

## VARIABILIDAD DEL GENE "PrP" EN ALGUNAS RAZAS OVINAS CRIADAS EN EL ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

VARIABILITY OF THE "PrP" GENE IN SOME SHEEP BREEDS EXPLOITED IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Lara M.A.C.<sup>1\*</sup>, Moreira B.G.<sup>2</sup>, Santos-Silva M.F.M.<sup>3</sup>, Ruivo C.C.<sup>2</sup>, Cavalcante A.<sup>1</sup>, Bueno M.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Caixa Postal 60. CEP 13.460-000. Nova Odessa, SP, Brasil. \*malara@iz.sp.gov.br.

<sup>2</sup>Associação Paulista de Criadores Ovinos - ASPACO, São Manuel, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Unidade de Genética, Reprodução e Melhoramento Animal – INRB. Vale de Santarém. Portugal.

**Keywords:** Molecular markers; PCR/RFLP; Prion; Scrapie.

**Palabras clave:** Marcadores moleculares; PCR/RFLP; Prion; Scrapie.

### ABSTRACT

The resistance of sheep to scrapie is determined by prion protein gene (PrP). Polymorphisms at codons 136 (A/V), 154 (H/R) and 171 (Q/H/R) are the main determinants of the susceptibility/resistance to classical scrapie. For information on the resistance to this disease, this polymorphism was studied in 424 sheep in main breeds raised in the State of São Paulo: Morada Nova (N = 59), Santa Inés (N = 58), Dorper (N = 146) and Suffolk (N = 161), using PCR/RFLP technique. The allele ARR, considered favorable, because is associated with the resistance, was the more frequent in Suffolk (0.4286) in comparison with others herds, whose frequencies range between 0.1207 (Santa Inés) and 0.2480 (Dorper). The allele VRQ, which is associated with the susceptibility, was not detected in Suffolk sheep, but occurred in Morada Nova (0.0169), Santa Inés (0.0775) and Dorper (0.0909) breeds. The results show that the Suffolk sheep have good resistance to scrapie, due, probably, to selection and selective crossbreeding in herds for the ARR allele. The variability observed in other breeds suggests the use of selection assisted by molecular marker to increase the resistance of the herds.

### RESUMEN

La resistencia de ovinos al scrapie está determinada por el gen codificador de la proteína priónica PrP. Polimorfismos del gen PrP en los codones 136 (A/V), 154 (H/R) y 171 (Q/H/R) son los principales determinantes de la susceptibilidad o resistencia al *Scrapie* típico. Para obtener información sobre la resistencia a esta enfermedad, este polimorfismo fue estudiado en 424 ovinos de las principales razas criadas en el Estado de São Paulo: Morada Nova (N=59), Santa Inés (N = 58), Dorper (N=146) y Suffolk (N=161), empleando la técnica de PCR/RFLP. El alelo ARR, considerado favorable, porque se asocia con la resistencia al scrapie clásico, fue el más frecuente en los rebaños Suffolk (0,4286) en comparación con otros, cuyas frecuencias oscilan entre 0,1207 (Santa Inés) y 0,2480 (Dorper). Por el contrario, el alelo VRQ, que se asocia con la susceptibilidad, no fue detectado en ovejas Suffolk, pero ocurrió en las razas Morada Nova (0,0169), Santa Inés (0,0775) y Dorper (0,0909). Los resultados obtenidos muestran que las ovejas de la raza Suffolk investigadas presentan buena resistencia al scrapie, debido, probablemente, a selección y cruzamiento selectivos efectuados en los rebaños a favor del alelo ARR. La variabilidad observada en las otras razas sugiere el uso de selección asistida por marcadores moleculares para aumentar la resistencia de los rebaños.

### INTRODUCCIÓN

La paraplejia enzoótica o Scrapie, que forma parte del grupo de las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) es una enfermedad de carácter neurodegenerativa, progresiva y fatal que afecta a ovejas y cabras (Woolhouse *et al.*, 1998). Está causada por la acumulación de una isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>), denominada

prion, que resulta de un cambio conformacional en la proteína priónica (PrP), que es codificada por el propio hospedador (Roels *et al.*, 2004). Esta enfermedad ha sido reportada en multitud de países, con excepción de Australia y Nueva Zelanda consideradas libres de la enfermedad (Ianella *et al.*, 2011), lo que ha facilitado la importación de ovinos desde estos países a Brasil. Brasil no está considerado libre de la enfermedad debido a la importación de un ovino infectado de la raza Hampshire Down de Inglaterra y a casos aislados en algunos rebaños Suffolk, Santa Inés y Dorper, que se encuentran en los estados de Rio Grande do Sul, São Paulo y Paraná (Pacheco *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2015). Los estudios de esta enfermedad en el ganado ovino han contribuido a la identificación temprana de individuos con genotipos susceptibles al agente priónico, lo que permite el monitoreo de los rebaños y el control de su propagación. Esto es debido a que algunas variantes del gen PrP se han asociado con mayor riesgo de que el animal desarrolle la enfermedad (Hunter *et al.*, 1989; Cloucard *et al.*, 1995). Muchos polimorfismos del gen PrP han sido descritos (Heaton *et al.*, 2003) con cambios a nivel de la proteína. Los que afectan a los codones 136 (A / V - sustitución de alanina por valina), 154 (R / H - arginina por histidina) y 171 (Q / R / H - glutamina por arginina o histidina) están fuertemente asociados con el grado de susceptibilidad de la especie ovina al scrapie clásico (Benkel *et al.*, 2007). Las combinaciones de estos polimorfismos de nucleótido único (SNP) ofrecen doce posibles alelos, cinco de los cuales son los más frecuentes: *A136 R154 Q171* (alanina / arginina / glutamina), *VRQ* (valina / arginina / glutamina), *AHQ* (alanina / histidina / glutamina), *ARH* (alanina / arginina / histidina) y *ARR* (alanina / arginina / arginina), y confieren las diferencias en el grado de resistencia en ovinos (Dawson *et al.*, 1998). En algunas razas la susceptibilidad es mayor en el genotipo *VRQ / VRQ* (O'Doherty *et al.*, 2002; Moum *et al.*, 2005), en otras, sin embargo, como la Hampshire Down y Suffolk, que no tienen valina en el codón 136, el mayor riesgo se ha relacionado con el genotipo *ARQ / ARQ*. Ovinos de genotipo *ARR / ARR*, se consideran los más resistentes (Dawson *et al.*, 2008), aunque esta resistencia no es absoluta (Groshup *et al.*, 2007). En rebaños Suffolk y Santa Inés en los que predominan los alelos *ARQ* y *ARR* y con menos frecuencia el *ARH*, hay evidencia de que el codón 171 es el más importante en la evaluación de la susceptibilidad de estas razas (Andrade *et al.*, 2011). O'Doherty *et al.* (2002) compararon ovinos de Irlanda con síntomas clínicos de scrapie y saludables, y encontraron que la presencia del alelo *AHQ* podría reducir el riesgo con relación al alelo *ARQ*. En varios países de Europa y EE.UU., el genotipado del gen PrP, en base a la combinación de SNPs, principalmente con relación a los codones 136, 154 y 171, ha permitido conocer la susceptibilidad de los animales al scrapie, siendo una excelente estrategia para aumentar la resistencia de rebaños mediante la selección de sementales con el alelo *ARR* (Dawson *et al.*, 1998). En Brasil, el control de esta enfermedad se realiza con el empleo de técnicas inmunohistoquímicas, aunque hay iniciativas para poner en práctica un programa de certificación de los rebaños en base a la determinación del genotipo del gen PrP, con el objetivo de conocer la predisposición de los rebaños a esta enfermedad. Este estudio tuvo como objetivo conocer la situación actual de la resistencia / susceptibilidad al Scrapie de algunas razas de ovino criadas en el Estado de São Paulo-Brasil.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 424 ovinos de las razas Morada Nova (N = 59), Santa Inés (N = 58), Dorper (N = 146) y Suffolk (N = 161) fue investigado. Para obtener una muestra representativa de cada raza, los animales fueron muestreados en varios rebaños en el Estado de São Paulo, excepto la raza Morada Nova. La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de sangre o del bulbo capilar utilizando kits comerciales: *Genomic DNA Purification Kit* y *Puregene Core Kit A* (GentraSystems - USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen de la proteína priónica (PrP) se investigaron mediante la técnica PCR / RFLP, según Lühken *et al.* (2004) con modificaciones. Las muestras de ADN se sometieron a dos reacciones de PCR sobre la base de polimorfismos en los codones 136 (alanina, A / valina, V); 154 (histidina, H / arginina, R) y 171 (histidina, H / glutamina, Q / arginina, R). En la 1ª PCR el fragmento de 197 pb fue amplificado en volumen de 25 µL que contenía: 50 ng de ADN, 0,10 µM de cada cebador (F: 5'GTGGCAGGAGCTGCTGCAGCT3' y R1: 5'TGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATC'3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP y 1U de *Taq DNA* polimerasa. El protocolo de esta amplificación consistió en una 95°C/ 5 minutos seguido de 35 ciclos: 94°C/ 30 segundos, 55,8°C/ 2 minutos y 72°C/ 1 minuto y una extensión

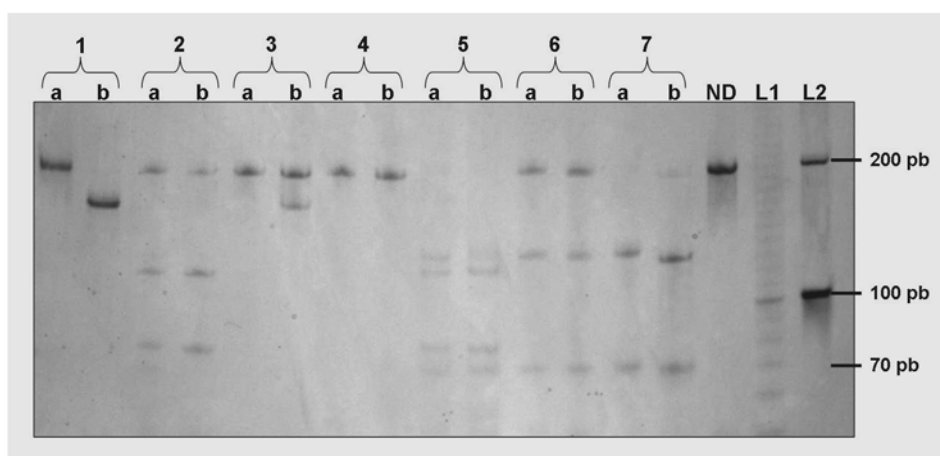
final a 72°C/ 10 minutos. En la 2ª PCR el fragmento de 196 pb fue amplificado utilizando las mismas condiciones y protocolo de amplificación descritos anteriormente, excepto para el cebador reverso que fue sustituido por R2: 5'GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATAT3' y la temperatura de anillamiento que se aumentó a 60°C por 1 minuto. Para las reacciones de clivaje se utilizaron enzimas de restricción *BspHI* y *BspDI*. Los productos de la primera PCR (197 pb) se digirieron solamente con enzima *BspHI* y de la segunda (196 pb) con las dos enzimas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, utilizando una concentración final de 2,5 unidades de cada enzima en las reacciones. Los RFLPs se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (49:1) y fueron visualizados siguiendo a Sanguinetti *et al.* (1994). Las frecuencias de los alelos y genotipos se calcularon empleando el programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998). La clasificación de riesgo de los animales a scrapie se efectuó de acuerdo con los criterios de Dawson *et al.* (1998), que han sido utilizado como una estrategia de selección en el Programa Nacional de Scrapie de Gran Bretaña (NSP 1, 2006). Los grupos de riesgo se calificaron como R1 (bajo riesgo) a R5 (riesgo elevado).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de PCR/RFLP utilizada en el análisis del gen PrP permitió conocer la susceptibilidad de los animales para el desarrollo de la enfermedad. La digestión del fragmento de 197 pb con la enzima *BspHI* y doble digestión enzimática del fragmento de 196 pb con las enzimas *BspH* y *BspDI* resultó en dos patrones, que definieron en conjunto los genotipos mediante el análisis de sus alelos (tabla I).

**Tabla I.** Patrón de restricción de los fragmentos de 197 y 196 pb, después de la escisión con los enzimas *BspHI* y *BspDI* para la identificación de los cinco alelos del gen PrP. (*Restriction pattern of fragments 197 and 196 pb, after cleavage with BspHI and BspDI enzymes for the identification of five alleles of PrP gene.*)

|     | Alelos                |                                      |
|-----|-----------------------|--------------------------------------|
|     | 197 pb – <i>BspHI</i> | 196 pb – <i>BspHI</i> e <i>BspDI</i> |
| ARR | 197                   | 170 (26)                             |
| ARQ | 197                   | 196                                  |
| ARH | 172 (25)              | 196                                  |
| AHQ | 118 e 79              | 118 e 78                             |
| VRQ | 131 e 66              | 130 e 66                             |



**Figura 1.** Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen PrP, representando los diferentes genotipos (carriles 1-7), en gel de poliacrilamida 10%. a: fragmento 197 pb, digerido con *BspHI*. b: fragmento 196 pb, digerido con *BspHI* y *BspDI*. Muestra 1: genotipo ARR/ARR. Muestra 2: genotipo ARQ/AHQ. Muestra 3: genotipo ARR/ARQ. Muestra 4: genotipo ARQ/ARQ. Muestra 5: genotipo AHQ/VRQ. Muestra 6: genotipo ARQ/VRQ. Muestra 7: genotipo VRQ/VRQ. ND: ADN sin digerir. L1: escala 10 pb. L2: escala 100 pb. (*Polymorphism of length of the restriction fragments (RFLP) of gene PrP, representing the different genotypes (lanes 1-7), polyacrylamide gel 10%. a:*

fragment 197 pb, digested with BspHI. b: fragment 196 pb, digested with BspHI and BspDI. Sample 1: ARR / ARR genotype. Sample 2: ARQ / AHQ genotype. Sample 3: ARR / ARQ genotype. Sample 4: ARQ / ARQ genotype. Sample 5: AHQ / VRQ genotype. Sample 6: ARQ / VRQ genotype. Sample 7: VRQ / VRQ genotype. ND: DNA without digesting. L1: scale 10 pb. L2: scale 100 pb).

La Figura 1 muestra algunos patrones de restricción obtenidos en este estudio. Los datos presentados en la tabla II nos muestran que los ovinos de las razas Morada Nova, Santa Inés y Dorper presentaron polimorfismos en los tres codones (136, 154 y 171), White Dorper, en los codones 136 y 154, mientras que Suffolk, solamente en el codón 171. El SNP Q (glutamina) / R (arginina) en el codón 171 se detectó en todas las razas, pero el SNP Q / H (histidina), solamente en los animales Suffolk. El alelo ARR que, de acuerdo con la bibliografía, proporciona un alto grado de resistencia en los ovinos, se detectó en todos los rebaños, con mayor incidencia en los animales Suffolk (0,4286). Para los otros rebaños (tabla II), las estimaciones de las frecuencias ARR oscilaron entre 0,1207 (Santa Inés) a 0,2480 (Dorper).

**Tabla II.** Estimaciones de las frecuencias alélicas para los codones 136, 154 y 171 del gen PrP en cinco razas ovinas. (Estimates of allele frequencies for the codons 136, 154 and 171 of the PrP gene in five sheep breeds).

| Alelos |     |     | Rebaños |        |        |        |        |
|--------|-----|-----|---------|--------|--------|--------|--------|
| 136    | 154 | 171 | MN      | SI     | D      | WD     | S      |
| A      | R   | R   | 0,2288  | 0,1207 | 0,2480 | 0,1800 | 0,4286 |
| A      | H   | Q   | 0,1186  | 0,0344 | 0,033  | 0      | 0      |
| A      | R   | H   | 0       | 0      | 0      | 0      | 0,0155 |
| A      | R   | Q   | 0,6357  | 0,7674 | 0,6281 | 0,7800 | 0,5559 |
| V      | R   | Q   | 0,0169  | 0,0775 | 0,0909 | 0,0400 | 0      |

**Tabla III.** Clasificación de los genotipos según el riesgo de los animales a scrapie y estimaciones de las frecuencias genotípicas para las cinco razas investigadas. (Classification of genotypes as the risk of animals a scrapie and estimates of genotype frequencies for the five breeds investigated).

| Genotipos | Grupo | Clasificación*                               | Razas ovinas |            |            |            |            |
|-----------|-------|----------------------------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
|           |       |                                              | MN<br>N=59   | SI<br>N=58 | D<br>N=121 | WD<br>N=25 | S<br>N=161 |
| ARR/ARR   | R1    | Muy resistente                               | 0,0847       | 0,0172     | 0,0413     | 0          | 0,0621     |
| ARR/AHQ   | R2    | Resistente<br>(riesgo bajo)                  | 0,0339       | 0          | 0          | 0          | 0          |
| ARR/ARH   |       |                                              | 0            | 0          | 0          | 0,0062     |            |
| ARR/ARQ   |       |                                              | 0,2542       | 0,2070     | 0,4050     | 0,3600     | 0,7267     |
| ARQ/AHQ   | R3    | Resistencia<br>Moderada<br>(riesgo moderado) | 0,1356       | 0,0517     | 0,0661     | 0          | 0          |
| AHQ/AHQ   |       |                                              | 0,0339       | 0          | 0          | 0          | 0          |
| ARQ/ARQ   |       |                                              | 0,4408       | 0,5863     | 0,3223     | 0,56       | 0,1801     |
| ARQ/ARH   |       |                                              | 0            | 0          | 0          | 0          | 0,0249     |
| ARR/VRQ   | R4    | Susceptibles<br>(riesgo)                     | 0            | 0          | 0,0083     | 0          | 0          |
| ARQ/VRQ   | R5    | Muy susceptibles<br>(riesgo alto)            | 0            | 0,1034     | 0,1405     | 0,0800     | 0          |
| AHQ/VRQ   |       |                                              | 0            | 0,0172     | 0          | 0          | 0          |
| VRQ/VRQ   |       |                                              | 0,0169       | 0,0172     | 0,0165     | 0          | 0          |

\*Dawson *et al.*, 1998

El alelo ARQ que confiere resistencia moderada, fue el más frecuente en todos los rebaños, cuyas frecuencias oscilaron entre 0,5559 (Suffolk) a 0,7800 (Dorper Blanco). Estudios similares muestran que ARQ es el más

frecuente en las razas autóctonas portuguesas, con frecuencias entre 0,52 y 0,91 (Gama *et al.*, 2006) y en los rebaños estudiados por Acín *et al.* (2004), siendo la forma alélica ancestral. Por lo tanto, la mayor parte de las variaciones del gen PrP se podrían haber derivado de una única mutación en la secuencia de ARQ (Santos *et al.*, 2012; Sotomaior *et al.*, 2012). Por el contrario, el alelo VRQ, que confiere un alto grado de susceptibilidad al Scrapie clásico (Moum *et al.*, 2005), no se detectó en los animales Suffolk y en las otras razas ocurrió en frecuencias bajas (tabla II) de 0,0169 (Morada Nova) a 0,0909 (Dorper). De acuerdo con los resultados de Gama *et al.* (2006), lo mismo ocurrió en la mayoría de las razas portuguesas en que este alelo apareció en frecuencia muy baja (menor que 0,10) y estuvo ausente en tres de ellas (Churra Badana, Mondegueira and Merino Precoce). El alelo AHQ, que según Hunter *et al.* (1996) puede aumentar la resistencia en algunas razas, sólo se detectó en los animales Morada Nova, Santa Inés y Dorper, mientras que el alelo ARH, que parece tener un efecto neutro sobre la respuesta del hospedador al agente priónico (Dawson *et al.*, 1998), ocurrió sólo en un rebaño Suffolk, pero a muy baja frecuencia (0,0155). Como puede verse en la tabla III, de los quince posibles genotipos, solamente AHQ / ARH, ARH / ARH y ARH / VRQ no fueron observados. En los rebaños Suffolk se detectaron sólo cinco genotipos (tabla III). En cuanto a la clasificación del rebaño Morada Nova, de acuerdo con Dawson *et al.* (1998), los resultados obtenidos muestran que, a pesar de ser una raza local, rústica y bien adaptada, solamente el 8,47% de los animales investigados se agruparon en R1, considerado genéticamente muy resistente. La mayoría se clasificaron en el grupo R2 (28,81%) y R3 (61,03%), considerados de riesgo moderado, que requiere atención en la selección de sementales para cruzamiento. En R5, sin embargo, se agruparon solamente el 1,69% de los animales investigados, que son considerados como extremadamente sensibles al scrapie clásico y deberían ser descartados de los rebaños. Se observaron resultados similares para Santa Inés, que es una raza adaptada en Brasil, resultante del cruzamiento intercurrente de las razas Bergamacia, Morada Nova, Somalies y otros ovinos sin clasificación racial definida, donde el 1,72% de los animales se clasificaron en el grupo R1 (considerados resistentes), el 20,7% en el grupo R2 (riesgo bajo) y una gran mayoría del 63,8% en el grupo R3 (riesgo moderado). En los rebaños de Morada Nova y Santa Inés, se observa que el mayor número de animales susceptibles (grupo R5) se detectó en Santa Inés (13,78%), con solo el 1,69% en Morada Nova. El genotipado de 29 ovejas de Santa Inés, criadas en el nordeste de Brasil (Lima *et al.*, 2007), mostró que el 41,3% de los animales pertenecían a los grupos de riesgo alto o medio, y sólo el 10,3% al grupo resistente (R1). Según estos autores, a pesar de no haberse notificado scrapie en ovejas de pelo, es importante conocer la sensibilidad de estos ovinos, pues los cruzamientos entre ovejas Santa Inés con moruecos Suffolk y Hampshire Down son bastante frecuentes. La comparación de los resultados obtenidos en este estudio, mostró que en los rebaños Dorper y Dorper Blanco, el genotipo ARR / ARR ocurrió en sólo el 4,13% de los animales Dorper, que se agrupan en R1, considerados resistentes. En R2, representado por los genotipos ARR / AHQ, ARR / ARH, y ARR / ARQ que se correlacionan con bajo riesgo, pero requieren una atención especial para su uso en los programas de selección, se agruparon el 40,5% y el 36,0% de los animales Dorper y Dorper blanco, respectivamente. En el grupo R3, representado por los genotipos ARQ / AHQ, AHQ / AHQ, ARQ / ARQ y ARQ / ARH que se correlacionan con resistencia moderada o riesgo moderado, se clasificaron el 38,84% y 56,0% de los animales Dorper y Dorper Blanco, respectivamente. El genotipo ARR / VRQ, considerado susceptible al scrapie clásico se detectó solamente en el 0,083% de la raza Dorper (R4), mientras que los genotipos ARQ / VRQ, AHQ / VRQ y VRQ / VRQ, correlacionados con alta susceptibilidad, se detectaron en el 15,7% y 8,0% de los animales Dorper y Dorper blanco, respectivamente. Estos resultados sugieren que, a pesar de la existencia de genotipos desfavorables en ambos rebaños, el 92% de los animales Dorper Blanco se pueden considerar de resistencia moderada a baja, mientras que los rebaños Dorper tienen un gran potencial para convertirse en resistentes, pues presentan el 4,13% de animales con alta resistencia. En cuanto a la raza Suffolk, los resultados observados muestran que los animales investigados son el resultado de programas de selección a favor del alelo ARR. El 6,21% de los animales estudiados eran homocigotos (ARR / ARR) y se clasifican en R1, considerado resistente, y el 73,29% heterocigotos (ARR/ARQ) clasificados en R2, considerados de bajo riesgo. Este último grupo también requeriría atención para ser utilizado como grupo reproductor. Se observó asimismo que los genotipos ARQ / ARQ y ARQ / ARH, correlacionados con resistencia moderada, se detectaron en el 20,49% de los animales. Los resultados presentados en las tablas II y III nos muestran que la variabilidad observada en los rebaños

Suffolk se debe únicamente al polimorfismo del codón 171, lo que es coherente con la literatura. Los resultados obtenidos por Andrade *et al.* (2011) en un rebaño Suffolk infectado con scrapie clásico nos muestra que sólo el 0,097% de los animales eran R1 (resistente), el 41,9% del grupo R2 (bajo riesgo), el 44,10% del grupo R3 (riesgo moderado), el 3,2% del grupo R4 (alto riesgo) y el 1,1% del grupo R5 (muy sensible). Ribeiro *et al.* (2007) encontraron que el 55,04% de los animales Suffolk pertenecían al grupo de alto riesgo de scrapie, cuya prevalencia de genotipos susceptibles era muy similar a la encontrada en los rebaños Suffolk norteamericanos que no habían sido seleccionados previamente a favor de la resistencia (Yuzbasivan-Gurkan *et al.*, 1999). En el presente estudio, los animales resistentes representaron un porcentaje mayor con relación a la literatura consultada, demostrando que ha existido selección a favor del alelo *ARR*, que se está llevando a cabo en los rebaños investigados en el Estado de Sao Paulo. Según la literatura, los genotipos detectados en los rebaños ayudan a explicar los casos de Scrapie que ocurrieron en el rebaño nacional. Desafortunadamente, en las importaciones de ovinos desde Reino Unido y EE.UU. / Canadá llegaron animales infectados con los priones. La transmisión de este agente infeccioso se ha facilitado por la sensibilidad genética de algunos animales, lo que ha permitido la propagación del scrapie en nuestros rebaños.

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que con un plan de selección y cruzamientos eficientes sería posible aumentar la frecuencia del alelo *ARR*, ya que hay muchos heterocigotos en todos los rebaños investigados. Las diferencias demuestran la necesidad de extender el análisis del gen PrP en estas y en otras razas, con el objetivo de permitir la identificación de los genotipos favorables para aumentar la resistencia en el ganado ovino brasileño. Este conocimiento contribuirá sin duda a la implementación de un programa de cruzamiento selectivo y ciertamente puede añadir valor a las razas ovinas criadas en el país.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la FAPESP por el apoyo financiero (Processo 2013/ 10973-6), la ASPACO y a los Criadores de ovinos por las muestras biológicas que permitieron la realización de este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acín C., Martín-Burriel I, Goldmann W., Lyahyai J., Monzón M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola J.J., Zaragoza, P.2004. Prion protein polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *Journal of General Virology* 85, 2103-10.
- Andrade C.P., Almeida I.L., Castro, L.A., Leal J.S., Silva S.C., Driemeier D. 2011. Single nucleotide polymorphism at 15 codon of the prion protein gene form a scrapie-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31, 893-98.
- Andrade C.P., Oliveira E.C.O., Leal J.S., Almeida L.L., Castro L.A., Silva S. C.Driemeier D. 2015. Report of outbreaks of classical scrapie in Dorper sheep and associated prion protein gene polymorphisms in affected flocks. *Tropical Animal Health and Production* 47, 1203-12.
- Cloucard C., Beaudry P., Esen D. 1995. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology* 76, 2097-101.
- Dawson M., Hoinville L.J., Hosie, B.D., Hunter N. 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record* 142, 623-25.
- Gama L.T., Carolino M.I., Santos-Silva M.F., Pimenta J.A., Costa M.S. 2006. Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. *Livestock Science* 99, 175-84.
- Groschup M.H., Lacroux C., Buschman A., Lûken G. et al.2007. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1201-7.
- Heaton, M.P., Leymaster K.A., Freking B.A. Hawk D.A., Smith T.P., Keele J.W., Snelling W.M., Fox J.M., Chitko-McKown C.G., Laegreid W.W. 2003. Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle and deer. *Mamm. Genome* 14, 765-77.
- Hunter N., Foster J.D., Dickinson A.G., Hope J. 1989. Linkage of the gene for scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Slip gene in Cheviot sheep. *Veterinary Record* 124, 364-6.
- Hunter N., Foster J.D., Goldmann W. Stear M.J., Hope J., Bostock C.1996. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* 141, 809-24.

- Ianella P., McManus C., Caetano A.R. 2011. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: issues for conservation and breeding programs. *Reserch in Veterinary Science*93, 191-25.
- Lima A.C.B., Bossers C.E., Souza S.M.P., Oliveira S.M., Oliveira D.M. 2007. PrP genotypes in a pedigree flock of a Santa Inês sheep. *Veterinary Record* 160, 336-7.
- Luhken G., Buschann A., Groschup M.H., Erhardt, G. 2004. Prion protein allele A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch Virol* 149, 1571- 80.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639–55.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. 2005. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J.Gen. Virol* 86, 231-5.
- NSP 1. 2006. *National Scrapie Plan for Great Britain*: (Disponíbleen: <http://www.defra.gov.uk>).36p.
- O'Doherty E, Healy A., Aherne M., Hanrahan J.P., Weavers E, Doherty M., Roche J.F., Gunn M., Sweeney, T. 2002. Prion protein (prp) gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland. *Res. Vet. Sci.*73, 243-50.
- Pacheco A.C.L., Oliveira S.M.P., Gouveia J.J.S., Diniz M.C., Vasconcelos E.J.R., Viana D.A., Rosinha G.M.S., Maggioni R., Costa, R.B., Oliveira D.M. 2007. Analysis of prion protein gene (PRNP) polymorphisms in healthy Morada Nova sheep reveals the presence of genotypes susceptible to scrapie. *Ciência Animal* 17, 130-3.
- Ribeiro L.A.O., Passos D.T., Rodrigues N.C., Weimer T.A. 2007. Scrapie (paraplexia enzoótica) em ovinos no Brasil. *Veterinária em Foco* 4, 203-9.
- Roels, S., Renard, C., De Bosschere, H., Geeroms R., Van Poucke, M., Peelman, L., Vanopdenbosch, E. 2004. Detection of polymorphism in the prion protein gene in the Belgian sheep population some preliminary data. *The Veterinary Quarterly*, 26: 3-11.
- Sanguinetti C.J., Neto, E.D., Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17, 914-21.
- Santos C.R., Mori E., Leão D.A., Mariorka P.C. 2012. Genotipagem de polimorfismos no gene prpn em ovinos da raça Santa Inês no Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 221-6.
- Woolhouse, M.E, Stringer, S.M, Matthews, L., Hunter, N., Anderson, R.M. 1998. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. *Proceedings Biological Sciences*, 7, 1205–1210.