

REVISTA

BIOCIENCIAS

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud

Vol. 13, Núm. 2 (2018)

GENOTIPADO DEL GEN DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA EN OVEJAS CALIFICADAS DE “EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”: LA OVEJA MERINAS NEGRA DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.

Martín Palomino, P. Gómez Calle, L. Serejo Proença, J. Ruiz Maestre, E. Fernández-García, JL.

Universidad Alfonso X el Sabio

Facultad de Ciencias de la Salud

Villanueva de la Cañada

GENOTIPADO DEL GEN DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA EN OVEJAS CALIFICADAS DE “EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”: LA OVEJA MERINAS NEGRA DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.

Martín Palomino, P

Laboratorio de diagnóstico veterinario ALJIBE SC. Cáceres, Extremadura España.
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Alfonso X El Sabio, Madrid, España.

Gómez Calle, L

Laboratorio de diagnóstico veterinario ALJIBE SC. Cáceres, Extremadura España.

Serejo Proença, J

Veterinario oficial. Câmara Municipal de Idanha-a-Nova, Portugal.

Ruiz Maestre, E

Laboratorio de diagnóstico veterinario ALJIBE SC. Cáceres, Extremadura España.
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Alfonso X El Sabio, Madrid, España. Área de genética y cría de animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, 10071 Cáceres, España.

Fernández-García, JL

Área de genética y cría de animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, 10071 Cáceres, España.

Dirección de correspondencia: Pedro Martín Palomino. Correo electrónico: pmartpal@uax.es

RESUMEN

La variedad merino negra, es una variedad de oveja merina emergente gracias a su lana de calidad fina. Sus rebaños se han criado en Portugal y España bajo diferentes criterios, incluyendo la selección de haplotipos de resistencia al scrapie. El objetivo de este estudio fue informar por primera vez en el ovino de raza merino negro, sobre la distribución de la frecuencia del haplotipo del gen de la proteína prión (PRNP) utilizando métodos de la secuenciación de ácidos nucleicos. En este estudio se analizaron 120 ovejas pertenecientes a cuatro rebaños aparentemente inconexos. Tres de ellos fueron de Portugal y uno de España, pero en este último se han seleccionado para aumentar los genotipos ARR / ARR de acuerdo a la normativa CE (Comisión Europea, 2003). El número de sitios de polimorfismo se extendió aquí desde tres posiciones (136, 154 y 171) hasta un mínimo de cinco, pues se agregaron al menos las posiciones 141 y 143. De esta forma, se puede analizar la susceptibilidad a la tembladera clásica y atípica. Hasta ocho haplotipos podrían ser informados en el merino negro, siendo los que se citan a continuación: ALHRR, ALHRQ, ALRRQ, ALHHQ, AFHRQ, ALHRH, VLHRQ y T112ALHRQ (este último fue un haplotipo aislado). Los resultados mostraron una alta diferenciación genética entre los rebaños debido a una distribución de frecuencia desequilibrada de los haplotipos, lo que sugiere un escaso flujo genético entre ellos en Portugal y nulo con el rebaño de España. Después de colapsar los haplotipos en tres posiciones (136, 154 y 171), el merino negro de Portugal mostró frecuencias de haplotipos similares respecto a los estudios precedentes, excepto para los haplotipos VRQ con mayor frecuencia en este estudio. El hallazgo de AFHRQ fue interesante porque se asoció a la tembladera atípica siendo los únicos casos declarados en Portugal de esta enfermedad. En conclusión, se informó de una gran riqueza en haplotipos en esta oveja, pero su distribución depende críticamente del lote estudiado. Esta riqueza genética permite analizar diferentes escenarios cuando se pretendan aplicar programas de mejora de resistencia al scrapie. De esta manera, la aplicación de un programa de cría para controlar la tembladera parece ser una tarea menos desafiante.

PALABRAS CLAVE: Ovejas merinas negras, tembladera; resistencia scrapie; haplotipos, diferenciación genética.

ABSTRACT

The black merino variety is an emerging merino sheep variety which it is appreciated due to the production of quality fine wool. Their flocks have been bred in Portugal and Spain but under different criteria including those related to the selection of scrapie resistance haplotypes. The main aim of this study was to report for the first time in that black merino sheep on the distribution of the haplotype frequency of the prion protein gene (PRNP) using nucleic acid sequencing methods. In this study, 120 sheep belonging to four apparently unrelated herds were analyzed. Three of them were from Portugal and other one from Spain, but in the latter they have been selected to increase the ARR / ARR genotypes according to EC (European Commission) regulations. The number of polymorphism sites was extended from three positions (136, 154 and 171) to a minimum of five, since positions 141 and 143 were added as relevant mutations. In this way, susceptibility to classical and atypical scrapie can be studied. Up to eight haplotypes could be reported in the black merino, being as follows: ALHRR, ALHRQ, ALRRQ, ALHHQ, AFHRQ, ALHRH, VLHRQ and T112ALHRQ (the latter was an isolated haplotype). The results showed a high genetic differentiation among flocks due to an unbalanced frequency distribution of the haplotypes, suggesting scarce genetic flow among them, both within Portugal as between Portugal and Spain. After collapsing the haplotypes into three positions (136, 154 and 171), the black merino from Portugal showed similar haplotype frequencies with respect to previous studies, except for the VRQ haplotypes more frequently in this study. The finding of AFHRQ was interesting because it was associated with atypical scrapie being the only cases declared in Portugal for this disease. In conclusion, a great wealth of haplotypes was reported in this sheep, but its distribution depends critically on the studied flock. This genetic richness allows us to analyze different scenarios in order to stablish improvement programs for scrapie resistance. In this way, the application of a breeding program to control scrapie appears to be a less challenging task.

KEY - WORDS: Black merino sheep; scrapie; scrapie resistance; haplotypes, genetic differentiation.

1. INTRODUCCION

Muchas razas de ovino y/o sus variedades se encuentran catalogadas como animales domésticos en peligro de extinción en el correspondiente catálogo del MAPAMA. Entre las treinta y cuatro razas en el contexto nacional, se encuentra la variedad negra de la raza merina. Esta variedad de merino negro es una oveja de lana fina. Sus rebaños se criaron en Portugal y España bajo diferentes criterios de cría, incluyendo los de selección para resistencia genética a la tembladera. Este hecho conduce a la diferenciación genética entre rebaños y distribución de las frecuencias de los haplotipos PRNP desequilibrada entre rebaños. Así, por ejemplo, el hallazgo de haplotipos AFHRQ en ovino merino negro de Portugal merece el calificativo de, *interesante*, debido a que recientemente se ha asociado con el prurigo lumbar atípico, siendo además el único tipo declarado en Portugal. Por ello, informar sobre la riqueza genética de haplotipos en los diferentes rebaños de esta raza, permite analizar diferentes escenarios ante la inminente implantación de planes de mejora, tendentes a erradicar cualquiera de los tipos científicamente reconocidos de esta enfermedad.

En relación con la tembladera, es el término más común aplicado a la encefalopatía espongiiforme transmisible (EET), que se produce naturalmente en pequeños rumiantes como la oveja y la cabra. Las EET están caracterizadas por la acumulación progresiva y fatal de proteína priónica asociada a la enfermedad (PrP^{sc}) en tejidos cerebral y linfoide. Descrita por primera vez en el Reino Unido alrededor del siglo XVIII (Comber et al., 1772)¹, la tembladera es reconocida como una enfermedad endémica no solo en la Unión Europea (UE) (Orge et al., 2004)² con posibles relaciones entre la tembladera en las ovejas y la EEB (Encefalopatía Espongiiforme de Bovino) en el ganado, sino también en casi todo el mundo, por ejemplo, Islandia (1878), Canadá (1938), Estados Unidos (1947), Australia (1952), Noruega (1958), India (1961), República de Sudáfrica (1966), Kenia (1970), Alemania (1973), Brasil (1978), Yemen (1979), Suecia (1988) (ver Yaman y Ün 2017)³.

Por un lado, aunque las fuentes o los vehículos de infección aún no se conocen bien, se ha demostrado la transmisión de la enfermedad incluso utilizando leche de ovejas afectadas de tembladera (Konold et al., 2013; Konold et al., 2016)^{4,5}. Por ello, las ovejas se consideran una fuente potencial de EET para bovinos y cabras (Spiropoulos et al., 2011)⁶.

Por otro lado, hay interacciones de la proteína priónica y el genotipo de la susceptibilidad a tembladera en ovejas. Hoy en día, se reconocen dos tipos de prurigo lumbar de ovejas, el scrapie clásico y el atípico (Nor 98) (EFSA, 2005)⁷. Así, ya desde principios de la década de 1990 se sabe que el patrón genético de resistencia a la tembladera clásica está relacionado, aunque no de forma exclusiva, con el genotipo respecto a posiciones concretas de la secuencia de la PRNP. Específicamente, el tipo clásico está predominantemente influido por polimorfismos en los codones 136 (alanina [A136] o valina [V136]), 154 (arginina [R154] o histidina [H154]) y 171 (glutamina [Q171], histidina [H171] o arginina [R171]), siendo el genotipo ARR/ARR relativamente de mayor resistencia y los genotipos VRQ/VRQ, ARQ/ARQ y VRQ/ARQ los de mediana hasta muy alta sensibilidad o susceptibles (Goldmann et al., 2008)⁸. Sin embargo, el hallazgo reciente del tipo de scrapie atípico (Benestad et al., 2003)⁹ se ha relacionado, aunque no de forma exclusiva, con polimorfismos en ovejas en el codón 141leucina [L141] o fenilalanina [F141]. Así, la EFSA (2005)⁷ extendía sus recomendaciones de vigilancia a la tembladera atípica ya que se ha informado en varios países europeos, incluidos Portugal (Orge et al., 2004)² y España (Acín et al., 2004)¹⁰.

De esta forma, se ha sugerido un refinamiento adicional de la implicación del codón L141F (Moum et al., 2005)¹¹ usando el genotipado, porque explica alrededor de la mitad de los casos atípicos (Konold et al., 2016)⁵. Curiosamente, la tembladera clásica y atípica difieren en la edad promedio para detectar animales enfermos, siendo los más tardíos los pertenecientes al último tipo (Fast y Groschup, 2013)¹².

Estudios recientes mostraron que el número de casos positivos en genotipos considerados clásicamente de bajo riesgo (genotipos que contienen ARR y AHQ) se han subestimado como capaces de desarrollar la enfermedad clínica; lo cual tienen implicaciones importantes para la vigilancia, el control de la enfermedad y la evaluación de pruebas diagnósticas (Tongue et al., 2008)¹³. Por consiguiente, las autoridades de vigilancia de la tembladera ovina, continúan en el siglo XXI, preocupadas por la posible epidemia oculta en las poblaciones ovinas europeas.

Todos estos razonamientos llevan a la Unión Europea (UE) a seguir desarrollando programas de mejoramiento dirigidos a aumentar la frecuencia de alelos resistentes en razas de todos los Estados miembros (Comisión Europea, 2003)¹⁴. Estos programas europeos se basan en cinco categorías de genotipos, desde altamente resistentes (R1) a altamente sensibles (R5); cuyos alelos ARR y VRQ se consideran altamente resistentes y susceptibles a la tembladera del tipo clásico, respectivamente (Hunter et al., 1997; Elsen et al., 1999; European Commission, 2003)^{15,16,14}. Sin embargo, poco se sabe en relación a los haplotipos más resistentes en la forma atípica y las posibles interacciones con aquellos de la forma clásica.

Respecto a los programas de mejoramiento que pretenden obtener poblaciones genéticamente resistentes a scrapie, no faltan las críticas en razón a que tales programas pueden reducir la variabilidad genética para la selección y conservación de la raza ovina en riesgo (Álvarez et al., 2007; Windig et al., 2007)^{17,18}. A pesar que se han valorado diferentes estrategias de selección en diferentes razas ovinas, para aumentar la resistencia al prurigo lumbar con costos mínimos en términos de pérdidas de variabilidad genética (Molina et al., 2006; Alfonso et al., 2006; Álvarez et al., 2007)^{19, 20,17}, se informó de resultados diferentes según la frecuencia inicial de los haplotipos dentro de las razas (Álvarez et al., 2009)²¹. Por lo tanto, las regulaciones europeas prevén que en razas en peligro de extinción se realice una implementación secuencial de estos programas de cría.

En otro orden, es necesario recordar que la historia de la raza merina está estrechamente vinculada a la historia y economía de España y Portugal, en la que la variedad merino negro fue objeto de eliminación progresiva vinculada a su color. Pero su resurgir obedece a que su lana es apreciada por su gran calidad en la fabricación de abrigos, mantas y alfombras. Hoy en día está calificada como raza autóctona en peligro de extinción debido al cruzamiento indiscriminado con razas no autóctonas (Esteban et al., 2003)²² tanto en España como en Portugal. El censo actual se ha estimado en aproximadamente 6.373 y 10.355 animales vivos, respectivamente, sugiriéndose cierta recuperación según las asociaciones de criadores.

Por todo lo anterior, investigar la variación de alelos, haplotipos y genotipos en la raza merina de la variedad negra y la comparación entre sus rebaños, es relevante en el programa de selección genética del prurigo lumbar.

2. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Muestras biológicas

Se tomaron 125 muestras de sangre de ovejas de la raza de variedad merino negro incluidas de cuatro rebaños para la evaluación genética de la secuencia del gen PRNP. En concreto, se utilizaron un rebaño de España (n = 36) y tres rebaños de animales no emparentados de merino negro portugués (n = 89), no controladas para resistencia genética a la tembladera y distribuidos de la siguiente manera:

- a) Re1 (n = 16)
- b) Re2 (n = 60)
- c) Re3 (n = 13)

El DNA se obtuvo de la sangre entera por el método “salt-out” (Fernández-García, 2012)²³ y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.2. Amplificación y secuenciación del gen PRNP.

Las amplificaciones del gen PRNP se realizaron mediante PCR convencional en un volumen de reacción de 15 µl usando como cebadores los descritos en Bossers et al., (1996)²⁴ y el siguiente protocolo de termociclado:

- a) un ciclo inicial de 7 minutos a 95°C
- b) 35 ciclos de 0,5 minutos a 95°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C
- c) un ciclo final de extensión durante 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se controlaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con colorante de geles SybrTM-SAFE (InvitrogenTM) y visualización en un transiluminador UV de longitud de onda larga. La secuenciación del gen para determinar los polimorfismos presentes y establecer los haplotipos y el genotipado de cada individuo, se realizó mediante electroforesis capilar en un Analizador Genético 3130xl (Applied Biosystems). Para ello fue necesario preparar las siguientes etapas:

- a) Purificar con ExoSap-IT (Thermo Scientific TM) los productos de PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante
- b) Secuenciar ambas hebras del producto de PCR purificado usando el correspondiente cebador y el kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems),
- c) Purificar los productos de secuenciación usando el método recomendado por Applied Biosystems
- d) Leer el resultado mediante electroforesis capilar en el Analizador Genético 3130xl (Applied Biosystems) y el programa Sequencing Analysis ver 5.1 bajo licencia de Applied Biosystems .

2.3. Determinación de haplotipos.

Las secuencias se redujeron a haplotipos después de deducirse aquellos animales homocigóticos cuando fue posible. Los sitios polimórficos se presentaron como grupos de aminoácidos de acuerdo al orden en la proteína de sus codones como sigue: A136V, L141F, H143R, R154H y Q171R o H, pero haciendo coincidir la primera letra con el nucleótido atribuido al tipo silvestre o SNP_w (Polimorfismo de un Solo Nucleótido, w = tipo silvestre). Los genotipos se reconstruyeron usando las combinaciones por pares de los códigos de haplotipos individuales deducidos como se describió anteriormente y cuyo resultado permitió establecer el genotipo como se muestra a continuación: ALHRQ/AFHRQ.

2.4. Análisis genético poblacional

Se utilizó el programa GenePop 4.2 (Rousset et al., 2008)²⁵, versión “On Line” con objeto de evaluar las desviaciones de los equilibrios de Hardy-Weinberg (HWE) (MCM 1000 iteraciones), las frecuencias alélicas, homocigosis observadas (H_o) y heterocigosis esperada (H_e) por países (España y Portugal) y rebaños. Los valores de P se calcularon mediante el método de Fisher. Además, la significación de la diferenciación genética para cada par de rebaños se estimó utilizando la prueba G exacta.

2.5. Declaraciones Éticas

Los animales de este estudio fueron usados para obtener muestras de sangre por venipunción, realizada con motivo de la campaña sanitaria oficial.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de polimorfismo y haplotipos.

El segmento de la secuencia de la PRNP obtenido consistió finalmente en una porción de 413 pb que abarca del nucleótido 215 al 626 de ARNm completo. Este resultado se verificó usando la secuencia del GenBank con número de acceso N° KF830262. Los polimorfismos de PRNP en los codones 136, 154 y 171 relacionados con la tembladera clásica, se han identificado con precisión usando la secuenciación en todos los rebaños. No obstante, los polimorfismos en los codones 112, 141 y 143 pueden informarse simultáneamente utilizando este método, aunque algunos de ellos se han asociado a la tembladera atípica (sitio 141) y clásica (sitio 143) (Acín et al., 2004; Lühken et al., 2007)^{10,26}. De acuerdo con nuestros resultados, se encontraron hasta seis SNP que implican cambios de aminoácidos de la siguiente manera: M112T, A136V, L141F, H143R, R154H y Q171R o H.

Además, las sustituciones en la posición de aminoácido 141 (transición T → C, cambio de aminoácido M a T) solo ocurrió en merino negro portugués, 143 (transición A → G, cambio de aminoácido H a R) y 112 (transición T → C, cambio de aminoácido M a T). Todas estas mutaciones se describieron por primera vez en la raza merino negra. El sitio 143 tenía una frecuencia de 6.5% a 12.4, en seleccionados (merino negro español) y no seleccionados (merino negro portugués), respectivamente, y el sitio 112 que solo apareció una vez en heterocigosis (frecuencia = 0.42%) causante de un haplotipo raro (T₁₁₂ALHRQ) en ovino portugués. Las frecuencias (expresadas como proporción) de los haplotipos, excepto aquel que parece una sola vez, se investigaron en los siete haplotipos observados en las ovejas merinas negras (es decir, ALHRR, ALHRQ, ALRRQ, ALHHQ, AFHRQ, ALHRH y VLHRQ) por localidades y rebaños.

Después de analizar el conjunto de datos considerando cuatro rebaños (uno en España y tres en Portugal), los haplotipos ALHRR, ALHRQ y ALRRQ estuvieron presentes en todos los rebaños. Las frecuencias ALHRR fueron diferentes entre todos ellos, donde fue más notable pero obvia la mayor frecuencia de este haplotipo en el lote español seleccionado (83,9%) seguido del Re2 (41,7%), sugiriendo que es factible la selección a favor de haplotipos resistentes a tembladera clásica en merino negro de Portugal. También debe destacarse que el haplotipo más frecuente en cada rebaño fue diferente. Especialmente, ALHRQ, ALHRR y ALRRQ alcanzan la frecuencia más alta en Re1, Re2 y Re3, respectivamente. El haplotipo VLHRQ no estuvo presente en la población española, pero se mantuvo a un nivel inferior a ¼ de la frecuencia global en las ovejas portuguesas. El resto de los haplotipos no superaron la frecuencia 0,2 en ningún momento y algunos fueron exclusivos del lote, es decir, AFHRQ en Re2.

3.2. Frecuencias genotípicas

Los resultados se obtuvieron para 125 animales y se presentan las correspondientes frecuencias genotípicas por rebaños. La prueba de HWE no indicó una desviación significativa de las proporciones de equilibrio de la frecuencia genotípica dentro de los rebaños (todos los valores $P > 0,05$), sugiriendo una distribución aleatoria de genotipos dentro de rebaños. Sin embargo, se obtuvo diferenciación genotípica altamente significativa en todas las comparaciones por pares entre rebaños (todos los valores $P < 0.001$), ello puede atribuirse a un flujo genético escaso entre rebaños con independencia de su país de procedencia. Por lo anterior, se puede afirmar que las conexiones entre rebaños de esta raza podrían ser en algunos casos muy débiles, incluso a escala geográfica fina.

Además, en el ovino negro de Portugal predominaron diferentes genotipos dependiendo del rebaño considerado (Figura 1). De tal forma que para Re1, Re2 y Re3 dominan los genotipos ALHRQ / VLHRQ, ALHRR / VLHRQ y ALRRQ / ALRRQ, respectivamente (Figura 1). El genotipo más resistente (ALHRR / ALHRR) no se encontró en Re3 y la frecuencia más alta en rebaños de Portugal ocurrió en Re2. Por consiguiente, en base a las frecuencias genotípicas se pudieron identificar que los rebaños de ovino merino negro de Portugal constituyen, respecto a los genotipos de scrapie, grupos genéticos significativamente aislados dentro de esta raza.

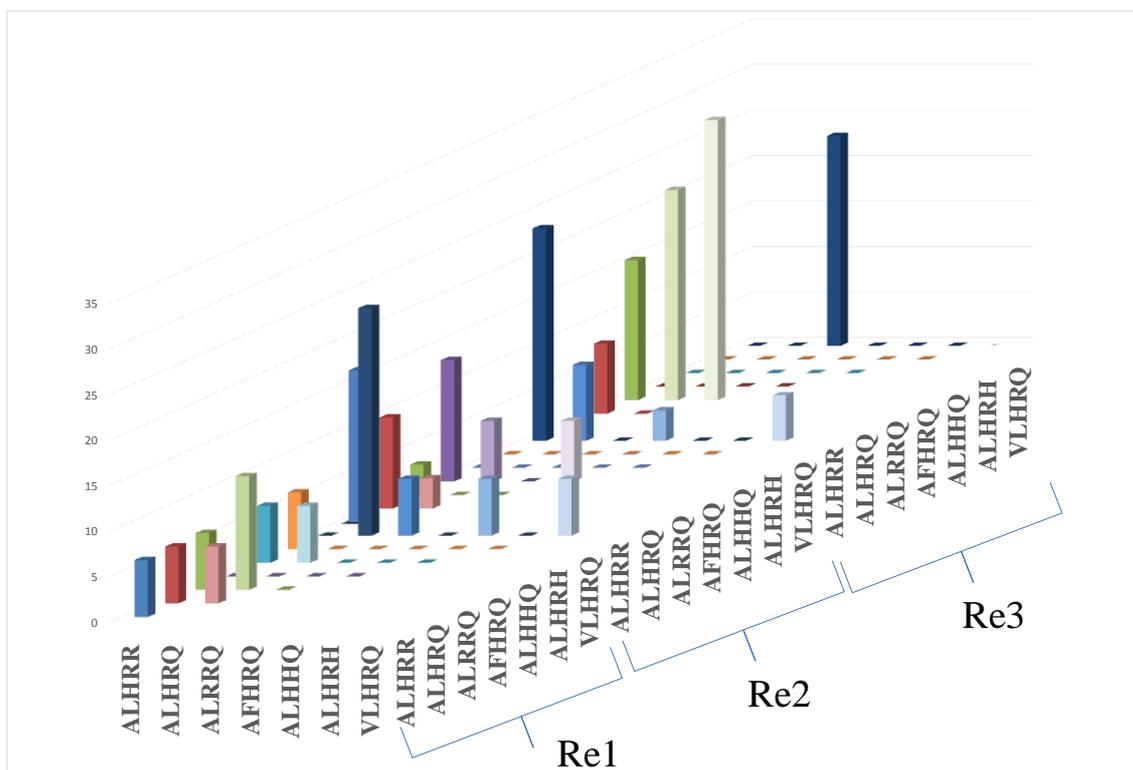


Figura 1. Diagrama de dispersión de las frecuencias de genotipo en cada explotación de Portugal.

4. DISCUSIÓN

Aunque muchas de las investigaciones se han enfocado solo en tres *loci* polimórficos de la PRNP, específicamente en A136V, R154H y Q171R / H (A/V, R/H, Q/R/H; (Hunter, 1997)¹⁵, se han informado de otras variantes alélicas, en relación a estos tres *loci* polimórficos. Estas variantes incluyen las siguientes:

- a) VRR (Kutzer et al., 2002)²⁷
- b) TRR, TRQ, TRH (Billinis et al., 2004, Meydan et al., 2012)^{28,29}
- c) ARK (Guo et al., 2003; Billinis et al., 2004, Meydan et al., 2012)^{30, 28,29}.

Además, también se han informado de otras mutaciones que afectan a otros *loci* que también son relevantes en el contexto sanitario del scrapie o tembladera ovina como la mutación L141F (Fast y Groschup, 2013, Acín et al., 2004, Konold et al., 2016)^{12, 10,5} y la mutación H143R (Stephens et al., 1998, Acín et al., 2004)^{31,10}. Éstas dos últimas adquieren la calificación de epidemiológicamente importantes (ver Fast y Groschup, 2013 para más detalles)¹² como consecuencia de mostrar un patrón epidemiológico más complejo (Benestad et al., 2003)⁹ y probablemente vinculado a su mayor difusión en Europa (Benestad et al. 2003; Acín et al. 2004, Webb et al., 2009; este estudio)^{9, 10,32} no descartándose otros ovinos fuera de Europa (Kittelberger et al., 2010)³³.

A pesar del gran número de resultados publicados sobre resistencia genética a la tembladera en diferentes razas ovinos y países, fueron cinco los haplotipos (ARR, ARQ, VRQ, ARH y AHQ) comúnmente considerados como asociados a la enfermedad (Hunter et al., 1997)¹⁵. Los genotipos que surgen de la combinación de estos haplotipos se han agrupado en cinco niveles decrecientes respecto al riesgo (R1 a R5), donde R1 se refiere al riesgo más bajo y R5 a mayor riesgo. Sin embargo, en esta clasificación solo se hace referencia a la tembladera clásica y no se tiene en cuenta los haplotipos asociados a la forma atípica de esta enfermedad.

En relación a los datos de frecuencia de haplotipos en ovino negro, los haplotipos ARR, ARQ, ARH y AHQ (ALHRR, ALHRH, ALHHQ en este estudio) mostraron una frecuencia similar a los publicados por Gama et al. (2006)³⁴ en merino negro de Portugal, aunque, a diferencia de lo observado en este estudio, no informaron de la existencia de diferencias significativas entre rebaños. En cuanto a las variantes de haplotipos AFHRQ y ALRRQ, han sido informadas aquí por primera vez, señalando así una peculiaridad de la raza de ovejas nativas de lana fina, comercialmente interesante.

La variante ARR, representada aquí por el haplotipo ALHRR, estuvo presente en todos los rebaños estudiados, aunque en el rebaño español fue dos veces mayor que el mejor rebaño portugués (Re2), pero esto se justifica pues el merino negro español está inmerso en un proceso de continua selección en favor de haplotipos ARR.

Si atendemos a los resultados de frecuencia de los haplotipos extremos respecto a su clasificación de resistencia, según Gama et al. (2006)³⁴, la frecuencia del haplotipo ARR debe ser de alrededor del 35.6% en Portugal, lo cual fue similar a nuestros resultados, pero el haplotipo VRQ (también VLHRQ) fue dos veces más alto que los informado en Gama et al. (2006)³⁴; ello sugiere la importancia de estudiar los rebaños de forma separada, ya que como demostramos aquí, la distribución de frecuencias depende críticamente del rebaño estudiado.

Con respecto a los haplotipos AFHRQ y ALRRQ, debemos ser conscientes que, si no se analizan específicamente, ellos permanecerán ocultos como haplotipos ARQ, siendo obvia su ausencia en aquellos informes donde solo se identifiquen los sitios polimórficos en 136, 154, 171. Después de reagrupar los hapotipos AFHRQ, ALRRQ y ALHRQ como uno único, al tener en común los sitios ARQ, la frecuencia del grupo fue levemente menor (45%) a los que informaron en Gama et al. (2006)³⁴ (52%), pero debemos destacar que AFHRQ representa casi un tercio de los ARQ (27,6%) y todos los ovinos portadores se encontraban en el Re2. Hechos como este deberían ser considerados de relevancia epidemiológica, pues el perfil de frecuencia de cada rebaño debe incluirse como una medida de su factor de riesgo a cada una de las dos formas de scrapie, siendo razonable integrar esta información, en las estrategias de vigilancia basadas en el riesgo para la identificación de rebaños "en riesgo pero asociándolas, además, a las distintas variantes de tembladera" (Tongue et al., 2009)³⁵.

Otros haplotipos como los AHQ y ARH tienen generalmente frecuencias muy bajas (Gama et al., 2006; este estudio)³⁴, siendo una regla general en las razas de la Península Ibérica (Acín et al., 2004, Gama et al., 2006)^{10,34}.

Se encontraron frecuencias de haplotipos VRQ (VLHRQ aquí) ligeramente superiores al 20% en merino negro de Portugal, dos veces más alto que en Gama et al. (2006)³⁴. Esto contrastó con el resultado de estos ovinos en España donde no se encontró ningún animal portador de VRQ. Un resultado tan poco favorable en los ovinos merinos negros de Portugal debe ser notificado cuando se pretende realizar un control genético en las granjas de EET (EC 2007)¹⁴, pues cualquier plan de erradicación de los haplotipos VRQ debería implementarse cuidadosamente para evitar pérdidas irreversibles de variabilidad genética (Gama et al., 2006, Álvarez et al., 2009)^{34,21}. Además, lo anterior adquiere un grado adicional de relevancia como consecuencia de la fuerte diferencia genotípica entre rebaños que sugiere una falta de flujo genético entre los rebaños y, por ello, las actuaciones de erradicación de ciertos genotipos podría tener consecuencias sobre la pérdida de variabilidad muy diferente según el rebaño considerado. Esta escasa conexión entre los rebaños de merinos negros ha sido advertido por los programas de mejoramiento en Portugal (Programa de Conservación y Melhoramento Genético Animal, DGV, Ministerio de Agricultura, Desarrollo Rural e das Pescas). Curiosamente, la erradicación de los haplotipos VRQ en la raza merino negra española se realizó a partir de 2006 y aunque no condujo a sus rebaños a pérdida de variabilidad genética no se sabe si afectó a la resistencia frente al tipo de scrapie atípico.

Estudios recientes (Moum et al., 2005)¹¹ respaldaron un bajo riesgo de tembladera atípica para el genotipo ALHRQ /ALHRQ pero sin conferir una resistencia absoluta (Lühken et al., 2007)²⁶. Esto apoyaría nuestro método de trabajo, ya que nos permitió segregar los alelos ARQ en ALHRQ, AFHRQ y ALRRQ. Recientemente, debido a la vigilancia obligatoria de la tembladera en los Estados miembros de la UE (EM), varios estados miembros han identificado la forma atípica de tembladera incluyendo Portugal (detalles en Tongue et al., 2008)¹³. Aunque Orge et al. (2004)² no encontraron relación entre genotipos específicos y la tembladera atípica en Portugal, los ensayos experimentales sugirieron un papel importante para la mutación L141F (Konold et al., 2016)⁵ que está claramente relacionado con el haplotipo ARQ. Esta es una razón por la cual el haplotipo AFHRQ (27.6% entre los ARQ), encontrado en merino negro podría ser considerado relevante para evitar subestimar el riesgo (Tongue et al., 2008)¹³. Incluso más, como se sugiere en Tongue et al. (2008)¹³, en situaciones de alta diferenciación genotípica entre rebaños, se hace necesario analizar las cuestiones epidemiológicas a nivel de rebaño, principalmente si es deseable la conexión genética entre ellos en un contexto de los programas de mejora/conservación. De acuerdo con Gama et al. (2006)³⁴, debe subrayarse que la mayoría de las razas nativas de ovejas en Portugal se consideran en peligro, habiéndose realizado esfuerzos en los últimos años para mantenerlas. Los programas europeos de cría selectiva contra la tembladera clásica en ovejas (Comisión Europea, 2003)¹⁴ implementaron políticas de cría tendentes, por un lado, a incrementar la resistencia natural al prurigo lumbar atribuible a los animales de genotipos ARR/ARR, pero susceptible al scrapie atípico y, por otro lado, a reducir los VRQ/WRQ susceptible a tembladera clásica pero resistente al scrapie atípico. Esto constituye un nuevo desafío para la propuesta de selección, pero ahora con un enfoque global de resistencia a la tembladera clásica y atípica. Por tanto, se deben estudiar cuidadosamente todos los posibles escenarios antes del comienzo de dicho programa selectivo, para evitar problemas en los planes de conservación actuales en merino negro (Gama et al., 2006)³⁴. Más aún, si somos conscientes que existen evidencia de paradójica incertidumbre respecto a las diferentes formas de la tembladera, y su relación con el genotipo.

Quizás por ello, se ha propuesto optimizar el apareamiento de tal manera que el riesgo de producir genotipos susceptibles se minimice mediante la construcción de una matriz de riesgos que mida el nivel medio de susceptibilidad (Baylis et al., 2004)³⁶ de la descendencia(http://hccmpw.org.uk/publications/farming_and_industry_development/research_and_development) y obtener de esta manera una solución óptima (Álvarez et al., 2009)²¹.

5. CONCLUSIONES

- a) Informamos de una gran riqueza en haplotipos en esta raza de ovejas nativas de Portugal, aunque la distribución de la variación genética depende fundamentalmente del rebaño analizado
- b) Por el contrario, en rebaños seleccionados se ha producido la fijación casi completa de genotipos ARR/ARR, quizás quedando estos últimos desprotegidos a otras formas de scrapie como p.e. a la forma atípica.
- c) Disponer de una gran riqueza genética permitiría analizar diferentes escenarios antes que los programas de mejoramiento tomaran un camino definitivo.
- d) Se propone una mejor forma de realizar estudios del scrapie mediante genotipado exhaustivo basado en secuencias como vía fundamental de evaluar las propiedades de los nuevos haplotipos de la PRNP sobre la resistencia tanto a la tembladera atípica como clásica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Comber, T. 1772. Real Improvements in Agriculture, First edition eds. W. Nicoll, London Detwiler, L.A. 1992. Scrapie. *Revue scientifique et technique*, 11:491-537.
2. Orge, L; Galo, A; Machado, C; Lima, C; Ochoa, C; Silva, J; Ramos, M and Simas, JP. 2004. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *The Journal of General Virology*, 85, 3487-3491.
3. Yaman, Y and Ün, C. 2017. Genetic Resistance to Prion Diseases. In: Yusuf Tutar (ed.). *Prion - An Overview*. INTECH, Chapters published March 08, 2017 under CC BY 3.0 license. DOI: 10.5772/63289.
4. Konold, T; Moore, SJ; Bellworthy, SJ; Terry, LA; Thorne, L; Ramsay, A, Salguero, FJ; Simmons, MM and Simmons, HA. 2013. Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Veterinary research*,9(1):99.
5. Konold, T; Thorne, L; Simmons, HA; Hawkins, SA; Simmons, MM and González, L. 2016. Evidence of scrapie transmission to sheep via goat milk. *BMC Veterinary research*.12, 208-218.
6. Spiropoulos, J; Lockey, R; Sallis, RE; Terry, LA; Thorne, L; Holder, TM; Beck, KE and Simmons, MM. 2011. Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerging infectious diseases*. 17(12), 2253-61.
7. EFSA recommends continuation of EU sheep breeding programme to reduce risk of scrapie and BSE. 2005.
8. Goldmann, W. 2008. PrP genetics in ruminant transmissible spongiforme encephalopathies. *Veterinary research*,39(4):30.

9. Benestad, SL; Sarradin, P; Thu, B; Schönheit, J; Tranulis, MA and Bratberg, B. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98. *The Veterinary Record*, 153, 202-208.
10. Acín, C; Martin-Burriel, I; Goldmann, W; Lyahyai, J, Monzon, M; Bolea, R; Smith, A; Rodella, C; Badiola, JJ and Zaragoza, P. 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *The Journal General of Virology*, 85, 2103–2110.
11. Moum, T; Olsaker, I; Hopp, P; Moldal, T; Valheim, M; Moum, T and Benestad SL. 2005. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *The Journal of General Virology*, 86(1), 231-35.
12. Fast, C and Groschup, MH. 2013. Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. In: Zou, WQ, Gambetti, P (eds). *Prions and Diseases*. Springer, New York, NY.
13. Tongue, SC; Wilesmith, JW; Nash, J; Kossaibati, M and Ryan, J. 2008. The importance of the PrP genotype in active surveillance for ovine scrapie. *Epidemiology and Infection*, 136(5), 703-712.
14. European Commission 2003. Commission Decision of 13 February 2003 Laying Down Minimum Requirements for the Establishment of Breeding Programmes for Resistance to Transmissible Spongiform Encephalopathies in Sheep (2003/100/EC).
15. Hunter, N. 1997. Molecular biology and genetics of scrapie in sheep. In: Piper L, Ruvinsky A (Eds.). *The Genetics of Sheep*. CAB International.
16. Elsen, JM ; Amigues, Y ; Schelcher, F ; Ducrocq, V ; Androletti, O ; Eychenne, F ; Khang, JV ; Poivey, JP ; Lantier, F and Laplanche, JP. 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of virology*, 144, 431-445.
17. Álvarez, I, Royo, LJ; Gutiérrez, JP; Fernández, I; Arranz, JJ and Goyache, F. 2007. Genetic diversity loss due to selection for scrapie resistance in the rare Spanish Xalda sheep breed. *Livestock Science*, 111, 204-212.
18. Windig, JJ; Meuleman, H and Kaal, L. 2007. Selection for scrapie resistance and simultaneous restriction of inbreeding in the rare sheep breed. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 161-171.
19. Molina, A; Juárez, M and Rodero, A. 2006. Merino sheep breed's genetic resistance to scrapie: genetic structure and comparison of five eradication strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 75, 239-250.
20. Alfonso, L; Parada, A; Legarra, A; Ugarte, E and Arana, A. 2006. Effects on genetic variability of selection against scrapie sensitivity in the Latxa black-faced sheep. *Genetics Selection Evolution*, 38, 495-511.
21. Álvarez, I; Gutiérrez, JP; Royo, LJ; Fernández, I and Goyache, F. 2009. Quantifying diversity losses due to selection for scrapie resistance in three endangered Spanish sheep breeds using microsatellite information. *Preventive Veterinary Medicine*, 91(2-4):172-178.
22. Esteban, C. 2003. Razas ganaderas españolas. II. Ovinas. Madrid, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
23. Fernández-García, JL 2012. The endangered *Dama dama mesopotamica*: genetic variability, allelic loss and hybridization signals. *Contributions to zoology*, 81, 223-233.

24. Bossers, A; Bram, E; Schreuder, C; Muileman, H; Peter, B; Belt, G and Marl A. Smits.1996. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 77, 2669-2673.
25. Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
26. Lühken, G; Buschmann, A; Brandt, H, Eiden, M and Groschup, M. 2007. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Veterinary research*, 38 (1), 65-80.
27. Kutzer, T; Pfeiffer, I and Breing. B. 2002. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 119, 201-208.
28. Billinis, C; Psychas, V; Leontides, L; Spyrou, V; Argyroudis, S; Vlemmas, I, Leontides, S, Sklaviadis, T and Papadopoulou. 2004. Prion protein polymorphisms in healthy and scrapie affected sheep in Greece. *The Journal of General Virology*, 85, 547-554.
29. Meydan, H; Yüceer, B; Degirmenci, R; Özkan, M M and Yildiz, MA. 2012. Prion protein gene polymorphism and genetic risk evaluation for scrapie in all Turkish native sheep breeds. *Virus Genes*, 45, 169-175.
30. Guo, X; Kupfer, DM; Fitch, GQ; Roe, BA and De Silva, U. 2003. Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *Animal Genetics*, 34, 303-305.
31. Stephens, A; Wansg, S; Holyoak, GR; Timofeevskaja, O; Shay, TL; Vernon, W; Ellis, S; Beever, J and Cockett, N. 1998. Characterization of the Prion Protein (PrP) Gene in Ten Breeds of Sheep. *Proceedings of the Plant & Animal Genome VI Conference*, 18-22 January 1998.
32. Webb, PR; Powell, L; Denyer, M; Marsh, S; Weaver, C; Simmons, MM; Johns, E; Sheehan, J; Horsfield, P and other authors. 2009. A retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 21, 826-829.
33. Kittelberger, R; Chaplin, MJ; Simmons, MM; Ramirez-Villaescusa, A; McIntyre, L; MacDiarmid, SC; Hannah, MJ; Jenner, J; Bueno, R; Bayliss, D; Black, H; Pigott, CJ and O'Keefe, JS. 2010. Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 863-875.
34. Gama, LT; Carolino, MI; Santos-Silva, MF; Pimenta, JA and Costa, MS. 2006. Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. *Livestock Science*, 99, 175-184.
35. Tongue, SC; Pfeiffer, DU; Shearn, PD and Wilesmith, JW. 2009. PrP genotype: A flock-level risk factor for scrapie? *Preventive Veterinary Medicine*, 92, 309-323.
36. Baylis, M; Chihota, C; Stevenson, E; Goldmann, W; Smith, A; Sivam, K; [Tongue, S](#) and [Graveno, MB](#). 2004. Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *The Journal of General Virology*, 85, 2735-2740.

7. AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado en la Universidad Alfonso X El Sabio mediante fondos aportados por la Fundación Banco Santander (España).