ITEA (2004), Vol. **100A N.° 2,** 81-87

SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL SCRAPIE EN LAS VARIEDADES BLANCA Y NEGRA DE LA RAZA OVINA MANCHEGA

J.A. Bouzada*,[1], J. Luque*, M.O. Vega*, M.E. Donado-Mazarrón*, R. Gallego, M.D. Pérez-Guzmán***

* CERSYRA Consejería de Agricultura, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Avda. del Vino, 6, 13300 Valdepeñas (Ciudad Real), Spain.

** AGRAMA Ctra. Madrid s/n 02080 Albacete, lpcersyra@jccm.es • crazas@jccm.es

RESUMEN

El scrapie es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a ovejas y cabras. En ovinos, el genotipo del gen PrP determina la mayor o menor resistencia de los animales a padecer la enfermedad. Esta diferente resistencia está especialmente influenciada por los codones 136, 154 y 171. El CERSYRA de Valdepeñas ha iniciado el genotipado de estas tres posiciones polimórficas del gen PrP en los animales del esquema de selección de la raza ovina Manchega (ESROM) para, una vez conocida la situación general en la que se encuentra las dos variedades de esta raza, Blanca y Negra, diseñar las estrategias más adecuadas para mejorar la resistencia genética a esta enfermedad.

Palabras clave: Polimorfismo molecular, SNPs, PrP.

SUMMARY

GENETIC SUSCEPTIBILITY TO SCRAPIE IN THE BLACK AND WHITE MANCHEGO SHEEP BREED

The scrapie is a neuro-degenerative disease that affects goats and sheep. In sheeps, the genetype of the gene PrP determines the animals' highest and lowest resistance of suffering from the disease. This different resistance is specially influenced by the codons 136, 154, and 171. The CERSYRA of Valdepeñas has initiated the genetic analysis of these three polymorphic positions in the PrP gene in the selection and breeding program of animals belonging to the Manchega race (ESROM) of sheep in order to design, once it is known the general situation of the two varieties of this race, White and Black, the most adequate strategies to improve the genetic resistance to this disease.

Key words: Molecular polymorphism, SNPs, PrP.

1. Autor al que debe dirigirse la correspondencia.

Introducción

La tembladera o scrapie es una encefalopatía espongiforme transmisible (EET) descrita por primera vez hace más de 250 años, que afecta a ovejas y cabras. La sintomatología incluye prurito, hiperexcitabilidad, temblores, falta de coordinación en la marcha para acabar en parálisis y muerte del individuo. El desarrollo de la enfermedad se caracteriza por sus largos periodos de incubación y la degeneración progresiva del sistema nervioso central, que finalmente adquiere un aspecto espongiforme y acaba con la muerte del animal.

En ovinos, influye decisivamente en el padecimiento de esta enfermedad el genotipo para un gen denominado PrP que se sitúa en el cromosoma 13 (CASTIGLIONI *et al.*, 1998) y codifica una proteína de 256 aminoácidos. En el cuadro 1 se describen las posiciones polimórficas detectadas para este gen así como los cambios aminoacídicos que en ellos se podrían producir (LAPLANCHE *et al.*, 1993; CLOUSCARD *et al.*, 1995; BELT *et al.*, 1995; BOSSERS *et al.*, 1996; HUNTER *et al.*, 1996; TORISSON *et al.*, 1998; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999).

De todos ellos, los polimorfismos detectados en los codones 136, 154 y 171 parecen estar directamente relacionados con la distinta susceptibilidad a la hora de padecer la enfermedad en diferentes razas ovinas. Se encuentra que existen alelos asociados a resistencia, ARR y AHQ, mientras que otros, ARQ, ARH y VRQ se asocian a sensibilidad a padecer esta patología. En general, los animales ARR/ARR son los más resistentes y los VRQ/VRQ son los más sensibles a la enfermedad (DAWSON *et al.*, 1998).

A raíz de estos datos la Unión Europea ha establecido normas con respecto al genotipado del gen PrP (Decisión 2002/1003/CE) y la implementación de los datos de resistencia a las EET en los programas de cría de razas puras de ovinos y caprinos (Decisión 2003/100/CE). Estas decisiones condicionan muy fuertemente el desarrollo de los programas de selección que se están llevando a cabo en estos momentos y la resistencia a esta enfermedad será un nuevo parámetro que añadido al valor genético de los animales (en el caso de la raza Manchega, producción de leche) se debe tener en cuenta a la hora de elegir los reproductores. El CERSY-

Cuadro 1. Polimorfismos alélicos detectados en el gen PrP. Se indica el codón afectado así como el cambio aminoacídico que tiene lugar. Los aminoácidos se indican según el código de una letra

Table 1. Allelic polymorphism detected in the PrP gene. It is showed implicated codon and amino acidic change. Amino acid are indicated with a key code

Codón	112	136	137	138	141	151	154	171	176	211
Variantes alélicas	M T	A T V	M T	S F	L F	R C	R H	Q R H K	N K	R Q

A = Alanina, C = Cisteina, F = Fenilalanina, H = Histidina, K = Lisina, L = Leucina, M = Metionina, N = Asparragina, Q = Glutamina, R = Arginina, S = Serina, T = Tirosina, V = Valina.

RA de Valdepeñas, como responsable del esquema de selección de la raza ovina Manchega variedad Blanca y Negra, se ha propuesto como objetivo prioritario disponer cuanto antes del genotipo de los animales implicados de cara a mejorar la resistencia genética de la raza a esta patología descartando los animales hipersensibles y dando prioridad a los animales de los genotipos resistentes.

Material y métodos

Material Biológico: Se han genotipado 2.590 animales pertenecientes a la Asociación de Ganaderos de la raza ovina Manchega (AGRAMA), 421 hembras y 2.169 machos (todos los sementales de los que dispone la asociación junto con animales candidato a serlo en el futuro), distribuidos en un total de 70 ganaderías (65 de la variedad Blanca y 5 de la Negra). La distribución de los animales fue la siguiente: 2.492 (343 hembras y 2.149 machos) fueron de la variedad Blanca y 98 (78 hembras y 20 machos) pertenecieron a la variedad Negra. Las muestras utilizadas consistieron exclusivamente en 5 ml de sangre usando EDTA como anticoagulante.

Extracción de ADN: Se ha realizado según el protocolo de KAWASAKI, (1990).

Genotipado: Se ha llevado a cabo mediante la técnica denominada *"primer extension analysis"* (Syvanen, 1999; Sauer *et al.*, 2000) usando el *ABI PRISM*^{R} *SNaPshot*^{TM}*Multiplex Kit* de *Applied Biosystems,* lo que ha permitido analizar, de forma simultánea, las 4 posiciones polimórficas que condicionan los 3 codones citados. Las reacciones de PCR, defosforilación y SnaPshot se realizaron según los protocolos que acompañan al kit. Los resultados fueron finalmente visualizados mediante una electroforesis capilar en un *3100-Avant Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems* y la posterior lectura se ha llevado a cabo usando los software *Genotyper*^{R} *Software version 3.7* o el *GeneScan*^{R} *Analysis Software versión 3.7.1* con los que viene equipado este aparato.

Estudio Poblacional: Se ha realizado mediante el programa Genepop versión 3.2a, actualizada al año 2000 (RAYMOND y ROUSSET, 1995).

Simulaciones: Para establecer una estrategia de cara a mejorar la resistencia genética a esta enfermedad en la raza Manchega hemos simulado teóricamente (datos no mostrados) varias posibilidades tomando como punto de partida la situación actual. Hemos planteado, durante 5 generaciones, varias posibilidades de selección: a) seleccionar solo sobre machos, b) seleccionar con el mismo criterio sobre machos y hembras. Dentro de estas dos posibilidades se ha estudiado: 1) eliminar los portadores de algún alelo VRQ, 2) eliminar los portadores de VRQ y los ARQ/ARQ, 3) eliminar los portadores de VRQ y utilizar solo animales del grupo que lleven algún alelo ARR y AHR, 4) eliminar los portadores de VRQ, y utilizar solo animales R1, R2, y portadores de algún alelo ARR y 5) utilizar solo animales R1 y R2. 6) esquema secuencial usando en las dos primeras generaciones el tipo 2 solo en machos y luego el 3 en machos y hembras en las siguientes 3 generaciones. En el estudio hemos valorado tanto las frecuencias de los alelos resistentes que se conseguían alcanzar como el coste en animales que era necesario apartar del esquema de selección con la consiguiente perdida de valor genético y aumento de consanguinidad que podría conllevar.

Resultados y discusión

En el cuadro 2 se muestran las frecuencias de los 15 genotipos que hasta el momento se han descrito en la proteína PrP ovina, de los cuales, sólo se han detectado 12 (no se han encontrado los genotipos VRQ/VRQ, ARH/ARH y ARH/VRQ) después de haber analizado 2590 animales. Como es habitual en la mayoría de las razas ovinas, el genotipo más abundante es el ARQ/ARQ y, en general, todos aquellos genotipos que incluyen el alelo ARQ, aunque esta abundancia es especialmente alta en las dos variedades de la raza Manchega. En el cuadro 3 se presentan los frecuencias para cada uno de los cinco alelos detectados. El alelo ARQ es muy abundante en ambas variedades. El siguiente alelo más frecuente es el ARR. El alelo hipersensible VRQ también se ha detectado, aunque a muy baja frecuencia. Este alelo, sólo ha aparecido en machos, tanto de la variedad Blanca como de la Negra pero nunca en hembras, esto puede ser debido al número tan diferente de animales analizado en ambos sexos y que los animales hembra pertenecen únicamente a dos ganaderías, mientras que los machos están distribuidos por 68 ganaderías. Otro resultado que se observa es que el alelo AHQ sólo ha aparecido en animales de la variedad Blanca pero nunca en los de la negra y, a pesar de que se han analizado muchos más animales de la variedad Blanca, de acuerdo con la frecuencia alélica obtenida si debería haberse observado algún animal de la variedad Negra con este alelo.

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas en la variedad Blanca y Negra de la raza ovina Manchega. En cada una de las variedades se presentan los datos totales y separados por sexos
Table 2. Genotypic frequencies in the Black and Red Manchego sheep breed. Total data and data by sex are showed in both breeds

	Frecuencias Genotípicas					
	Manchega Blanca			Manchega Negra		
	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras
AHQ/AHQ	0,0016	0,0019	0	0	0	0
AHQ/ARH	0,0004	0,0005	0	0	0	0
AHQ/VRQ	0,0004	0,0005	0	0	0	0
ARH/ARH	0	0	0	0	0	0
ARH/VRQ	0	0	0	0	0	0
ARQ/AHQ	0,0626	0,0563	0,1020	0	0	0
ARQ/ARH	0,0301	0,0251	0,0612	0,0102	0	0,0128
ARQ/ARQ	0,6950	0,6980	0,6764	0,7653	0,5500	0,8205
ARQ/VRQ	0,0060	0,0070	0	0	0	0
ARR/AHQ	0,0100	0,0084	0,0204	0	0	0
ARR/ARH	0,0040	0,0047	0	0,0102	0,0500	0
ARR/ARQ	0,1798	0,1875	0,1312	0,1837	0,3000	0,1538
ARR/ARR	0,0084	0,0084	0,0087	0,0102	0,0000	0,0128
ARR/VRQ	0,0016	0,0019	0	0,0204	0,1000	0
VRQ/VRQ	0	0	0	0	0	0

A partir de las frecuencias alélicas del cuadro 3 se observa que la distribución de los genotipos presenta equilibrio de Hardy-Weinberg cuando se considera toda la raza en conjunto (no diferenciando entre las dos variedades), cuando se calcula la distribución de genotipos en cada una de las dos variedades por separado y cuando dentro de cada una de las variedades se toman por separado machos y hembras. En cambio, la distribución de genotipos es estadísticamente diferente en machos y en hembras cuando se considera la raza en conjunto y también se manifiestan desajustes estadísticamente significativos en cada una de las variedades por separado. En estos momentos sólo se han genotipado hembras de una ganadería de variedad Blanca y otra de la variedad Negra por lo que es necesario esperar a tener datos de más ganaderías para ver si esta situación se mantiene y en su caso explicar el factor que la produce. Esto es muy importante de cara a establecer el protocolo de actuación en la raza de cara a aumentar la frecuencia de los genotipos más resistentes a la enfermedad ya que podría condicionar que estrategia es más efectiva en cada caso, tanto en su desarrollo teórico como a la hora de llevarla a la práctica.

La raza ovina Manchega, tanto en su variedad Blanca como en la variedad Negra parte, de una situación muy desfavorables en cuanto a la frecuencia de genotipos de la proteína de la PrP si se compara con otras razas españolas de las que se dispone de datos en estos momentos (SANZ-PARRA *et al.*, 2001; ACÍN *et al.*, 2003; PONZ *et al.*, 2003; JUAREZ *et al.*, 2003a,b). En conjunto, la raza presenta, únicamente, el 14,4%, en la variedad blanca y el 11,7% en la variedad Negra de los alelos que se ha descrito que confieren resistencia a padecer la enfermedad. La frecuencia del alelo ARR, alelo cuya frecuencia debe tenderse a aumentar en los rebaños es muy baja, un 10,6 y un 11.7% en la variedad Blanca y en la Negra respectivamente. En contrapartida presenta la frecuencia más alta de las conocidas en razas españolas para el genotipo ARQ, que en principio se considera como un genotipo no deseable en los rebaños. Afortunadamente la raza en conjunto presenta la frecuencia más baja, de las cono-

Cuadro 3. Frecuencias alélicas de los cinco haplotipos detectados para la proteína PrP en la variedad Blanca y Negra de la raza ovina Manchega. Se muestran por separado los valores obtenidos para machos y para hembras en cada una de las variedades

Table 3. Allelic frequencies of the five haplotypes detected in PrP protein in the Black and White Manchego sheep breed. Result in males and females of each breed are showed separately

	Frecuencias Alelicas					
	Manchega Blanca			Manchega Negra		
	Total	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras
ARQ	0,834	0,836	0,824	0,862	0,700	0,904
ARR	0,106	0,110	0,085	0,117	0,225	0,090
AHQ	0,038	0,035	0,061	0	0	0
ARH	0,017	0,015	0,031	0,010	0,025	0,006
VRQ	0,004	0,005	0	0,010	0,050	0

cidas, del alelo VRQ, alelo calificado como hipersensible a la enfermedad y que se considera que debe ser eliminado lo antes posible de los rebaños. Todos estos datos en conjunto hacen pensar que el programa de selección para mejorar la resistencia genética al scrapie va a tener que ser llevado a cabo con un horizonte temporal amplio por la difícil situación actual.

Usando como punto de partida los datos de las frecuencias alélicas obtenidos en el presente trabajos hemos llevado a cabo una serie de simulaciones teóricas de distintas posibilidades de selección para aumentar la frecuencia de los alelos resistentes a la enfermedad. Los resultados obtenidos hacen pensar en una serie de directrices como pueden ser: antes de afrontar la selección es necesario establecer si las frecuencias alélicas en machos y hembras son estadísticamente similares o se comportan como poblaciones distintas como parece suceder en el caso de la raza Manchega, seleccionar solo para machos reduce significativamente el número de animales que es necesario genotipar (el ministerio pretende genotipar todos los animales en un plazo relativamente corto) y el número de animales que se deben eliminar del esquema pero da lugar a unos progresos genéticos demasiado lentos. Las 5 primeras estrategias analizadas presentan siempre algún grave inconveniente de cara a llevarlas a la practica, o es necesario eliminar una gran cantidad de animales por presentar genotipos indeseables o el progreso genético en demasiado lento. Por ello, en una población como la Manchega, con unas frecuencias de los alelos resistentes tan bajas planteamos, por un lado, establecer horizontes temporales relativamente más amplios, por otro establecer estrategias mixtas donde se vaya aumentando la intensidad de selección y eliminando en cada generación más genotipos indeseables y por último y quizás mucho más importante es necesario hacer un esquema de cruces totalmente dirigido ya que utilizar apareamientos al azar entre los animales que se mantengan en los esquemas daría lugar a la perdidas de los escasos alelos resistentes combinándose en genotipos no del todo aprovechables. Por todo ello planteamos, genotipar el mayor número de animales posibles, plantearse la estrategia de selección con cada generación, siendo más exigentes cuando la situación lo permita, intentar generar animales de los genotipos resistentes con alto valor genético cuanto antes a partir de apareamientos diseñados para ello, organizar lotes de monta atendiendo a los genotipos de los animales implicados o usar inseminación artificial de los animales que nos aseguren descendientes de los genotipos deseados, sacar el máximo rendimiento posible a los animales heterozigotos portadores de alelos deseables y optimizar el uso de los animales homozigotos de manera que una vez asegurado el parentesco con sus descendientes no sea ya necesario hacer el genotipo para el gen de la PrP con el consiguiente ahorro en tiempo y en dinero que eso conlleva.

Bibliografía

Acín C., Martín-Burriel I., Lyahyai J., Monleón E., Rodellar C., Badiola J.J., Zaragoza P., 2003. Riesgo Genético del ovino aragonés a la enfermedad de scrapie. ITEA, Volumen extra 24: 474-476.

Belt P.B.G.M., Muileman I.H., Schreuder B.E.C., Ruitjer J., Bos-de Gielkens A.L.J., Smits M.A., 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. J. Gen. Virol., 76: 509-517.

Bossers A., Shreuder B.E.C., Muileman I.H., Belt P.B.G.M., Smits M.A., 1996. PrP genotypes contribute to determining survival times of sheep with natural scrapie. J. Gen. Virol., 77: 2669-2673.

CASTIGLIONI B., COMINCINI S., DRISALDI B., 1998. Comparative mapping of the priongene (PRNP) locus in cattle, sheep and human with PCR-generated probes. Mammalian Genome, 9: 853-855.

CLOUSCARD C., BEAUDR P., ELSEN J.M., MILAN D., DUSSAUCY M., BOUNNEAU C., SCHELCHER F., CHATELAIN J., LAUNAY J.M., LAPLANCHE J.L., 1995. Different allelic effects of the codons 136 and 171of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. J. Gen. Virol., 76: 2097-2101.

DAWSON M., HOINVILLE B., HOSIE B.D., HUNTER N., 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Vet. Rec., 142: 623-625.

DECISIÓN 2002/1003/CE por la que se fijan los requisitos mínimos para un estudio de los genotipos de la proteína del prión de las especies ovinas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 24/12/2002: 105-106.

DECISIÓN 2003/100/CE por la que se fijan los requisitos mínimos para el establecimiento de programas de cría de ovinos resistentes a las encefalopatías espongiformes transmisibles. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 14/02/2003: 41-45.

HUNTER N., 1996. Genotyping and susceptibility of sheep to scrapie. En: Methods in Molecular Medicine: Prion Diseases, 211-221. Ed. Baker, H., Ridley, R.M. y Totowa, N.J.: Humana Press Inc.

JUAREZ M., CÁMARA M.C., RODERO A., MOLINA A., BARAJAS F., 2003a. Evaluación de posibles alternativas para la lucha contra el scrapie en el ganado Merino autóctono español. XXVII congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y caprinotecnia, 281-284.

JUAREZ M., CÁMARA M.C., RODERO A., MOLINA A., BARAJAS F., 2003b. Evaluación de posibles alternativas para la lucha contra el scrapie en el ganado Merino negro. XXVII congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y caprinotecnia, 277-280.

KAWASAKI E.S., 1990. Sample Preparation from Blood, Cell, and other fluids. In "PCR Protocal" (ed. by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J White), 146-152. Academic Press. NY.

LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., BEAUDRY P., DUSSAUCY M., LAUNAY J.L., 1993. French autochthonous scrapied sheep without the 136 Val PrP polymorphism. Mammalian Genome, 4: 463-464.

PONZ R., MONTEAGUDO L.V., ARRUGA M.V., 2003. Estimación de frecuencias genotípicas deñ gen PrP en la raza ovina rasa aragonesa. Identificación de animales con alelos sensibles a scrapie. Arch. Zootec., 52: 85-88.

RAYMOND M., ROUSSET F., 1995. Genepop (updated version 3.2a, 2000): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity, 86: 248-149.

SANZ-PARRA A., BARANDIKA J., BELTRÁN DE HEREDIA I., ARRESE F., HURTADO A., JUSTE R.A., OPORTO B., GARCÍA CRESPO D., GARCÍA-PÉREZ A.L., 2001. Patrón de resistencia genética al scrapie en ganado ovino de raza Latxa. ITEA, Volumen extra 22: 66-69

SAUER S., LECHNER D., BERLIN K., LEHRACH H., ESCARY J.L., FOX N., GUT G., 2000. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res., 28: E13.

SYVANEN A.C., 1999. From gels to chips: "minisequencing" primer extension analysis of point mutations and single nucleotide polymorphism. Hum. Mutat., 13:1-10.

THORGEIRSDOTTIR S., SIGURDARSON S., VROMANS M.E.W., LANGEVELD J.P.M., SMITS M.A., 1999. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. J. Gen. Virol., 80: 2527-2534.

THORISSON H.N., THORGEIRSDOTTIR S. SIGURDARSON S., GEORGSSON G., PALSDOTTIR A., 1998. Two novel PrP allelic variants found in Icelandic sheep. Abs. Simp. In Prion and Lentiviral Diseases. XIX Northern Lights Neuroscience Symposium, 96.

(Aceptado para publicación el 2 de marzo de 2004).