



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO GENÉTICO E
MOLECULAR

Polimorfismos do gene da proteína Prion, envolvidos com a encefalopatia
espongiforme bovina (EEB)

Dissertação para obtenção do Título
de Mestre em Diagnóstico Genético
e Molecular.

Alexandre Roberto Kerber

Orientadora: Dra. Tania de Azevedo Weimer

CANOAS

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Índice

Resumo	3
<i>Abstract</i>	4
Introdução	5
Justificativa e Objetivos	13
Material e Métodos	14
Resultados e Discussão	18
Referências Bibliográficas	25

Resumo

A Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), uma doença do grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET), ou doença do prion, é uma doença neurodegenerativa fatal, afetando várias espécies de mamíferos e produzindo uma degeneração espongiforme, característica, do cérebro. O agente infeccioso é uma molécula protéica resistente à protease, PrP^{sc} que resulta de uma alteração conformacional de uma glicoproteína normal, codificada pelo hospedeiro, PrP^c. Uma vez formada, a PrP^{sc} induz sua conformação à PrP^c, gerando moléculas adicionais de PrP^{sc}, em uma reação autocatalítica. A doença pode ser transmitida tanto dentro como entre espécies de mamíferos. Dois polimorfismos de inserção/deleção, um de 23 pares de base (pb) na região promotora do gene PrP e outro de 12 pb no íntron 1 do gene foram descritos, em bovinos, na Alemanha, associados à susceptibilidade à EEB, os animais portadores das deleções sendo mais frequentemente afetados pela doença. Este trabalho tem como objetivo verificar as frequências alélicas destes polimorfismos, em dois rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul, Aberdeen Angus e Charolês. O DNA foi investigado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com primers específicos, sendo o produto de amplificação analisado em gel de poliacrilamida a 10% e corado com nitrato de prata. Nas amostras de Aberdeen as frequências das deleções de 23 e 12 pb foram, respectivamente, 73% e 56%, os valores correspondentes, nos Charolês, sendo de 68% e 58%. As frequências do haplótipo del 23-del12 foi de 54 e 57% em Aberdeen e Charolês, respectivamente. Estes dados mostram a alta frequência dos alelos e do haplótipo de susceptibilidade à doença e a necessidade de seleção para aumentar a frequência dos animais resistentes, reduzindo as chances de desenvolvimento de EEB, em nossas populações.

Abstract

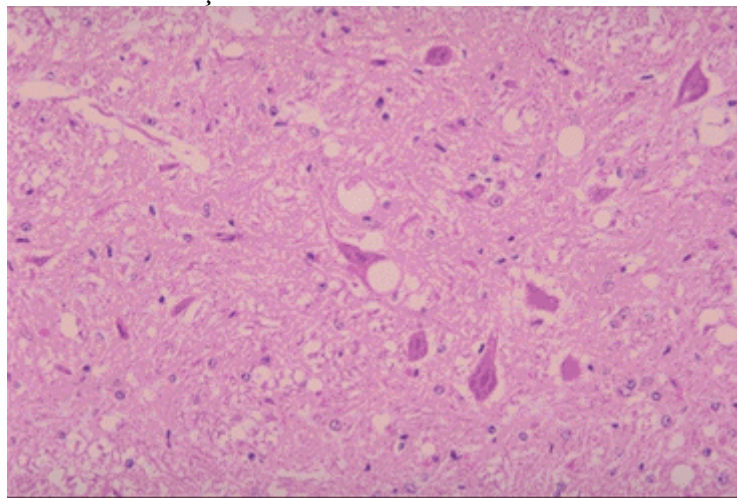
The bovine spongiform encephalopathy (BSE), a disease of the transmissible spongiform encephalopathies (TSE) group, or prion disease, is a fatal neurodegenerative disorder, affecting a wide variety of mammalian species and producing a characteristic spongiform degeneration of the brain. The infectious agent is a protease resistant protein molecule designated PrP^{sc}, resulting from a conformationally altered form of a normal, host-encoded membrane glycoprotein called PrP^c. Once PrP^{sc} has been formed it impresses its abnormal conformation on PrP^c, thereby generating additional molecules of PrP^{sc} in an autocatalytic reaction. Prion diseases could be transmitted to the same or to a different host mammalian species. Two deletion/insertion polymorphisms, one of 23 base pairs (bp) on the promoter region of PrP gene and other of 12 bp on intron 1 of PrP gene, have been described in German cattle as associated to different susceptibility to BSE disease, the animal with deletions presenting greater susceptibility. The objective of this work was to verify the allele frequencies of these polymorphisms in two cattle breed from Rio Grande do Sul, Aberdeen Angus and Charolais. The DNA was investigated through polimerase chain reaction (PCR), with specific primers and the amplicon analyzed in 10% polyacrylamide electrophoresis gel and silver nitrate staining. The 23bp and 12bp deletion frequencies in Aberdeen were, respectively, 73% and 56%, the Charolais values being 68% and 58%. The 23del-12del haplotype frequency was 54 and 57% in Aberdeen and Charolais, respectively. These data show the high frequencies of susceptibility alleles and haplotype in these herds and the need of selection to increase the frequency of resistant animals and reduce the probabilities of a BSE development in our populations.

Introdução

1 Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET), também conhecidas como doenças do prion, provocam degenerações cerebrais, lentamente progressivas, caracterizadas por vacuolização do tecido cerebral (Figura 1) e depósito de uma proteína anormal (PrP^{sc}), e ocorrem tanto no homem como em animais. Têm como características comuns, nas diferentes espécies, o fato de possuírem tempo de incubação prolongado, atingirem o sistema nervoso, serem debilitantes e sempre fatais, sendo que o agente etiológico não induz resposta imune detectável (Castiglioni *et al.*, 1998; Costa, 2004; Vrtková *et al.*, 2001), o diagnóstico confirmatório só podendo ser realizado pós-mortem.

Figura 1. Vacuolização do tecido cerebral em indivíduos com EEB

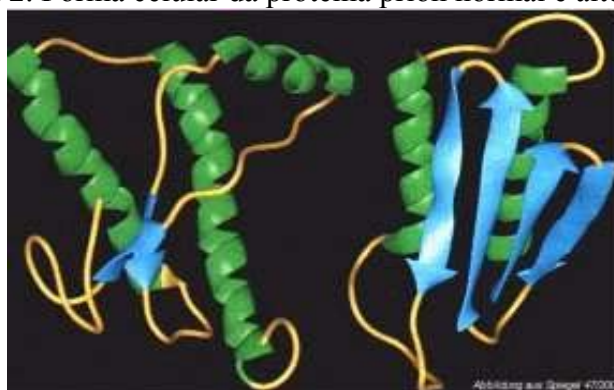


(niah.naro.affrc.go.jp/disease/bse/images/img0034gif; acesso em 28/10/05)

Estas desordens resultam do acúmulo, no cérebro, da proteína prion (PrP^{sc}), que é uma forma alterada de uma proteína normal (PrP^{c}), uma glicoproteína normalmente encontrada no organismo de animais e do homem com cerca de 250 aminoácidos. A PrP^{c} é uma proteína celular presente em vários tipos de células, incluindo músculos e linfócitos. Essa proteína parece atuar na função neuronal, estando envolvida na sinapse.

A PrP^{sc} é formada em um processo catalítico, sendo uma forma insolúvel da PrP^c, muito resistente à digestão por proteases. A sequência de aminoácidos da proteína normal e da anormal é a mesma, diferindo somente em relação ao comportamento bioquímico e biofísico, sendo a forma celular normal predominantemente alfa-helicoidal e a alterada, beta-helicoidal (Figura 2). Moléculas com maior proporção da estrutura beta-helicoidal parecem ser mais resistentes à digestão enzimática por proteases (Hunter, 1999).

Figura 2. Forma celular da proteína prion normal e alterada



Proteína normal

Proteína alterada

(www.arzt-und-gesundheit.de/gemeinsam-arzt-und-gesundheit/graphic/bse/bse-prion.jpg;
acesso em 28/10/05)

As partículas infectantes não possuem material genético (DNA ou RNA), multiplicam-se rapidamente, simplesmente através da alteração da estrutura espacial da proteína normal, embora essas transformações não sejam totalmente conhecidas. O desenvolvimento da doença depende tanto da estrutura da forma normal da proteína, no hospedeiro, quanto da estrutura alterada, infectante, que é introduzida no organismo. O mecanismo responsável pela doença parece ser que, ao ser inoculado ou ingerido, um PrP^{sc} em contato com o PrP^c do hospedeiro se multiplica no tecido linfóide, onde permanece por longo período. Quando ganha acesso ao sistema nervoso ocorre a formação de um heterodímero PrP^c/PrP^{sc} entre a proteína normal do hospedeiro e a prion infectante. Este heterodímero converte-se rapidamente no homodímero PrP^{sc}/PrP^{sc}, levando a um círculo vicioso de transformação exponencial da proteína PrP^c, na forma alterada PrP^{sc} que se acumula no cérebro causando lesões características (Harris, 1999; Nicholas, 1999; Dormont, 2002a; Weissmann, 2004). As principais diferenças e semelhanças entre a forma normal e a infectante constam na Tabela 1.

Existem outras teorias sobre a etiologia destas doenças. Uma advoga que o agente transmissor seria um vírus com características bioquímicas incomuns, e outra, de que seria um virino, uma proteína contendo uma pequena partícula de ácido nucléico que codificaria apenas a si próprio, o que explicaria a ausência de resposta imune. No entanto, as duas teorias não se sustentam quando se observa a ausência de identificação de ácidos nucléicos, no patógeno e a resistência do agente às irradiações ionizante e ultravioleta, que inativaria os ácidos nucléicos de um possível vírus ou virino (Dormont, 2002b; Hill, 2004; Weissmann, 2004).

Tabela 1. Diferenças entre a forma normal (PrP^c) e a associada à doença (PrP^{sc})

	PrP ^c	PrP ^{sc}
Proteases (PK)	Sensível	Parcialmente resistente
Massa molecular (-PK)	33-35kDa	33-35kDa
Massa molecular (+PK)	Degradada	27-30 kDa
Detergentes	Solúvel	Insolúvel
Localização	Superfície das células	Agregados

(Hunter, 1999).

O agente patogênico é altamente estável e resistente ao congelamento, ressecamento e calor (do cozimento normal), à pasteurização, e esterilização à temperatura e tempo usuais. Pode resistir, também, a uma solução formolizada a 20% durante quatro meses, à temperatura de 90°C durante uma hora e ao calor seco de 160°C, durante 24 horas. O agente também é resistente às irradiações ionizante e ultravioleta, como referido anteriormente. No entanto, temperatura de 105°C, sob pressão, durante 30-60 minutos, pode inativar o agente infeccioso, dependendo do tamanho da partícula (Costa, 2004; Dormont, 2002a).

Diferentes EET têm sido descritas em animais [“scrapie” – Encefalopatia de ovinos e caprinos; EEB – Encefalopatia espongiforme bovina (conhecida popularmente como doença da vaca louca); TME – Encefalopatia transmissível em vison (Minks); CWD – Doença debilitante crônica, em mulas e alces; FSE – Encefalopatia espongiforme felina] e humanos (Kuru; FFI – Insônia familiar fatal; GSS – Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker; CJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob; Otto, 2000).

Essas doenças foram descritas há décadas, “scrapie” por volta de 1750, EEB em 1850 e entre 1920 e 1930 houve referência a casos de CJD (Bodemer e Kaup, 2004).

Os casos de transmissão das EET entre humanos, com exceção da Kuru, comum em uma população da Nova Guiné e transmitido por canibalismo ritual, são raros, mas há relatos de infecção por instrumentos cirúrgicos ou transplante de córnea proveniente de pacientes com CJD. A transmissão de animais para humanos tem sido descrita, como, por exemplo, a contaminação humana por ingestão de carne de bovinos afetados pela EEB, resultando em uma forma variante de CJD, com manifestação em idades anteriores à da CJD clássica (Doh-ura e Kitamoto, 1996). Em espécies diferentes, a transmissão é mais provável entre organismos evolutivamente mais aparentados. A epidemia da “Vaca Louca” no Reino Unido em 1986, por exemplo, parece ter ocorrido porque o gado estava sendo alimentado com ração que continha proteína, farinha de carne e osso (FCO), proveniente de ovelhas afetadas por “scrapie”. A distribuição destas doenças é mundial e preocupa pelo fato de ser sempre fatal, por não induzir uma resposta imune que permita o diagnóstico, e por poder ser confirmada somente após a morte do infectado, por análise do material cerebral.

A transmissão entre animais de espécies distintas é caracterizada por um longo período de incubação, sem a presença dos sintomas. Isso porque a propagação da prion depende da interação entre PrP^c do receptor e PrP^{sc} infectante e, consequentemente da homologia entre os genes de PrP dos diferentes organismos, sendo este processo chamado de barreira das espécies (Dormont, 2002b). Muitas vezes o tempo de incubação ultrapassa o tempo de vida do animal que é abatido antes de apresentar a manifestação da doença, embora podendo transmiti-la, o que aumenta o risco de contaminação.

O período de incubação pode variar entre organismos e espécies, e a ausência de sintomas clínicos em um indivíduo não exclui a possibilidade de transmissão a um novo hospedeiro. O longo período de incubação e o fato de poucos animais morrerem logo nos primeiros períodos após a infecção dificultam bastante o diagnóstico.

2 - A Encefalopatia Espongiforme Bovina

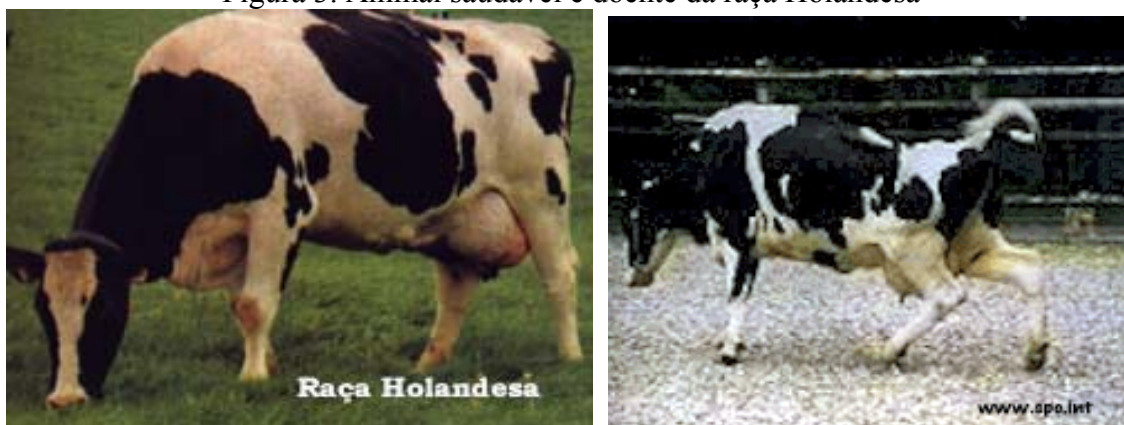
A encefalopatia espongiforme bovina (EEB), uma das doenças pertencentes ao grupo das EET, embora descrita já no século XIX, foi reconhecida pela primeira vez, no Reino Unido, em 1986 e passou a ser conhecida como doença da “vaca louca”. Uma das teorias do surgimento da doença é de que uma alteração introduzida no processo de

obtenção de farinha de carne e osso (FCO), utilizada na alimentação do gado, no final dos anos 70 e início dos 80, permitiram que o agente infeccioso oriundo da scrapie dos ovinos sobrevivesse e contaminasse os bovinos.

Não há predisposição relacionada ao sexo ou raça, e a susceptibilidade genotípica não é clara, como ocorre com a scrapie. O período de incubação tem sido considerado como de quatro a cinco anos podendo, em alguns casos, ser de dois. A evolução da doença para morte varia de uma a quatorze semanas, após os primeiros sintomas.

Os animais afetados tornam-se muito difíceis de manejar e demonstram aumento de sinais de ataxia e alterações de comportamento, medo, agressividade, sensibilidade ao barulho e ao toque, salivação, tremores, e atitude de lambar o focinho (Hunter, 1999). Na locomoção, passam a hesitar nos movimentos, como ao passar por ralos, por exemplo (Figura 3).

Figura 3. Animal saudável e doente da raça Holandesa



a) animal saudável

b) animal doente

(www.saudeanimal.com.br/images/mal_vaca_louca.gif; acesso em 28/10/05)

Projetou-se que, com algumas medidas profiláticas, como retirada da FCO da alimentação dos animais e abate e incineração dos animais infectados, a doença seria eliminada até o ano de 2001 (Hunter, 1999); mas, apesar da redução do número de casos, no mundo, a incidência da doença continuou, distribuindo-se mundialmente e atingindo países na Europa, América e Ásia (Costa, 2004).

Em março de 1996, em humanos, uma nova forma de CJD foi reportada afetando pessoas jovens, ao redor dos 20 anos. Isto não acontece normalmente já que a forma usual de CJD afeta indivíduos entre a quinta e a sexta década de vida. Esta nova forma da doença foi denominada como variante da CJD (vCJD). Desde os casos iniciais, ocorreram 139

mortes de pacientes com vCJD no Reino Unido, até o final de fevereiro de 2004. Esta nova doença sugeriu um novo fator de risco para CJD. Através de pesquisas sobre a estrutura molecular e os mecanismos de infecção identificou-se semelhança entre a prion da vCJD e da EEB, demonstrando a possível contaminação através da ingestão de carne de gado contaminado com EEB (Hill, 2004).

Enquanto as pesquisas de genes em humanos ou ratos são realizadas para um melhor entendimento de doenças e manutenção da saúde pública, em animais domésticos, as análises de genes são mais interessantes quando associados à importância econômica. Assim, genes de interesse são os que conferem resistência a doenças, ou que permitem selecionar características fisiológicas ou morfológicas que gerem um maior ganho para o criador como, por exemplo, reprodução, lactação e crescimento do animal. Neste sentido, a EEB apresenta todos os requisitos para ser estudada (Vaiman, 1999).

Desde que a doença surgiu no Reino Unido em 1986, mais de 170 mil cabeças de gado foram sacrificadas. O medo da EEB reduziu drasticamente o consumo de carne em toda a Europa e os custos associados a medidas para controlar a doença e suportar os prejuízos do mercado de carne ficaram ao redor de 2,5 bilhões de dólares no período de 1996-1997 e foi estimado um prejuízo de aproximadamente 3 bilhões de dólares para o período de 1997-2000 (Costa, 2004).

A eliminação da FCO da alimentação do gado, na Europa, fez com que as exportações brasileiras de soja para ração animal subissem 45% em dezembro de 2000 quando comparado a dezembro de 1999; além disso, as exportações de carne também se elevaram consideravelmente.

Estes dados demonstram a importância de manutenção do Brasil como zona livre de EEB; caso contrário, os prejuízos para a pecuária e para a economia nacional seriam enormes, além dos riscos para a saúde humana.

O Brasil apresenta, em princípio, baixo risco de aparecimento da EEB, mas as medidas sanitárias adotadas são imprescindíveis para evitar sua introdução no país. Para a manutenção do Brasil como país livre da presença da doença fazem-se necessárias algumas medidas tais como a não utilização de FCO na alimentação dos animais, que deve conter somente pasto e outros insumos que não tenham como base proteína animal, que é a principal forma de transmissão da doença, bem como a proibição de importação de animais e seus produtos, de países com registro da doença.

3 - Prion: gene codificador, proteína e polimorfismos

O genoma do gado é composto de 29 pares de autossomos e 2 cromossomos sexuais. O gene codificador da proteína prion (PrP) localiza-se no cromossomo 13 e é formado por 3 éxons e 2 íntrons. O mRNA maduro sofre alterações pós transcricionais e somente uma fração do éxon 3, de 4244 pares de bases (pb) é traduzida gerando uma proteína funcional que é uma glicoproteína composta por cerca de 250 aminoácidos, associada à glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) que se liga a muitos tipos de células, especialmente nervosas. Sua função parece ser facilitar a transmissão de sinais e a entrada de íons nas células nervosas (Wechselberger *et al.*, 2002).

Está comprovado que certos genótipos do gene PrP são resistentes à doença neurodegenerativa em ratos, ovelhas e homem, mas, embora algumas sugestões tenham sido feitas, isto não foi comprovado no gado (Vrtková *et al.*, 2001).

Em humanos, o gene PrP exibe um polimorfismo no códon 129, a homozigose (metionina/metionina ou valina/valina), estimada em 50%, estando associada com a susceptibilidade à doença (Dormont, 2002b; Preuss *et al.*, 2003).

Em ovinos, os polimorfismos nos códons 136 (alanina ou valina – A/V), 154 (histidina ou arginina – H/R) e 171 (glutamina, arginina, histidina ou lisina – Q/R/H/K), têm sido descritos como associados à susceptibilidade dos animais, o genótipo VRQ sendo o mais susceptível, em algumas raças (DeSilva *et al.*, 2003).

Em bovinos, mais de 60 polimorfismos foram identificados nos três éxons, bem como na região promotora do gene PrP. Sequências variantes no gene PrP bovino poderiam ter influência sobre a sequência de aminoácidos ou o nível de expressão da proteína prion e, deste modo, sobre a susceptibilidade à EEB. Entre estes, repetições de octapeptídeos no éxon 3, de 5, 6 e 7 unidades foram descritas em animais de diferentes raças, entre elas Charolês, Simental e outras, sendo os homozigotos 5/5 associados à maior resistência à EEB (Vrtková *et al.*, 2001). No entanto, estes achados não foram confirmados por outros autores (Premzl *et al.*, 2000; Walawski *et al.*, 2003). Na Alemanha, Sander *et al.* (2004) sequenciaram o gene PrP de bovinos de raças alemãs, detectando 60 polimorfismos. Destes, os autores selecionaram 4 que ou alteravam a sequência de aminoácidos da proteína (repetição de octapeptídeos, anteriormente citada) ou poderiam ter efeito sobre a

expressão do PrP, e testaram sua associação com a susceptibilidade à EEB. Entre estes polimorfismos, apenas dois mostraram associação significativa: duas inserções/deleções (indel), uma de 23 pb na região promotora e outra de 12 pb no íntron 1, os animais portadores das deleções sendo mais freqüentemente afetados pela doença. (Sander *et al.*, 2004).

Posteriormente, Sander *et al.* (2005), através da análise funcional da região promotora do gene PrP, verificaram que os dois indels contêm sítios de ligação a fatores de transcrição que modelam a expressão do gene PrP e que a combinação deleção 23pb/deleção 12 bp apresenta maior expressão gênica, o que é compatível com os achados de associação entre animais portadores das duas deleções e maior susceptibilidade à EEB. Convém salientar que, embora o indel de 12 pb esteja em um íntron, há indicações de que esta região interfere na atividade promotora do gene PrP (Inoue *et al.*, 1997).

Justificativa e Objetivos

No Brasil, a EEB, “scrapie” e as demais patologias relacionadas estão incluídas no grupo de doenças exóticas, para as quais o sistema brasileiro de vigilância epidemiológica mantém postura de alerta permanente, face tratar-se de doenças de notificação obrigatória.

Entre os muitos polimorfismos já descritos, no gene PrP, os únicos que apresentam indicações mais consistentes de estarem associados à susceptibilidade à EEB são as deleções de 23 e 12 pb descritas por Sander *et al.*(2004).

Assim, este trabalho tem por objetivos:

Geral: analisar a diversidade genética de dois polimorfismos de inserção/deleção (indel), um de 23 pb, na região promotora do gene e outro de 12 pb no íntron 1, em bovinos, no Rio Grande do Sul.

Específicos:

1. verificar, em dois rebanhos do Rio Grande do Sul (Aberdeen Angus e Charolês) , a distribuição dos alelos do indel de 12 pb;
2. verificar, nos mesmos rebanhos, as frequências gênicas do indel de 23 pb;
3. estimar os parâmetros de diversidade genética, desses rebanhos, com base nestes dois polimorfismos;
4. estimar, nos dois rebanhos as frequências haplotípicas e verificar se os dois locos encontram-se em equilíbrio de ligação.

Os resultados obtidos permitirão, uma vez repassados aos criadores, a seleção de rebanhos formados por animais portadores de genótipos resistentes, diminuindo, assim, as chances de desenvolvimento desta doença, em nossos rebanhos.

Material e Métodos

1. Amostras:

Os animais, cujas amostras foram utilizadas nesta investigação, são todos fêmeas adultas, sadias, com idade variando de 4 a 6 anos, de dois rebanhos do Rio Grande do Sul, provenientes da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, um Aberdeen Angus (n: 99) e um Charolês (n: 82). Estas duas raças têm sido, tradicionalmente, criadas em grande escala em nosso Estado.

A história do Charolês começa com um gado nativo de cor creme que habitava a comarca de Charolais, na região central da França, entre os rios Loire e Saône. A raça ancestral provavelmente apresentava muitas características comuns ao gado Simental, da Suíça e da Alemanha.

Da aptidão tripla (carne, trabalho e leite) passou para uma raça especializada em carne, aumentando muito sua reputação desde o início do século XX.

São bovinos grandes e pesados, de pelagem branca ou creme (amarelo claro), com reflexos amarelados. Os chifres nascem lateralmente, encurvando-se para frente e para cima, na extremidade. (Figura 4).



Figura 4. Animais da raça Charolês (www.codeman.fi; acesso em 28/10/2005)

A raça Aberdeen Angus existe na Escócia há 400 anos e se desenvolveu no século XIX no nordeste escocês nos condados de Angus e Aberdeen. Sua origem é muito remota, e já nas antigas esculturas há representação dos bovinos mochos, nesta zona. O gado negro sem chifres é mencionado no século IX e no início do século XVI. (Figura 5).

A mescla de todos os tipos locais em uma nova raça foi estimulada por dois grandes criadores: Watson e McCombie (condados de Angus e Aberdeen, respectivamente). A raça, formada por eles e seus vizinhos, originou o Aberdeen Angus que apresenta o biótipo clássico de raça produtora de carne.



Figura 5. Animais da raça Aberdeen Angus

(www.glymptonaberdeenangus.co.uk/sale.html; acesso em 28/10/05)

2. Métodos Laboratoriais

O DNA foi isolado a partir de sangue total, obtido da veia jugular, através do método de Miller *et al.* (1988) e foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguindo a técnica descrita por Sander *et al.* (2004), que consta basicamente de:

Para um volume final de 25 μ l, a PCR continha 20 ng DNA, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada primer (Tabela 2), 5 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$ e tampão da Taq DNA polimerase, fornecido pelo fabricante da enzima. A reação foi efetuada com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 56°C por 45 s e extensão a 72°C por 2 min.

Após os 35 ciclos foi efetuada uma extensão final a 72°C por 5 min. Os protocolos de amplificação foram idênticos para os dois marcadores. Os produtos de PCR foram analisados em gel de acrilamida não desnaturante a 10%, permitindo a visualização dos alelos 100/123 para a indel de 23 pb e 91/103 para a indel de 12 pb.

Tabela 2. Seqüência dos primers utilizados nesta investigação

Indel de 23 pb	Seqüência dos primers
F	5 'GTGCCAGCCATGTAAGTG 3'
R	5' TGGACAGGCACAATGGG 3'
Indel de 12 pb	
F	5' TTACCCTCCTGGTTAGGAG 3'
R	5' CTAGATTCCTACACACCAC 3'

Sander *et al.* (2004)

3. Análises estatísticas

As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram calculadas por contagem direta.

O grau de similaridade entre as populações e entre as frequências haplotípicas observadas e esperadas foi testado pelo cálculo do qui-quadrado (χ^2), através da fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E},$$

onde, O são as frequências genotípicas absolutas observadas e E as esperadas, calculadas em tabela de contingência.

A heterozigotidade esperada (h) em cada loco, ponderada pelo tamanho amostral foi calculada conforme Nei (1978), através da fórmula:

$$h = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n-1)$$

onde, xi são as frequências alélicas e n é o número amostral.

A Heterozigotidade média (H) média foi calculada pela fórmula:

$$H = \sum h/n, \text{ sendo } n \text{ o número de locos.}$$

O conteúdo de informações polimórficas (PIC), que revela a potencialidade de um sistema para análises de ligação, foi avaliado segundo Botstein *et al.* (1980), através da fórmula:

$$P = 1 - (\sum p_i^2) - \sum 2p_i^2 \cdot 2p_j^2$$

onde, p_i e p_j são frequências alélicas.

A análise do equilíbrio entre os dois locos foi realizada por comparação entre as frequências gaméticas observadas e as esperadas com base nas frequências alélicas, conforme:

$$d = (G_{11} \times G_{22}) - (G_{12} \times G_{21}), \text{ em que,}$$

G_{11} e G_{22} são os gametas em acoplamento e G_{12} , G_{21} são os gametas em repulsão (Lewontin, 1988).

A significância do desvio foi estimada por:

$$\chi^2 = d^2 N / p_1 p_2 q_1 q_2, \text{ em que,}$$

N é o número total de gametas da população e $p_1 q_1$ e $p_2 q_2$ são as frequências alélicas dos dois locos (Lewontin, 1988).

Todos os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Excel para Windows[®] ou com o auxílio de uma calculadora.

Não se analisou a associação entre os polimorfismos e a doença porque a EEB inexistia em nossas populações.

Resultados e Discussão

Os produtos de PCR, analisados em gel de acrilamida não desnaturante a 10%, permitiram a identificação dos alelos 100/123 para a indel de 23 pb e 91/103 para a indel de 12 pb; exemplos dos genótipos obtidos encontram-se representados nas figuras 6 e 7.

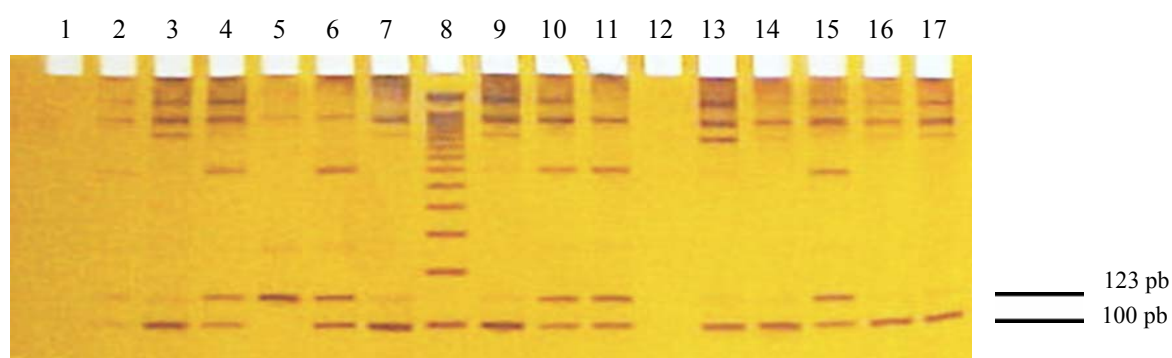


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % do indel de 23 pb, das amostras de DNA de bovinos submetidas a PCR. Canaletas 1 e 12 controles negativos, canaleta 8 marcador de DNA de 50 pb. Demais canaletas, amostras.

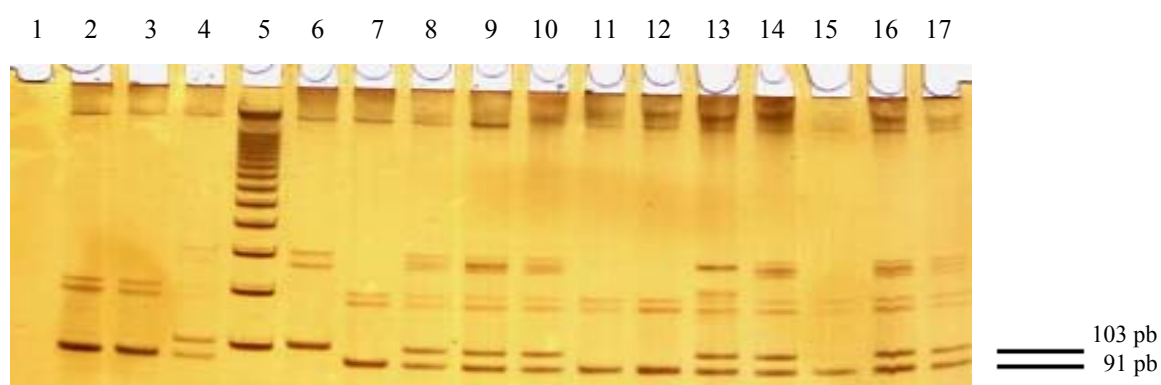


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % do indel de 12 pb, das amostras de DNA de bovinos submetidas a PCR. Canaleta 1 controle negativo, canaleta 5 marcador de DNA de 50 pb. Demais canaletas, amostras.

As frequências gênicas e genóticas para as indels de 23 pb e 12 pb encontram-se nas Tabelas 3 e 4. As duas populações não diferem significativamente quanto às distribuições genóticas, nos dois polimorfismos. Comparados com os dados obtidos, em animais sadios, na Alemanha (único trabalho anterior sobre a distribuição desses polimorfismos), verifica-se que as frequências alélicas em nossas populações são mais elevadas que as observadas naquele País (del 23 = 0,57 e del 12 = 0,51; Sander *et al.*, 2004).

Tabela 3. Frequências genóticas e gênicas da inserção/deleção de 23 pb no gene PrP em duas raças bovinas

Genótipos	Aberdeen (n=99)		Charolês (n=82)	
	Nº	%	Nº	%
100/100	49	50	38	46
100/123	46	46	36	44
123/123	4	4	8	10
Alelos				
100		73		68
123		27		32

Heterogeneidade entre raças: $\chi^2 = 3,18$, NS;

Tabela 4. Frequências genóticas e gênicas da inserção/deleção de 12 pb no gene PrP em duas raças bovinas

Genótipos	Aberdeen (n=99)		Charolês (n=82)	
	Nº	%	Nº	%
91/91	34	34	29	34
91/103	43	44	37	48
103/103	22	22	16	18
Alelos				
91		56		58
103		44		42

Heterogeneidade entre raças: $\chi^2 = 0,16$, NS

Os parâmetros de diversidade genética estão apresentados na Tabela 5. Os valores da heterozigosidade esperada são muito similares aos observados, indicando não haver desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Apesar de serem sistemas di-alélicos, os valores do conteúdo de informação polimórfica, estão no intervalo considerado por Botstein *et al.* (1980) como razoavelmente

informativos para análise de ligação. Segundo esses autores sistemas altamente informativos apresentariam PIC superior a 0,5, os razoavelmente informativos teriam valores de PIC entre 0,5 e 0,25, enquanto os que apresentem valores inferiores a 25% seriam fracamente informativos.

Tabela 5. Parâmetros de diversidade observados em dois polimorfismos do gene PrP, em duas raças bovinas

		Aberdeen	Charolês
23 pb	h:	0,40	0,44
	PIC:	0,32	0,34
12 pb	h:	0,50	0,49
	PIC:	0,37	0,37
Conjunto	H:	0,45	0,46

Como os dois polimorfismos estão muito próximos (um na região promotora e outro no íntron 1) e como, de acordo com Sander *et al.* (2005), os homozigotos para ambas as deleções apresentam maiores níveis de expressão do gene PrP, realizou-se a análise dos haplótipos, cujos resultados estão apresentados na Tabela 6, onde também constam as frequências genotípicas esperadas com base nas frequências alélicas dos locos independentes. Pode-se verificar que há um grande desvio, os genótipos 23 del/12 del, 23 het/12 het e 23 ins/12 ins sendo bem mais frequentes que o esperado, indicando que os locos não se encontram em equilíbrio de ligação.

As frequências haplotípicas calculadas com base nestes dados estão apresentadas na Tabela 7, onde se pode verificar que o haplótipo 23D-12D apresenta frequência bastante alta nas duas populações.

O desvio do equilíbrio foi estatisticamente significativo nas duas populações (Tabela 7), indicando que os locos estão em forte desequilíbrio de ligação, de forma similar ao que havia sido observado por Sander *et al.* (2005).

Tabela 6. Frequências genotípicas observadas e esperadas, nas duas populações, considerando-se os dois locos, simultaneamente

Fenótipo	Genótipo	Aberdeen			Charolês		
		N	%	E	N	%	E
23 del 12del	DD/DD	30	30,3	17	28	34,1	13
23 del 12 het	DD/DI	13	13,1	26	9	11,0	19
23 del 12 ins	DI/DI	6	6,1	10	1	1,2	7
23 het 12 del	DD/ID	4	4,0	12	1	1,2	12
23 het 12het	DD/II*	29	29,3	19	28	34,1	17
23 het 12 ins	DI/II	13	13,1	8	7	8,5	6
23 ins 12 del	ID/ID	0	0	2	0	0	3
23 ins 12 het	ID/II	1	1,0	4	0	0	4
23 ins 12 ins	II/II	3	3,0	1	8	9,8	1

N: frequência absoluta observada; E: frequência absoluta esperada; χ^2 : Aberdeen = 40,01, $P < 0,001$; Charolês = 104,05, $P < 0,001$; 23 del, 12 del : homozigotos para a deleção; 23het, 12 het: heterozigotos para a deleção; 23 ins, 12 ins: homozigotos para a inserção; D:deleção; I: inserção;* genótipo mais provável.

Tabela 7. Frequências haplotípicas e valores do desvio do equilíbrio de ligação, nas duas populações

Haplótipo	Frequências	
	Aberdeen	Charolês
DD	0,54	0,57
DI	0,19	0,11
ID	0,02	0,01
II	0,25	0,31
D	0,13*	0,18**

D: deleção; I; inserção; todos os haplótipos representam o indel 23, seguido pelo indel 12; * χ^2 (Aberdeen) = 68,3, $P < 0,001$; ** χ^2 (Charolês) = 100,3, $P < 0,001$.

A proteína prion tem papel central nas encefalopatias espongiformes transmissíveis em várias espécies de mamíferos. Em alguns organismos há associações comprovadas entre mutações no gene codificador desta proteína e a maior predisposição à EET. Assim, por exemplo, em ovinos as substituições de aminoácidos Ala136Val, Arg154His e

Gln171Arg/His/Lis estão relacionadas à doença, os genótipos AlaArgGln ou AlaArgHis sendo susceptíveis e o ValArgGln sendo hiper-susceptível à encefalopatia. Similarmente, em humanos, as substituições Met129Val e Asp178Asn estão relacionadas ao desenvolvimento de EET. No entanto, nenhuma associação consistente entre polimorfismos e susceptibilidade à EEB tem sido relatada. Na Tabela 8, pode-se verificar que a maioria das mutações descritas não apresenta associação com a doença, com a repetição de oito nucleotídeos apresentando resultados contraditórios. Os dois polimorfismos de inserção/deleção descritos por Sander *et al.* (2004), investigados em raças alemãs, são os que apresentam resultados mais promissores, principalmente, considerando que as análises funcionais dos mesmos revelaram que essas regiões estão envolvidas no reconhecimento de fatores de transcrição e que os animais homozigotos para as duas deleções apresentam maiores níveis de expressão do gene PrP, particularmente nos linfonodos intestinais cuja expressão parece estar envolvida com a transformação entre a prion normal e a infectante, o que é compatível com a maior susceptibilidade dos animais com deleção e a BSE (Sander *et al.* (2005)

Tabela 8. polimorfismos estudados pela associação com EET

Autor/raça	Gene/Polimorfismo	Sensibilidade à EEB
Vrtková <i>et al.</i> 2001 Raças: Holstein, Charolês, Pinzgau, Czech red, Polish red, Czech pied	PrP / octarepetições (5,6 e 7)	5 <
Walawski <i>et al.</i> 2003 Raça: Holstein Friesian	PrP / octarepetições (5 e 6)	-----
Sander <i>et al.</i> 2004 Raças alemãs (sem especificação)	PrP / Indel 23 pb PrP / Indel 12 pb	del 23 pb > del 12 pb >
	PrP / Indel 14 pb	-----
	PrP / octarepetições (5 e 6)	-----
Balbus <i>et al.</i> 2005	PRND / R50H	-----
Raças: Holstein, Friesian,	PRND / R132Q	-----
Holstein Red, Simmental,	PRND / C4820T	-----
Swiss Brown	PRND / A5063T	-----
Jeong <i>et al.</i> 2005	PrP / códon 78 (G-A)	-----
Raças: Hanwoo, Holstein	PrP / códon 192 (C-T)	-----
	PrP / del de uma octarepetição	-----

O presente trabalho verificou, nas duas raças, alta frequência dos alelos e dos haplótipos de deleção, associados à susceptibilidade à doença, em bovinos de raças Alemãs, o que sugere a importância da seleção visando o aumento de animais portadores de genótipos resistentes para diminuir, assim, as chances de desenvolvimento desta doença, em nossas populações.

A EEB nunca foi registrada em território nacional, no entanto, em ovinos, a “scrapie” foi registrada em 1985 em animais importados do Reino Unido e, recentemente, foi observada, no estado do Paraná, em animais nascidos no Brasil, de terceira geração (Ministério da Agricultura, comunicação pessoal). Saliente-se que a doença pode ser transmitida horizontalmente, entre animais de espécies distintas.

A manutenção da condição de país livre de EEB é fundamental, seja pelo aspecto sanitário (saúde humana e animal) ou pela visão do comércio internacional (Pereira, 1996).

A falta de um plano de controle sanitário torna o país mais susceptível a este tipo de doença. Entidades como a União Européia (EU) classificam os países conforme o risco da doença. A imprensa comum divulgou que a falta de fornecimento de informações fez com que o Brasil tivesse elevado de 1 para 2 a classificação de risco de EEB.

Desta forma, considerando a importância potencial desses polimorfismos na susceptibilidade à EEB e na alta frequência das deleções em nossas populações é importante a seleção de animais com genótipos resistentes, o que possibilitaria a redução do risco da encefalopatia e de sua disseminação, obtendo-se rebanhos com melhor sanidade e qualidade em nível sanitário e financeiro. A obtenção de rebanhos resistentes pode ser feita através da seleção de touros com genótipo para resistência (homozigotos para as duas inserções) que transmitirão esta característica para os descendentes, mesmo que gerando animais heterozigotos. As gerações seguintes podem continuar sendo melhoradas, por cruzamentos dirigidos, até a obtenção de rebanhos homozigotos para esta característica, tomando-se, no entanto o cuidado de evitar os cruzamentos endogâmicos, e, conseqüentemente, o aumento da homozigose no restante do genoma.

Destaque-se que ser portador para um alelo que predisponha à doença não significa necessariamente desenvolver a patologia, o que dependerá da presença, no rebanho, de um animal afetado, ou da proteína, no pasto, já que a prion proveniente de ovinos (“scrapie”) parece persistir por vários anos no ambiente, podendo infectar outros animais (Doyle,

2002). No entanto, selecionar animais com genótipos mais resistentes reduziria a incidência da doença, naquela população.

Convém salientar que essas duas raças são largamente criadas no Rio Grande do Sul, o que enfatiza ainda mais a importância da seleção.

Referências Bibliográficas

- BALBUS, N.; HUMENY, A.; KASHKEVICH, K.; HENZ, I.; FISCHER, C.; BECKER, C.; SCHIEBEL, K. DNA polymorphisms of the prion doppel gene region in four different German cattle breeds and cows tested positive for bovine spongiform encephalopathy. **Mammalian Genome**, v.16, p. 884-892, 2005.
- BODEMER, W.; KAUP, F. J. Zur aktuelln Verbreitung und Epidemiologie von BSE und Prionerkrankungen. **Gesundheitswesen**, v. 66, Suppl. 1, p. 21-25, 2004.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CASTIGLIONI, B.; COMINCINI, S.; DRISALDI, B.; MOTTA, T.; SCHLAPFER, J.; DOLF, G.; HILLS, D.; WILLIAMS, J. L.; FERRETI, L. The prion gene (PRNP) in cattle: Genomic structure and comparative mapping in cattle, sheep and man. **Animal Genetics**, v. 29, p. 33-34, 1998.
- COSTA, L.M.C.; BORGES, J.R.J. Encefalopatia espongiforme bovina-"Doença da Vaca Louca". In: MAPA (Ed.) **Encefalopatia espongiforme transmissível**. Caderno Técnico. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2004, p.62-80.
- DESILVA, U.; GUO, X.; KUPFER, D.M.; FERNANDO, S.C.; PILLAI, A.T.V.; NAJAR, F. Z.; SO, S.; FITCH, G. Q.; ROE, B. A. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. **Cytogenetic and Genome Research**, 2003.
- DOH-URA, K.; KITAMOTO, T. Prion diseases and a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 36, p. 1370-1372, 1996.
- DORMONT, D. Prions, BSE and food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 181-189, 2002a.
- DORMONT, D. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 529, p.17-21, 2002b.
- DOYLE, E. Bovine Spongiform Encephalopathy. **Food Research Institute**, 2002.
- HARRIS, D. A. Cellular Biology of Prion Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 429-444, 1999.
- HILL, A. F. Identification of a new prion strain in cattle – is there more than one form of BSE? **Australian Veterinary Journal**, v.82, p. 288-291, 2004.

- HUNTER, N. Molecular Biology and Genetics of Bovine Spongiform Encephalopathy. In: FRIES, R. & RUVINSKY, A. **The Genetics of Cattle**, New York: CABI Publishing, 1999.
- INOUE, S.; TANAKA, M.; HOURIUCHI, M.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M. Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. **Journal of Veterinary Medicine Science**, V. 53, p. 175-183, 1997.
- JEONG, B.; SOHN, H.; LEE, J.; KIM, N.; KIM, J.; LEE, S.; CHO, I.; JOO, Y.; CARP, R.; KIM, Y. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) and Holstein cattle. **Genes Genetics System**, v. 80, p. 303-308, 2005.
- LEWONTIN, R. C. On Measures of Gametic Disequilibrium. **Genetics**, v.120, p. 849-852, 1988.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for Extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.
- NEI, M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NICHOLAS, F. W. Doenças prion. In: **Introdução à Genética Veterinária**. Porto Alegre: ArtMed, p. 197-198, 1999.
- OTTO, P. G. Doenças causadas por “prion”. In: **Genética Básica para Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca Ltda, p. 270-271, 2000.
- PEREIRA, E. A. Encefalopatia espongiforme bovina (BSE/EEB). Resumos do **XV PANVET - Congresso Pan Americano de Ciências Veterinárias**, p. 16, 1996.
- PREUSS, S.; PEISCHL, T.; MELCHINGER, E.; GELDERMANN, H. Numerous Polymorphic microsatellites in human prion gene complex (including *PRNP*, *PRND* and *PRNT*). **Gene**, p.197-203, 2003.
- PREMZL, M.; BOZIC, P.; GAMULIN, V. PRNP octarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. **Animal Genetics**, v. 31, p. 408-419.
- SANDER, P.; HAMANN, H.; PFEIFFER, I.; WEMHEUER, W.; BREINIG, B.; GROSCHUP, M. H.; ZIEGLER, U.; DISTL, O.; LEEB, T. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. **Neurogenetics**, v. 5, p. 19-25, 2004.
- SANDER, P.; HAMANN, H.; DRÖGEMÜLLER, C.; KASHKEVICH, K.; SCHIEBEL, K.; LEEB, T. Bovine Prion Protein Gene (PRNP) Promoter Polymorphisms Differences

- in Bovine Spongiform Encephalopathy Susceptibility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 37408-37414, 2005.
- VAIMAN, D. The Molecular Genetics of Cattle. In: FRIES, R. & RUVINSKY, A. **The Genetics of Cattle**, New York: CABI Publishing, 1999.
- VRTKOVÁ, L.; KÚBEK, A.; FILISTOWICZ, A.; REHOUT, V.; DVORAK, A. The Polymorphism of PRNP gene in cattle. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**, v.4, p. 160-163, 2001.
- WALAWSKI, K.; CZARNIK, U. Prion octapeptide-repeat polymorphism in Polish Black-and-White cattle. **Journal Applied Genetics** v. 44, p. 191-195, 2003.
- WECHSELBERGER, C.; WURM, S.; PFARR, W.; HÖGLINGER, O. The Physiological Functions of Prion Protein. **Experimental Cell Research**, v. 281, p. 1-8, 2002.
- WEISSMANN, C. The State of the Prion. **Nature Reviews**, v. 2, p. 861-871, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)