

FREQUÊNCIA DO INDEL DE 23 PB NO GENE *PRNP* ASSOCIADO A RESISTÊNCIA À ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA NA RAÇA NELORE

FREQUENCY OF THE 23 BP INDEL IN THE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN NELORE CATTLE

Lavínia Barbosa de Jesus Ferreira¹

Beatriz Bastos Senes²

Silel Vinícius Simões Andrade Maciel³

Ingrid Pereira Pinto Oliveira⁴

Jackeline Santos Alves⁵

Gregório Miguel Ferreira de Camargo⁶

Resumo

A Encefalopatia Espongiforme Bovina Atípica (EEB-H) é uma enfermidade neurodegenerativa fatal de ocorrência espontânea, associada a mutações no gene da proteína do príon (*PRNP*). Polimorfismos nesse gene, como o indel de 23 pb na região promotora, são candidatos a marcadores para programas de seleção assistida voltados ao aumento da resistência nos rebanhos. Este trabalho estimou as frequências genotípicas e alélicas do indel de 23 pb no gene *PRNP* em 267 bovinos da raça Nelore. O material genético foi obtido de folículos pilosos da cauda, submetido a extração de DNA, amplificação por PCR e genotipagem por eletroforese em gel de agarose. Três genótipos foram detectados: II (5,99%), ID (10,49%) e DD (83,52%), com frequências alélicas de 11,24% para o alelo I (resistência) e 88,76% para o alelo D (suscetibilidade). A distribuição reflete a ausência histórica de seleção direcionada a esse loco na raça. A presença do alelo I em 16,48% dos animais indica variabilidade suficiente para viabilizar programas de seleção assistida por marcadores moleculares visando ao incremento de genótipos resistentes em rebanhos Nelore.

Palavras-chave: Bovinocultura. Genotipagem. Marcadores moleculares.

Abstract

Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE-H) is a fatal neurodegenerative disease of spontaneous occurrence, associated with mutations in the prion protein gene (PRNP). Polymorphisms in this gene, such as the 23 bp indel in the promoter region, are candidate markers for marker-assisted selection programmes aimed at increasing herd resistance. This study estimated genotypic and allelic frequencies of the 23 bp indel in the PRNP gene in 267 Nelore cattle. Genetic material was obtained from tail hair follicles and subjected

to DNA extraction, PCR amplification and agarose gel electrophoresis. Three genotypes were detected: II (5.99%), ID (10.49%) and DD (83.52%), with allelic frequencies of 11.24% for allele I (resistance) and 88.76% for allele D (susceptibility). The distribution reflects the historical absence of directed selection at this locus in the breed. The presence of allele I in 16.48% of the animals indicates sufficient variability to support marker-assisted selection strategies aimed at gradually increasing resistant genotypes in Nelore herds.

Keywords: Beef cattle. Genotyping. Molecular markers.

¹ Graduanda em Zootecnia pela UFBA/EMEVZ. E-mail: lavinia.ferreira@ufba.br

² Doutoranda em Zootecnia pela UFBA/EMEVZ. E-mail: bee_senes@hotmail.com

³ Doutorando em Zootecnia pela UFBA/EMEVZ. E-mail: silel2009@hotmail.com

⁴ Doutoranda em Zootecnia pela UFBA/EMEVZ. E-mail: ingridppoliveira@gmail.com

⁵ Pesquisadora Visitante (pós-doutorado) em Animal Science pela Purdue University. E-mail: alvesl@purdue.edu

⁶ Professor Doutor, Departamento de Zootecnia, UFBA/EMEVZ. E-mail: gregorio.camargo@ufba.br

1 Introdução

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) são doenças neurodegenerativas fatais causadas pelo acúmulo da isoforma anormal da proteína priônica (PrP^{sc}) no sistema nervoso central. Em bovinos, a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) clássica está associada à ingestão de alimentos contaminados, cujo controle no Brasil é regido pela Instrução Normativa nº 8 do MAPA (BRASIL, 2004). A EEB atípica, por sua vez, ocorre de forma espontânea, independente de exposição alimentar, e subdivide-se em H e L (OLECH, 2023), representando risco que medidas sanitárias convencionais não eliminam.

Polimorfismos no gene *PRNP* modulam a suscetibilidade às EET em bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos (VITALE et al., 2016; STEPANEK; HORIN, 2017; YAMAN et al., 2017). Em bovinos, o indel de 23 pb na região promotora é funcionalmente relevante: o alelo de inserção (I) potencializa a ligação do repressor transcricional RP58, reduzindo a expressão do gene e a disponibilidade de substrato para conversão priônica, ao passo que o alelo de deleção (D) enfraquece essa ligação, elevando a suscetibilidade à EEB (SANDER et al., 2005).

A raça Nelore, representante da bovinocultura de corte nacional, nunca foi submetida a programas de seleção para esse marcador. Considerando que todos os casos já registrados no

Brasil são da EEB atípica, torna-se imperativo caracterizar a variabilidade alélica do *PRNP* nessa raça como etapa preliminar para estratégias de melhoramento voltadas à sanidade do rebanho.

2 Material e Métodos

O presente projeto foi aprovado pelo CEUA-UFBA (protocolo n. 75/2023).

Foram coletados pelos da cauda de 267 bovinos da raça Nelore provenientes de diferentes regiões do Brasil. O DNA genômico foi extraído com o kit NucleoSpin® Tissue, quantificado por espectrofotometria em NanoDrop e diluído a 50 ng/μL.

A amplificação do indel de 23 pb foi realizada por PCR com os primers descritos de Msalya *et al.* (2009): *forward* 5'-GTGCCAGCCATGTAAGTG-3' e *reverse* 5'-CCTATTCTGGCTATTGTTGC-3'. As reações continham 100 ng de DNA, 0,5 μL de cada primer (10 pM), 12,5 μL de Taq Mix e 9,5 μL de água ultrapura, com ciclagem descrita por Yang *et al.* (2017). As bandas foram analisadas em gel de agarose 4% (120 V, por 230 min) e fotografados no L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia), possibilitando a classificação dos genótipos homozigotos para inserção (II), heterozigotos (ID) e homozigotos para deleção (DD). As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas utilizando o software GeneAIEx versão 6.5. O teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg por meio da comparação entre as frequências genotípicas observadas e esperadas, adotando-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3 Resultados e Discussão

Os três genótipos esperados foram detectados no rebanho Nelore: DD (83,52%; $n = 223$), ID (10,49%; $n = 28$) e II (5,99%; $n = 16$), com frequências alélicas de 88,76% para D e 11,24% para I. A marcante predominância do alelo D reflete a ausência de pressão seletiva histórica sobre o gene *PRNP* no Brasil, onde a inexistência de EEB clássica e a ausência de programas específicos de melhoramento para esse loco permitiram que o alelo evoluísse. Esse padrão contrasta com populações europeias, em que o monitoramento da EEB e o descarte de animais afetados exerceram seleção indireta, elevando relativamente à frequência de genótipos mais resistentes (SANDER *et al.*, 2004).

Do ponto de vista funcional, a alta frequência do alelo D tem implicações sanitárias diretas: a deleção reduz a ligação do RP58 ao promotor do *PRNP*, aumenta a expressão de PrP^c e, consequentemente, amplia a oferta de substrato para conversão patológica (SANDER *et al.*,

2005). Esse mecanismo é especialmente crítico frente à EEB atípica, de ocorrência espontânea e não passível de controle por medidas sanitárias convencionais (OLECH, 2023), impondo riscos econômicos relevantes à bovinocultura nacional, desde perdas diretas de rebanho até restrições comerciais internacionais (BITENCOURT; RIBEIRO, 2022).

Em relação a predominância do alelo relacionado a suscetibilidade, a presença do alelo I em 16,48% dos animais (n = 44; genótipos II e ID) demonstra que a variabilidade necessária para programas de seleção assistida por marcadores (SAM) já está disponível na população. Experiências com ovinos na República Tcheca e no Reino Unido mostram que a SAM baseada em polimorfismos do *PRNP* pode incrementar a frequência de alelos de resistência em poucas gerações (STEPANEK; HORIN, 2017). A priorização de reprodutores II ou ID em sistemas de acasalamento dirigido constitui, portanto, uma estratégia concreta e imediatamente aplicável à raça Nelore, sem necessidade de introdução de material genético externo.

4 Conclusão

O indel de 23 pb no gene *PRNP* em bovinos da raça Nelore possui predominância do alelo D (88,76%) e do genótipo DD (83,52%), evidenciando elevada proporção de animais geneticamente suscetíveis à EEB. Porém, apesar de pequena, a presença do alelo I em 16,48% dos indivíduos demonstra variabilidade suficiente para sustentar programas de seleção assistida por marcadores, cujo objetivo seria aumentar gradualmente a frequência de genótipos resistentes. O mapeamento desse polimorfismo constitui uma etapa fundamental para estratégias de melhoramento voltadas à sanidade animal, contribuindo para a mitigação dos riscos sanitários e econômicos das encefalopatias espongiformes transmissíveis na bovinocultura brasileira.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pró-reitoria de extensão, arte e cultural da UFBA (PROEXT-AC).

5 Referências

BITENCOURT, K. B.; RIBEIRO, L. F. Encefalopatia Espongiforme em Bovinos. **Revista GeTeC**, v. 11, n. 35, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 8, de 25 de março de 2004**. Proíbe a produção, comercialização e utilização de produtos para alimentação de ruminantes que contenham proteínas e gorduras de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

COLLINGE, J.; CLARKE, A. R. A general model of prion strains and their pathogenicity. **Science**, v. 318, p. 930–936, 2007.

MSALYA, G. et al. Gene and haplotype polymorphisms of the Prion gene (*PRNP*) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle. **Animal Science Journal**, v. 80, n. 5, p. 520–527, 2009.

OLECH, M. Conventional and State-of-the-Art Detection Methods of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7135, 2023.

PRUSINER, S. B. Nobel Lecture: Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13363–13383, 1998.

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

SANDER, P. et al. Bovine prion protein (*PRNP*): promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and may be responsible for differences in BSE susceptibility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37408–37414, 2005.

STEPANEK, O.; HORIN, P. Genetic diversity of the prion protein gene (*PRNP*) coding sequence in Czech sheep and evaluation of the national breeding programme for resistance to scrapie. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 1, p. 111–121, 2017.

VITALE, M. et al. Scrapie incidence and *PRNP* polymorphisms: rare small ruminant breeds of Sicily with TSE protecting genetic reservoirs. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 921, 2016.

YAMAN, Y.; KARADAĞ, O.; ÜN, C. Investigation of the prion protein gene (*PRNP*) polymorphisms in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 427–430, 2017.

YANG, Q. et al. The evaluation of 23-bp and 12-bp insertion/deletion within the *PRNP* gene and their effects on growth traits in healthy Chinese native cattle breeds. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 505–511, 2017.