

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**

**Curso de Medicina Veterinária e Bem Estar Animal**

**Yasmin El Hayek**

**GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA  
PRIÔNICA POR PCR EM TEMPO REAL EM OVINOS CRIADOS  
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**SÃO PAULO  
2015**

**YASMIN EL HAYEK**

**GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA  
PRIÔNICA POR PCR EM TEMPO REAL EM OVINOS NO  
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação Stricto  
Sensu em Medicina Veterinária e  
Bem Estar Animal da Faculdade de  
Medicina Veterinária da Universidade  
de Santo Amaro como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Caio Rodrigues  
dos Santos

**SÃO PAULO  
2015**

Hayek, Yasmin El

Genotipagem de Polimorfismos da Proteína Priônica por PCR em Tempo Real em Ovinos Criados no Estado de São Paulo / Yasmin El Hayek, Caio Rodrigues dos Santos. -- São Paulo , 2015  
53 f.

Dissertação (Curso de Medicina Veterinária e Bem Estar Animal) - Universidade de Santo Amaro, 2016

Orientador(a): Prof. Dr. Caio Rodrigues dos Santos

1.Ovinos. 2.PCR em Tempo Real. 3.Scrapie. 4.gene PRNP.  
5.Encefalopatia Espongiforme Transmissível. I.Santos, Caio Rodrigues dos II.Prof. Dr. Caio Rodrigues dos Santos, orient. III.Universidade de Santo Amaro IV.Título

**Ficha catalográfica gerada automaticamente pelo  
Sistema de Bibliotecas da Universidade de Santo Amaro - UNISA**

**YASMIN EL HAYEK**

**GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA  
PRIÔNICA POR PCR EM TEMPO REAL EM OVINOS CRIADOS  
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação  
Stricto Sensu em Medicina  
Veterinária e Bem Estar Animal da  
Faculdade de Medicina  
Veterinária da Universidade de  
Santo Amaro como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Caio  
Rodrigues dos Santos

São Paulo, 14 de Dezembro de 2015

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Ao meu pai Ibrahim, minha mãe Cida, Irmãs Shadya e Dunya, pelo carinho, apoio e amor. Ao meu esposo Guilherme pela paciência, cobrança e amor.

Aos meus filhotes Shrek, Buzi e Lolla pela companhia nas muitas horas dedicadas ao trabalho. A Nadya que ainda não chegou, mas me acompanhou e deixou ainda mais feliz nesses últimos meses...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Caio Rodrigues dos Santos pelo apoio e orientação ao longo de todo o processo. Também ao Prof. Dr. Kleber da Cunha Peixoto Junior pela oportunidade e apoio. Ao veterinário Marcelo Piagentini pela ajuda fundamental na coleta das amostras. Aos professores do programa de Mestrado da Universidade de Santo Amaro que em muito acrescentaram nos conhecimentos durante as aulas.

Ao meu esposo Guilherme Martins pelo apoio técnico e sabedoria que muito ajudaram no processo de maturidade ao longo do trabalho.

Aos meus amigos de trabalho, Carol por me apoiar, incentivar, ajudar nas substituições de aula e risadas diárias, Rafa, Dani e Raquel pela preocupação e carinho ao longo do processo.

**“Tudo vale a pena se a alma não é pequena”...  
(Fernando Pessoa)**

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação de risco ao Scrapie (R1 A R5).....	22
Quadro 2: Relação dos alvos e respectivos <i>primers</i> ( <i>Primer</i> direto e <i>primer</i> reverso).....	27
Quadro 3: Relação entre os SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) utilizados e as sondas utilizadas.....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Categorização dos genótipos quanto ao grau de susceptibilidade.....	30
---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentual de categorização encontrado nas amostras.....30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de amplificação do códon 136.....	31
Figura 2: Curva de amplificação do códon 154.....	31
Figura 3: Curva de amplificação do códon 171.....	32
Figura 4: reação homozigótica do códon 136 para o aminoácido Alanina (AA).....	32
Figura 5: reação homozigótica do códon 136 para o aminoácido Arginina (RR).....	33
Figura 6: reação heterozigótica do códon 171 para Glutamina e Arginina (QR).....	33

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
1.1.1 Gerais .....	16
1.1.2 Específicos.....	16
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs)</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Características do PrPc .....	18
2.1.2 Características do PRPsc.....	19
2.1.3 Classificação das Doenças Priônicas.....	20
2.1.4 Patogenia e Sinais Clínicos .....	20
<b>2.2 Scrapie</b> .....	<b>21</b>
2.2.2 Formas Clássica e Atípica .....	24
2.2.3 Tratamento e Programas de Seleção.....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Amostras</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Extração do Material Genético</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Quantificação</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Integridade dos DNAs</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5 Primers e Sondas</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7 Análise dos Dados</b> .....	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1 Genotipagem</b> .....	<b>36</b>
5.1.1 Estudos Brasileiros.....	36
5.1.2 Estudos Internacionais .....	39
<b>5.2 Comparação entre as Técnicas de PCR</b> .....	<b>41</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>49</b>
<b>Anexo A: Relação de animais participantes do projeto</b> .....	<b>49</b>
<b>Anexo B: Resultados das quantificações realizadas nas amostras, verificação do grau de pureza das amostras.</b> .....	<b>52</b>

## RESUMO

O Scrapie é uma doença neurodegenerativa progressiva de ovinos e caprinos adultos, foi descoberta há mais de 200 anos e faz parte das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis. É caracterizado por um acúmulo anormal da proteína priônica (PrP), derivada de um hospedeiro, não possui tratamento, levando a morte. Os polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 possuem associação com a suscetibilidade ou resistência ao Scrapie clássico. A combinação dos polimorfismos nesses códons sugerem que VRQ e ARR são antagonistas na determinação da suscetibilidade a doença. O haplótipo 136A/154R/171R (ARR) confere resistência, sendo os indivíduos homocigotos os mais resistentes, já o haplótipo VRQ confere suscetibilidade. Esse trabalho teve como objetivo categorizar e padronizar os genótipos obtidos em animais resistentes suscetíveis, utilizando o método Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR). Observou-se após a análise dos resultados que das 125 amostras coletadas, apenas 94 apresentaram resultados após a reação. Foram encontrados 4 alelos (ARQ, ARR, AHQ e VRQ) e 6 genótipos, sendo ARR/ARR, ARR/ARQ, ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ e ARQ/VRQ. Utilizando a classificação de risco de Dawson (1998), 6 animais se enquadram na categorização R1 (extremamente resistente), 15 animais são R2 (resistentes), a maioria dos animais se enquadram em R3 (65) apresentando leve resistência, nenhum (0) em R4 (suscetível) e 8 animais sendo R5 (altamente suscetível). O método de genotipagem q-PCR é eficiente para o gene PRNP, sendo uma técnica rápida, com custo relativamente baixo para um número alto de amostras, e com muita especificidade na reação, mostrando assim, que no rebanho testado, a grande maioria dos animais apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, e poucos são resistentes.

Palavras chave: Ovinos, Scrapie, Encefalopatia Espongiforme Transmissível, PCR em Tempo Real

## ABSTRACT

The Scrapie is a progressive neurodegenerative disease of sheep and goats adults. It was discovered over 200 years and it is part of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Scrapie is characterized by abnormal accumulation of prion protein (PrP) derived from a host. Since it has no treatment, lead the animal to death. Polymorphisms at codons 136, 154 and 171 have association with susceptibility or resistance to classical Scrapie. The combination of polymorphisms in these codons suggests that VRQ and ARR are antagonists in determining susceptibility to disease, the haplotype 136A / 154R / 171R (ARR) conferring resistance, and the homozygous the toughest since the VRQ haplotype confers susceptibility. This study aimed to categorize and standardize the genotypes obtained in susceptible resistant animals using the method Reaction Polymerase Chain Realtime (q-PCR). It was observed, after analyzing the results of the 125 samples collected, that only 94 had results after the reaction. It was found 4 alleles (ARQ, ARR, AHQ and VRQ) and 6 genotypes, being ARR / ARR ARR / ARQ, ARQ / ARQ, ARQ / AHQ, AHQ / AHQ and ARQ / VRQ. Using Dawson risk classification (1998), 6 animals fall in the categorization R 1 (extremely tough), 15 animals are R2 (resistance), the majority of animals fall into R3 (65) exhibiting light resistance, no (0) in R4 (susceptible) and 8 animals being R5 (highly susceptible). The genotyping method qPCR is effective for the PRNP gene, and a rapid technique with relatively low cost for a high number of samples and with great specificity in the reaction, thus showing that the flock tested, the vast majority of animals exhibit greater susceptibility to disease development, and few are resistant.

Key words: Sheep Scrapie, Transmissible Spongiform Encephalopathy, Real-Time PCR

## 1. INTRODUÇÃO

O Scrapie é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal que acomete ovinos e caprinos, pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs). Há relatos na literatura desde o século XVIII, sendo a mais antiga das EETs. É originada a partir de um agente infeccioso denominado príon (proteinaceous infectious particle), que possui a proteína priônica ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) na sua isoforma anormal ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) e se acumulam no sistema nervoso central do hospedeiro causando uma lesão degenerativa que evolui até a morte.

A doença é influenciada por polimorfismos no gene da proteína priônica, e animais podem ser categorizados em susceptíveis (s) ou resistentes (r), de acordo com as sequências observadas no gene que codifica esta proteína em ovinos. O estudo de Polimorfismos do gene da proteína priônica em ovinos é um exemplo de avanço na compressão molecular do desenvolvimento de Scrapie, tendo sido realizado em diversos países, com intuito de seleção e melhoramento genético para resistência a doença.

Estudos sobre o perfil de susceptibilidade da doença se fazem necessários, pois que podem auxiliar o desenvolvimento de seleção e melhoramento animal, com vistas à resistência ao desenvolvimento da doença. Lembrando que o Brasil obteve um efetivo de 16,789 milhões de cabeças de ovinos no ano de 2012, segundo dados do IBGE<sup>1</sup> o que indica forte mercado de produção de carne e lã e aumento do interesse nos cuidados com o desenvolvimento de doenças que podem levar a uma queda da produção.

Técnicas como a reação em cadeia da polimerase convencional e sequenciamento genômico já foram descritas como ferramentas de genotipagem destes polimorfismos. A genotipagem utilizando o PCR em Tempo Real tem sido utilizada com sucesso para determinar genótipos PrP em ovelhas e apresenta mais um avanço na Biologia Molecular.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Gerais**

- Desenvolvimento de métodos para avaliação do gene da proteína priônica em ovinos.
- Categorização e padronização dos genótipos obtidos em animais resistentes e animais susceptíveis.

### **1.1.2 Específicos**

- Estabelecimento do método Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR).
- Identificação de genótipos de resistência (R) e susceptibilidade (S) ao desenvolvimento do Scrapie.
- Comparar a técnica de q-PCR com outras já descritas e publicadas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs)

Doenças priônicas são desordens fatais que afetam o Sistema Nervoso em diversas espécies, conhecidas como Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, caracterizadas por perda progressiva de neurônios, falta de inflamação clássica, aparição de vacuolização no tecido nervoso, deposição de conformações anormais de proteína priônica e que pode ser transmitida de varias formas <sup>2</sup>. Pode apresentar um período de incubação de muitos meses a anos após a exposição <sup>3</sup>.

Durante muitos anos as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) permaneceram entre as doenças mais intrigantes e enigmáticas<sup>4</sup>. Elas compõem uma classe de doenças neurodegenerativas fatais de mamíferos que englobam a Doença de Kuru, Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheiker e Insônia Familiar Fatal em humanos, Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) em bovinos, Scrapie em ovinos e caprinos, e a Doença Emaciante Crônica (CWD) em cervídeos <sup>2,4,5</sup>.

As formas de transmissão, longo tempo de incubação, e existência de fenótipos distintos de EETs fizeram muitos acreditarem em se tratar de um tipo de vírus lento”, mais tarde foi proposto que sua natureza era protéica, por sua incomum resistência a radiação e nucleases. O termo Prion (Proteinaceous Infectious Particle) foi dado por Stanley Prusiner para descrever um patógeno único <sup>6</sup>.

Essa característica particular dos príons de resistência a inativação por processos físicos ou químicos faz com que resistam ao congelamento, dessecação, ultravioletas (UV), enterro, degradação por enzimas proteolíticas e aos métodos usuais para a desinfecção química e de calor<sup>7</sup>. O Scrapie, a Doença de Kuru e a CJD causam a morte sem nenhum sinal de resposta imunológica <sup>5</sup>.

Em humanos já foram descritas variadas formas de transmissão, em rituais de canibalismo (doença de Kuru), transplantes de córnea, uso de hormônios do crescimento (GH) e gonadotrofinas derivadas de cadáveres, e procedimentos de neurocirurgia geraram casos de CJD. Há relatos de mais de noventa jovens contaminados por CJD após o uso de hormônios cadavéricos, e mais de 60 casos de CJD pós enxerto de dura mater <sup>5</sup>. Existem indícios de que uma variante da CJD (vCJD) tenha sido transmitida por príons da BSE de bovinos, através da ingestão de carne contaminada. Não há relatos de transmissão de príons de ovinos para seres humanos <sup>5,8</sup>.

A Grã Bretanha apresentou um surto de BSE em bovinos, com uma estimativa de um milhão de animais contaminados, tendo como suposta fonte de contaminação um preparado nutricional de carne e ossos feito a partir de miudezas de ovinos, bovinos, suínos e aves oferecido aos animais. A doença em bovinos tem período de incubação de 5 anos, sendo que muitos desses animais contaminados foram abatidos entre 2 e 3 anos e não apresentaram sintomas da BSE. Em 1988 a oferta dessa farinha de carne e osso para ruminantes foi proibida, reduzindo o número de casos de BSE em bovinos e Scrapie em ovinos <sup>5</sup>.

### **2.1.1 Características do PrP<sup>c</sup>**

Existem várias formas de PrP, reconhece-las é essencial para melhor entender o fenótipo, variabilidade e patogenia das doenças priônicas. A fisiológica, chamada de forma celular de PrP (PrP<sup>c</sup>) é uma glicoproteína, formada por aproximadamente 250 aminoácidos, detectada no cérebro saudável, possui uma estrutura em alfa-hélice e é solúvel em detergentes e sensível ao tratamento com proteinase K. É expressa no início da embriogênese, e no adulto está presente em maiores quantidades nos neurônio do cérebro e medula espinhal, pode ser encontrada também em menor quantidade nas células gliais do sistema nervoso central <sup>9</sup>.

É sintetizada no retículo endoplasmático e processada no Complexo de Golgi. Suas possíveis funções fisiológicas compreendem papéis na neurogênese, sinaptogênese e neuritogênese, funções citoprotetoras especialmente anti ou pró apoptóticas, manutenção dos níveis de cobre, inibição do estresse oxidativo, metabolismo e transporte de zinco e na manutenção da homeostase <sup>2,5,9</sup>.

O grau de semelhança na sequência de aminoácidos do PrP entre as espécies muitas vezes pode ter consequências para a transmissibilidade das EETs entre elas. Observações sobre a variação genética do PrP em espécies relacionadas são, portanto, importantes na tentativa de compreender a susceptibilidade e o controle dessas doenças (GOLDMANN, 2008)

### **2.1.2 Características do PRPsc**

A principal diferença entre o PrP<sup>c</sup> e forma patológica PrP<sup>sc</sup> é a mudança conformacional. Predomina a estrutura beta-folha, enquanto no PrP<sup>c</sup> é a alfa-hélice (PRUSINER, 1998). É insolúvel a detergentes e resistentes ao tratamento com proteases, é hidrofóbica e possui meia vida com eficácia de dias ou até meses (PRUSINER, 1998). A proteína priônica é codificada no genoma do próprio hospedeiro, não havendo diferenças nos genes de animais saudáveis e doentes, assim sendo, as alterações de conformação encontradas na PrP<sup>sc</sup> aconteceram após a tradução da mesma (BASLER *et al*, 1986).

Dois tipos de polimorfismos são encontrados na proteína PrP de ruminantes. O primeiro são os SNPs (Single Nu) no DNA que muitas vezes provocam alterações em um único aminoácido. Eles representam a grande maioria de todas as variantes. O segundo são precisas inserções ou deleções de repetições nas características do PrP <sup>10</sup>.

### **2.1.3 Classificação das Doenças Priônicas**

Doenças priônicas são classificadas de acordo com sua etiologia, apresentação clínico-patológica, fenótipo e conformação do gene PrP, e por eventos esporádicos não identificados que geram o PrP<sup>Sc</sup> <sup>2</sup>.

Há relatos de exposições vindas de rituais de canibalismo (doença de Kuru), iatrogênica (CJD) e através da dieta (BSE). (WILL, 2003). Casos esporádicos como a CJD esporádica (sCJD) e a esporádica insônia fatal (sFI) ainda não tiveram a forma de infecção elucidadas <sup>2</sup>.

As formas genéticas ou hereditárias estão associadas a mutações no PRNP, e podem ser observadas na CJD genética (gCJD), Embora muitos casos apresentem-se como uma doença autossômica dominante, a ausência de histórico familiar é frequentemente encontrada <sup>2</sup>.

### **2.1.4 Patogenia e Sinais Clínicos**

As alterações histológicas características no Sistema Nervoso Central podem ser observadas na vacuolização neurônios, propagação de astrócitos e degeneração neuronal. Em ovinos essas mudanças tem predileção por certos núcleos neuroanatômicos, particularmente no tronco cerebral, e no óbex, e são geralmente bilateral e simétrica. O perfil dessa lesão característica em ovinos é a base para a triagem de rotina histológica para o Scrapie. O acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> pode ser demonstrado no interior dessas lesões <sup>13</sup>.

Os agregados de PrP<sup>Sc</sup> podem bloquear o transporte axonal, interferindo com a função sináptica, ou desencadeando mecanismos normais de apoptose. A perda da atividade anti apoptótica do PrP<sup>c</sup> pode levar a morte neuronal. Existe também a possibilidade da interação da PrP<sup>Sc</sup> com a PrP<sup>c</sup> converter os sinais neuroprotetores em sinais neurotóxicos <sup>9</sup>.

Após um prolongado período de incubação, os humanos afetados por essa doença apresentam sintomas neurocomportamentais e psiquiátricos, como disfunção motora progressiva, declínio cognitivo e ataxia cerebral. O cérebro dos indivíduos afetados são altamente anormais, mostrando características de degeneração espongiiforme, astrogliose, e depósitos de proteínas <sup>4,14</sup>.

Em ovinos, os primeiros sinais da doença são a intolerância ao exercício, seguido por incoordenação motora, desenvolvendo uma marcha instável, hiperexcitabilidade e prurido intenso. Após cerca de dois meses, começam a perder condição corporal, o equilíbrio e tornarem-se rapidamente cansados, também observa-se alopecia. Depois de três ou quatro meses após os primeiros sinais, apresentam caquexia com severa perda de massa muscular, paralisia, tremores, e até estado convulsivo, e nas próximas duas a quatro semanas não resistem mais e morrem <sup>13</sup>.

## **2.2 Scrapie**

O Scrapie é uma doença neurodegenerativa progressiva de ovinos e caprinos adultos, foi descoberta há mais de 200 anos e faz parte das EETs <sup>5</sup>. Também é conhecido por Tremor Epizoótico Ovino ou Paraplexia Epizoótica Ovina. Está incluso na lista de doenças de caprinos e ovinos notificáveis pela OIE ( World Organization for Animal Health), sendo obrigatória a notificação em 24 horas após a confirmação <sup>5, 13</sup>.

É caracterizado por um acúmulo anormal da proteína priônica (PrP), derivada de um hospedeiro. Em ovelhas mais de 40 polimorfismos de PrP já foram descritos <sup>15</sup>.

A incidência de Scrapie em caprinos é muito mais baixa do que em ovinos. O primeiro relato de Scrapie em caprinos ocorreu na França, com um animal sintomático em um rebanho ovino com vários casos da doença, desde

então, vários casos foram registrados na Europa e outras regiões do mundo. Entre os anos de 2002 e 2009 países da União Européia reportaram 3.292 casos de Scrapie em caprinos e 15.034 casos em ovinos, a maioria dos casos em caprinos ocorreu no Chipre onde o Scrapie clássico é endêmico <sup>8</sup>.

Os polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 possuem associação com a suscetibilidade ou resistência ao Scrapie clássico <sup>16,15</sup>. O códon 136 possui dois aminoácidos possíveis Alanina (A) e Valina (V), o códon 154 também possui dois, Arginina (R) e Histidina (H) e o códon 171 possui três possibilidades de aminoácidos, Glutamina (Q), Arginina (R) e Histidina (H). Esses polimorfismos se combinam e formam cinco alelos (ARQ, VRQ, AHQ, ARR e ARH), e esses podem se dispor em quinze diferentes genótipos, como por exemplo, ARR/ARR, VRQ/ARQ ou ARH/AHQ <sup>10</sup>.

Os alelos do gene PRNP codificadores para ARR são formados pelos aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Arginina no códon 171. Os alelos do gene PRNP codificadores para AHQ são formados pelos aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Histidina (H) no códon 154 e Glutamina (Q) no códon 171. Os alelos do gene PRNP codificadores para ARQ possui os aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Glutamina no códon 171. Os alelos do gene PRNP codificadores para os aminoácidos Valina (V) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Glutamina (Q) no códon 171 é denominado VRQ. Os alelos do gene PRNP codificadores para ARH possui os aminoácidos Alanina (A) no códon 136, Arginina (R) no códon 154 e Histidina (H) no códon 171 <sup>17,18</sup>.

A combinação dos polimorfismos nesses códons sugerem que VRQ e ARR são antagonistas na determinação da suscetibilidade a doença, O haplótipo 136A/154R/171R (ARR) confere resistência, sendo os indivíduos homocigotos os mais resistentes. Os alelos ARQ, AHQ, ARH e VRQ estão associado a um aumento da suscetibilidade em desenvolver o scrapie <sup>19,16, 20</sup>.

Dawson et al <sup>20</sup>, elaboraram uma classificação de risco de acordo com a suscetibilidade ao scrapie, utilizando 5 grupos (R1 a R5), que podem ser observados no quadro 1. Mas lembram que para o desenvolvimento da doença, deve-se ter o contato com o agente infeccioso.

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

**Quadro 1 – Classificação de risco ao Scrapie (R1 A R5)**

Fonte: adaptado de DAWSON *et al* (1998)

O NSP (Plano Nacional de Scrapie) da Grã Bretanha utiliza classificação semelhante ao Dawson et al (1998), adicionando restrições a criação e reprodução de animais de acordo com sua classificação. Sendo os animais classificados no grupo R1 liberados para a reprodução, os animais R2 devem ser utilizados com cuidado em programas de melhoramento genético, em R3 devem ser utilizados com cuidado na reprodução, R4 não devem ser utilizados na reprodução, a menos que em um contexto de programa de melhoramento genético aprovado e controlado, e por fim, os animais em R5 não devem ser usados para reprodução, e se possível, serem abatidos ou castrados <sup>21, 22</sup>.

### **2.2.1 Distribuição**

O Scrapie está presente em vários países da União Européia, especialmente no Reino Unido, também já foi relatado no Canadá, Estados Unidos, Islândia, Índia, Japão e Brasil. Israel também relatou surtos de scrapie, com o mais recente em 2007. Também há relatos de casos em que a doença foi confinada a ovinos importados e foi erradicada através da

destruição do grupo afetado em uma série de países, incluindo a Austrália (1952), Nova Zelândia (1954) e a República da África do Sul (1972) <sup>13</sup>.

No Brasil o primeiro caso de Scrapie foi relatado no Rio Grande do Sul, em 1978, em um ovino importado. A primeira notificação oficial à Organização Mundial de Saúde (OIE) foi em 1985 de um surto também no Rio Grande do Sul, foram relatados casos em 2000, 2001, 2003, 2005 e 2006. Os últimos casos relatados foram entre os anos de 2005 e 2010, todos em animais importados, nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná e Minas Gerais <sup>23,17,24,25</sup>.

### **2.2.2 Formas Clássica e Atípica**

De acordo com a apresentação clínica, o scrapie pode ser classificado na forma clássica ou atípica. No scrapie clássico pode ser observado mudança de comportamento, ataxia, incoordenação e prurido, afetando ovelhas jovens (2 a 4 anos de idade). Já a forma atípica tende a ocorrer em alguns casos sem prurido e afetando ovelhas mais velhas <sup>16</sup>.

O termo “atípico” foi dado a uma variação do Scrapie clássico, após a confirmação de da morte de uma ovelha na Noruega em 1998, sendo denominado também como “Nor98”. No Scrapie Atípico os códons 141 e 154 são de grande importância para a suscetibilidade à doença <sup>8</sup>. A maioria dos casos são encontrados em animais classificados como R1-R3, sendo os grupos que apresentam baixa suscetibilidade ao desenvolvimento do Scrapie clássico <sup>10</sup>.

### **2.2.3 Tratamento e Programas de Seleção**

Não há tratamento para o scrapie, é uma doença sempre fatal <sup>16</sup>. A genotipagem em ovelhas para determinar a suscetibilidade ao Scrapie é uma técnica utilizada em práticas de reprodução seletiva <sup>26</sup>.

Alguns programas de seleção de ovinos com genótipos resistentes ao Scrapie foram utilizados durante vários anos na tentativa de erradicar a doença, no Canadá a seleção de raças e genótipos tem demonstrado bons resultados no controle do scrapie. O programa de genotipagem na Grã-Bretanha (Plano Nacional de Scrapie – NSP), com uma seleção negativa para o genótipo VRQ e positiva para ARR, demonstrou um aumento significativo no haplótipo ARR e no grupo R1, com redução dos outros haplótipos e ovelhas suscetíveis (R3 a R5) <sup>21,16,22</sup>. No Brasil não há programa de seleção relacionado a doença<sup>19</sup>.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras**

Foram coletadas 125 amostras de sangue de diferentes animais, colhidas pela veia jugular. Este procedimento foi realizado com tubos Vacutanier contendo EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*). As amostras de sangue foram aliqüotadas em três partes iguais de 1,5 ml cada, após identificadas foram conservadas a -20°C até a extração do DNA. Das 125 amostras coletadas, 94 apresentaram resultados após a reação. Os animais doadores das amostras pertencem a propriedades localizadas na cidade de Avaré (SP).

Todos os animais doadores são da espécie Ovina (*Ovis aries*), das raças Santa Inês, Dorper, Texel, Suffolk, Ile de France e Hampshire, todos com mais de 8 meses de vida, sendo o animal mais velho com 5 anos e meio. O sistema de criação utilizado na propriedades é semi-intensivo. Ambos os sexos foram utilizados, porém o número de fêmeas é maior que o número de machos. A relação dos animais doadores pode ser observada no Anexo A.

#### **3.2 Extração do Material Genético**

As extrações de DNA foram realizadas a partir de sangue total. Para o procedimento de extração foi adotado como método de extração o kit comercial illustra™ blood genomic GE Healthcare®.

Foi adicionado 20 microlitros de proteinase K no tubo Ependorf com 200mL de sangue total e 400 microlitros de Lysis buffer (tampão), e misturado no vórtex durante 15 segundos. Aguardou-se 10 minutos com algumas agitações no vórtex para auxiliar na quebra. O conteúdo foi transferido para um tubo com mini-coluna com o auxílio de uma pipeta, em

seguida foi para a microcentrífuga durante 1 minuto e descartado o líquido residual. Na etapa de lavagem, foi adicionado o tampão lise e centrifugado por um minuto, em seguida o tampão de lavagem e centrifugado por mais três minutos, sendo descartado o líquido residual e o tubo. A coluna foi transferida para um novo tubo Ependorf e foi adicionado 200 microlitros de *buffer* aquecido a 70 °C, incubado durante um minuto e centrifugado por um minuto.

Após a extração, o DNA obtido foi alíquotado em três partes iguais e armazenados em freezer -80°C.

### **3.3 Quantificação**

As quantificações foram aferidas em aparelho de espectrofotômetro, foi avaliado a concentração (nanogramas por microlitro), conforme observado na Anexo B em relação aos resultados obtidos na quantificação.

### **3.4 Integridade dos DNAs**

A integridade dos DNAs obtidos foram analisadas através do método de eletroforese em gel de agarose, os géis foram revelados por Brometo de Etideo e analisados através de luz ultravioleta (UV).

### **3.5 Primers e Sondas**

Foram utilizados 3 pares de *primers* relacionados aos 3 códon de interesse (136, 154 e 171) os mesmos foram obtidos através do ensaio proposto por Andrade *et al*<sup>19</sup> e adaptado pelo software *Primer Express* (Applied Biosystems®). Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen®, sendo utilizados os primers diretos e os primers reversos para cada códon. Como pode ser visto no Quadro 2, onde observa-se a relação com os alvos e os respectivos *primers*.

<p><b>Códon 136 - Foward</b> 5'-GGGCCTTGGTGGCTACATG-3'</p> <p><b>Códon 136 - Reverse</b> 5'-TCCTCATAGTCATTGCCAAAATGTAT-3'</p>
<p><b>Códon 154 - Foward</b> 5'-GGCCTCTTATACATTTTGGCAATG-3'</p> <p><b>Códon 154 - Reverse</b> 5'-ATCCAAGTGGTCTGTAGTACACTTGGT-3'</p>
<p><b>Códon 171 - Foward</b> 5'-GTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGA-3'</p> <p><b>Códon 171 - Reverse</b> 5'-TGTTGACACAGTCATGCACAAAG-3'</p>

**Quadro 2: Relação dos alvos e respectivos primers (Primer direto e primer reverso)**

Fonte: Andrade et al (2013)

As sondas foram desenhadas de acordo com os alelos selvagens de cada SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) estudado, no Quadro 3 estão relacionadas as sequencias das sondas. Para todas as sondas foi utilizado como *Quencher* a química MGB.

<p><b>Códon 136 – SNP A</b> 5'-6FAM-TGGGAAGTGCCATGAG-3'</p> <p><b>Códon 136 – SNP V</b> 5'-VIC-TGGGAAGTGTGATGAG-3'</p>
<p><b>Códon 154 – SNP R</b> 5'-6FAM-ACCGTTACTATCGTGAAA-3'</p> <p><b>Códon 154 – SNP H</b> 5'-VIC-ACCGTTACTATCATGAAA-3'</p>
<p><b>Códon 171 – SNP Q</b> 5'-6FAM-CAGTGGATCAGTATAGTAA-3'</p> <p><b>Códon 171 – SNP R</b> 5'-VIC-CAGTGGATCGGTATAG-3'</p> <p><b>Códon 171 – SNP H</b> 5'-NED-CAGTGGATCATTATAG-3'</p>

**Quadro 3: Relação entre os SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) utilizados e as sondas utilizadas**

Fonte: Andrade et al (2013)

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

As análises de q-PCR foram realizadas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems®), e as reações preparadas com reagentes padronizados para q-PCR (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems®). As reações foram submetidas a 1 ciclo inicial de 2 minutos a

50 °C, seguido de 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Foi utilizada água deionizada no lugar do DNA para o controle negativo. O volume final de cada reação foi de 20 µl.

Foram utilizados na reação, 10 microlitros do reagente TaqMan Universal PCR Master Mix, 5 20 µl M/120 µl. de Primer Forward, 5 20 µl.M/120 µl de Primer Reverse, 100ng de sonda, 1 ng de DNA e 9,5mL de H<sub>2</sub>O ultrapura.

### **3.7 Análise dos Dados**

Os resultados foram analisados e tabulados, utilizando a análise descritiva quantitativa no programa GrafPpad Prism (GrafPad Software Inc.). Classificando os animais quanto ao grau de resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento de Scrapie de acordo com os critérios estabelecidos pelo genótipo apresentado. A classificação foi baseada na frequência alélica dos códons 136, 154 e 171, obtidas na genotipagem do gene PRNP, usando critérios estabelecidos por Dawson et al (1998), as possíveis combinações alélicas são divididas em cinco grupos (R1 / mais resistente – R5 / mais suscetível).

#### 4. RESULTADOS

Após a análise dos dados obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, observou-se que das 125 amostras coletadas, apenas 94 apresentaram resultados após a reação.

Foram encontrados 4 alelos (ARQ, ARR, AHQ e VRQ) e 6 genótipos, sendo ARR/ARR, ARR/ARQ, ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ e ARQ/VRQ.

Dessas amostras, 48 animais (51%) apresentaram o genótipo ARQ/ARQ, 15 o genótipo ARR/ARQ (15,9%), 11 animais ARQ/AHQ (11,7%), 8 ARQ/VRQ (8,5%), 6 animais com genótipo AHQ/AHQ (6,3%) e outros 6 com ARR/ARR (6,3%).

Utilizando a classificação de risco de Dawson *et al* (1998), pode-se considerar que das amostras analisadas, 6 animais se enquadram na categorização R1 (extremamente resistente), 15 animais são R2 (resistentes), a maioria dos animais se enquadram em R3 (65) apresentando leve resistência, nenhum (0) em R4 (suscetível) e 8 animais sendo R5 (altamente suscetível), como pode ser observado na Tabela 1.

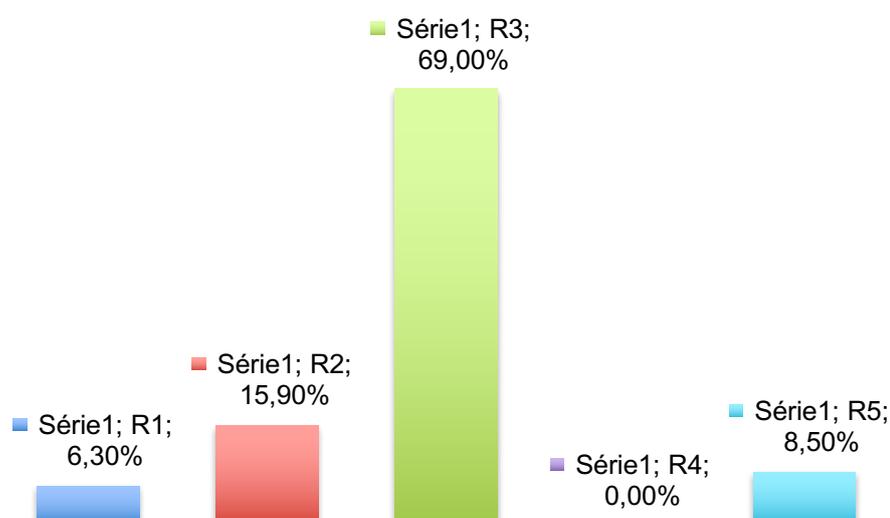
O gráfico (1) abaixo destaca o percentual das amostras categorizadas de acordo com a classificação proposta por Dawson *et al* <sup>20</sup>.

**Tabela 1: Categorização dos genótipos quanto ao grau de susceptibilidade**

Categorização	Número de animais por categoria (% da amostra)	Grau de Susceptibilidade	Genótipos	Percentual do genótipo
R1	6 (6,3%)	Extremamente Resistente	ARR/ARR	6,3%
			ARR/AHQ	0,0%
R2	15 (15,9%)	Resistente	ARR/ARH	0,0%
			ARR/ARQ	15,9%
			ARQ/ARQ	51,0%
R3	65 (69,0%)	Leve Resistência	ARQ/ARH	0,0%
			ARQ/AHQ	11,7%
			AHQ/AHQ,	6,3%
			ARH/ARH	0,0%
			AHQ/ARH	0,0%
R4	0 (0,0%)	Susceptível	ARR/VRQ	0,0%
R5	8 (8,5%)	Altamente Susceptível	VRQ/VRQ	0,0%
			ARQ/VRQ	8,5%
			ARH/VRQ	0,0%
			AHQ/VRQ	0,0%

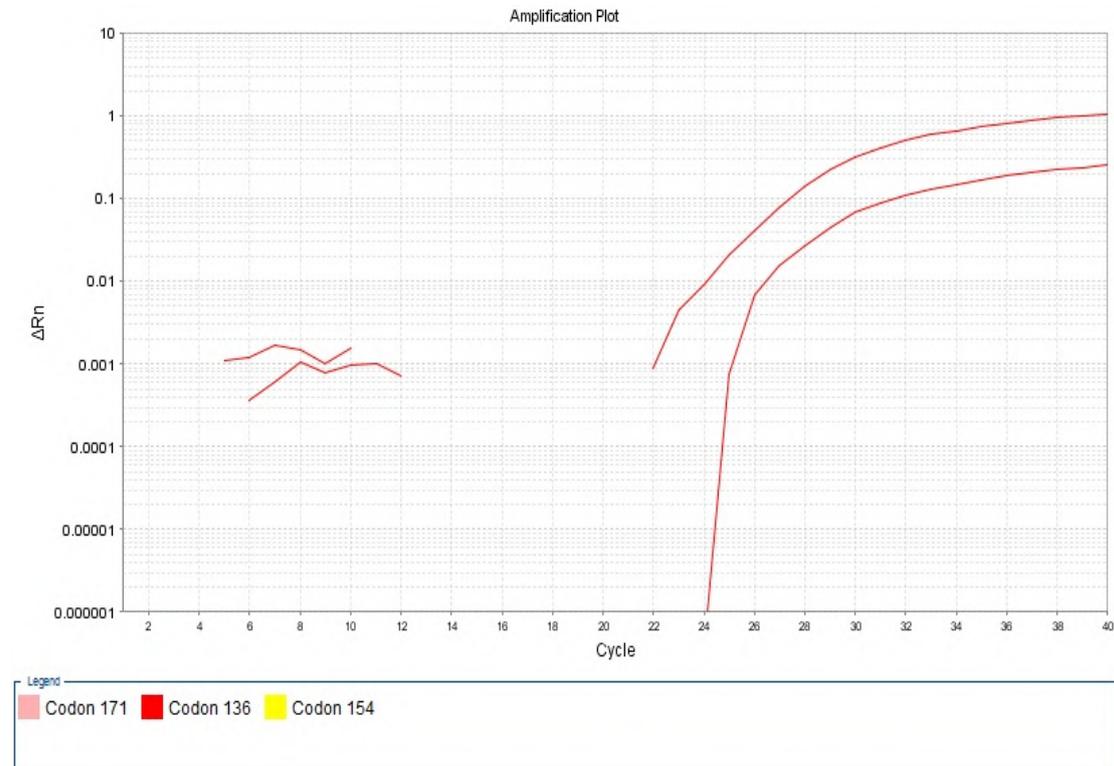
Fonte: dados da pesquisa (n=94).

**Gráfico 1: Percentual de categorização encontrado nas amostras**

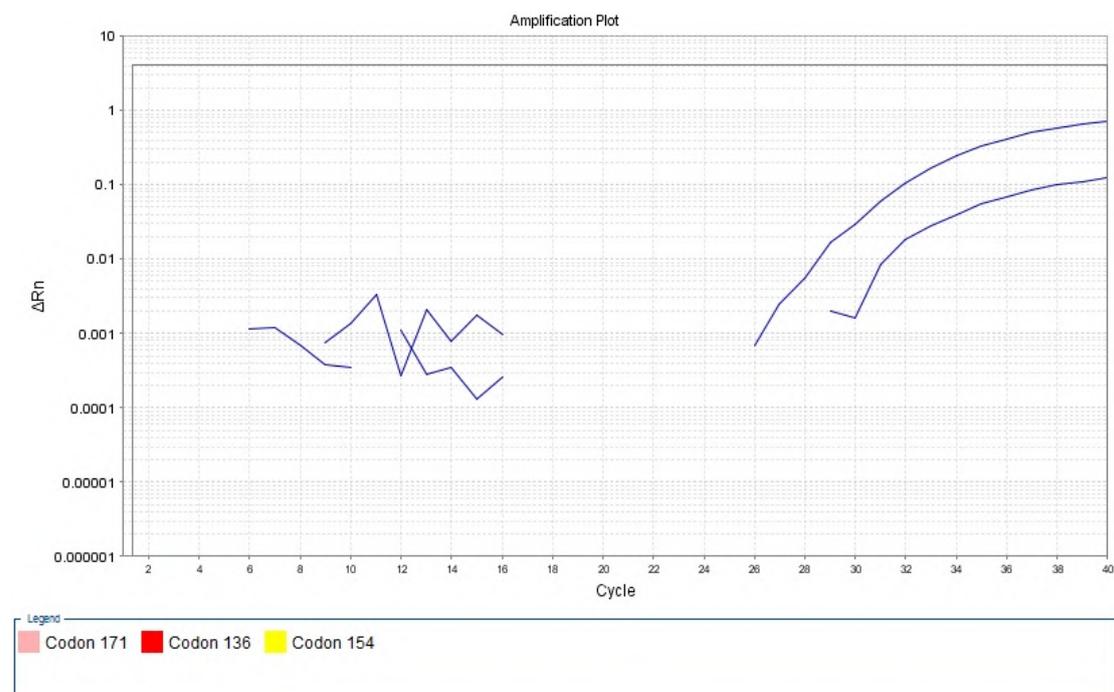


Fonte: dados da pesquisa (n=94).

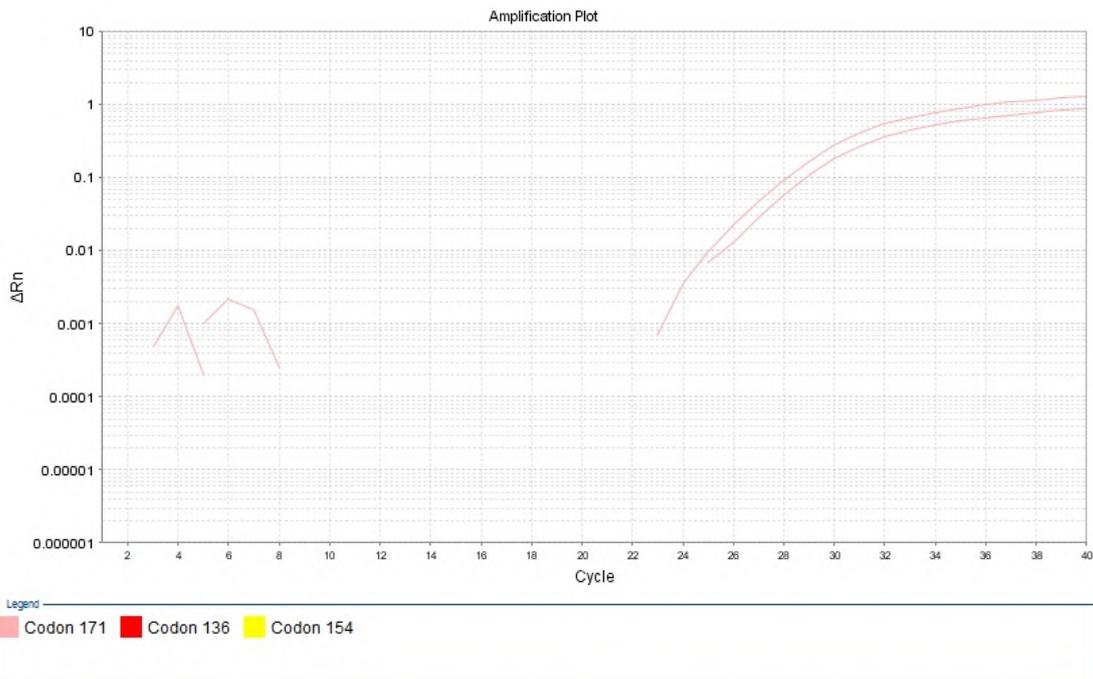
As figuras 1, 2 e 3 representam as curvas de amplificação dos códons 136, 154 e 171 em uma das amostras testadas, demonstrando que houve reação entre o DNA e as sondas utilizadas.



**Figura 1: Curva de amplificação do códon 136**  
Fonte: dados da pesquisa



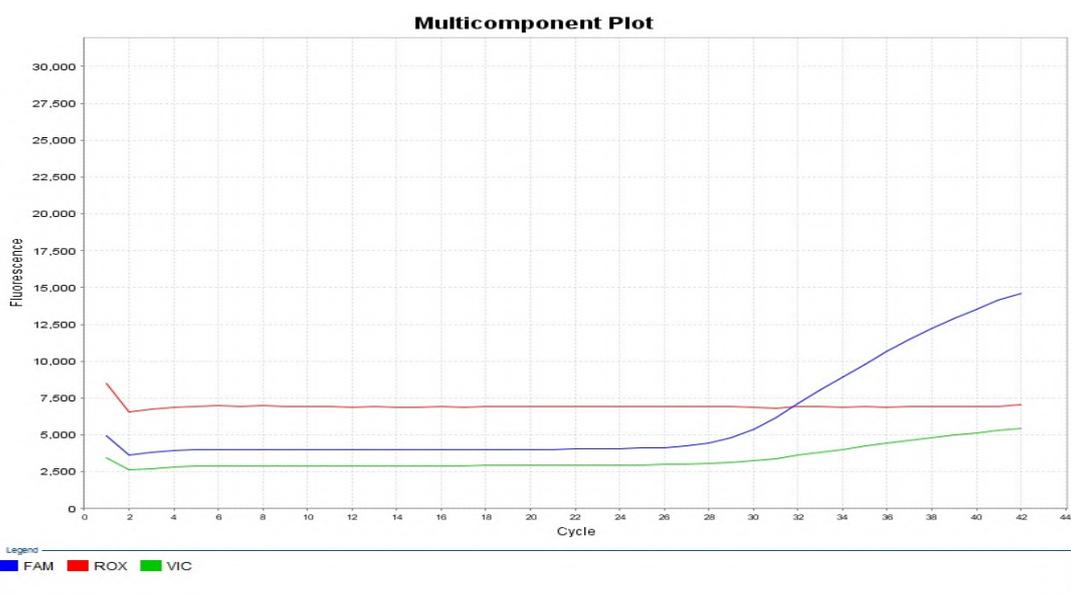
**Figura 2: Curva de amplificação do códon 154**  
Fonte: dados da pesquisa



**Figura 3: Curva de amplificação do códon 171**

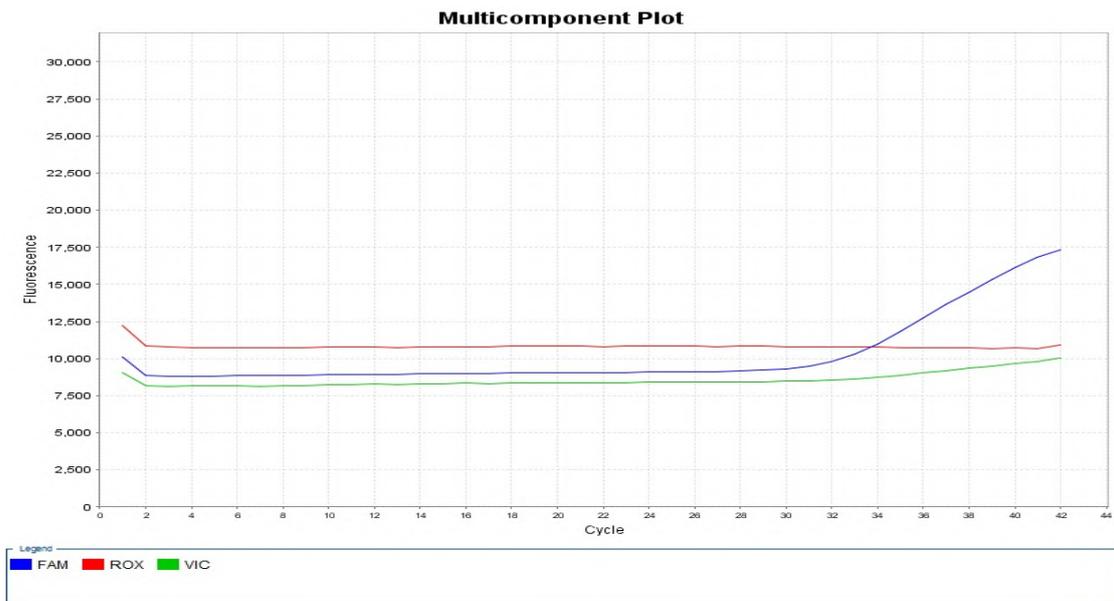
Fonte: dados da pesquisa

Analisando as figuras 4 e 5 observa-se que as reações revelam alelos homocigotos. Na reação do códon 136 (figura 4) apenas FAM reagiu, indicando a presença única do aminoácido Alanina (A), sendo essa amostra AA. Já na reação do códon 154 (figura 5) a reação foi para o aminoácido Arginina (R), manifestando homocigose no alelo RR.



**Figura 4: reação homocigótica do códon 136 para o aminoácido Alanina (AA)**

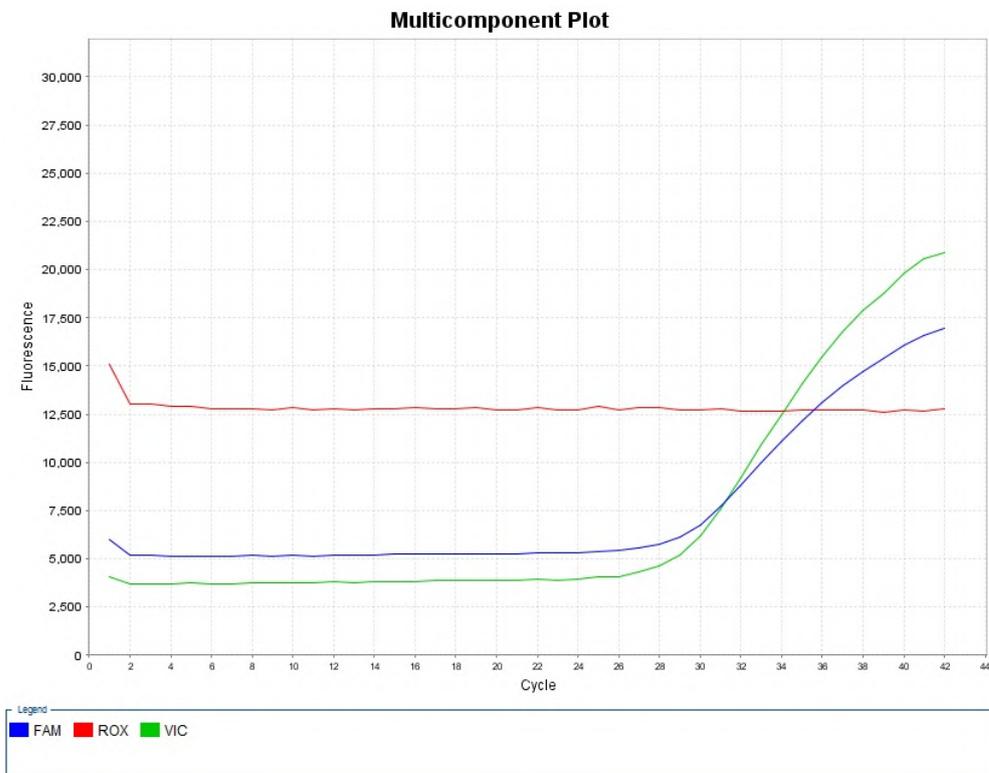
Fonte: dados da pesquisa



**Figura 5: reação homozigótica do códon 136 para o aminoácido Arginina (RR)**

Fonte: dados da pesquisa

A reação no códon 171 ocorreu em FAM e VIC, demonstrando um alelo heterozigoto, tendo nessa amostra a presença dos aminoácidos Glutamina e Arginina, formando o alelo QR, como pode ser observado na figura 6.



**Figura 6: reação heterozigótica do códon 171 para Glutamina e Arginina (QR)**

Fonte: dados da pesquisa

Após a análise dos gráficos obtidos pelo programa do q-PCR pode-se concluir que a amostra analisada possui o genótipo  $A_{136}R_{154}R_{171}/A_{136}R_{154}Q_{171}$ , sendo classificada como R2 – Resistente, utilizando a classificação de Dawson et al (1998), representando um exemplo de como foram analisadas as amostras desse trabalho.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Genotipagem

#### 5.1.1 Estudos Brasileiros

##### 5.1.1.1 Quantidade de Alelos e Genótipos

No estudo feito por Lima *et al*<sup>15</sup>, utilizando a técnica de RT-PCR em amostras de sangue de 29 ovelhas da raça Santa Inês, foram encontrados 19 diferentes genótipos PrP formados por 13 alelos diferentes. No trabalho publicado por Santos *et al*<sup>17</sup> utilizando PCR Convencional em 118 amostras de ovinos da raça Santa Inês foi observado 6 diferentes alelos, formando 11 genótipos. Ianella *et al*<sup>28</sup> genotiparam 1400 ovinos de variadas raças e encontraram em seu trabalho 4 alelos, ARR, ARQ, AHQ e VRQ, e 9 genótipos. Sotomaior *et al*<sup>22</sup> avaliou 325 ovinos de variadas raças e encontrou 6 diferentes genótipos. No presente trabalho foram encontrados 4 alelos e 6 diferentes genótipos. Essa variação ocorre pois o gene PrNP de ovinos é altamente polimórfico<sup>10</sup>.

##### 5.1.1.2 Grupo R1 – Genótipos Extremamente Resistentes

Foram encontradas nesse trabalho 6,5% de amostras com o genótipo ARR/ARR, considerado como R1 – Extremamente Resistente ao desenvolvimento da doença. Já em Santos *et al*<sup>17</sup>, Lima *et al*<sup>15</sup> e Sotomaior *et al*<sup>27</sup> utilizando apenas animais da raça Santa Inês, foram encontradas 0,84%, 0% e 0% respectivamente. Ianella *et al*<sup>28</sup> encontraram 2,9% de ovinos da raça Santa Inês com o genótipo ARR/ARR, e frequências maiores como nas raças Ile de France e Hampshire (41,7% e 20,8%, respectivamente). Em Sotomaior *et al*<sup>22</sup>, observaram 14,4% de animais do grupo R1, dispensando qualquer restrição para a reprodução.

#### 5.1.1.3 Grupo R2 e R3- Genótipos Resistentes e com leve resistência

Os genótipos considerados como resistentes (R2) e levemente resistentes (R3) apresentaram 15,9% e 69,0% respectivamente, nas amostras aqui analisadas, predominando o genótipo ARQ/ARQ (51%). Santos *et al*<sup>17</sup>, Lima *et al*<sup>15</sup> e Sotomaior *et al*<sup>27</sup> confirmaram em seus estudos a predominância desse genótipo nas amostras analisadas, com 56,7%, 37,9% e 43%, respectivamente. Ianella *et al*<sup>28</sup> agruparam os animais R1 e R2 e observaram frequências superiores a 60% para resistência ao Scrapie nas variadas raças testadas, como por exemplo, 70,8% em Hampshire e 62,5% em Ile de France. Já no grupo R3 encontraram 48,3% de ovinos Santa Inês, com leve resistência ao desenvolvimento da doença. Sotomaior *et al*<sup>22</sup> observaram em suas amostras 29,5% de animais pertencentes ao grupo R2 e 47,8% R3.

#### 5.1.1.4 Grupo R4 – Genótipos Susceptíveis

Em Lima *et al*<sup>15</sup> foram encontrados 3,4% de animais com genótipo VRQ/ARR, em Sotomaior *et al*<sup>27</sup> 2%, sendo considerados susceptíveis (R4) ao desenvolvimento da doença. Os resultados apresentados nesse trabalho não encontraram o genótipo do grupo R4, assim como em Santos *et al*<sup>17</sup>. Já Ianella *et al*<sup>28</sup>, obtiveram frequências entre 1% (Crioulo Pantaneiro), 3,1% (Santa Inês) e 20% (Corriedale) para esse genótipo. Sotomaior *et al*<sup>22</sup> obtiveram 1,6% de animais do grupo R4 em suas amostras.

#### 5.1.1.5 Grupo R5 – Genótipos Altamente Susceptíveis

As amostras contendo o genótipo ARQ/VRQ totalizaram 8,5% no presente trabalho, sendo observado fato semelhante em Santos *et al*<sup>17</sup> com 8,7% de ARQ/VRQ em suas amostras.

Nos estudos de Lima *et al*<sup>15</sup> e Sotomaior *et al*<sup>27</sup> não foram encontrados o genótipo VRQ/VRQ, assim como no presente trabalho. Já em Santos *et al* (2012) esse genótipo estava presente em 0,84% das amostras.

O grupo R5 (altamente susceptível) de Santos *et al*<sup>17</sup> totalizou 9,3% , das amostras. Nesse estudo 8,5% fazem parte desse grupo, já em Lima *et al*<sup>15</sup> não foram encontrados animais desse grupo. Ianella e colaboradores<sup>28</sup> não encontraram o genótipo VRQ/VRQ, considerado o mais susceptível para o desenvolvimento da doença, mas estavam presentes outros genótipos do grupo R5, variando entre as raças testadas, com 4,6% em ovinos Santa Inês e 20% em Dorper. Sotomaior *et al*<sup>22</sup> encontraram 6,7% de animais pertencentes ao grupo R5.

Apesar de serem potencialmente suscetíveis geneticamente ao Scrapie, os surtos da doença em 2001 e 2003 não afetou a raça Santa Inês. Ambos os casos relatados foram em ovelhas Hampshire Down. Mas é importante conhecer o perfil genotípico da raça pois os cruzamentos com outras raças são cada vez mais frequentes<sup>15</sup>.

#### 5.1.1.6 Genótipos de Diferentes Regiões do Brasil

Ianella *et al*<sup>28</sup>, analisou 56 ovinos de raças variadas na região Sudeste, e obteve como resultado, 28% de animais do grupo R1, 37,8% grupo R2, 14,6% R3, 16% R4 e 3,6% R5. Santos *et al*<sup>17</sup> genotipou ovinos da raça Santa Inês no Estado de São Paulo, encontrando 13,49% de animais considerados potencialmente resistentes ao Scrapie, e 86,51% de animais susceptíveis ou fracamente resistentes a doença. Lima *et al*<sup>15</sup> encontrou em animais do Estado do Ceará (Região Nordeste) 41,3% de genótipos susceptíveis ao Scrapie e 10,3% de extremamente resistentes.

No Rio Grande do Sul houve um caso confirmado de Scrapie, todo o rebanho (90 ovinos) foi avaliado por imunohistoquímica e genotipagem, e como resultado encontram 10 animais positivos para a doença, desses, 2 tinham o genótipo ARR/ARR (R1), 2 ARR/ARQ (R2), 1 ARH/ARH (R3), 4

ARQ/ARQ (R4), e 1 ARQ/VRQ (R5). O diagnóstico de Scrapie nesses dois homozigotos ARR/ARR indicou que a resistência desse genótipo para a forma clássica da doença é discutível, embora seja rara a manifestação da doença nesse grupo, o que indica que sua ocorrência depende de uma combinação de fatores como agentes infecciosos, incluindo diferenças biológicas e propriedades bioquímicas nos hospedeiros naturais para esse príon<sup>29</sup>.

### 5.1.2 Estudos Internacionais

No Canadá, a genotipagem de 3343 ovelhas entre os anos de 2005 a 2012 demonstrou que a seleção de genótipos resistentes na província de Ontario, apresentou resultados no aumento de resistência desde 2005, aumentando a frequência do haplótipo ARR (R1) entre 2005 e 2012. No mesmo período, houve uma diminuição no grupo R3, reduzindo os haplótipos AHQ e ARH. Já o haplótipo VRQ permaneceu estável durante o período do estudo. Observaram também que nas províncias do Canadá o genótipo mais frequente entre 2008 e 2012 foi o ARR e o segundo mais frequente o ARQ, os dois juntos representaram 92% dos genótipos analisados. Quase 80% dos animais testados em Ontario e Nova Scotia apresentaram os genótipos resistentes (R1 ou R2) ao Scrapie.<sup>16</sup>

Um estudo feito por Gambetti, *et al*<sup>14</sup> avaliou através de PCR convencional amostras de 11 humanos com suspeita de doenças priônicas e observaram que todos os pacientes eram homozigóticos para a Valina no códon 129 do gene PrP, três indivíduos tinham polimorfismos silenciosos no códon 117 e 122 e nenhuma mutação no gene PrP ORF, sugerindo que uma mutação fora desse gene também pode gerar uma doença priônica. A presença da Valina no genótipo das ovelhas avaliadas no presente estudo confirma uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças priônicas.

Mckay et al <sup>26</sup>, testaram 3.672 amostras provenientes de várias regiões dos Estados Unidos, todas genotipadas no códon 171, e observaram que 88,9% dos animais continham uma Arginina (R) combinada com Histidina (H) ou glutamina (Q) nesse códon, o que confere suscetibilidade a esses animais, já 38,75% apresentavam RR171, conferindo resistência.

Em um trabalho realizado na Índia, Choudhary *et al* <sup>30</sup> avaliaram utilizando o PCR Convencional 200 amostras de ovinos saudáveis, sem nenhum sinal da doença, e encontraram 100% de ARQ em duas das raças avaliadas (Garole e Malpura) e 77,75% no rebanho em geral, os alelos de risco elevado e de alta resistência estavam presentes apenas em ovinos da raça Karnah, e concluem que apesar de existirem animais com os alelos de susceptibilidade, nenhum apresentou sintomas do Scrapie, o que sugere que existem fatores adicionais que podem estar envolvidos no controle da doença, como por exemplo, interações genótipo-ambiente.

A seleção para indivíduos resistentes e, em particular, carneiros resistentes tem sido associado com uma redução na incidência de tremor epizoótico em rebanhos de ovinos. Este tipo de seleção, também demonstrado não ter efeito significativo sobre a produção de leite, características de reprodução, crescimento, ou carcaça. Estas são as razões para a adoção de programas, como o Plano Nacional de Scrapie Grã-Bretanha, na qual a seleção negativa para VRQ e seleção positiva para alelos ARR entre carneiros é incentivada <sup>16</sup>.

Um cuidado deve ser tomado ao adotar programas de seleção, pois todo o esforço realizado para se reproduzir resistência ao Scrapie clássico poderia levar a um aumento do risco para o desenvolvimento do Scrapie Atípico, visto que os genótipos que conferem resistência ao clássico, são susceptíveis ao atípico, lançando o desafio de encontrar uma explicação para a susceptibilidade de ambas as formas de Scrapie e o ponto ideal de seleção para as futuras pesquisas <sup>10</sup>.

## 5.2 Comparação entre as Técnicas de PCR

O desenvolvimento da técnica de PCR (Reação de Cadeia da Polimerase) foi considerado o grande avanço da Biologia Molecular, possibilitando novas análises do DNA e diagnóstico de doenças infecciosas. Segundo Fraga *et al*<sup>31</sup>, surgiu em 1992, e desde então houve um rápido aumento na sua utilização, mudando a natureza de como a pesquisa biomédica é conduzida.

A PCR em Tempo Real apresenta vantagens em relação a técnica convencional, como a maior velocidade da reação, reprodutibilidade do processo e capacidade de quantificação, além de eliminar a etapa de pós amplificação com o gel de eletroforese<sup>32</sup>. Permite a quantificação precisa de ácidos nucléicos específicos em uma mistura complexa, mesmo que com concentração de material muito baixa. Isto é possível através da monitorização da amplificação de uma sequência alvo em tempo real utilizando uma tecnologia fluorescente, sendo que a velocidade com que o alvo amplificado atinge um nível de detecção de limiar se correlaciona com a quantidade de material de partida presente<sup>31</sup>.

A técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real promove a quantificação acurada e o monitoramento do produto amplificado em tempo real, tendo várias possibilidades de aplicações, como identificação de alelos em DNA genômico, análise de sequências virais, bacterianas ou de protozoários, patógenos em alimentos, produtos transgênicos e diagnósticos<sup>32</sup>. As reações utilizando a q-PCR possuem menos etapas quando comparadas ao sequenciamento genômico, reduzindo o tempo de realização do experimento e também a quantidade de amostras e enzimas. Mas apesar dessas vantagens, ela necessita de grande quantidade de componentes, como as sondas que emitem a fluorescência, tornando o custo relativamente mais alto, quando comparado ao sequenciamento genômico<sup>17</sup>

O estudo de genotipagem realizado por Andrade *et al*<sup>19</sup> demonstrou eficiência em seus resultados utilizando a técnica de Q-PCR, com uma boa precisão, rapidez e especificidade nos resultados, além de não necessitar de

pós manipulações do PCR.

A genotipagem utilizando TaqMan tem sido utilizada com sucesso para determinar genótipos PrP em ovelhas, são as mais utilizadas para o PCR em Tempo Real (qPCR). Um cuidado na concepção das sondas utilizadas devem evitar reações cruzadas, detectando sequências alvo sem ambiguidades <sup>19</sup>.

No estudo de McKay et al <sup>26</sup> foi realizada a genotipagem de 3.672 ovinos utilizando o Real Time PCR, mas com a técnica Syber Melting, apresentando as vantagens de ter um baixo custo quando comparado ao q-PCR, e ser eficiente na identificação dos genótipos do códon 171, porém necessitando de uma intensa padronização por não haver especificidade, já que qualquer ligação com DNA emite a fluorescência, diferentemente do que ocorre no q-PCR.

Apesar desses avanços tecnológicos, os métodos de amplificação da molécula de DNA podem apresentar limitações que incluem resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação com DNA, provenientes de reações anteriores (em tubos, reagentes, pipetas e bancadas) e resultados falso-negativos relacionados com a presença de inibidores da PCR ou volume amostral relativamente baixo para o processamento <sup>31</sup>. Esses fatores podem auxiliar a compreensão dos motivos pelos quais 31 amostras desse estudo não reagiram ao processo da PCR.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi observado nesse trabalho que o método de genotipagem q-PCR é eficiente para o gene PRNP, sendo uma técnica rápida, com custo relativamente baixo para um número alto de amostras, e com muita especificidade na reação. Apresentando vantagens em relação a outras técnicas já descritas e testadas.

Em relação aos genótipos de resistência e susceptibilidade, obteve-se como resultado a grande maioria das amostras categorizadas como Grupo R3 (69%) sendo levemente resistente ao desenvolvimento do Scrapie, seguido pelo grupo R2 (15,90%) com resistência, sendo o grupo R5 (8,5%) altamente susceptível ao desenvolvimento da doença e por último o grupo R1 (6,3%) de amostras altamente resistentes ao desenvolvimento da doença. Mostrando assim, que no rebanho testado, a grande maioria dos animais apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, e poucos são resistentes.

Mais estudos são sugeridos testando os métodos de genotipagem e a relação entre os genótipos e os graus de resistência ou susceptibilidade para o desenvolvimento de Scrapie em ovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IBGE, [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2012/ppm2012.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf) – acessado em 09/11/2015.
2. KOVACS, G. G.; BUDKA, H. Molecular pathology of human prion diseases. *International journal of molecular sciences*, 10(3), 976-999, 2009.
3. PRUSINER, S. B.; BOLTON, D. C.; GROTH, D. F.; BOWMAN, K. A.; COCHRAN, S. P.; MCKINLEY, M. P. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, 21(26), 6942-6950, 1982.
4. COBB, N. J.; SUREWICZ, W. K. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry*, 48(12), 2574-2585, 2009.
5. PRUSINER, S. B. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13363-13383, (1998).
6. PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144, 1982.
7. TAYLOR, D. M. Inactivation of prions by physical and chemical means. *Journal of Hospital Infection*, 43, S69-S76, 1999.
8. VACCARI, G., PANAGIOTIDIS, C. H., ACIN, C., PELETTO, S., BARILLET, F., ACUTIS, P., ... & GOLDMANN, W. State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Veterinary research*, 40(5), 1-18, 2009.

9. WESTERGARD, L., CHRISTENSEN, H. M., & HARRIS, D. A. The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 629-644, 2007.
10. GOLDMANN, W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary research*, 39(4), 1-14. 2008.
11. BASLER, K.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D. F.; MCKINLEY, M. P.; PRUSINER, S. B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, v. 46, n. 3, p. 417-428, 1986.
12. WILL, R. G. Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *British Medical Bulletin*, 66(1), 255-265, 2003
13. ANIMAL HEALTH AUSTRALIA Disease strategy: Scrapie (Version 3.0). Australian Veterinary Emergency Plan (AUSVETPLAN), Edition 3, Primary Industries Ministerial Council, Canberra, ACT, 2009. Acessado em: [http://www.animalhealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2011/04/SCR3\\_0-10FINAL27Jan09.pdf](http://www.animalhealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2011/04/SCR3_0-10FINAL27Jan09.pdf)
14. GAMBETTI, P., DONG, Z., YUAN, J., XIAO, X., ZHENG, M., ALSHEKHLI, A., ... & ZOU, W. Q. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Annals of neurology*, 63(6), 697-708. 2008.
15. LIMA, A. C. B., BOSSERS, A., SOUZA, C. E., OLIVEIRA, S. M., & OLIVEIRA, D. M. PrP genotypes in a pedigree flock of Santa Ines sheep. *Veterinary record*, 160(10), 336, 2007.

16. CAMERON, C., BELL-ROGERS, P., MCDOWALL, R., REBELO, A. R., & CAI, H. Y. Prion protein genotypes of sheep as determined from 3343 samples submitted from Ontario and other provinces of Canada from 2005 to 2012. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(4), 260, 2014.
17. SANTOS, C. R., MORI, E., LEÃO, D. A., & MAIORKA, P. C. Genotipagem de polimorfismos no gene prnp em ovinos da raça Santa Inês no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(3), 221-226, (2012).
18. LÜHKEN, G.; BUSCHMANN, A.; GROSCUP, M. H.; ERHARDT, G. Prion protein allele A136 H 154 Q 171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Archives of virology*, 149(8), 1571-1580, 2004.
19. ANDRADE, C. P.; de ALMEIDA, L. L.; de CASTRO, L. A.; DRIEMEIER, D.; da SILVA, S. C. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for single nucleotide polymorphism genotyping codons 136, 154, and 171 of the prnp gene and application to Brazilian sheep herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 120-124, 2013.
20. DAWSON, M.; HOINVILLE, L. J.; HOSIE, B. D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record*, v. 142, n. 23, p. 623-625, 1998.
21. DEFRA, <http://www.defra.gov.uk/animalhealth/managing-disease/NSPAC/tables/genotypes.pdf>. acessado em 10/10/2015.
22. SOTOMAIOR, C. S., THOMAZ-SOCCOL, V. Scrapie susceptibility in meat sheep of Paraná State–Brazil. *Estudos de Biologia*, 32(76-81), 97-104, 2011.

23. FERNANDES, R. E.; C.M., R.; J.C., F. "Scrapie" em Ovinos no Rio Grande do Sul. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 6, n., p. 139-143, 1978.
24. MARTINS, H. M.; CARVALHO, N. M.; RIBAS, N. L.; DRIEMEIER, D.; LEMOS, R. A.; GUIMARÃES, E. B. Scrapie e seu diagnóstico diferencial em ovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras*, 32(12), 1230-1238, 2012.
25. OIE. Terrestrial Animal Health Code. Scrapie.: secondary title, 2010.
26. MCKAY, J. T.; BRIGNER, T. A.; CAPLIN, B. E.; MCCURDY, K. S.; FORDE, R. L. A real-time polymerase chain reaction assay to detect single nucleotide polymorphisms at codon 171 in the prion gene for the genotyping of scrapie susceptibility in sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 20(2), 209-212, 2008.
27. SOTOMAIOR, C. S., SOTOMAIOR, V. S., MADEIRA, H. M. F., THOMAZ-SOCCOL, V. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the state of Parana, Brazil. *Animal genetics*, 39(6), 659-661. 2008.
28. IANELLA, P., MCMANUS, C. M., CAETANO, A. R., & PAIVA, S. R. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: issues for conservation and breeding programs. *Research in veterinary science*, 93(1), 219-225. 2012.
29. LEAL, J. S., DE ANDRADE, C. P., CORREA, G. L. F., BOOS, G. S., BIANCHI, M. V., DA SILVA, S. C.; DRIEMEIER, D. Classical Scrapie Diagnosis in ARR/ARR Sheep in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 43, 1-7, 2015.

30. CHOUDHARY, S., GUPTA, N., JETHRA, G., & GOUR, D. S. Genetic evidence for susceptibility and resistance against scrapie in Indian sheep. *Journal of genetics*, 94(1), 129-133., 2015.
31. FRAGA, D., MEULIA, T., FENSTER, S. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 10-3. 2008.
32. CAVALCANTI, M. P. et al. Avanços Biotecnológicos Para O Diagnóstico Das Doenças Infecciosas E Parasitárias. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008.

## ANEXOS

### Anexo A: Relação de animais participantes do projeto

Nº AMOSTRA	Nº ANIMAL	ESPÉCIE	RAÇA	IDADE	SEXO
1	59	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
2	104	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
3	109	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
4	118	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
5	179	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
6	163	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
7	5250	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
8	117	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
9	151	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
10	6	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
11	46	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
12	S/N	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	M
13	33	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
14	21	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
15	81	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
16	9	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
17	125	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
18	136	<i>Ovis aries</i>	ILE DE FRANCE	3-4 ANOS	F
19	13	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
20	50	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK PO	3-4 ANOS	M
21	ÚNICO	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	M
22	77	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
23	4	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
24	23	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
25	2	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
26	141	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
27	56	<i>Ovis aries</i>	TEXEL / SUFFOLK	1 ANO	F
28	13	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
29	60	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
30	61	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
31	159	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
32	165	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
33	129	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
34	80	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
35	157	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
36	115	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
37	52	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
38	X	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
39	16	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
40	162	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
41	133	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
42	116	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
43	112	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F

Nº AMOSTRA	Nº ANIMAL	ESPÉCIE	RAÇA	IDADE	SEXO
44	26	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
45	33	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
46	148	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
47	105	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
48	173	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
49	17	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
50	31	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
51	106	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
52	47	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
53	144	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
54	12	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
55	9	<i>Ovis aries</i>	1/2 SUFFOLK	3-4 ANOS	F
56	27	<i>Ovis aries</i>	DORPER / SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
57	177	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
58	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
59	127	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
60	119	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
61	68	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
62	113	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
63	135	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
64	169	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
65	31	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
66	147	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK /SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
67	172	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
68	177	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
69	22	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS / WHITE DOPPER	3-4 ANOS	F
70	176	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
71	140	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
72	158	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
73	51	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
74	98	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
75	125	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
76	76	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
77	102	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
78	160	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
79	86	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
80	29	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
81	175	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
82	154	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
83	5	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
84	149	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
85	108	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
86	156	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
87	168	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
88	119	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
89	65	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3-4 ANOS	F
90	49	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS / SUFFOLK	3-4 ANOS	F

<b>Nº AMOSTRA</b>	<b>Nº ANIMAL</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>RAÇA</b>	<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>
91	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS 1/2 SANTA INÊS /	3-4 ANOS	F
92	72	<i>Ovis aries</i>	DORPER	3-4 ANOS	F
93	128	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
94	182	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
95	95	<i>Ovis aries</i>	1/2 TEXEL	3-4 ANOS	F
96	92	<i>Ovis aries</i>	TEXEL	3-4 ANOS	F
97	3	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
98	121	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	8 ANOS	F
99	129	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
100	80	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
101	189	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
102	138	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK / HAMPSHIRE	3-4 ANOS	F
103	43	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
104	192	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
105	111	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
106	83	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
107	27	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
108	59	<i>Ovis aries</i>	SUFFOLK	3-4 ANOS	F
109	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	M
110	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
111	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
112	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
113	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
114	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
115	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
116	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
117	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
118	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
119	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
120	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
121	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
122	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
123	S/N	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	6-8 MESES	F
124	178	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	3 ANOS	F
125	86	<i>Ovis aries</i>	SANTA INÊS	5 ANOS	F

Fonte: dados da pesquisa.

**Anexo B: Resultados das quantificações realizadas nas amostras, verificação do grau de pureza das amostras.**

<b>Animal</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>[ ] ng/ul</b>
1	1,55	0,74	193
2	1,61	0,94	349
3	0,8	0,14	40
4	5,91	0,14	288
5	1,12	0,34	166
6	1,16	0,26	70
7	1,21	0,45	185
8	0,62	0,15	50
9	1,33	0,58	286
10	0,99	0,33	70
11	1,37	0,53	358
12	1,11	0,36	175
13	1,03	0,31	97
14	1,08	0,34	109
15	0,99	0,31	80
16	0,98	0,22	185
17	1,15	0,37	254
18	1,25	0,48	215
19	1,33	0,46	170
20	0,99	0,3	109
21	1,14	0,33	135
22	1,54	0,75	473
23	1,23	0,42	151
24	1,48	0,72	355
25	1,24	0,46	267
26	1,28	0,47	144
27	1,37	0,62	282
28	1,37	0,55	188
29	1,21	0,4	115
30	1,43	0,53	296
31	1,19	0,33	155
32	1,15	0,29	274
33	1,36	0,48	343
34	1,36	0,47	248
35	1,44	0,63	351
36	1,46	0,8	382
37	1,38	0,52	164
38	1,33	0,46	190
39	1,34	0,4	180
40	1,49	0,53	255
<b>Animal</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>[ ] ng/ul</b>
41	1,52	0,75	398

42	1,33	0,43	139
43	1,52	0,67	265
44	1,51	0,69	287
45	1,48	0,55	170
46	1,21	0,43	176
47	1,33	0,68	235
48	1,4	0,71	282
49	1,36	0,6	250
50	1,53	0,86	499
51	1,43	0,67	386
52	1,27	0,46	233
53	1,42	0,65	300
54	1,44	0,7	271
55	1,27	0,48	217
56	1,29	0,44	207
57	1,5	0,31	156
58	1,29	0,28	164
59	1,18	0,29	187
60	1,34	0,41	237
61	1,14	0,32	205
62	1,22	0,37	210
63	1,18	0,29	170
64	1,09	0,27	153
65	1,14	0,28	161
66	1,29	0,38	256
67	1,14	0,29	269
68	1,31	0,45	294
69	0,85	0,16	231
70	1,14	0,32	255
71	1,05	0,27	420
72	1,07	0,25	223
73	0,92	0,23	379
74	0,92	0,23	269
75	0,96	0,24	224
76	0,88	0,2	375
77	0,8	0,14	124
78	0,82	0,18	249
79	1,02	0,21	275
80	1,15	0,35	164
81	1,03	0,14	116
82	1,2	0,35	323
83	0,94	0,17	133
84	0,88	0,22	365
85	0,96	0,23	213
<b>Animal</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>[ ] ng/ul</b>
86	1,18	0,32	450

<b>87</b>	1,36	0,26	137
<b>88</b>	1,37	0,6	233
<b>89</b>	1,3	0,34	182
<b>90</b>	1,48	0,68	319
<b>91</b>	1,41	0,71	377
<b>92</b>	1,37	0,81	355
<b>93</b>	1,53	0,77	581
<b>94</b>	1,24	0,23	137
<b>95</b>	1,08	0,48	158
<b>96</b>	1,48	0,45	164
<b>97</b>	1,7	0,7	275
<b>98</b>	1,04	0,28	219
<b>99</b>	1,4	0,63	380
<b>100</b>	1,58	0,83	419
<b>101</b>	1,4	0,62	242
<b>102</b>	1,48	0,78	370
<b>103</b>	1,5	0,95	523
<b>104</b>	2,3	0,36	70
<b>105</b>	1,51	0,87	358
<b>106</b>	1,4	0,83	500
<b>107</b>	1,45	0,75	420
<b>108</b>	1,53	0,8	434
<b>109</b>	1,61	0,62	301
<b>110</b>	1,52	0,7	377
<b>111</b>	1,45	0,49	221
<b>112</b>	1,24	0,44	230
<b>113</b>	1,57	0,71	187
<b>114</b>	1,55	0,66	269
<b>115</b>	1,47	0,41	148
<b>116</b>	1,34	0,41	88
<b>117</b>	1,55	0,62	214
<b>118</b>	1,57	0,74	231
<b>119</b>	1,49	0,48	90
<b>120</b>	1,62	0,95	205
<b>121</b>	1,58	0,69	306
<b>122</b>	1,59	0,65	145
<b>123</b>	1,88	1,07	206
<b>124</b>	1,74	0,98	196
<b>125</b>	1,64	0,71	141

---

Fonte: dados da pesquisa (São Paulo, 2015)