteína recém-sintetizada transita através do complexo de Golgi para a superfície da célula onde se ligará a uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI). Próxima à superfície celular, a PrP<sup>C</sup> é metabolizada ou convertida em PrP<sup>Sc</sup>. A molécula recém-formada volta à célula através de domínios membranares caveolares (CLD) localizados na superfície da célula como resultado de invaginações da membrana plasmática. Tais estruturas são ricas em proteínas ligadoras de colesterol, glicofosfolipídeos, sendo insolúveis em detergentes (VEY et al., 1996; KANEKO et al., 1997). O caráter infeccioso do *scrapie* ocorre pelo aumento das concentrações de PrP<sup>Sc</sup>. SABÓRIO et al. (1999) demonstraram em experimentos *in vitro* que a conversão da isoforma normal PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup> requer componentes celulares, os quais foram fornecidos na forma de células lisadas. Não se observou a conversão na ausência dos componentes celulares.



**Figura 3.** Modelos tridimensionais da Proteína Prion. O modelo da esquerda representa a forma normal da proteína  $\text{PrP}^{\text{C}}$  em que há predomínio de estruturas em  $\alpha$ -hélices. O modelo da direita representa a forma mutante da proteína prion a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  em que há predomínio de estruturas  $\beta$ -folheadas. (COHEN & PRUSINER, 1999).

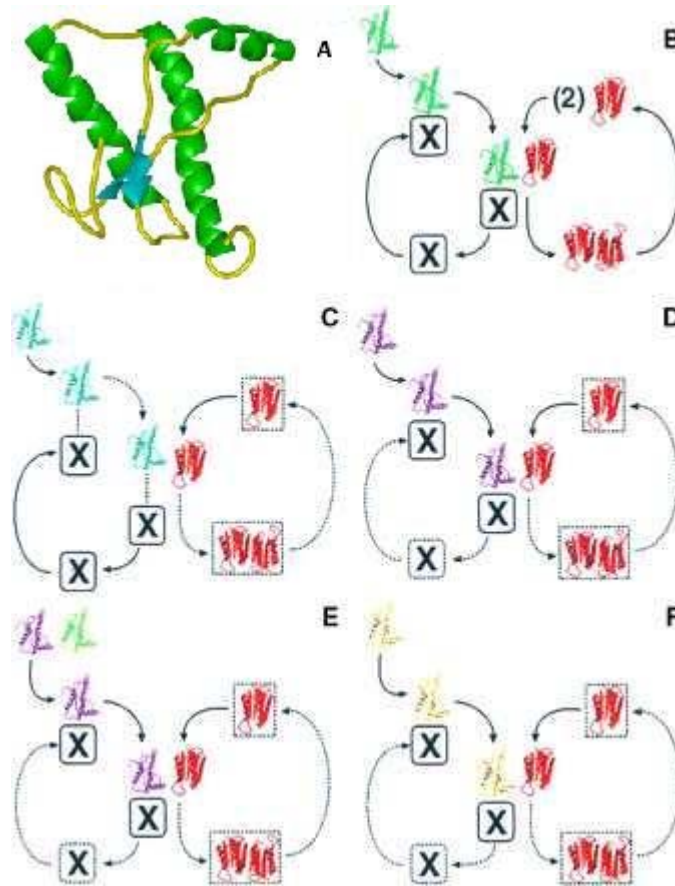
A  $\text{PrP}^{\text{C}}$  é uma proteína de conformação  $\alpha$ -hélice (42%) e sua conversão em  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  implica no aumento de estruturas  $\beta$ -folheadas (43%) e diminuição de conformação  $\alpha$ -hélice (30%) (PAN et al, 1993). Ambas possuem a mesma seqüência de aminoácidos e são covalentemente idênticas. Esta transição estrutural é acompanhada por profundas mudanças nas propriedades da proteína  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , como insolubilidade em detergentes não desnaturantes, propensão a agregar-se e resistência a proteinases (PRUSINER et al., 1996), interação anormal de membrana, termorresistência (SAFAR, 1996), meia vida mais longa, na qual a  $\text{PrP}^{\text{C}}$  tem duração de seis horas, enquanto a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  pode durar anos (BOSSERS, 1999).

**Tabela 3:** Comparação entre PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>.

|                                               | PrP <sup>C</sup>    | PrP <sup>Sc</sup>            |
|-----------------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| <b>Estrutura</b>                              | Estendida           | Globular                     |
| <b>Resistência a protease</b>                 | Não                 | Sim                          |
| <b>Presença de fibrilas de <i>scrapie</i></b> | Não                 | Sim                          |
| <b>Localização em ou nas células</b>          | Membrana Plasmática | Vesículas<br>citoplasmáticas |
| <b>Rotatividade</b>                           | Horas               | Dias                         |

Fonte: ELBOURN, 1999.

As alterações observadas na conformação da PrP<sup>C</sup> ocorrem por instabilidade da sua estrutura espacial. Tal efeito resulta de uma mutação ocorrida no gene PrP, a qual gera alelos múltiplos, onde cada um deles provocará um efeito diferente na expressão do gene. Evidências genéticas apontam para a existência de um fator auxiliar (proteína X) na conversão de PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup>. A proteína X é um fator desconhecido do hospedeiro, que pode ser uma ou mais moléculas que atuam como chaperonas (LIEMANN & GLOCKSHUBER, 1998). Em experimento realizado por KANEKO et al. (1997), demonstrou-se que o PrP<sup>C</sup> existe em equilíbrio com uma forma denominada PrP\* (PrP<sup>C</sup> ligada a Proteína X), que é definida como uma intermediária na formação do PrP<sup>Sc</sup>. Sob condições normais a forma do PrP<sup>C</sup> domina o equilíbrio conformacional. Com a ocorrência da doença infecciosa, o PrP<sup>Sc</sup> é fornecido a partir de fonte exógena, formando dímeros PrP<sup>Sc</sup> / PrP<sup>Sc</sup>. As vias de replicação da PrP<sup>Sc</sup> são demonstradas na **Figura 4**.



**Figura 4. Replicação de PrP<sup>Sc</sup> a partir de PrP<sup>C</sup>.** (A) Mostra a estrutura da PrP<sup>C</sup>. (B) Demonstra que a PrP<sup>C</sup> interage com a proteína X antes da formação do complexo PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup>. Dois ciclos são requeridos para a formação de PrP<sup>Sc</sup>. O ciclo da esquerda mostra a proteína X ligando-se a PrP<sup>C</sup> (verde) resultando em um complexo heterólogo que é capaz de interagir com a PrP<sup>Sc</sup> (vermelha). Após a conversão de PrP<sup>C</sup> na nascente PrP<sup>Sc</sup>, a proteína X dissocia-se do complexo, por uma relativa falta de afinidade com a isoforma PrP<sup>Sc</sup>. A proteína X é subsequenteemente reciclada. O ciclo da direita descreve a interação da PrP<sup>Sc</sup> com o complexo PrP<sup>C</sup>/proteína X e a conversão de PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup>. Com o passar do tempo, o resultado é um aumento exponencial na concentração de PrP<sup>Sc</sup> enquanto os outros componentes utilizados na conversão são reciclados. Os diagramas de C a F mostram como específicas mutações podem bloquear este mecanismo de conversão: (C) Mostra uma PrP<sup>C</sup> mutante (azul) contendo uma mutação na interface PrP<sup>C</sup>/proteína X, levando a uma fraca interação com a proteína X e subsequente a não formação do complexo PrP<sup>C</sup>/proteína X/ PrP<sup>Sc</sup>. Sob estas circunstancias não há formação de PrP<sup>Sc</sup> ou ocorre muito lentamente. (D) Mostra uma mutação na mesma região, porém forma-se uma ligação muito forte com a proteína X ocorrendo um ausência na liberação da mesma bloqueando a via de produção de PrP<sup>Sc</sup>. (E) A PrP<sup>C</sup> devido a sua habilidade de se ligar fortemente a proteína X compete com a forma normal PrP<sup>C</sup> (B) e previne a propagação de PrP<sup>Sc</sup>. (F) Mostra outro tipo de inibição, desta vez devido à barreira interespecífica, aonde a PrP<sup>C</sup> de ratos irá se ligar a proteína X e formar o complexo Proteína X/ ratoPrP<sup>C</sup>/ ovinoPrP<sup>Sc</sup>, mas não é capaz de estabelecer a conversão em PrP<sup>Sc</sup>, a proteína X é sequestrada e então a PrP<sup>Sc</sup> não é replicada. (Fonte: KANEKO et al., 1999).

Acredita-se que a região da PrP<sup>C</sup> envolvida na conversão inclua a curva que liga o primeiro cordão  $\beta$ -folheado ao primeiro domínio  $\alpha$ -hélice. Isto quer dizer que as mutações dentro das regiões de curva da PrP<sup>C</sup> tem efeito mais

significativo na formação de PrPres (Proteína Prion resistente à ação da proteinase K) e, portanto da doença (PRIOLA, 1999).

Uma recente hipótese formulada por DELEAULT et al (2003) adiciona um novo fato, a presença do RNA como elemento estimulador (um co-fator) na conversão da PrP<sup>C</sup> para a isoforma PrP<sup>Sc</sup>. Em artigo publicado na revista *Nature*, os autores sugerem que moléculas específicas de RNA são co-fatores celulares para a formação de PrP<sup>Sc</sup> *in vitro*.

### **2.2.3 Prions transmitem infecção**

A transmissão de prions de uma espécie para outra requer longo período de incubação ao se comparar à transmissão intraespecífica. Este fenômeno foi denominado barreira interespecífica (LIEMANN & GLOCKSHUBER, 1998). De acordo com PRUSINER et al. (1990), entre indivíduos da mesma espécie ocorre a transmissão de prions homólogos, onde a seqüência das duas isoformas (PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>) é semelhante. Diferentes espécies expressam formas da PrP<sup>C</sup> levemente diferentes, estas proteínas diferem um pouco na quantidade de aminoácido presente na seqüência de cada espécie, por exemplo, a PrP de ratos difere da PrP de Hamster por 16 aminoácidos, então se inocularmos PrP<sup>Sc</sup> de hamster em ratos a doença raramente se desenvolverá. Entretanto a diferença na seqüência de aminoácidos entre ovinos e bovinos é de apenas 7 aminoácidos, portanto a transmissão entre as duas espécies não é difícil. A proteína PrP humana difere da dos bovinos por mais de 30 aminoácidos, o que torna difícil a transmissão de BSE para o homem extremamente difícil, mas não impossível (OWEN, 1998). A transmissão de prions heterólogos entre espécies requer a troca de seqüências entre doador e hospedeiro, já que estas se apresentam diferentes (SCOTT et al., 1997). A diferença na seqüência do prion se dá através da linhagem e possivelmente através da interação do PrP<sup>C</sup> com um fator (ou fatores) desconhecido(s) do hospedeiro, denominado proteína X por (LIEMANN &

GLOCKSHUBER, 1998). Segundo WILESMITH et al. (1991), a grande semelhança de seqüências entre os prions dos ungulados parece ter facilitado a transmissão de prions ovinos para bovinos.

### 2.3 . Doenças Priônicas

As doenças prion (**Tabela 4**) ou doenças priônicas são patologias neurodegenerativas fatais e incuráveis que ocorrem nos Sistemas Nervoso Central (SNC) e Linfático a partir da modificação da proteína prion ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) (PRUSINER, 1997, 1998; WOOLHOUSE et al., 2001). Prions mutantes se acumulam em células cerebrais que morrem e abrem vacúolos espongiformes no cérebro, causando perda de coordenação motora, confusão e declínio mental seguida de morte.

A clássica característica neuropatológica das doenças priônicas inclui degeneração espongiforme, gliose e perda neuronal na ausência de resposta inflamatória (ELBOURN, 1999).

Devido às suas características de apresentação as doenças priônicas são conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) e podem ser transmitidas tanto naturalmente como experimentalmente. Estas doenças podem ser classificadas como **esporádica** (sem eventos antecedentes), **adquirida** (pela contaminação com o agente infeccioso) ou **familiar** (herança genética), das quais todas envolve uma modificação da proteína prion ( $\text{PrP}$ ), um constituinte normal das células de mamíferos (PRUSINER, 1998).

As TSEs estão associadas com o acúmulo de uma forma patológica da proteína prion normal ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), na qual estruturas  $\beta$ -folheadas aumenta enquanto estruturas  $\alpha$ -hélice diminui, e são especificamente detectadas no sistema nervoso central e tecidos linfóides de animais infectados, com *scrapie* (HORIUCHI, et al, 2002). A conversão da proteína normal ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) para uma isoforma resistente a proteases, a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , parece ser o principal evento na patogenicidade do *scrapie* e

outras doenças priônicas, e a PrP<sup>Sc</sup>, de acordo com a teoria priônica é o componente único da partícula infecciosa desta doenças (PRUSINER, 1998).

**Tabela 4:** As Doenças Priônicas

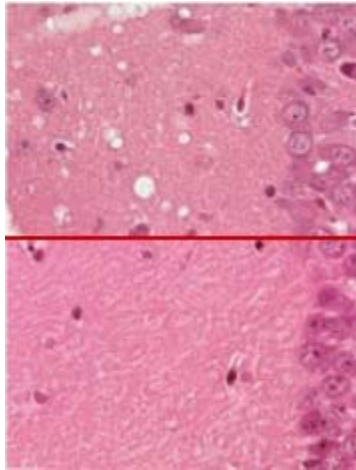
| <b>Doença</b>                       | <b>Hospedeiro</b>         | <b>Mecanismo de Patogenicidade</b>                                                       |
|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kuru                                | Humanos                   | Infecção através de rituais de canibalismo                                               |
| iCJD                                | Humanos                   | Infecção por hormônio do crescimento contaminado com prion, enxertos de dura mater, etc. |
| vCJD                                | Humanos                   | Infecção através de prion bovinos (carne contaminada)                                    |
| fCJD                                | Humanos                   | Mutação no gene PrP                                                                      |
| GSS                                 | Humanos                   | Mutação no gene PrP                                                                      |
| FFI                                 | Humanos                   | Mutação no gene PrP                                                                      |
| sCJD                                | Humanos                   | Mutação somática ou conversão espontânea de PrP <sup>C</sup> em PrP <sup>Sc</sup>        |
| FSI                                 | Humanos                   | Mutação somática ou conversão espontânea de PrP <sup>C</sup> em PrP <sup>Sc</sup>        |
| <b>Scrapie</b>                      | Ovinos                    | Infecção em ovinos geneticamente susceptível                                             |
| BSE                                 | Gado                      | Infecção com MBM ( <i>meat and bone meal</i> ) contaminados com prions.                  |
| TME                                 | Marta                     | Infecção através de prions de gado ou ovinos                                             |
| CWD                                 | Veado, Alce               | Desconhecido                                                                             |
| FSE                                 | Gatos                     | Infecção através de tecidos bovinos ou MBM contaminados com prions                       |
| Encefalopatia de ungulados exóticos | Órix, Nyala, Greater Kudu | Infecção com MBM ( <i>meat and bone meal</i> ) contaminados com prions.                  |

Fonte: PRUSINER, 1998.

### 2.3.1. Diagnóstico e terapia de doenças priônicas

Atualmente apenas o diagnóstico *post mortem* é realizado com segurança, através de exame histopatológico, que pode ser ambíguo para o hospedeiro no início da doença e, caso o material submetido esteja autolisado, o exame torna-se impossível de ser realizado com uma boa margem de segurança. Uma das principais dificuldades encontra-se no fato de que há uma grande semelhança entre a proteína PrP normal (PrP<sup>C</sup>) e a patogênica (PrP<sup>Sc</sup>). Visando o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico *ante mortem*, diversos anticorpos têm sido testados para detecção do agente infeccioso (O'ROURKE et al. 1998, O'ROURKE et al. 2000). Com o propósito de diagnosticar a PrP<sup>Sc</sup> em bovinos, MEYER et al. 1999, utilizaram o teste de ELISA, entretanto o teste só se mostrou eficaz quando a amostra foi submetida ao calor e tiocianato de guanidina, provavelmente por ter tornado acessíveis sítios antigênicos anteriormente escondidos.

Ainda não existe terapia efetiva contra as doenças priônicas. Entretanto, diversos grupos têm procurado desenvolver formas e substâncias capazes de parar e ou reverter a produção de PrP<sup>Sc</sup> causadora da doença (CHARBRY et al. 1999; SUPATTAPONE et al. 1999; PERRIER et al. 2000; SOTO et al. 2000). MALLUCCI et al., 2003 conseguiram parar a conversão da proteína saudável para a mutante em cobaias geneticamente modificadas. As cobaias recuperaram-se e viveram tanto quanto animais não infectados, a despeito da contínua presença do prion anormal no cérebro dos mesmos. O processo de conversão, e não o acúmulo da proteína, parece ser a chave da doença. Levando a suspeita de que a substituição da proteína normal pela mutante pode produzir um tóxico (pelo produto), uma forma intermediária, ou pode esgotar um fator que seja crucial para a sobrevivência das células cerebrais (**Figura 5**).



**Figura 5.** Dano no cérebro de cobaias (1) e recuperação, quando a conversão de prions foi parada (2), (MALLUCCI et al. 2003).

### 2.3.2. Saúde Pública

O impacto da BSE sobre a economia e saúde humana está refletido principalmente na Grã-Bretanha, onde a doença assume caráter epidêmico e quase um milhão de cabeças de gado foram infectados por prions. O elo de ligação entre *scrapie*, BSE e vCJD deu-se através da alimentação de bovinos com suplementos nutricionais protéicos a partir de restos de ovinos, bovinos, suínos e frangos. No final dos anos 70, o método de extração em solvente de hidrocarbonetos foi abandonado, resultando em suplemento mais rico em gordura. Esse fenômeno permitiu que prions sobrevivessem ao processamento da carne dos ovinos e passassem aos bovinos, causando a BSE. Casos de vCJD na Grã-Bretanha e França levaram à possibilidade de transmissão de prions bovinos para o homem, após consumo de cérebro e tecidos linfóides bovinos (PRUSINER et al., 1996; PRUSINER, 1997; AGUZZI & BRANDNER, 1999), aumentando a preocupação com as doenças priônicas.

## 2.4 Scrapie

O *scrapie* é uma TSE endêmica de ovinos domésticos (*Ovis aires*) e selvagens, atingindo também os caprinos. A doença é assim chamada porque os animais que sofrem desta enfermidade coçam (*scrapes*) o próprio corpo para aliviar o incômodo do prurido que estão sentindo, provocando danos na pele e em si próprio. O *Scrapie* foi reconhecido pela primeira vez como uma síndrome/doença na Grã Bretanha e Oeste da Europa há aproximadamente 250 anos.

O *scrapie* acomete ovinos de 1 a 4 anos de idade, apresentando períodos de incubação variáveis. O período de incubação pode ser influenciado por fatores isolados distintos ou por linhagens de prions que podem ser reconhecidas tanto por produzir períodos de incubação diferentes, como por causar diferenças nas características neuropatológicas padrões em experimentos realizados com ratos. Estima-se que existam aproximadamente 30 linhagens diferentes de prions associados ao *scrapie* (LAURENT, 1998; BARON et al. 2000; JACKSON & COLLINGE, 2000).

Ovinos e caprinos usualmente contraem o agente infeccioso do *scrapie* quando mastigam ou ingerem placenta e/ou fluidos contaminados. Além da ingestão oral, outras possíveis rotas de infecção podem ocorrer por escarificação e por via conjuntiva. Entretanto, nenhuma infectividade foi encontrada nas fezes, urina, leite, colostro ou saliva por teste de inoculação em ratos. A transmissão materna tem sido relatada como possível meio de disseminação do agente (GROSCHUP et al., 1996). Trabalhos realizados na Alemanha também sugeriram que as doenças prion podem ser transmitidas pelas moscas em diferentes estágios de desenvolvimento, mesmo após a morte, o que pode ser relevante na transmissão do *scrapie* e BSE (POST et al. 1999).

Observaram-se duas formas clínicas da doença: a forma pruriginosa e a forma nervosa, de acordo com a predominância de sinais sensitivos ou motores. Dentre os principais sinais tem-se: demência, ataxia, mioclonia,

prurido, hiperexcitabilidade e incoordenação motora. A evolução lenta da doença até a morte leva o animal a um estado de caquexia, paralisia. O estresse causado pelo manejo pode provocar um estado convulsivo no animal (BRUGERE-PICOUX, 1994; MARTINS, 1999; USDA, 1999; HARRIS, 2000).

No cérebro de animais com *scrapie*, ao exame microscópico, foram observadas áreas de gliose, perda neuronal, vacuolização dos neurônios e ausência de resposta inflamatória. Quando os tecidos do SNC foram fixados em formalina houve degeneração espongiiforme do cérebro e degeneração dos tecidos (O'ROURKE et al. 2000; WONG, 2001). Em ovinos afetados naturalmente com *scrapie*, foi evidenciada ainda a ocorrência de hipercorticismismo, em animais que apresentaram altas concentrações de cortisol no sangue (GAYRARD et al. 2000; PICARD-HAGEN et al. 2000).

Vários polimorfismos nos quadros abertos de leituras, ORF (*Open reading frame*) estão associados com diferentes níveis de expressão de fenótipos nas doenças prion, como por exemplo, período de incubação e sinais clínicos (BOSSERS et al, 2000). Para o gene PrP de ovinos pelo menos 11 diferentes aminoácidos polimórficos mutuamente exclusivos foram identificados nas determinadas posições: 112 (Met para Thr), 136 (Ala para Val), 137 (Met para Thr), 138 (Ser para Asn), 141 (Leu para Phe), 151 (Arg para Cys), 154 (Arg para His), 171 (Gln para Arg para Gln para His), 176 (Lys para Asn) and 211 (Arg para Gln) descritos por vários autores (BELT et al. 1995, 1996; BOSSERS et al, 1996; GOLDMANN et al. 1990, 1991; HUNTER et al. 1996; LAPLANCHE et al. 1993; TRANULIS et al. 1999, VACCARI et al. 2001). O polimorfismo nos códons 136 e 171 e menos extensamente no códon 154 ocorre freqüentemente e são determinantes de parâmetros para a classificação em relação à resistência/suscetibilidade ao *scrapie*. (BELT et al. 1995, HUNTER et al. 1996). Segundo VACCARI et al 2001, em todas as raças estudadas até os dias de hoje, uma mudança de aminoácido no códon 171 de Glutamina (Q) para Arginina (R) no gene PrP concede ao animal mais resistência ao desenvolvimento de *scrapie* natural, havendo apenas um caso descrito de *scrapie* relatado em ovino portador de genótipo homozigoto ARR até o momento (IKEDA et al. 1995). Em várias raças

analisadas, a suscetibilidade ao *scrapie* parece estar aumentada quando ocorre uma substituição do aminoácido Alanina (A) por Valina (V) no códon 136 (CLOUSCARD et al. 1995). Em raças em que o genótipo VRQ é muito raro ou ausente, o genótipo ARQ é associado com a suscetibilidade ao *scrapie* (KUTZER et al. 2002).

O mecanismo pelo qual diferentes variantes alélicas contribuem para a suscetibilidade ao *scrapie* não está completamente explicado. Baseando-se em estudos genéticos, pode-se deduzir que a ocorrência natural de variantes do gene PrP, incluindo aqueles que estão associados com um alto risco para *scrapie*, provavelmente não podem induzir um desenvolvimento espontâneo de *scrapie* em ovinos (BOSSERS, 1999; HUNTER, 1997 e 1998). Entretanto outros aspectos biológicos das TSE, como barreiras entre espécies, barreiras polimórficas, e propagação não genética de linhagens fenotípicas de prion têm refletido na especificidade das reações de conversão de PrP (BESSEN, 1995; BOSSERS, 1997; RAYMOND, 1997; KOCISKO, 1995).

O estudo da *scrapie* torna-se sensível e complicado pelos diferentes genótipos encontrados nas raças e pela possibilidade de várias linhagens de *scrapie* infecciosos existirem, juntamente com afinidades diferentes aos genótipos dos hospedeiros (SMITS et al. 1997).

A ocorrência de casos do *scrapie* no Brasil se resume ao Paraná, onde foram descritos os 3 únicos casos da doença, cujo foco inicial foi uma matriz Hampshire Down trazida dos EUA em 1989. Após a ocorrência do *scrapie* no município de Cândia – PR, o Ministério da Agricultura proibiu a importação de ovinos e caprinos, bem como sêmen e embriões, de países nos quais a doença tenha sido registrada (SOUZA, 2001).

A literatura mostra a grande relevância do *scrapie* no rebanho ovino, tanto em países afetados como naqueles considerados zona livre, bem como a importância em se determinar um sistema de seleção eficaz, que permita não só a melhoria de produtividade, mas também a geração de animais geneticamente resistentes.

#### 2.4.1 Estratégias de melhoramento animal

Com o surgimento de epidemias que comprometem a produção animal, a ciência busca meios de combate às doenças associadas ao desenvolvimento biotecnológico. De acordo com LEANES (1997), programas de melhoramento animal, visando à precocidade e massa muscular em ovinos de corte, podem estar associados à epidemia de *scrapie*, onde a seleção para características de desenvolvimento muscular e a conformação compacta do Suffolk (e outras raças de ovinos) parecem ter se associado à geração de altas taxas de prevalência de *scrapie*.

A aparente persistência do *scrapie* no rebanho ovino inglês, principal foco da epidemia de *scrapie* e BSE na Europa, por mais de 250 anos é um fato difícil de explicar, pois a susceptibilidade está associada a alelos únicos no gene PrP. Acredita-se que a tendência natural é a redução dos animais portadores de genótipos susceptíveis através da seleção natural, porque embora o *scrapie* afete ovinos com idade geralmente superior a 2 anos ou mais, onde o animal já se apresenta em puberdade, a doença reduz significativamente a expectativa de vida e, como consequência, reduz também a contribuição do indivíduo afetado às gerações futuras. A implicação disso seria o desaparecimento do *scrapie* entre a população ovina. Partindo deste pressuposto, um método ideal para controle do *scrapie* seria através do melhoramento genético baseado na seleção de acasalamentos, considerando a genotipagem dos indivíduos (seleção de animais com genótipos resistentes) ou abate seletivo (WOOLHOUSE et al., 2001).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados na tentativa de identificar raças de ovinos e os respectivos genótipos quanto à susceptibilidade ou resistência ao *scrapie*. As raças mais afetadas são Suffolk, Dorset Horn, Wiltshire Horn, Norfolk Horn, e com menor severidade Hampshire e Berkshire. Algumas raças aparentemente não apresentam a doença. São elas Southdown, Cotswold,

Dishley Leicester, Merino, Ryeland, Shropshire, Mendip, Portland, Lincoln e Romney Marsh, assim como seus cruzamentos (LEANES, 1997).

Além das raças, THOMAS, 2000; identificou-se também os genótipos de animais mais afetados, através de seus alelos **Tabela 5**. Os alelos podem ser definidos como as formas alternativas pelas quais o gene pode se apresentar em diferentes indivíduos.

**Tabela 5:** Possíveis genótipos para proteína prion em ovinos nos códons 136, 154, 171 e índice de resistência ao *scrapie* para cada genótipo.

| Códons |     |     | Índice de Resistência a<br>Scrapie* |
|--------|-----|-----|-------------------------------------|
| 136    | 154 | 171 |                                     |
| AA     | RR  | QQ  | 3                                   |
| AA     | RR  | QR  | 9                                   |
| AA     | RR  | RR  | 13                                  |
| AA     | RH  | QQ  | 3                                   |
| AA     | RH  | QR  | 9                                   |
| AA     | RH  | RR  | 13                                  |
| AA     | HH  | QQ  | 3                                   |
| AA     | HH  | QR  | 9                                   |
| AA     | HH  | RR  | 13                                  |
| AV     | RR  | QQ  | 1                                   |
| AV     | RR  | QR  | 7                                   |
| AV     | RR  | RR  | 11                                  |
| AV     | RH  | QQ  | 1                                   |
| AV     | RH  | QR  | 7                                   |
| AV     | RH  | RR  | 11                                  |
| AV     | HH  | QQ  | 1                                   |
| AV     | HH  | QR  | 7                                   |
| AV     | HH  | RR  | 11                                  |
| VV     | RR  | QQ  | 0                                   |
| VV     | RR  | QR  | 6                                   |
| VV     | RR  | RR  | 10                                  |
| VV     | RH  | QQ  | 0                                   |
| VV     | RH  | QR  | 6                                   |
| VV     | RH  | RR  | 10                                  |
| VV     | HH  | QQ  | 0                                   |
| VV     | HH  | QR  | 6                                   |
| VV     | HH  | RR  | 10                                  |

\* O índice é a soma numérica de cada valor numérico designado para cada genótipo de determinado codon:

**códon 136:** AA=3, AV=1, VV=0; **códon 154:**

RR=RH=HH=0; **códon 171:** RR=10, RQ=6, QQ=0.

Valores altos indicam maior resistência.

Fonte: THOMAS, 2000.

BALTER (2000) discutiu a possibilidade de duas raças serem infectadas por linhagens de prions diferentes, ou que a raça Suffolk produza maiores níveis de PrPc e por isso haja maior disponibilidade para conversão em PrPsc.

A resistência genética ao *scrapie* depende não somente do genótipo do prion do ovino, mas também da linhagem de *scrapie* presente. Genótipos que mostraram resistência à determinada linhagem têm-se mostrado suscetíveis a outra linhagem (THOMAS, 2000).

#### **Códon 136.**

Ovinos homozigotos para Alanina (AA) têm se mostrado mais resistente ao *scrapie* que ovinos homozigotos para Valina (VV) ou heterozigotos (AV) em estudos realizados na Europa (LAPLANCHE et al. 1993; TRANULIS et al. 1999, VACCARI et al. 2001). Entretanto alguns casos de ovinos AA ainda continuam sendo diagnosticados positivos para *scrapie* em rebanhos europeus, o que corrobora, portanto, o fato de que ovinos com genótipo AA não são considerados 100% resistentes à doença.

#### **Códon 154**

Dentre os três códons mais importantes, mudanças de aminoácidos no códon 154 aparentam ter um efeito mais leve na suscetibilidade ao *scrapie* que os outros dois (136 e 171) e genótipos suscetíveis não são consistentes entre os estudos. Em alguns estudos, ovinos com o alelo Arginina (R) apresentam menor incidência ao *scrapie*, já em outros estudos, demonstrou-se que ovinos com alelo Histidina (H) apresentam menor incidência (THOMAS, 2000). Aparentemente até o presente momento, a procura por genótipos de ovinos baseada no códon 154 não tem revelado grandes detalhes à questão do aumento da resistência ao *scrapie*.

#### **Códon 171**

Mudanças no aminoácido do códon 171 têm demonstrado um grande efeito na suscetibilidade ao *scrapie* em ovinos. Virtualmente nenhum ovino homozigoto para Arginina (RR) foi identificado com *scrapie*. A única exceção é um ovino Suffolk no Japão que foi diagnosticado positivo para *scrapie* (IKEDA et al. 1995). A frequência de ovinos heterozigotos (QR) também é baixa entre os ovinos infectados por *scrapie*. Entretanto, a frequência de ovinos homozigotos para

Glutamina (QQ) exatamente nesta posição é muito alta entre os ovinos infectados por *scrapie* (THOMAS, 2000). Porém, é preciso lembrar que possuir um genótipo dito suscetível, como o QQ no códon 171, não implica em infecção por *scrapie*. O *scrapie* não é uma doença puramente genética, e nem causada por um genótipo particular. Um agente infeccioso causa o *scrapie*. Para contraí-lo, portanto, é necessário que estejam presentes ambos os fatores, genótipo suscetível e agente infeccioso. Por exemplo, a Austrália e Nova Zelândia são livres de *scrapie*, mas genótipos suscetíveis são encontrados nas raças Suffolk, Cheviot, Merino e Poll Dorset deste países. No entanto, como já mencionado, a Austrália e Nova Zelândia são países onde até o presente momento não foi diagnosticado nenhum caso de *scrapie* (HUNTER & CAIRNS, 1998).

Programas para erradicação do *scrapie* têm sido implementados em alguns países através da seleção de ovinos resistentes ao *scrapie* e de acasalamentos baseados em genotipagem (DAWSON et al. 1998).

Segundo THOMAS, 2000, um rebanho onde todas as ovelhas sejam portadoras de genótipo suscetível QQ (códon 171) pode ser convertido rapidamente em um rebanho de genótipos resistentes QR e RR pelo simples uso de um carneiro portador de genótipo RR nos cruzamentos. Com a reposição normal das ovelhas numa taxa de 20% ao ano, mais de 2/3 das ovelhas do rebanho será de genótipos QR ou RR após 5 anos, simplesmente usando o carneiro portador de genótipo RR, com o descarte de ovelhas e crias portadoras de genótipo suscetíveis. A conversão do rebanho para animais portadores de genótipo QR e RR será mais rápida se, em adição ao uso de carneiros portadores de genótipo RR, a reposição dos cordeiros for preferencialmente selecionada com genótipos QR e RR e as ovelhas com genótipo QQ forem descartadas. De forma semelhante, algumas propriedades na Irlanda iniciaram um programa de melhoramento baseado em genotipagem, visando reduzir a proporção de alelos QQ<sub>171</sub> e aumentar a de alelos RR<sub>171</sub> (O'DOHERTY et al. 2000).

A literatura mostra a grande relevância do *scrapie* no rebanho ovino, tanto em países afetados como naqueles considerados zona livre, bem como a

importância em se determinar um sistema de seleção eficaz, que permita não só a melhoria de produtividade, mas também a geração de animais geneticamente resistentes. Dentre a bibliografia consultada, foi detectada a realização de apenas um estudo com raças do Brasil, realizado por LIMA (2002) no Ceará, com ovinos da raça Santa Inês. Nesse trabalho foram analisados 24 animais, tendo sido observada a presença de genótipo ARQ/ARQ em 38% das amostras. A presença de genótipo ARQ/ARQ é considerado um genótipo de risco ao desenvolvimento de *scrapie*, caso o animal entre em contato com o agente infeccioso, o que torna esses resultados preocupantes para a ovinocultura cearense/nordestina em geral. Dada à ocorrência de casos de *scrapie* no Paraná, e a carência de relatos técnicos científicos nessa área no Brasil, fortalece-se a necessidade de produção de conhecimentos referentes genotipagem para o gene PrP dos animais nativos do Brasil, em especial o nordeste brasileiro (onde a ovinocaprino cultura é utilizada como subsistência para grande número de famílias). A exemplo do que foi feito na Islândia, em que os estudos realizados em animais nativos islandeses permitiram identificar um comportamento diferenciado do gene PrP em relação aos demais países da Europa (THORGURSDOTTIR et al., 1999), faz-se necessária uma caracterização do gene PrP nos animais nativos do Nordeste do Brasil, visando o desenvolvimento de estratégias para prevenir a ocorrência de *scrapie* nesta região.

## **2.5 Polimorfismo de nucleotídeo único – SNP: (*Single Nucleotide Polymorphism*)**

Polimorfismos genéticos surgem a partir de uma mutação em determinada localização de um gene. Estes, provavelmente, não alteram a estrutura do gene ou sua função e podem não estar diretamente associados com mudanças no fenótipo (COLLINS et al, 1999). Diferentes classes polimórficas são geralmente nomeadas pela base ou tipo de mutação que resulta no polimorfismo (PALMER et al, 2001). A mais simples destas classes deriva da mutação de uma única base,

que substitui um nucleotídeo por outro, e tem sido chamada de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

A natureza e organização de polimorfismos, ou diferenças entre indivíduos, são de grande interesse para a pesquisa porque estas variações podem ser associadas com, ou até fundamentar, traços fenotípicos, incluindo suscetibilidade a doenças. Os SNPs são as fontes mais abundantes de variação genética entre os indivíduos de uma mesma espécie (JORDAN et al. 2001), o que fornece uma base compreensível para averiguação da diversidade genética (WILTSHIRE, 2002). Eles possuem um alto potencial para a classificação de genótipos. Entretanto, os protocolos de genotipagem por SNP, desenvolvidos até hoje exigem uma amplificação dos loci que contêm o SNP como, por exemplo, na reação de PCR.

Vários projetos têm sido conduzidos para a identificação de SNPs, incluindo estudos sobre genes específicos (NICKERSON et al, 1998), cromossomos (DAWSON et al. 2001) e o papel dos genomas (ALTSHULER et al. 2000). A análise de SNP tem sido feita por PCR e seqüenciamento de DNA, onde os primers são desenhados para amplificar regiões das seqüências que flanqueiam o SNP (TSUI et al. 2003). Problemas surgem por limitações não descritas durante a investigação de SNP, como por exemplo entre a associação genótipo-fenótipo nas doenças e a interação entre genética e fatores ambientais (RISCH & MERIKANGAS, 1996; PALMER et al, 2000).

A suscetibilidade ao *scrapie* é primeiramente controlada pelo polimorfismo do tipo SNP no gene da proteína prion. O polimorfismo ocorre no sítio de clivagem entre o terminal-N e a região hidrofóbica da proteína prion de ovinos, e esta região exibe alta taxa de conservação entre os mamíferos, levando a uma maior ou menor resistência do animal ao *scrapie* (SEABURY & DERR, 2003).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Realização do experimento

O experimento foi dividido em três etapas. A primeira etapa foi realizada a campo, onde foi feita a coleta do sangue dos animais para a extração de DNA genômico a partir de células mononucleares. A segunda etapa foi realizada em bancada de laboratório de biologia molecular – *wet lab*, constituída de separação de células monucleares a partir de sangue periférico, extração de DNA, reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e da reação de sequenciamento de DNA. A terceira e última etapa foi realizada em laboratório de bioinformática – *dry lab*, onde as seqüências de DNA obtidas foram analisadas qualitativa- e quantitativamente.

A primeira etapa do experimento foi realizada na Fazenda Experimental Vale do Curu da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizada em Pentecostes – CE e na EMBRAPA Caprinos/CNPC – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos localizada em Sobral – CE. A segunda e terceira partes do experimento foram realizadas no **NUGEN** – Núcleo de Pesquisa Genômica e Bioinformática (<http://nugen.lcc.uece.br>) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) .

#### 3.2. Ovinos

Os ovinos utilizados foram da raça deslanada Morada Nova, totalizando um total de 72 animais, sendo 29 da variedade vermelha (3 machos e 26 fêmeas), pertencentes ao rebanho da EMBRAPA Caprinos/CNPC – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos localizada em Sobral – CE, e 43 da variedade branca (3 machos e 40 fêmeas), pertencentes ao rebanho da Fazenda Experimental Vale do Curu da Universidade Federal do Ceará localizada em Pentecostes – CE. Ambas as regiões onde os animais estão localizados são livres de *scrapie*.

A coleta de sangue periférico dos animais foi realizada em tubos a vácuo contendo anti-coagulante do tipo EDTA, dado que a heparina parece inibir as enzimas usadas no processo de genotipagem (DAWSON et al. 1998). O sangue foi coletado por punção da veia jugular externa, conforme mostrado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Coleta de sangue por punção da veia jugular externa realizada em tubos *Vacuntainer* contendo EDTA.

### **3.3. *Wet Lab***

#### **3.3.1. Extração e Amplificação de DNA**

O DNA genômico foi isolado a partir de células mononucleares do sangue periférico total com EDTA (Ácido Etilenodiamino-tetracético), utilizando um método modificado a partir do descrito por KAWASAKI (1990) constando das seguintes etapas:

1. Centrifugou-se aproximadamente 5mL de sangue dentro de tubo Vacuntainer a 3.000 rpm por 7 min.
2. O creme leucocitário foi retirado e transferido para um tubo Eppendorf de 2ml.

3. A este tubo foi adicionado CLB\* 4°C até o volume de 2mL, submetido a forte agitação em vortex e posterior refrigeração a -20°C por 10 min.
4. Após nova agitação, os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 2min.
5. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 500µl de CLB\* 4°C. Os tubos foram vortexados até o sedimento ser liberado do fundo, e novamente refrigerados a -20°C por 10 min. Após este período, os mesmos foram centrifugados a 13.000rpm por 2 min. Este processo foi repetido até a obtenção de um pellet branco claro.
6. Ao pellet foi adicionado 300µl de SLB\* e 10µl de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho seco a 55°C por 2h, agitando periodicamente.
7. Após incubação, foi adicionado 100µl de NaCl 5M, sendo vortexados por 10min. e centrifugados por 10 min. a 13.000rpm.
8. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf (cônico) de 1,5mL e adicionado o mesmo volume de álcool etílico absoluto 4°C, agitado levemente e refrigerado *over night* a - 20°C.
9. Os tubos foram então centrifugados por 10min. a 13.00rpm e o sobrenadante desprezado cuidadosamente para não perder o pellet formado.
10. Adicionou-se aos tubos 500µl de álcool etílico 70%, os mesmos foram agitados brevemente e centrifugados por 10 min a 13.000rpm. O sobrenadante foi descartado e a operação foi repetida. Os tubos foram submetidos a uma temperatura de 90°C para secagem do DNA genômico.
11. O DNA foi ressuspensionado pela adição de 300µl de tampão TE e levados ao banho seco por 15min. a 55°C para completar a dissolução do material.
12. O DNA genômico foi então tratado com RNase A a uma concentração final de 10ug/ul e incubado por 1h a 37°C e então estocado a -30°C.

\* A composição destas soluções está descrita no Anexo 1

As amostras de DNA genômico extraído foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (WILEY & SONS, 1998) para verificação de contaminação e da qualidade das amostras. A quantificação das amostras foi feita através da leitura em espectrofotômetro (Genesys 8 - Spectronic Instruments<sup>®</sup>, gentilmente cedido pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilka Maria Vasconcelos, Laboratório de Toxinas Vegetais Departamento de Bioquímica da UFC) em comprimento de onda 260nm e 280nm. As amostras que apresentaram uma relação entre 1,4 e 2,1 foram consideradas com qualidade suficiente para a realização do PCR e seqüenciamento de DNA.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme INNIS & GELFAND, 1999, foi realizada numa reação de volume final de 10µL contendo 1µL de DNA genômico (10 – 100ng), 1µL de cada primer P8 (5' – CAG GTT AAC GAT GGT GAA AAG CCA CAT AGG – 3') e P143 (5' – CTG GGA TTC TCT CTG GTA CTG – 3' ) (THORGURSDOTTIR et al, 1999), armazenados uma concentração de 10pM/µL, 5µL de ReadyMix<sup>TM</sup> Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (20mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.002% gelatina, 0.4 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), estabilizadores, 0.06 unidades de Tad DNA Polymerase/ µL) e 2µL de água para PCR. O reagente utilizado ReadyMix<sup>TM</sup> Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> foi obtido do fabricante SIGMA<sup>®</sup>, enquanto os primers foram adquiridos do fabricante MWG BIOTECH Inc.

A reação de amplificação foi realizada num aparelho termociclador modelo Primus 96 Plus (MWG-Biotech), consistindo de um ciclo de 1,5min. a 95°C, 1,5min. a 58°C e 1,5min. a 72°C, seguido de 39 ciclos de 1min. a 94°C, 1,5min a 58°C e 1,5min. a 72°C, finalizando com uma incubação extensa de 10min. a 72°C (THORGURSDOTTIR et al, 1999). Após o PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio (0.5µg/ml), e visualizados em aparelho transiluminador sob radiação de luz ultravioleta (Transiluminador modelo FBTI 88, Fischer Scientific).

### 3.3.2. Seqüenciamento do produto de PCR

O seqüenciamento de DNA (SANGER et al. 1977) foi realizado na fita complementar dos produtos de PCR, utilizando o seqüenciador automático de DNA da marca ABI Prism® 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems). Antes de proceder ao seqüenciamento do DNA, os produtos de PCR foram purificados pelo método de precipitação com Etanol (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001) para a eliminação dos terminais não incorporados que, por ventura, pudessem ser detectados pelo seqüenciador, prejudicando a qualidade das seqüências. O processo de precipitação consistiu das seguintes etapas:

1. Adição de 25µL de água deionizada e 64µL de etanol 95% (a concentração final foi de 60%) em cada poço da placa de 96 *wells* e posterior incubação por 20 min. a temperatura ambiente para precipitar os produtos de extensão.
2. Centrifugação por 30 min. a 4000rpm.
3. Adição de 150µL de etanol 70% em cada *well*, inversão da placa para misturar e *spin down* para descartar o sobrenadante.
4. Secagem das amostras foi realizada no aparelho termociclador Primus 96 Plus (MWG-Biotech) a 90°C por 1min.

O produto da reação de PCR foi ressuspensa com a adição de 10µL de água mili-Q autoclavada e incubação por 1h a temperatura ambiente.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o primer P143 e terminais fluorescentes ddNTPs (ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit Version 3.0, Applied Biosystems), com 25 ciclos que consistiam em desnaturação a 95°C por 20s, anelamento a 50°C por 10s e extensão a 60°C por 4min.

A precipitação dos produtos não incorporados da reação de seqüenciamento foi realizada pela adição de isopropanol/etanol (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001) que consistiram dos seguintes passos:

1. Adição de 40µL de isopropanol a 65% em cada *well* (concentração final de 50%)

2. As amostras foram brevemente agitadas em vortex para homogeneização e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. na ausência de luz.
3. Centrifugação por 30 min. a 4000rpm
4. Imediatamente após a centrifugação, o isopropanol foi removido e adicionado 250µL de etanol 60%.
5. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 min. a 4000rpm
6. O etanol foi então removido e as amostras foram secadas no termociclador a 90°C por 1min.

Após a precipitação dos produtos não incorporados, as amostras foram, então, ressuspensas em 10µL de formamida e desnaturadas por um processo que consistiu de 5 minutos a 72°C no termociclador e 1 minuto de imersão em gelo para promover um choque térmico e a completa desnaturação do DNA. Após este processo, as amostras foram, então, levadas ao seqüenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems) mostrado na **Figura 7**.



**Figura 7.** Seqüenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems).

### **3.3.3. Condições da Corrida de Seqüenciamento do produto de PCR**

O produto de PCR submetido ao seqüenciamento, se trata de uma seqüência parcial de DNA, encontrada na ORF do éxon 1 no gene PrP de ovinos de aproximadamente 771pb.

Segundo APPLIED BIOSYSTEMS, 2001; o seqüenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, dispõe de um sistema de 16 capilares que injetam uma carga eletrostática nas amostras que migram através dos capilares de um pólo negativo até o pólo positivo localizado no final do capilar, encerrando a corrida eletroforética realizada em polímero *POP Version 6* (Applied Biosystems®). Os capilares dispõem de uma janela de detecção acoplada a um sistema de laser e a uma câmera. O feixe de raios laser, ao passar pela janela atravessando os capilares, incita as bases marcadas que produzem um comprimento de onda característica de cada base específica (ATCG). O comprimento de onda é então detectado pela câmera que transmite a informação ao computador acoplado ao seqüenciador. Este computador dispõe de um software, *Data Collection*® (Applied Biosystems®), que controla as operações do seqüenciador, bem como coleta e interpreta os dados produzidos. Os resultados coletados são posteriormente analisados pelo software *Sequence Analysis*® (Applied Biosystems®) responsável pela produção de um eletroferograma, que é representativo da seqüência de bases detectadas nas amostras. O eletroferograma é visualizado pelo aplicativo *Chromas*, que também pode traduzir o eletroferograma em um arquivo \*.txt (\*nome da amostra) em formato FASTA. O formato FASTA é um formato de texto padrão utilizado para submissão de seqüência a diversos programas de bioinformática, como por exemplo o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al, 1990). O tamanho do capilar utilizado neste trabalho foi o de 50cm, que seqüencia até aproximadamente 500 bases por corrida.

### **3.4 Dry Lab**

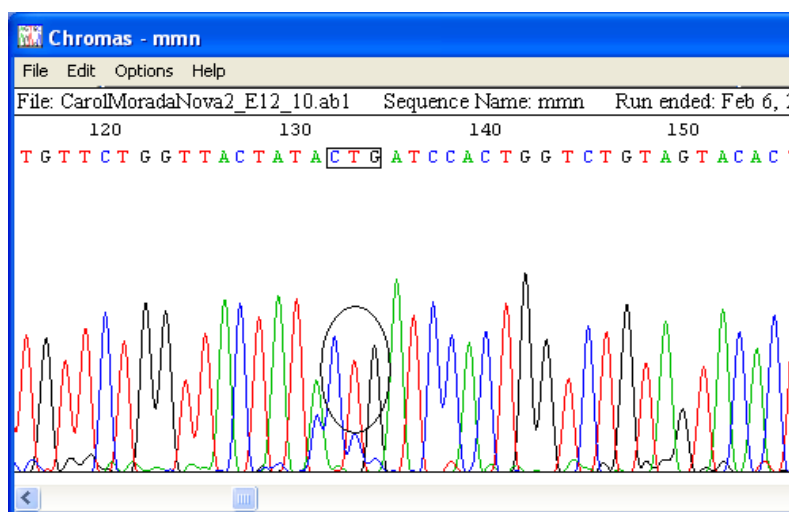
#### **3.4.1. Análise Bioinformática.**

As seqüências geradas pelo ABI Prism® 3100 foram salvas em arquivos do tipo \*.ab1 (onde \* é o nome da seqüência), contendo aproximadamente 195kb cada. Os dados foram posteriormente analisados pelo software Phred (*Base-*

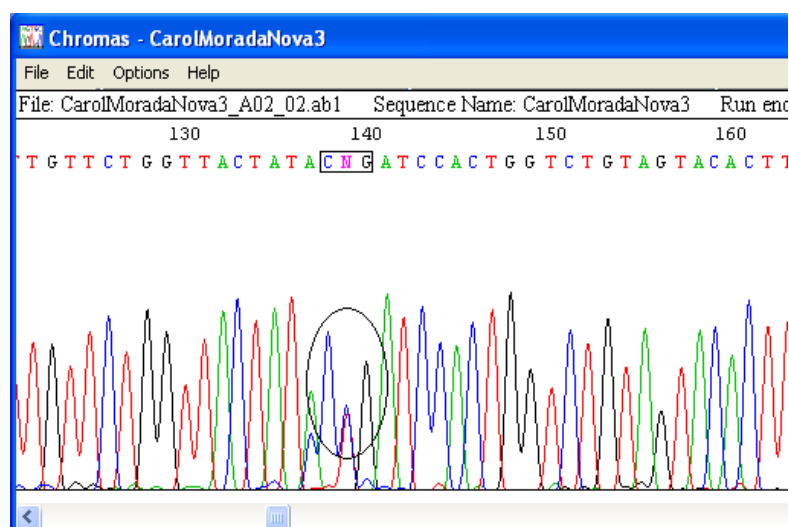
*Calling Software with Quality Information*) (GREEN & EWING, 2002) com a finalidade de verificar a qualidade das seqüências. O programa Phred consiste num software livre, cuja característica principal é transformar os arquivos de seqüências \*.ab1 em formato FASTA, atribuindo valores de qualidade (0-99) para cada nucleotídeo através de algoritmos que utilizam cálculos matemáticos para especificar a intensidade dos picos (altura e largura) gerados pelo eletroferograma (EWING et al. 1998). Além disso, o software Phred realiza a edição das seqüências para remoção de bases de baixa qualidade e ambigüidades. Somente as seqüências que apresentaram alta qualidade, bases com um escore Phred acima de 20 (valor confiável), foram selecionadas para análise dos genótipos dos animais. Aproximadamente 15% das amostras foram analisadas de uma vez (repetição de todo o processo deste a extração de DNA). Os polimorfismos nos códons 136 Ala/Val, 154 Arg/His, e 171 Gln/Arg/His foram utilizados como parâmetros para distinção dos genótipos do gene PrP.

As seqüências obtidas foram então submetidas a um BLAST (NCBI, 2004) para certificação da identidade das seqüências e identificação dos códons, 136, 154 e 171, bem como o aminoácido representativo de cada códon utilizado na identificação da genotipagem. O BLAST (ALTSCHUL et al, 1990) é um programa clássico em bioinformática que consiste numa serie de algoritmos heurísticos que fazem uma busca local (no banco de dados referenciado) de alinhamento de seqüências homólogas que compartilham regiões isoladas de similaridade.

Após a identificação dos genótipos no alelo 1, foi feita, a seguir, a análise do alelo 2 para a identificação de indivíduos homozigóticos e heterozigóticos. A análise foi realizada, conforme o método descrito por CORNUET et al. 1999, mediante a observação de picos simultâneos em uma mesma posição para cada códon determinante de parâmetro (136, 154, 171), onde a ausência de picos simultâneos classifica o indivíduo como homozigoto e a presença de picos simultâneos em uma mesma posição classifica o animal como heterozigoto. Conforme pode ser observado nas **Figuras 8 e 9**, que ilustram os eletroferogramas produzidos pelo software *Sequence Analysis*<sup>®</sup> e visualizado pelo aplicativo *Chromas*<sup>®</sup> do sequenciador ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer.



**Figura 8:** Ausência de picos simultâneos com códon 171 caracterizando um indivíduo homozigoto (Q/Q).



**Figura 9:** Presença de picos simultâneos com códon 171 caracterizando um indivíduo heterozigoto (Q/R).

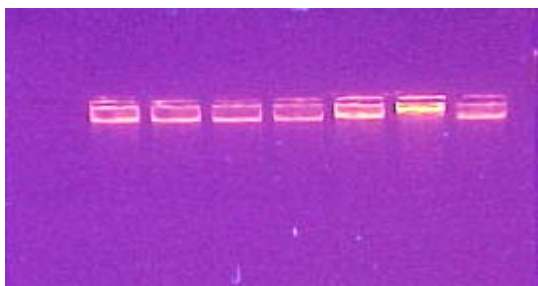
### 3.4.2. Análise Estatística

Os dados foram descritos na forma de frequência gênica na população. As associações entre as frequências dos diferentes genótipos e das mutações nos diferentes códons foram determinadas através de teste de Qui-quadrado a 1% de significância (SAS, 1999).

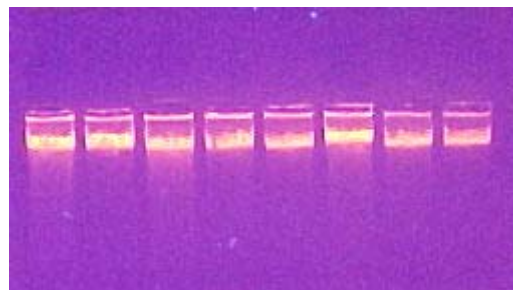
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extração e visualização do DNA genômico total dos ovinos Morada Nova

Subseqüente à realização do protocolo de extração do DNA genômico e corrida eletroforética, as amostras puderam ser visualizadas em géis ilustrados nas **Figuras 10 e 11**, demonstrando a ausência de contaminação por RNA ou outro DNA genômico, o que pode ser facilmente comprovado pela existência de uma banda larga e consistente, porem única.



**Figura 10.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando 7 (sete) canaletas contendo amostras de DNA genômico total de diferentes exemplares da raça Morada Nova



**Figura 11.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando 8 (oito) canaletas contendo amostras de DNA genômico total de diferentes exemplares da raça Morada Nova

A quantificação das amostras de DNA genômico apresentaram uma razão entre as leituras ao espectrofotômetro (em comprimento de onda 260nm e 280nm) de 1,6 a 2,1, conforme pode ser observado nas **Tabelas 6 e 7**.

**Tabela 6.** Quantificação do DNA genômico total das amostras de ovinos Morada Nova da variedade **vermelha**, verificada em espectrofotômetro (Genesys 8 - Spectronic Instruments®) com filtros de comprimento de onda 260nm e 280 nm.

| Nº de registro do animal | Sexo | Leitura a 260nm | Leitura a 280nm | Razão | Dosagem   |
|--------------------------|------|-----------------|-----------------|-------|-----------|
| 2930                     | ♀    | 0,017           | 0,010           | 1,70  | 0,17µg/µl |
| 2569                     | ♀    | 0,016           | 0,008           | 2,00  | 0,16µg/µl |
| 0877                     | ♀    | 0,018           | 0,011           | 1,64  | 0,18µg/µl |
| 2935                     | ♀    | 0,029           | 0,015           | 1,93  | 0,29µg/µl |
| 2907                     | ♂    | 0,018           | 0,011           | 1,64  | 0,18µg/µl |
| 2924                     | ♀    | 0,028           | 0,014           | 2,00  | 0,28µg/µl |
| 2585                     | ♀    | 0,017           | 0,009           | 1,90  | 0,17µg/µl |
| 0058                     | ♀    | 0,020           | 0,011           | 1,81  | 0,20µg/µl |
| 0181                     | ♀    | 0,032           | 0,016           | 2,00  | 0,32µg/µl |
| 2934                     | ♀    | 0,019           | 0,010           | 1,90  | 0,19µg/µl |
| 0220                     | ♀    | 0,018           | 0,010           | 1,80  | 0,18µg/µl |
| 2621                     | ♀    | 0,026           | 0,015           | 1,70  | 0,26µg/µl |
| 0894                     | ♀    | 0,020           | 0,012           | 1,67  | 0,20µg/µl |
| 2931                     | ♀    | 0,031           | 0,029           | 1,63  | 0,31µg/µl |
| 2691                     | ♀    | 0,010           | 0,005           | 2,00  | 0,10µg/µl |
| 2923                     | ♀    | 0,012           | 0,007           | 1,71  | 0,12µg/µl |
| 0057                     | ♀    | 0,016           | 0,009           | 1,77  | 0,16µg/µl |
| 0876                     | ♀    | 0,010           | 0,005           | 2,00  | 0,10µg/µl |
| 2690                     | ♀    | 0,025           | 0,012           | 2,08  | 0,25µg/µl |
| 0891                     | ♀    | 0,013           | 0,008           | 1,63  | 0,13µg/µl |
| 3707                     | ♀    | 0,020           | 0,012           | 1,67  | 0,20µg/µl |
| 1082                     | ♀    | 0,016           | 0,009           | 1,77  | 0,16µg/µl |
| 1161                     | ♀    | 0,020           | 0,011           | 1,80  | 0,20µg/µl |
| 2700                     | ♀    | 0,023           | 0,011           | 2,05  | 0,23µg/µl |
| 0179                     | ♀    | 0,045           | 0,022           | 2,04  | 0,45µg/µl |
| 2913                     | ♂    | 0,010           | 0,006           | 1,66  | 0,10µg/µl |
| 0207                     | ♂    | 0,017           | 0,010           | 1,70  | 0,17µg/µl |
| 1516                     | ♀    | 0,011           | 0,006           | 1,83  | 0,11µg/µl |
| 0899                     | ♀    | 0,010           | 0,006           | 1,67  | 0,10µg/µl |

**Tabela 7.** Quantificação de DNA genômico total das amostras de ovinos Morada Nova da variedade **branca**, verificada em espectrofotômetro (Genesys 8 - Spectronic Instruments®) com filtros de comprimento de onda 260nm e 280 nm.

| Nº de registro do animal | Sexo | Leitura a 260nm | Leitura a 280nm | Razão | Dosagem   |
|--------------------------|------|-----------------|-----------------|-------|-----------|
| 1593                     | ♀    | 0,029           | 0,018           | 1,60  | 0,29µg/µl |
| 1508                     | ♀    | 0,019           | 0,009           | 2,10  | 0,19µg/µl |
| 0543                     | ♀    | 0,023           | 0,011           | 2,03  | 0,23µg/µl |
| 1536                     | ♀    | 0,022           | 0,013           | 1,69  | 0,22µg/µl |
| 0370                     | ♀    | 0,018           | 0,010           | 1,80  | 0,18µg/µl |
| 0393                     | ♀    | 0,016           | 0,009           | 1,77  | 0,16µg/µl |
| 0668                     | ♀    | 0,044           | 0,023           | 1,91  | 0,44µg/µl |
| 1566                     | ♀    | 0,027           | 0,017           | 1,60  | 0,27µg/µl |
| 0633                     | ♀    | 0,024           | 0,014           | 1,71  | 0,24µg/µl |
| 0757                     | ♀    | 0,011           | 0,005           | 2,20  | 0,11µg/µl |
| 1589                     | ♀    | 0,035           | 0,021           | 1,67  | 0,35µg/µl |
| 0762                     | ♀    | 0,040           | 0,024           | 1,66  | 0,40µg/µl |
| 1516                     | ♀    | 0,022           | 0,010           | 2,20  | 0,22µg/µl |
| 0752                     | ♀    | 0,033           | 0,016           | 2,05  | 0,33µg/µl |
| 0665                     | ♀    | 0,015           | 0,007           | 2,10  | 0,15µg/µl |
| 1520                     | ♀    | 0,013           | 0,006           | 2,10  | 0,13µg/µl |
| 0679                     | ♂    | 0,028           | 0,016           | 1,75  | 0,28µg/µl |
| 0680                     | ♂    | 0,048           | 0,028           | 1,70  | 0,48µg/µl |
| 2002                     | ♀    | 0,050           | 0,030           | 1,67  | 0,50µg/µl |
| 1506                     | ♀    | 0,019           | 0,011           | 1,72  | 0,19µg/µl |
| 1594                     | ♀    | 0,020           | 0,011           | 1,8   | 0,20µg/µl |
| 0318                     | ♀    | 0,022           | 0,013           | 1,69  | 0,22µg/µl |
| 1587                     | ♀    | 0,031           | 0,019           | 1,63  | 0,31µg/µl |
| 0750                     | ♀    | 0,143           | 0,074           | 1,90  | 1,43µg/µl |
| 0720                     | ♀    | 0,026           | 0,012           | 2,05  | 0,23µg/µl |
| 0353                     | ♀    | 0,029           | 0,017           | 1,70  | 0,29µg/µl |
| 0305                     | ♀    | 0,026           | 0,015           | 1,73  | 0,26µg/µl |
| 0306                     | ♀    | 0,016           | 0,009           | 1,77  | 0,16µg/µl |
| 0066                     | ♀    | 0,020           | 0,010           | 2,00  | 0,20µg/µl |
| 0552                     | ♀    | 0,012           | 0,006           | 2,00  | 0,12µg/µl |
| 0634                     | ♀    | 0,022           | 0,011           | 2,00  | 0,22µg/µl |
| 0365                     | ♀    | 0,026           | 0,012           | 2,10  | 0,26µg/µl |
| 0379                     | ♀    | 0,026           | 0,013           | 2,00  | 0,26µg/µl |
| 2726                     | ♀    | 0,023           | 0,013           | 1,80  | 0,23µg/µl |
| 0387                     | ♀    | 0,018           | 0,011           | 1,70  | 0,18µg/µl |
| 1554                     | ♀    | 0,019           | 0,010           | 1,90  | 0,19µg/µl |
| 0678                     | ♂    | 0,035           | 0,022           | 1,60  | 0,35µg/µl |
| 1558                     | ♀    | 0,012           | 0,007           | 1,70  | 0,12µg/µl |
| 0088                     | ♀    | 0,025           | 0,015           | 1,70  | 0,25µg/µl |
| 0439                     | ♀    | 0,023           | 0,011           | 2,00  | 0,23µg/µl |
| 0306                     | ♀    | 0,021           | 0,012           | 1,80  | 0,21µg/µl |
| 0485                     | ♀    | 0,035           | 0,017           | 2,05  | 0,35µg/µl |
| 0723                     | ♀    | 0,039           | 0,018           | 2,10  | 0,39µg/µl |

#### 4.2. Reação de amplificação da ORF do éxon 1 do gene PrP e visualização dos produtos de PCR do gene PrP de ovinos Morada Nova.

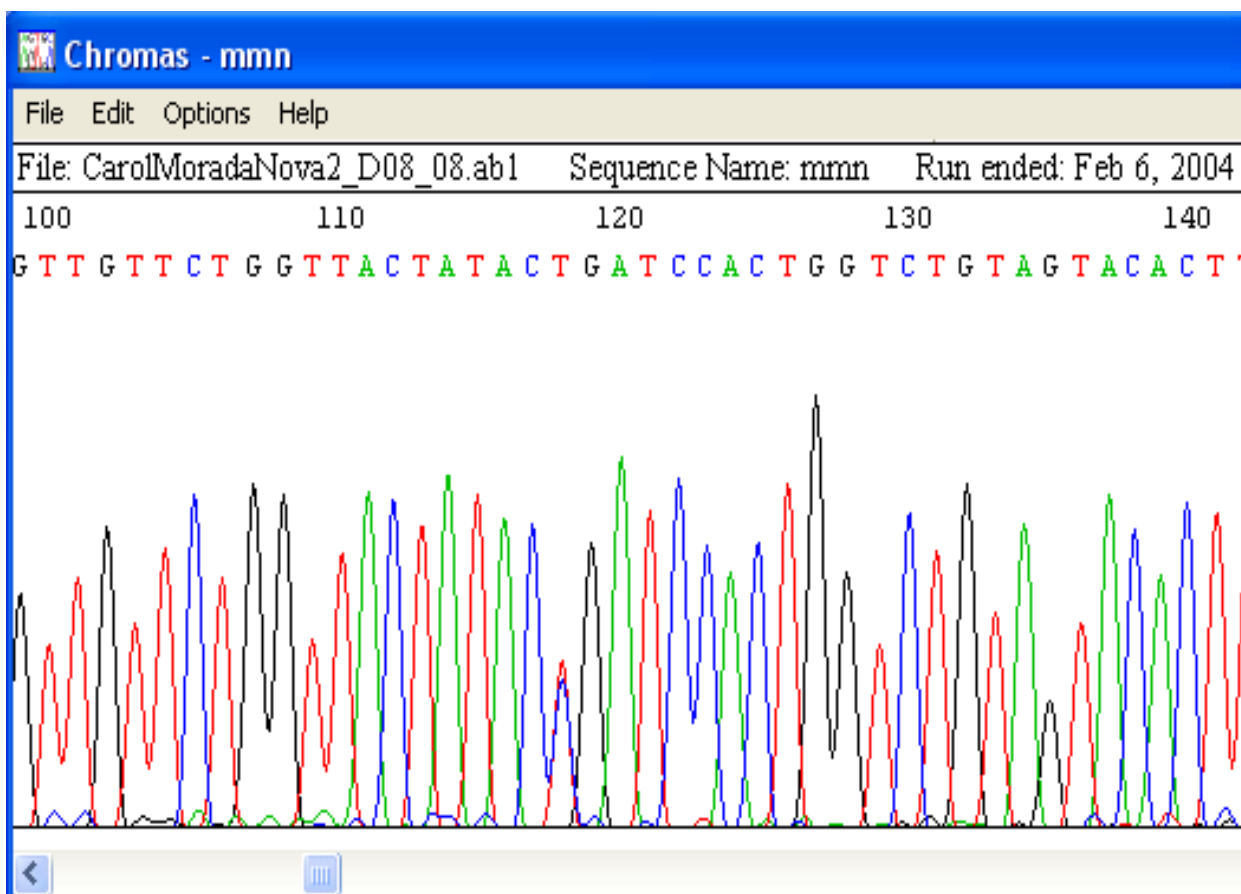
A **Figura 12** representa a visualização dos produtos do PCR em bandas de aproximadamente 771pb representativa da ORF do éxon 1 do gene PrP de ovinos, onde pode ser observado o tamanho e qualidade das amostras.



**Figura 12.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose para visualização de bandas contendo os produtos de PCR relativos ao éxon 1 do gene PrP ovino de 10 (dez) amostras da raça Morada Nova. A canaleta 1 ( esq.), apresenta o padrão molecular de DNA (DNA *Ladder*, 1KB – 0.5-10kb contendo 11 bandas, SIGMA®), enquanto nas demais canaletas são separadas as respectivas bandas para as 10 amostras corridas neste ensaio.

#### 4.3. Reação de seqüenciamento dos produtos de PCR do gene PrP de ovinos Morada Nova e visualização dos eletroferogramas.

O seqüenciamento dos fragmentos gerou, dentre outros formatos de dados, um arquivo gráfico contendo picos representativos dos quatro nucleotídeos ou bases possíveis (A para adenina, T para timina, C para citosina e G para guanina) e as posições relativas das bases, como números na parte superior, acima da discriminação de cada base representada por seu pico. A **Figura 13** abaixo, que ilustra o eletroferograma de uma das 72 amostras analisadas. A seqüência é apresentada desde a posição 105 ate 150 do fragmento.



**Figura 13.** Exemplo de um eletroferograma visualizado pelo aplicativo *Chromas*<sup>®</sup> (da Applied Biosystems) em uma interface gráfica para melhor visualização de picos e posições.

#### 4.4. Análise da qualidade das seqüências do gene PrP de ovinos Morada Nova

A **Figura 14** mostra a transformação sofrida por uma seqüência alvo, mediante a edição e análise antes e depois de tratada com o software PHRED.

[illegible]

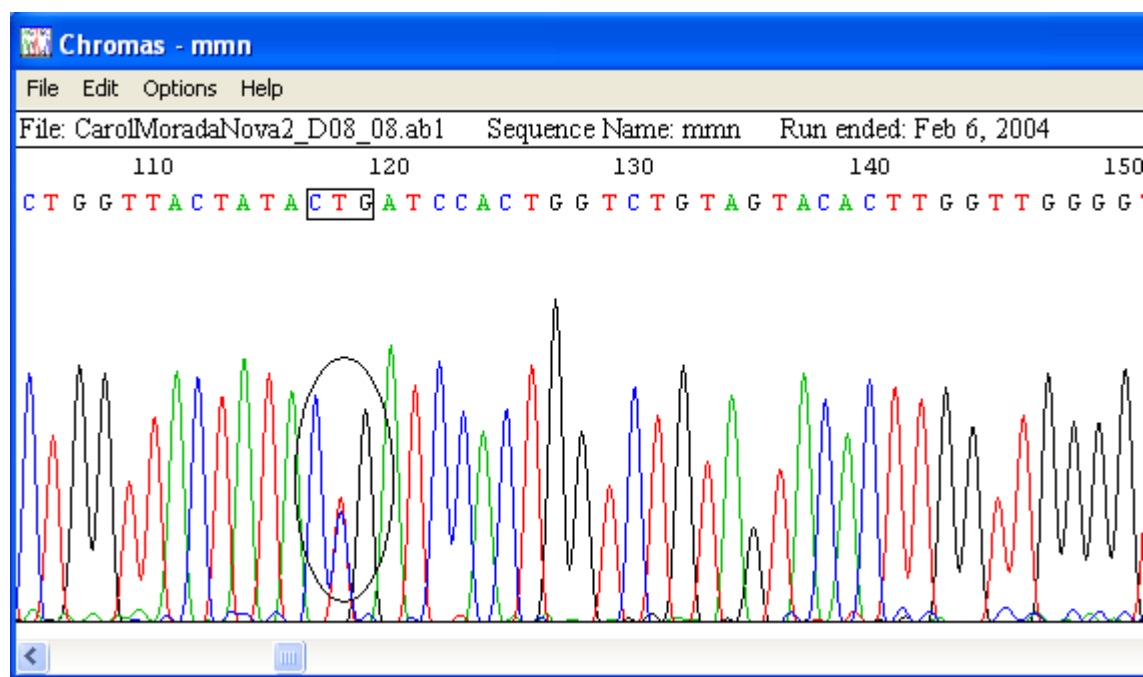
**Figura 14.** Comparação das seqüências obtidas pelo seqüenciador automático de DNA antes (1) e depois (2) de analisadas pelo software PHRED, onde as bases de baixa qualidade são eliminadas.

#### 4.5. Busca e análise de polimorfismos nas seqüências do gene PrP de ovinos Morada Nova.

As seqüências submetidas ao PHRED foram, subseqüentemente, analisadas individual- e manualmente por confirmação visual comparativa com os cromatogramas originais visualizado pelo aplicativo *Chromas*<sup>®</sup> (versão 1.45 – 32 bit, McCarthy, 1996). Os polimorfismos dos códons 136 (Ala/Val), 154 (Arg/His), e 171 (Gln/Arg/His) foram usados para distinção dos genótipos ovinos do gene PrP e as seqüências completas podem ser observados no **Anexo 2**.

#### 4.5.1. Determinação de homozigidade / heterozigidade para o gene PrP

A condição de homozigose ou heterozigose dos genótipos dos animais foi analisada pela localização direta dos códons polimórficos (136, 154 e 171) nos eletroferogramas de cada sequência, conforme pode ser visto na **Figura 15**.



**Figura 15.** Trecho do gene PrP de ovino Morada Nova. Exemplo de heterozigose encontrada no códon 171 (CTG, mostrado na figura com um círculo) evidenciada pela presença de picos simultâneos em uma mesma posição (base 118, um pico azul e um vermelho, concomitante).

#### 4.5.2. Análise quantitativa dos genótipos ovinos para o gene PrP

Ao todo, 72 ovinos da raça deslanada Morada Nova foram analisados e tiveram seus genótipos determinados para o haplótipo PrP.

Foram detectados os já conhecidos dimorfismos no códon 136 (Arginina ou Valina), porém o dimorfismo esperado no códon 154 (Arginina ou Histidina) não foi encontrado, aparecendo apenas o aminoácido Arginina (R) no códon 154 de todos os animais examinados. De modo similar, os esperados trimorfismos no códon 171 (Glicina ou Arginina ou Histidina) não foram detectados nos ovinos examinados, mas apenas um dimorfismo do códon 171

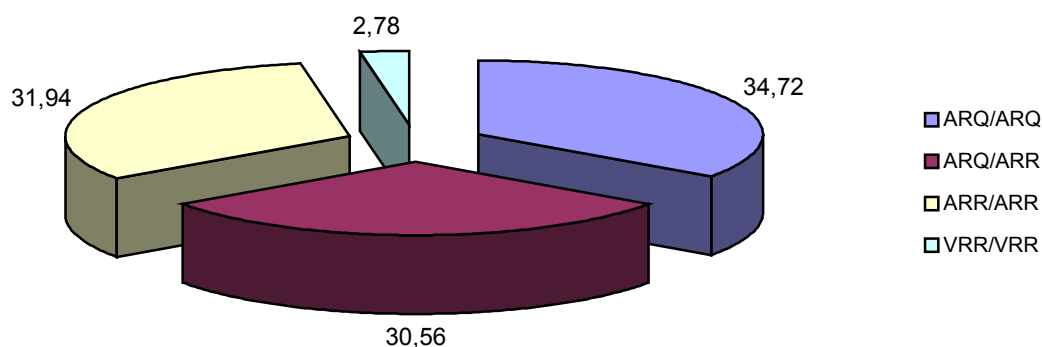
pôde ser detectado (com apenas dois tipos de aminoácidos aparecendo na posição 171, Glicina (Q) ou Arginina (R)).

A análise dos haplótipos mostrou quatro diferentes combinações de tipos polimórficos, incluindo o alélico variante VRR/VRR, detectado em apenas dois animais. Esta variante (VRR/VRR) é muito rara e sua relevância quanto à resistência ou suscetibilidade ao *scrapie*, embora extensamente comentada na literatura, ainda não está completamente evidenciada por confirmações reprodutíveis em experimentos de desafios, e requer, portanto, investigações futuras nas raças afetadas pela doença para comprovação definitiva. Considerando a baixa freqüência destes genótipos no total amostrado, conforme observado na **Tabela 8 e Gráfico 1**, este genótipo, embora preocupante, pode ser considerado raro na raça Morada Nova.

**Tabela 8:** Freqüência genotípica encontrada nos ovinos Morada Nova.

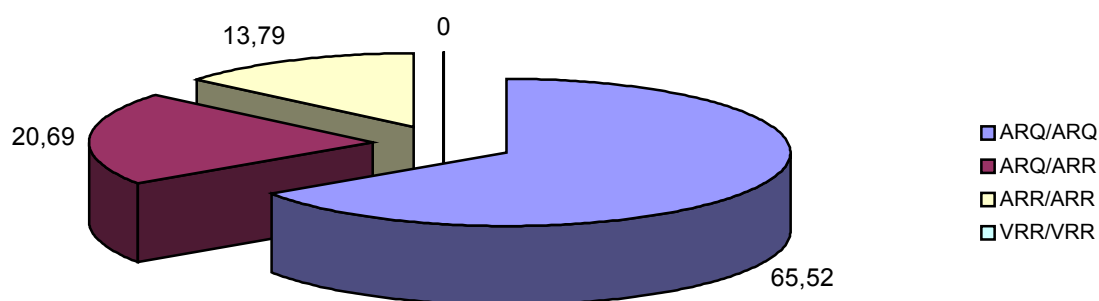
| Genótipo |     |     | n  | Percentual (%) |
|----------|-----|-----|----|----------------|
| 136      | 154 | 171 |    |                |
| AA       | RR  | QQ  | 25 | 34,72          |
| AA       | RR  | QR  | 22 | 30,56          |
| AA       | RR  | RR  | 23 | 31,94          |
| VV       | RR  | RR  | 2  | 2,78           |
| TOTAL    |     |     | 72 | 100            |

**Gráfico 1:** Freqüência genotípica encontrada nos ovinos deslanados Morada Nova

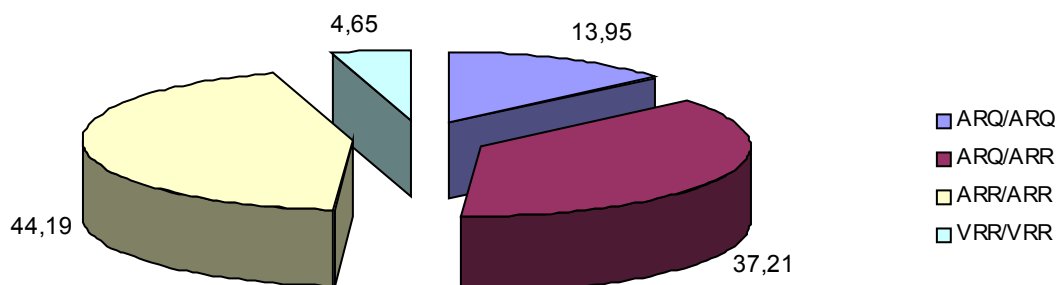


Foram encontradas diferenças significativas nas frequências genóticas entre as duas variedades da raça Morada Nova analisadas (vermelha e branca), conforme observado quando se compara os **Gráficos 2 e 3**.

**Gráfico 2: Frequência genotípica em ovinos deslanados Morada Nova variedade vermelha**



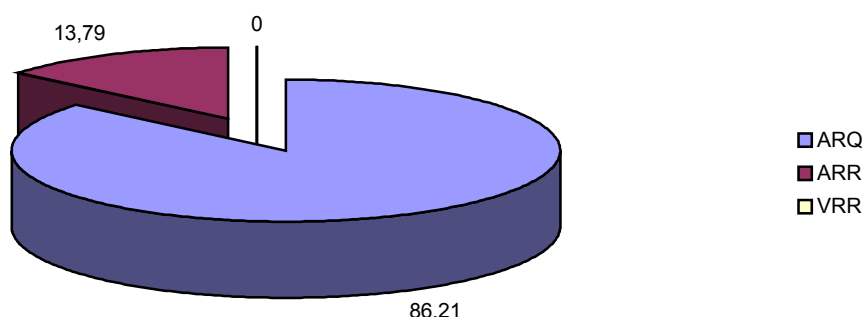
**Gráfico 3: Frequência genotípica em ovinos deslanados Morada Nova variedade branca**



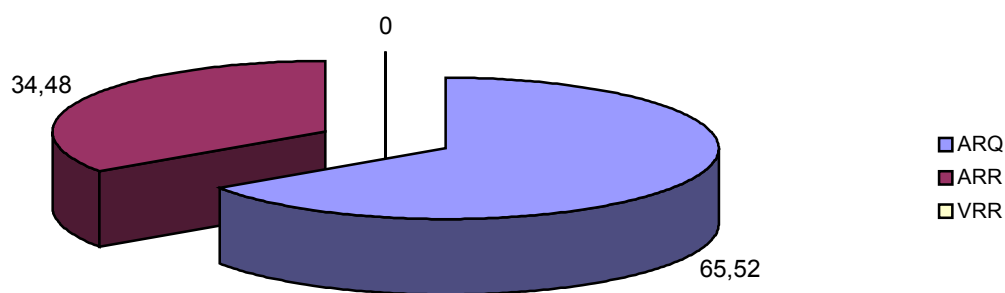
#### 4.5.3. Análise e distribuição da frequência alélica do gene PrP por variedade da raça Morada Nova

A análise da distribuição de frequência para o alelo 1 e 2 mostrou-se diferente nas duas variedades. Como pode ser observado nos **Gráficos 4 e 5**, na variedade vermelha há predominância dos genótipos ARQ tanto no alelo 1 como no alelo 2.

**Gráfico 4: Frequência genotípica do alelo 1 em ovinos deslanados Morada Nova variedade vermelha**

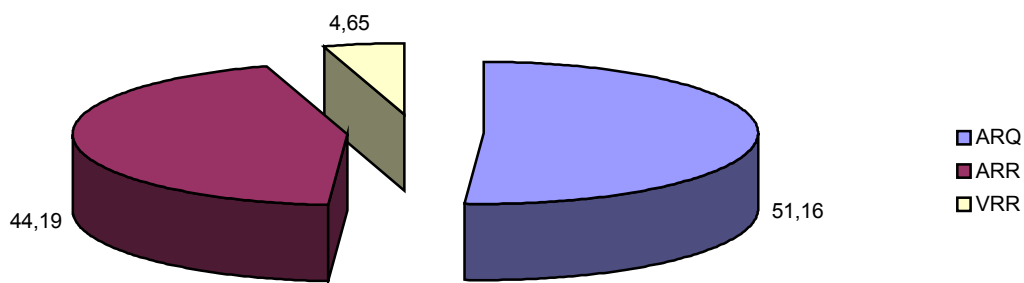


**Gráfico 5: Frequência genotípica do alelo 2 em ovinos deslanados Morada Nova variedade vermelha**

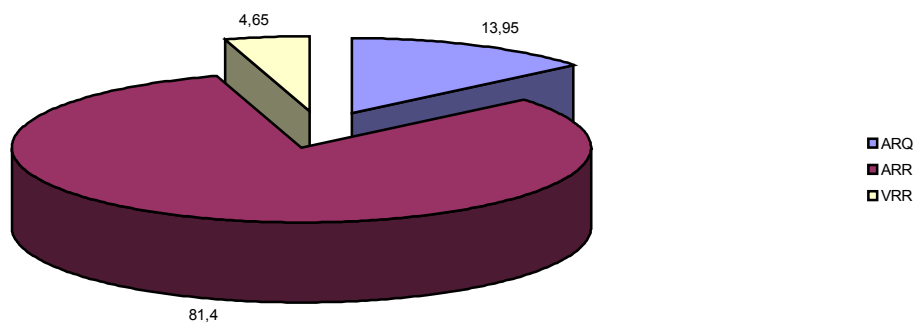


Na variedade branca os genótipos ARQ e ARR predominam no alelo 1, porém no alelo 2 o variante alelico ARR possui uma frequência bem maior que as demais variantes como pode ser observado nos **Gráficos 6 e 7**.

**Gráfico 6: Frequência genotípica do alelo 1 em ovinos deslanados Morada Nova variedade branca**



**Gráfico 7: Frequência genotípica do alelo 2 em ovinos deslanados Morada Nova variedade branca**



#### 4.5.4. Análise e distribuição da frequência alélica do gene PrP por sexo, na raça Morada Nova

Neste estudo, a análise dos resultados pelo teste Qui – quadrado mostrou que não há relação significativa entre a frequência genotípica e o sexo ( $\chi^2 \geq 4.1094$  e  $P \leq 0,2499$ ). Resultados este que estão de acordo com o relato de WOOD et al. (1992) e também de diversos outros autores, os quais demonstram que o *scrapie* afeta ovinos de um modo geral, sem distinção de sexo.

#### 4.5.5. Análise estatística e comparação geral dos polimorfismos genéticos apresentados pela raça Morada Nova em relação ao gene PrP

Como mostrado na **Tabela 10**, a variedade branca apresentou um grau maior de polimorfismo no códon 171 ( $\chi^2 \geq 20.9$  e  $P \leq 0.0001$ ), quando comparada com a variedade vermelha. Considerando o códon 136 da variedade vermelha, este se mostrou diferente do códon 136 da variedade branca por não ter apresentado nenhum alelo  $V_{136}$ .

**Tabela 9.** Comparação dos polimorfismos nos códons 136 e 171 em ovinos Morada Nova variedade branca e vermelha.  
Alelos dos códons 136 e 171 (a) e os resultados da comparação estatística (b) utilizando tabela de contingência  $N \times K$  ( $\chi^2$ ).

| (a)      | n  | PrP 136 |      |    |     | PrP 171 |      |    |      |    |      |
|----------|----|---------|------|----|-----|---------|------|----|------|----|------|
|          |    | AA      |      | VV |     | QQ      |      | QR |      | RR |      |
|          |    | n       | %    | n  | %   | n       | %    | n  | %    | n  | %    |
| Branca   | 43 | 41      | 95,4 | 2  | 4,6 | 6       | 13,9 | 16 | 37,2 | 21 | 48,9 |
| Vermelha | 29 | 29      | 100  | 0  | 0   | 19      | 65,5 | 6  | 20,7 | 4  | 13,8 |

| (b)                | PrP 136  |      | PrP 171  |         |
|--------------------|----------|------|----------|---------|
|                    | $\chi^2$ | P    | $\chi^2$ | P       |
| Branca vs Vermelha | 1,39     | 0,23 | 20,9     | <0,0001 |

Quanto ao códon 154, as duas variedades apresentaram homozigose completa para o aminoácido Arginina (R), não havendo nenhum caso diferente. Esse resultado mostrou-se interessante, pois revelou uma alta fixação do

aminoácido e vale ressaltar que o alelo R<sub>154</sub> em homozigose já foi associado a um maior risco de ocorrência do *scrapie*, quando comparado ao heterozigotismo R/H, segundo recente estudo de BILLINIS et al. (2004).

Tomados em conjunto, os resultados obtidos com os 72 animais da raça Morada Nova denotaram uma forte homozigosidade para o gene PrP, além de pouca variação alélica (apenas 3 variantes alélicas encontrados). Outro dado geral que chama a atenção, nas duas variantes da raça analisadas, é a baixa frequência polimórfica (apenas 4 tipos polimórficos encontrados), quando comparados com estudos em outras raças (onde até 10 variantes alélicas e 20 tipos polimórficos são descritos), segundo GOMBOJAV et al (2003), BILLINIS et al., (2004) e DROGEMULLER et al. (2001), dentre vários outros.

Os resultados do presente estudo mostraram a frequência genotípica relativa a três códons (136, 154 e 176) do gene PrP na raça ovina Morada Nova, do Nordeste brasileiro. Este é o primeiro relato de frequências haplotípicas para o gene PrP nesta raça deslanada, havendo um estudo anterior (LIMA, 2002) com a raça Santa Inês, cujos resultados corroboram os ora apresentados para a Morada Nova. Os quatro diferentes genótipos e três variantes alélicas representam um quadro revelador da situação genética da raça em relação ao gene PrP. Os dimorfismos nos códons 136 e 171 resultaram em três variantes alélicas (VRR, ARR e ARQ) que já foram descritos nas raças Suffolk, Corriedale, Ile-de France, Romanov e em raças nativas da Mongólia (Japão) e da Grécia, dentre inúmeras outras.

Quanto ao códon 136, foi aqui encontrado o alelo V (V<sub>136</sub>, tido como de alta suscetibilidade ao *scrapie*) em apenas dois animais, enquanto 70 apresentaram o alelo A<sub>136</sub>. Avaliando a raça Suffolk, um estudo na Irlanda mostrou apenas um animal com alelo variante na posição 136 em 188 examinados (O'DOHERTY et al., 2000), enquanto outro nos EUA mostrou 3% e 97%, respectivamente para os alelos V<sub>136</sub> e A<sub>136</sub> (YUZBASIANYAN-GURKAN et al., 1999), ao passo que na maioria das raças, inclusive japonesas da Mongólia (GOMBOJAV et al., 2003) e gregas (BILLINIS et al., 2004), a proporção se repete, demonstrando uma prevalência comum do alelo A<sub>136</sub> distribuída por diferentes raças de ovinos. Na

raça Morada Nova, a prevalência extremamente baixa para o alelo V<sub>136</sub> (2,78%) e extremamente alta para o alelo A<sub>136</sub> (97,22%), além de plenamente compatíveis com os dados descritos na literatura mundial, também se associam com a presença do alelo resistente R<sub>171</sub>, presente tanto na forma homozigota (31,94%) quanto heterozigota (30,56%).

No entanto, o achado do alelo Q<sub>171</sub> em homozigose (34,72%) e em heterozigose (30,56%QR), nos exemplares avaliados da raça Morada Nova, alerta para o potencial risco de cruzamentos usando estes genótipos. Sabe-se que a correlação positiva entre homozigosidade para o alelo Q<sub>171</sub> e o risco para *scrapie* tem sido observada numa serie de estudos com diversas raças (CLOUSCARD et al., 1995; O'ROURKE et al., 1997; BILLINIS et al., 2004, dentre outros). Ademais, a heterozigosidade para esse códon é outro fator genotípico considerado como favorável à resistência ao *scrapie*, segundo os mesmos e vários outros autores.

O alelo consistindo de VRQ nos três códons (136, 154, 171) do gene PrP é considerado raro ou ausente em várias raças, como Suffolk e da Mongólia, o que neste estudo com Morada Nova parece também ocorrer, mediante a ausência deste genótipo nos 72 animais examinados. Já o alelo consistindo de ARQ tem sido associado com alta suscetibilidade ao *scrapie* e, neste trabalho, aparece com frequência de 34,75% (em homozigosidade) e 30,45% (em heterozigosidade com ARR), este ultimo sendo um alelo que tem sido associado com baixa suscetibilidade ao *scrapie* e aqui aparece (ARR) em 31,92% (em homozigose) e em 30,49% (em heterozigose), dentre os animais genotipados.

Não houve até o momento nenhum relato de *scrapie* em raças de ovinos deslanados brasileiros, embora também não haja relatos de estudos sistemáticos de genotipagem para o gene PrP ovino seja em qualquer raça utilizada no Brasil. Os resultados aqui apresentados, porém, sugerem que a raça Morada Nova apresenta genótipos potencialmente suscetíveis para o *scrapie*, assim como também já havia sido relatado para a raça Santa Inês (LIMA, 2002). Este estudo se limitou a dois rebanhos da raça Morada Nova e a duas variedades da raça (vermelha e branca) criados nos municípios de Pentecostes e Sobral do estado do Ceará, mas outras investigações se fazem necessárias, com numero maior de

exemplares e maior representatividade do rebanho nordestino, para que os achados possam fornecer subsídios mais concretos a fim de sua utilização em programas de seleção e cruzamentos de animais resistentes ao *scrapie*.

Diversos países da Europa e América Central têm adotado sistemas de erradicação do *scrapie*, baseados na seleção de animais com genótipos resistentes, introdução desses animais em rebanhos para disseminação do genótipo alvo, bem como a eliminação de animais com genótipos potencialmente suscetíveis ao *scrapie*. Deve-se, então, procurar alcançar a conscientização dos criadores de ovinos e das autoridades agropecuárias e sanitárias do Estado (e da Região Nordeste) para incentivar programas de melhoramento genético visando a não introdução da enfermidade no Estado, tendo em vista que animais importados podem trazer o agente causador da doença e a mesma sofrer rápida disseminação entre animais com genótipos suscetíveis.

Adicionalmente, este tipo de estudo se torna a cada dia mais necessário e estratégico para a sanidade animal e saúde pública no Brasil, onde vários trabalhos têm sido publicados com o gene PrP humano e murino (RAYMOND et al., 1997, PRUSINER, 1997) em diferentes modelos *in vitro*, objetivando acessar e entender melhor os intrínsecos processos da proteína prion em seu mecanismo de conversão para uma isoforma resistente à degradação e, conseqüentemente, patogênica. A falta de dados genotípicos da população ovina (ruminante em geral) no Brasil em relação ao gene PrP é um fato que exige providências técnico-científicas e políticas para permitir uma maior inserção da pesquisa genética (e zootécnica) com sua devida contribuição, pertinente, para a sociedade num tema de interesse ao mesmo tempo local e global como as doenças associadas à proteína prion.

## 5. CONCLUSÕES

Dentre os polimorfismos encontrados para os códons 136, 154 e 171 do gene PrP nos 72 animais examinados, observaram-se quatro variantes genotípicas, previamente publicadas e conhecidas em outros estudos, ARQ/ARQ, ARR/ARR, ARQ/ARR, VRR/VRR. Nosso estudo confirmou dados extensamente reconhecidos na literatura de que a presença do aminoácido alanina (A) no códon 136 é um alelo comum, enquanto que o aminoácido valina (V) é uma variante rara.

Neste estudo, 4 diferentes genótipos foram identificados, porém apenas 3 foram comuns às duas variedades (ARQ/ARQ, ARQ/ARR, ARR/ARR). A variedade vermelha mostrou uma frequência maior para o genótipo ARQ/ARQ (65,52%), enquanto que a variedade branca mostrou uma frequência maior para o genótipo ARR/ARR (44,19%), o que, à luz do que se reconhece hoje como resistência genotípica, confere a esta variedade uma relativa maior resistência ao *scrapie*, se comparada à variedade vermelha.

A característica da raça Morada Nova, de possuir duas variedades bastante distintas, nos permitiu a oportunidade de comparar os genótipos, dentro de uma mesma espécie, habitantes de uma zona livre de *scrapie*. Não foi encontrado polimorfismo no códon 154 para nenhuma das duas variedades. Nenhuma diferença estatística foi encontrada na frequência de polimorfismo do códon 136 A/V entre os dois grupos. Porém no códon 171 a variedade branca mostrou-se mais polimórfica que a vermelha, apresentando uma maior frequência do genótipo ARR/ARR conferindo uma maior resistência ao *scrapie*.

A partir dos resultados obtidos, vê-se a importância de adotar uma estratégia de melhoramento animal, para aumentar o número de animais com genótipos resistentes ao *scrapie*, como o ARR/ARR, já que, animais portadores do genótipo ARQ/ARQ, caracterizam-se por uma maior suscetibilidade à doença após contato com o agente infeccioso.

Os resultados desta dissertação apontam para um risco considerável de desenvolvimento de *scrapie* na raça Morada Nova, corroborando os dados já descritos para a raça Santa Inês, com uma significativa presença de genótipos

particularmente suscetíveis para a doença. A associação entre polimorfismos tidos como resistentes e suscetíveis e o desenvolvimento da doença não é uma regra infalível, mas uma tendência consistente e comprovada que se repete em vários estudos mundo afora com diferentes raças. Isto posto e sem alarmismo, faz-se necessário estabelecer um levantamento sistemático dos genótipos para o PrP nas populações ovinas do Estado para que se mantenha a condição de área livre de *scrapie*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AGUZZI, A.; BRANDNER, S. The genetics of prions: a contradiction in terms? **Lancet**, 354: supp. 1, 2225-2232, 1999.
- ALTSHULER D., POLLARA, V.J., COWLES, C.R., VAN ETEN, W.J., BALDWIN, J., LINTON, L. AND LANDER, E.S. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. **Nature**, 407:513-516, 2000.
- APPLIED BIOSYSTEMS. ABI Prims® 3100M Genetic Analyzer, **Sequencing Chemistry Guide**, © Copyright 53p, 2001.
- ALTSCHUL S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215:403-410, 1990.
- BALTER, M. Writing scrapie's coda, codon by codon? **Science**, 287: n°5460, 1907, 2000.
- BARON, T. G. M.; MADEC, J. Y.; CALAVAS, D. et al. Comparation of French natural scrapies isolates with bovine spongiform encephalopathies and experimental scrapie infected sheep. **Neuroscience Letters**. 284: 175-178, 2000.
- BELT, P.B.; MUILEMAN, I. H.; SCHREUDER, B. E.; BOS-DE RUIJTER, J.; GIELKENS, A. L.; SMITS, M. A. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. **Journal of General Virology**. 76: 509-517, 1995.
- BELT, P. B. G. M.; BOSSERS, A.; SCHREUDER, B. E. C.; SMITS, M. A. PrP allelic variants associated with natural scrapie, p. 294-305. In C. J. Gibbs, Jr. (ed), **Bovine spongiform encephalopathy; the BSE dilemma**. Springer, New York, N.Y, p. 294-305, 1996.
- BESSEN, R. A.; KOCISKO D. A.; RAYMOND G. J.; NANDAN, S.; LANSBURY, P. T.; AND CAUGHEY. B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. **Nature** 375:698-700, 1995.
- BILLINIS, C., PSYCHAS, V., LEONTIDES L., SPYROU, V., ARGYROUDIS, S., VLEMMAS, I., LEONTIDES, S., SKLAVIADIS, T. & PAPADOPOULOS, O.. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. **Journal of General Virology**, 85: 547-554, 2004

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

BOSSERS, A.; BELT, P. B. G. M.; RAYMOND, G. J.; CAUGHEY, B.; DE VRIES, R.; SMITS, M. A. Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the *in vitro* conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 94: 4931-4936, 1997.

BOSSERS, A.; HARDERS, F. L.; SMITS, M.A. PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie. **Archives of Virology**, 144(4): 829-834, 1999.

BOSSERS, A.; DE VRIES, R.; SMITS, M. A. Susceptibility of Sheep for Scrapie as Assessed by In Vitro Conversion of Nine Naturally Occurring Variants of PrP. **Journal of Virology**, 74: 1407-1414, 2000.

BROWN, D. R.; WONG, B. S.; HERMS, J. W. et al. Microglial expression of the prion protein. **Neuroreport**. 9: 1425-1429, 1998.

BRUGÈRE-PICOUX, J. Maladies des moutons. **Paris: Editions France Agricole**, 239, 1994.

CHABRY, J.; PRIOLA, S.; WEHRLY, K. et al. Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence. **Journal of Virology**. 6245-6250, 1999.

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

COHEN, F. E. & PRUSINER, S. B. Structural studies of prion proteins. In: **Prion Biology and diseases**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, cap. 5, p. 191-228, 1999.

COLLING, S. B.; COLLINGE, J.; JEFFREYS, J. G. R. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  currents. **Neuroscience Letters**, 209:49-52, 1996.

COLLINS, A.; LONJOU, C.; MORTON, N. E. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 96:15173–15177, 1999.

CORNUET, J.M, PIRY, S., LUIKART, G., ESTOUP, A. E SOLIGNAC, M. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. **Genetics**, 153, 1989-2000, 1999.

DAWSON, M.; HOINVILLE, L. J.; HOISE, B. D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. **The Veterinary Record**, 1998.

DAWSON, E., CHEN, Y., HUNT, S., SMINK, L. J., HUNT, A., RICE, K.; LIVINGSTON, S., BUMPSTEAD, S., BRUSKIEWICH, R., SHAM, P. et al. A SNP resource for human chromosome 22: extracting dense clusters of SNPs from the genomic sequence. **Genome Research**, 11, 170-178, 2001

DELEAULT, N. R.; LUCASSEN, R. W.; SUPATTAPONE, S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. **Nature**.16;425(6959):717-720, 2003.

DROGEMULLER, C., LEEB, T. & DISTL, O. PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. **Veterinary Record**. 149:349-352, 2001.

ELBOURN, R. J. **Acesso ao documento primário:** The prion diseases: a molecular and genetic perspective. A Dissertation. Disponível em: <http://www.fortunecity.co.uk/psychic/24/prionpage/Project.htm>, 1999. Acesso em: 20. jan. 2004.

EWING B, HILLIER L, WENDL MC, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. 8(3):175-85, 1998.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <http://apps.fao.org/lim500/nphwrap.pl?Production.Livestock.Stocks&Domain>, 2002. Acesso em 23.dez.2003

FERNANDES, A.A.O. **Acesso ao documento primário:** Genetic and environmental factors affecting growth and reproduction characters of Morada Nova sheep in Northeast Brazil. Texas: Texas A & M Univ., College Station, (M.S.Thesis), 1985.

FERNANDES, A.A.O, BUCHANAN, D., SELAIVE-VILLARROEL A. B., Avaliação dos Fatores Ambientais no Desenvolvimento Corporal de Cordeiros Deslanados da Raça Morada Nova, **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol. 30 nº5, 2001.

GABUST, C.; DERRINGTON, E.; LEBLANE, P. et al. The prion protein has RNA binding and chaperoning proprieties characteristic of nucleocapsid protein NCp7 of HIV-1. **Journal of Biological Chemistry**, 276(22): 19301-19309, 2001.

GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; GRINO, M. et al. Major hypercorticism is an endocrine feature of ewes with naturally occurring scrapie. **Endocrinology**. 141(3): 988-994, 2000.

GREEN, P.; EWING, B. **Program Phred** Version: 0.020425.c, 2002.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; SALBAUM, J.M.; BEUREYTH, K.; HOPE, J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 87: 2476-2480, 1990.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; BENSON, G.; FOSTER, J.D.; HOPE, J. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. **Journal of General Virology**. 72: 2411-2417, 1991.

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

GROSCHUP, M.H.; WEILAND, F.; STRAUB, O.C. et al. Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. **Neurobiology of Disease**, 3: 191-195, 1996.

HARRIS, D.A. Prion Disease. **Nutrition**. 16: n.7/8, 2000.  
HOPE, J. The biology and molecular biology of scrapie-like disease. **Archives of Virology**. 7: 201-214, 1993.

HOPE, J. Prions and neurodegenerative diseases. **Current Opinion in Genetics and Development**. 10: 568-574, 2000.

HORIUCHI, M.; NEMOTO, T.; ISHIGURO, N.; FURUOKA, H.; MOHRI, S.; SHINAGAWA, M. Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**. 40: 3421-3426, 2002.

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

HUNTER, N.; CAIRNS, D.; FOSTER, J.D.; SMITH, G.; GOLDMANN, W.; DONNELLY, K. Is scrapie solely a genetic disease? **Nature** 386: 137, 1997.

HUNTER, N. AND CAIRNS, D. Scrapie-free Merino and poll Dorset sheep from Australia and New Zealand have normal frequencies of scrapie-susceptible PrP genotypes. **Journal of General Virology**. 79: 2079-2082, 1998.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Pesquisa da Pecuária Municipal do Ceará.** Fortaleza, 2000.

IKEDA, T.; HORIUCHI, M.; ISHIGURO, N.; MURAMATSU, Y.; KAI-UWE, G. D.; SHINAGAWA, M. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. **Journal of General Virology**. 76: 2577–2581, 1995.

INRA - INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE.  
Disponível em - <http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/intro2.pl>. Acesso em 15 fev 2004.

INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. Optimization of PCRs In: **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, chapter 1, 2-20p, 1999.

JACKSON, G. S. & COLLINGE, J. Prion disease – The propagation of infectious protein topologies. **Microbes and Infection**, 2: 1445-1449, 2000.

JORDAN, B.; CHAREST, A.; DOWD, J. F.; BLUMENSTIEL, J. P.; YEH, R. F.; OSMAN, A.; HOUSMAN, D. E.; LANDERS, J. E. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 99(5): 2942-2947, 2002.

KANEKO, K.; VEY, M.; SCOTT, M. et al. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 94: 2333-2338, 1997.

KAWASAKI, E. S. Sample preparation from blood, cells, and onther fluids. In: **PCR protocols – A guide to methods and applications**. Academic Press, cap. 18, p. 146-151, 1990.

KOCISKO, D. A.; PRIOLA, S. A.; RAYMOND, G. J.; CHESEBRO, B.; LANSBURY, P. T. JR.; CAUGHEY, B. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 92:3923–3927, 1995.

KUBOSAKI, A.; UENO, A.; MATSUMOTO, Y. et al. Analysis of prion protein mRNA by *in situ* hybridization in brain and placenta of sheep. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 273: 890-893, 2000.

KUTZER, T.; PFEIFER, I.; BRENING B.: Identification of new allelic variant in the ovine prion protein (PrP) gene. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. 119: 201-208, 2002.

LAPLANCHE, J. L.; CHATELAIN, J.; WESTAWAY D.; THOMAS S.; DUSSAUCY, M.; BRUGERE-PICOUX, J.; LAUNAY J.M. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. **Genomics** 15: 30-37, 1993.

LAURENT, M. Bistability and species barrier in prion disease: stepping across the threshold or not. **Biophysical Chemistry**, 72: 211-222, 1998.

LEANES, L. F. Scrapie – anotaciones utiles. Disponible em: [www.iicasanitet.net/pub/sanani/pdf/scrapie.pdf](http://www.iicasanitet.net/pub/sanani/pdf/scrapie.pdf), 1997. Acesso em 12. mai 2003.

LEE, I.Y.; WESTAWAY, D.; SMIT, A.F.A. et al. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genomic Research**, 8: 1022-1037, 1998.

LIEMANN, S. AND GLOCKSHUBER, R. Breakthroughs and views. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 250: 187-193, 1998.

LIMA, A. C. B. **Acesso ao documento primário:** Caracterização do Gene PrP em ovinos Santa Inês. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, 69p, 2002.

MANSON, J.C. Understanding transmission of the prion diseases. **Trends in Microbiology**, 7: 465-467, 1999.

MALLUCCI, G. et al. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science**, 302, 871 – 874, 2003.

MARTINS, V. R. A receptor for infection and cellular prion protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 32: 853-859, 1999.

MEYER, R. K.; OESCH, B.; FATZER, R. et al. Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP<sup>Sc</sup> by treatment with heat and guanidine thiocyanate. **Journal of Virology**. November: 9386-9392, 1999.

NCBI – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . Acesso em: 12 jan 2004.

NICKERSON, D. A., TAYLOR, S. L., WEISS, K. M., CLARK, A. G., HUTCHINSON, R. G.; STENGARD, J., SALOMA A. V., VARTIAINEN, E., BOERWINKLE, E. AND SING, C. F. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. **Nature Genetics**. 19, 216±217, 1998.

O'DOHERTY, E.; AHERNE, M.; ENNIS, S. et al. Detection of polymorphism in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep. **Veterinary Records**, 146/12: 335-338, 2000.

OLIVEIRA, S. M. P. **Acesso ao documento primário:** Desempenho de ovinos da Raça Morada Nova variedade branca no Estado do Ceará: Parâmetros genéticos e de ambiente. Belo Horizonte, BH: UFMG. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 69p, 1992.

O'ROURKE, K. I.; BASZLER, T. V.; MILLER, J. M. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. **Journal of Clinical Microbiology**. (6) 1750-1755, 1998.

O'ROURKE, K. I.; BASZLER, T. V.; BESSER, T. E. et al. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. **Journal of Clinical Microbiology**. 38: 3254-3259, 2000.

OWEN, F. Prions, **Biological Sciences**, 10 (5): 38-40, 1998.

PALMER L. J.; COOKSON W. O. C. M.; Atopy and asthma. In: **Genetic Analysis of Multifactorial Diseases**. Edited by Sham PC, Bishop T London: BIOS Scientific Publishers 215–237, 2000.

PALMER L. J.; COOKSON W. O. C. M. Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. **Respiratory Research**, 2:102–112, 2001.

PAN, K., BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH D. et al. Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in formation of the scrapie prion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. 90: 10962-10966, 1993.

PERRIER, V.; WALLACE, A. C.; KANEKO, K. et al. Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. 97(11): 6073-6078, 2000.

PEREIRA, R. M. A., LIMA, F. A. M., FREITAS, J. P., SILVA, M. A. Herdabilidade de peso e desempenho do nascimento aos 360 dias de idade de ovinos da raça Morada Nova variedade branca no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira Zootecnia**, 16(5):402-410, 1987.

PICARD-HAGEN, N.; GAYRARD, V.; ALVINERIE, M. et al. Naturally occurring scrapie is associated with a lower CBG [cortisol binding globulin] binding capacity in ewes. **Journal of Endocrinology**. 165(2): 527-532, 2000.

POST, K.; RIESNER, D.; WALLDORF, V. et al. Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. **The Lancet**, 354: 9194, 1969-1970, 1999.

PRIOLA, S. A. Prion protein and species barriers in transmissible spongiform encephalopathies. **Biomedical & Pharmacotherapy**, 53: 27-33, 1999.

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

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M.; FOSTER, K. M. et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. **Cell**, 63: 673-686, 1990.

PRUSINER, S. B. Introduction: Prion diseases. **Seminars in Virology**, 7: 157, 1996.

PRUSINER, S. B. Prion diseases and the BSE crisis. **Science**, 278: 245-251, 1997.

PRUSINER, S. B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Nobel Lecture 95: 13363-13383, 1998.

RAYMOND, G. J.; HOPE, J.; KOCISKO, D. A.; PRIOLA, S. A.; RAYMOND, L. D.; BOSSERS, A.; IRONSIDE, J.; WILL, R. G.; CHEN, S. G.; PETERSEN, R. B.; GAMBETTI, P.; RUBENSTEIN, R.; SMITS, M. A.; LANSBURY, P. T. JR.; CAUGHEY, B. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. **Nature** 388:285–288, 1997.

RIE – ROSLIN INSTITUTE EDINBURGH, Disponível em <http://projects.roslin.ac.uk/pigmap/>. Acesso em 12 jan 2004.

RISCH N, MERIKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, 273:1516–1517, 1996.

SABÓRIO, G. P.; SOTO, C.; KASCSAK, R. J. et al. Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 258: 470-475, 1999.

SAFAR, J. Spectroscopic conformational studies of prionprotein isoforms and the mechanism of transformation. **Seminars of Virology**, 7: 207-214, 1996.

SANGER, F., NICKLEN, S. AND COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. 74: 5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE INC. SAS/ STAT. User's Guide, version \*, Cary: **SAS INSTITUTE Inc**, 1999.

SCOTT, M.R.; SAFAR, G.; TELLING, O. et al. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions

to transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 94: 14279-14284, 1997.

SEABURY C. M.; DERR J. N. Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed. **Cytogenet Genome Research**. 102(1-4):85-8, 2003.

SMITS, M. A.; BOSSERS, A.; SCHREUDER, B. E. C., Prion protein and scrapie susceptibility. **Veterinary Quart.** 19: 101–105, 1997.

SMIDT, D. AND NIEMANN. Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science*, 59: 207-221, 1999.

SOTO, C.; KASCSAK, R. J.; SABORIO, G. P. et al. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic  $\beta$ -sheet breaker peptides. **The Lancet**. 355, 2000.

SOUZA, E. Ameaça entre ovelhas. Disponível em: <http://globo.rural.globo.com/edic/185/giro.htm>. Acesso em 12 jan 2001.

SUPATTAPONE, S.; NGUYEN, H-O.B.; COHEN, F. et al. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. 96(25): 14529-14534, 1999.

THOMAS, D. L. **Genetics of scrapie resistance in sheep**, Department of Animal Sciences, University of Wisconsin-Madison 329p, 2000.

THORGURSDOTTIR, S.; SIGURDARSON, S.; THORISSON, H. M. et al. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Iceland sheep. **Journal of General Virology**, 80: 2527-2534, 1999.

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

TSUI, C.; COLEMAN, L. E.; GRIFFITH, J. L.; BENNETT, E. A.; GOODSON, S. G.; SCOTT, J. D.; PITTARD, W. S.; DEVINE, S. E. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map to gaps in the human SNP. **Nucleic Acids Research**. 31(16): 4910-4916, 2003.

UNIDET STATE DEPARTEMENT OF AGRICULTURE (USDA). Fact sheet: Scrapie. Disponível em: [www.aphis.usda.gov](http://www.aphis.usda.gov), 1999. Acesso em: 23 mai 2003.

VACCARI, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U. et al. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. **Archives of Virology**. 146: 2029-2037, 2001.

VEY, M.; PILKUHN, S.; WILLE, H. et al. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. 93: 14945-14949, 1996.

VILES, J. H.; COHEN, F. E.; PRUSINER, S. B. et al. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 96: 2042-2047, 1999.

WILESMITH, J. M.; RYAN, J. B. M. AND ATKINSON, M. J. Bovine spongiform encephalopathy – Epidemiologic studies on the origin. **Veterinary Record**., 128: 199-203, 1991.

WILEY, J. & SONS, Inc. Resolution and Recovery of DNA fragments In: **Current Protocols in Molecular Biology**., section II, unit 10.4 All rights reserved, 1998.

WILTSHIRE, T.; PLETCHER, M. T.; BATALOV, S.; BARNES S. W. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis defines haplotype patterns in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 100(6):3380-3385, 2003.

WOOLHOUSE, M.E.J.; COEN, P.; MATHEWS, L. et al. A centuries-long epidemic of scrapie in British sheep. **Trends in Microbiology**, 9: 67-70, 2001.

WONG, B. S.; WANG, H.; BROWN, D. R. et al. Selective oxidation of methionine residues in prion proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 259: 352-355, 1999.

WONG, D. Prions. Disponível em:  
<http://sites.netscape.net/derekwongkk/viruses/PRIONS.htm>. 2001. Acesso em 12 jan 2003.

WOOD, J.; LUND, L. J.; DONE, S. H. The natural occurrence of scrapie in moufflon. **Veterinary Record**. 130: 25-27, 1992.

YUZBASIYAN-GURKAN V, KREHBIEL JD, CAO Y, VENTA PJ. Development and usefulness of new polymerase chain reaction-based tests for detection of different alleles at codons 136 and 171 of the ovine prion protein gene. **Journal of Veterinary Research**, 60(7):884-7, 1999.

## **ANEXO 1**

### **SOLUÇÕES:**

#### **CLB**

Sacarose ----- 109,53g  
Tris HCL 2M ----- 5,0ml  
Cloreto de Magnésio ---- 5,0ml  
Triton X-100 ----- 10,0ml  
H<sub>2</sub>O qsp ----- 1000ml

#### **SLB**

Tris HCL 2M ----- 500µl  
EDTA 0,5M ----- 2000µl  
NaCl 5M ----- 1000µl  
SDS 10% ----- 2000µl  
H<sub>2</sub>O qsp ----- 100ml

#### **TE<sup>4</sup> BUFFER**

Tris HCL 2M ----- 1,25ml  
EDTA 0,5M ----- 50µl  
H<sub>2</sub>O qsp ----- 250ml

## ANEXO 2

### 1. V, F, ARQ/ARQ

```
>CarolMoradaNova_A01_01.ab1      346      0      346  ABI trimmed
TGTTCTGGTTACTATACTGATCCACTGGACTGGAGTACACTTGGTTGGGG
TAACGGTACATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAA
ATGTATAAGAAGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGC
CCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCACCTCCTGCCACATGCTTCATGTTG
GTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCAATGACTGTGGCTACGACCTTGACC
CCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGT
TTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCAATGACTGTGGCTACCACTTGA
```

### 2. B, M, ARR/ARR

```
>CarolMoradaNova_A02_02.ab1      503      0      503  ABI trimmed
GCTCCATTATCTTGATGTCAGTTTCGGTGCAGTTCTCCCCCTTGGTGGTG
GTGGTGACTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTCATGCACAAA
GTTGTTCTGGTTACTATAACGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGG
GGTAACGGTACATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCA
AAATGTATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAG
GCCCCC TACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGT
TGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCAATGACTGTGGCTACCACTTGA
CCCCAGCCTCCACCACCATGTGGCTGTCCCCATCCACCACCATGGGGCTG
ACCCCATCCACCTCCATGATGTTGGCCCCAGCTACCTCCATGGGGCTGAC
CCCAGCCACCCCTCCTGAGGTGGATATCGGTTGCCTACCAGACTGCCC
TGT
```

### 3. B, F, ARQ/ARQ

```
>CarolMoradaNova_B01_03.ab1      304      0      304  ABI trimmed
GTGGTGACTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTATACACAGTCATACACCA
CAGTTGTTCTGGTTACTATACTGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTT
GGGGTAACGGTACATGTTTTTCACGATACTAACGGTCCTCATAGTCATTGC
CAAAATGTATAAGAGGCCTGATCATGGCATTTCAGCATGTAGCCACCA
AGGCTCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCACCTCCTGCCACATGCTTCAT
GTTGCTTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCAATGACTGTGGCTACCACTT
GACC
```

### 4. C, M, ARQ/ARQ

```
>CarolMoradaNova_B02_04.ab1      480      0      480  ABI trimmed
GGTGGTGGTGGTGAAGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTCAT
GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATACTGATCCACTGGTCTGTAGTACACT
TGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTC
ATTGCCAAAATGTATAAGAAGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGC
CACCAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGC
TTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCAATGACTGTGGCTACC
ACCTTGACCCAGCCTCCACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCAT
GGGGCTGACCCCATCCACCTCCATGATGTTGGCCCCAGCCACCTCCATGG
GGCTGACCCAGCCACCCCTCCTGAGGTGGATAGCGGTTGCCTCCAGG
ACTGCCCTGTCCCGGGTATCGGCTCCCCC
```

### 5. B, F, ARQ/ARR

```
>CarolMoradaNova_C01_05.ab1      307      0      307  ABI trimmed
GTGGTGACTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTATACACAGTCATGCACCA
AGTTGTTCTGGTTACTATAACGATCCACTGGACTGTAGTACACTTGGTCT
GCGGTAACGGTACATGTTTTTCACGATATTAACGGTCCTCATAGTCATTGC
CAAAATGTATAAGAATCCTGATCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCA
AGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCACCTCCTGCCACATGCTTCAT
GTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCAATGACTGTGACTACCACTT
GACCCCT
```

### 6. B, F, ARR/ARR

```
>CarolMoradaNova_C02_06.ab1      553      0      553  ABI trimmed
GCTCCATTATCTTGATGTCAGTTTCGGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGTG
```



12. V, F, ARQ/ARQ

13. V, F, ARR/ARR

14. B, F, ARQ/ARQ

15. B, F, ARR/ARR

16. B, F, ARR/ARR

79

ATTGCCAAAATGTATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGC  
CACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCACCTCCTGCCACATGC  
TTCATGTTGGTTTTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTT  
GACCCAGCCTCCAC

17. B, F, ARR/ARR

>CarolMoradaNova2\_A06\_02.ab1 374 0 374 ABI trimmed

TGGTGACTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTAACACAGTCTTGCGCCAAG  
TTGTTCTGGTTACTATAACCGATCCACTGGACTGTAGTACTCTTGTTGGG  
GTATCGGTACATGTTTTACGATATTAACGGTGCTCATAGTGATTGCCAC  
AATGTATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGG  
CCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTT  
GGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGAC  
GCCAGCTTCTACCACCATGTGGCTGTCCGCATCCACTACCATGGGGCTGA  
CACCATCCACATCCATGATGTTGG

18. B, F, ARR/ARR

>CarolMoradaNova2\_B06\_04.ab1 347 0 347 ABI trimmed

GACTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTCTTGACCAAGTTGT  
TCTGGTTACTATAACCGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAA  
CGGTACATGTTTTACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATG  
TATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCC  
CTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTT  
TTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCAG  
CCTCCACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACC

19. B, M, ARQ/ARQ

>CarolMoradaNova2\_E06\_10.ab1 357 0 357 ABI trimmed

TTGTTGCTTGACTGGGATGTTATACACAGTCATACGCCAAGTTTTCTGG  
AACTATATTGATCTACTGGACTGTGTGACTCTTGTTGCCGTATCGATA  
CATGTTTTGACGATATTATCGGTGCTCATAGTGATTGCCCAATGTATAA  
GACGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCATACC  
ACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGCTTTTTGG  
CTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCAGCCTC  
CACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACCCAGCCA  
CCTCCAT

20. B, F, ARR/ARR

>CarolMoradaNova2\_F06\_12.ab1 410 0 410 ABI trimmed

CATGCGCCAAGTTGTTCTGGTTACTATAACCGATCCACTGGACTGTAGTAC  
TCTTGGTTGGCGCAACGATACATGTTTTGACGATATTATCGATGCTCATA  
GTCATTGCCCCAATGTATAAGAAGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGT  
AGCCACCAAGGTCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCACCTCCTGCCACA  
TGCTTCATGTTGCATTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCT  
ACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTT  
TGGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCAGC  
CTCCACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACCCAG  
CCACCTCCAT

21. B, F, ARR/ARR

>CarolMoradaNova2\_A07\_01.ab1 316 0 316 ABI trimmed

TGGTGACTGTGTGTTGCTTGACTGGGATGTTGACACAGTCATGCGCCAAG  
TTGTTCTGGTTACTATAACCGATCCACTGGACTGTAGTACACTTGGTTGCG  
GCAACGGTACATGTTTTGACGATAGTAACGGTGCTCATAGTCGTTGCCAC  
AATGTATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGG  
CCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTT  
GGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGAC  
CCCAGCCTCCACCACC

22. B, F, VRR/VRR

>CarolMoradaNova2\_A08\_02.ab1 399 0 399 ABI trimmed

GTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTCATGCGCCAAGTTGTTCTGGATA  
CTATATCCATCTACTGGACTGTAGTACACTTGGTTGCCGCAACGGTACAT

GTTTTGACGATATTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCACAATGTATAAGAT  
 GCCTGCTCATGACACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCGCCCTACCACT  
 GCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGATTTTTGGCTT  
 ACTGGGCTTGTTCCTGACTGTGGCTACCAGGCCCCCTACCACTGCTCC  
 AGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGG  
 GCTTGTTCCTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCCAGCCTCCACCACC  
 23. B, F, ARR/ARR  
 >CarolMoradaNova2\_B07\_03.ab1 329 0 329 ABI trimmed  
 CCCTTGGTGGAGGTGGTGAATGCTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTTACACA  
 GTCATGCGCCAAGTTGTTCTGTTACTATAACCGATCCACTGGACTGTAGT  
 ACTCTTGGTTGCCGCAACGGTACATGTTTTACGATATTATCGGTCTCA  
 TAGTGATTGCCACAATGTATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCAT  
 GTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCA  
 CATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCTGACTGTGG  
 CTACCACCTTGACCCCAGCCTCCACCACC  
 24. B, F, ARQ/ARQ  
 >CarolMoradaNova2\_B08\_04.ab1 346 0 346 ABI trimmed  
 TTTCGGTGAACCTTCTCTCCCTTGGTGGAGGTGGTGAATGAGTGTGCTTG  
 ACTGTGATGTTTACACCGTCATGCGCCAAGTTTTTCTGGTTACTATACTG  
 ATCCACTGGACTGTGGTACTCTTGGCTGCCGCATCGGTACATGTTTTGAC  
 GATATTATCGGTGCTCATAGTCATTGCCACAATGTATAAGATGCCTGCTC  
 ATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGC  
 TGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCT  
 TGTTCCCTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCCAGCCTCCACCACC  
 25. B, F, ARR/ARR  
 >CarolMoradaNova2\_C07\_05.ab1 343 0 343 ABI trimmed  
 TGGTGAATGCTGTGTAGCTTGACTGTGATGTTTACACAGTCATGCACAAAG  
 TTGTTCTGGTTACTATACCGATCCACTGGACTGTAGTACTCTTGGTTGCC  
 GCAACGGTACATGTTTTTACGATATTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCCC  
 AATGTATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGG  
 CCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTT  
 GGATTTTTGGCTTACTGCGCTTGTTCCTGACTGTGGCTACTGGGCTTGT  
 TCCCTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCCAGCCTCCACCACC  
 26. B, F, ARQ/ARR  
 >CarolMoradaNova2\_C08\_06.ab1 307 0 307 ABI trimmed  
 GTGGTGAATGCTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTTATACACAGTCATGCACCA  
 AGTTGTTCTGGTTACTATAACCGATCCACTGGACTGTAGTACACTTGGTCT  
 GCGGTAACGGTACATGTTTTTACGATATTAACGGTCCTCATAGTCATTGC  
 CAAAATGTATAAGAATCCTGATCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCA  
 AGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCACCTCCTGCCACATGCTTCAT  
 GTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCTGACTGTGACTACCACCTT  
 GACCCCT  
 27. B, M, ARR/ARR  
 >CarolMoradaNova2\_D07\_07.ab1 312 0 312 ABI trimmed  
 CGGTGAATCTTCTCCCCCTTGGTGGTGGTGGTGAATGCTGTGTGTTGCTTGACT  
 GTGATGTTTATACAGTCATGCACCAAGTTGTTCTGGTTACTATAACCGAT  
 CCACTGGACTGTGGTACACTTGGTTGCCGCAACGGTACATGTTTTTACGA  
 TATTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCACAATGTATAAGAAGCCTGCTCAT  
 GGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGATG  
 CAGCAGCTCATGCCACATGCTTCATGTATGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTG  
 TTCCCTGACTG  
 28. B, F, ARQ/ARR  
 >CarolMoradaNova2\_D08\_08.ab1 372 0 372 ABI trimmed  
 TCGGTGAAGTTCTCTCCCTTGGTGGTGGTGGTGAATGCTGTGTGTTGCTTGAC  
 TGTGATGTTGACACAGTCATGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATACTGAT  
 CCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTTACGA  
 TAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAGAAGCCTGCTCAT



40. V, F, ARQ/ARR



```

>CarolMoradaNova2_F09_11.ab1      377      0      377  ABI trimmed
TCGGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGAGGTGGTGGACTGTGTGTTGCTTGAC
TGTGATGTTGACACAGTCATACACAAAGTTGTTCTGGTTACTATACTGAT
CCACTGGACTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTACGA
TATTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAGAAGCCTGCTCAT
GGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGATG
CAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTG
TTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCCAACCTCCACCACCATGTGG
CTGTCCCCATCCACTACCATGGGGCTG
47. V, F, ARQ/ARQ
>CarolMoradaNova2_F10_12.ab1      397      0      397  ABI trimmed
TTTCGGTGAAGTTCTCCCACTTGGTGGAGGTGGTGGACTGTGTGTTGCTTG
ACTGTGAATGTTTACACAGTCATGCACAAAGTTTTTCTGGTTACTATACT
GATCCACTGGACTGTAGTACTCTTGGTTGCCGCAACGATACATGTTTTCA
CGATATTAACGATCCTCATAGTCATTGCCACAATGTATAAGAAGCCTGCT
CATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAG
ATGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGC
TTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCAGCCTCCACCACCATG
TGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACCCAGCCACCTCCAT
48. V, F, ARQ/ARQ
>CarolMoradaNova2_G09_13.ab1      308      0      308  ABI trimmed
TGATGTCAGTTTTCGGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGAGGTGGTGGACTGTG
TGTTGCTTGACTGTGATGTTAACACAGTCATACACAAAGTTGTTCTGGTT
ACTATACTGATCCACTGGACTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACA
TGTTTTTACGATATTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCACAATGTATAAGA
GGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCAC
TGCTCCAGCATGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTGTGTTGGC
TTACTGGG
49. V, F, ARQ/ARQ
>CarolMoradaNova2_G10_14.ab1      315      0      315  ABI trimmed
TCGGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGAGGTGGTGGACTGTGTGTTGCTTGAC
TGTGATGTTAGTACACAGTCATACACCAAGTTGTTCTGGTTACTATACTG
ATCCACTGGACTGTAGTACTCTTGGTTGCCGCAACGGTACATGTTTTAC
GATATTAACGGTGCTCATAGTCATTGCCACAATGTATAAGACGCCTGCTC
ATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGA
TGCAGCAGCTCATGCCACATGCTTCATGTAGGTTTTTGGCTTACTGCGCT
TGTTCCACTGACTGT
51. B, F, ARQ/ARR
>CarolMoradaNova2_H09_15.ab1      366      0      366  ABI trimmed
TGGTGGACTGTTTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTTACACAGTCATGCACAAAG
TTTTTCTGGTTACTATATCCATCTACTGGACTGTAGTACTCTTGGTTGCC
GTATCGATACATGTTTTACGATATTATCGGTGCTCATAGTCATTGCCAC
AATGTATAAGAGGCCTGCTCATCGCACTTCCCAGCATGTAGCCGCCAAGG
CCCCCTACCACTGCTCCAGATGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTT
GGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCTACTGACTGTGGCTACCACCTTGAC
CCCAGCCTCCACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGA
CCCCAGCCACCTCCAT
52. V, F, ARQ/ARQ
>CarolMoradaNova2_H10_16.ab1      329      0      329  ABI trimmed
CTTGATGTCAGTTTTCGGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGAGGTGGTGGACTG
TGTGTTGCTTGACTGTGATGTTTACACAGTCATACGCCAAGTTGTTCTGG
TTACTATACTGATCCACTGGACTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTA
CATGTTTTTACGATATTAACGGTGCTCATAGTGATTGCCAAAATGTATAA
GAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCGCTACC
ACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGG
CTTACTGGGCTTGTTCCTACTGACTGTGGC
53. V, F, ARQ/ARQ

```



>CarolMoradaNova3\_F02\_12.ab1 406 0 406 ABI trimmed  
TACTATACCGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTAC  
ATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAG  
AGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCA  
CTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGC  
TTACTGGGCTTGTTCCTACTGACTGTGGCTACCACTTGACCCACCCCTCC  
ACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACCCAGCCAC  
CTCCATGAGGTTGGCCCCAGCCACCTCCATGGGGCTGACCCAGCCACCC  
CCTCCCTGAGGTGGATAGCGGTTGCCTCCAGGACTGCCCTGTCCCGGGTA  
TCGGCT

60. B, F, ARQ/ARQ  
>CarolMoradaNova3\_F01\_11.ab1 340 0 340 ABI trimmed  
CCTTGGTGGTGGTGGTGAAGTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAG  
TCATGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATACTGATCCACTGGTCTGTAGTA  
CACTTGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCAT  
AGTCATTGCCAAAATGTATAAGAAGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATG  
TAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCAC  
ATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCTACTGACTGTGGC  
TACCACCTTGACCCAGCCTCCACCACCATGTGGCTGTCC

61. B, F, ARR/ARR  
>CarolMoradaNova3\_E02\_10.ab1 307 0 307 ABI trimmed  
GGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGTGGTGGTGAAGTGTGTGTTGCTTGACTG  
TGATGTTGACACAGTCATGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATAACCGATCC  
ACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTTCACGATA  
GTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAGAGGCCCCGCTCATGG  
CACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCA  
GCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGT  
CCACTGA

62. B, F, ARQ/ARR  
>CarolMoradaNova3\_E01\_09.ab1 312 0 312 ABI trimmed  
GGTGAAGTTCTTCCCCCTTGGTGGTGGTGGTGAAGTGTGTGTTGCTTGACTG  
TGATGTTGACACAGTCATGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATACTGATCC  
ACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTTCACGATA  
GTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAGAAGCCTGCTCATGG  
CACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGCTGCA  
GCAGCTCCTGCCAAATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCTTGT  
TCCACTGACTGT

63. B, F, ARR/ARR  
>CarolMoradaNova3\_D02\_08.ab1 339 0 339 ABI trimmed  
GATGTCAGTTTTCCGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGTGGTGGTGAAGTGTGT  
GTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTCATGCACAAAGTTGTTCTGGTTA  
CTATAACCGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACAT  
GTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAGAG  
GCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACT  
GCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTT  
ACTGGGCTTGTTCCTACTGACTGTGGCTACCACCTTGACC

64. B, F, ARQ/ARR  
>CarolMoradaNova3\_D01\_07.ab1 322 0 322 ABI trimmed  
TTTTCCGTGAAGTTCTCCCCCTTGGTGGTGGTGGTGAAGTGTGTGTTGCTTG  
ACTGTGATGTTGACACAGTCATACACAAAGTTGTTCTGGTTACTATACTG  
ATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGGTACATGTTTTTCAC  
GATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTATAAGAGGCTGCTC  
ATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACCACTGCTCCAGC  
TGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTTGGCTTACTGGGCT  
TGTTCCACTGACTGTGGCTACC

65. B, F, ARQ/ARR  
>CarolMoradaNova3\_C01\_05.ab1 333 0 333 ABI trimmed

71. V, F, ARQ/ARQ

```

>CsrolMoradaNova3_D05_07.ab1      359      0      359  ABI trimmed
CTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTTTTGCCAAAGTTGTTCT
GGTTACTATACTGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAACGG
TACATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTAT
AAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTA
CCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTTTTT
GGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCCAGCC
TCCACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACCCCAGC
CACCTCCAT
72. V, F, ARQ/ARR
>CsrolMoradaNova3_D06_08.ab1      412      0      412  ABI trimmed
GACTGTGTGTTGCTTGACTGTGATGTTGACACAGTTATGCCCAAAGTTGT
TCTGGTTACTATACTGATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGGGTAA
CGGTACATGTTTTTCACGATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGCCAAAATG
TATAAGAGGCCTGCTCATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCC
CTACCACTGCTCCAGCTGCAGCAGCTCCTGCCACATGCTTCATGTTGGTT
TTTGGCTTACTGGGCTTGTTCCACTGACTGTGGCTACCACCTTGACCCCA
GCCTCCACCACCATGTGGCTGTCCCCAGCCACCACCATGGGGCTGACCCC
AGCCACCTCCATGAGGTTGGCCCCAGCCACCTCCATGGGGCTGACCCCAG
CCACCCCCTCCC

```