

## VARIABILIDAD EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN *PRNP* DE LA RAZA OVINA CRIOLLA NEGRA “CHILOTA”

L. Álvarez<sup>1</sup>, R. de la Barra<sup>2</sup>, J.J. Arranz<sup>1</sup> y F. San Primitivo<sup>1</sup>.

1. Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León. fsant@unileon.es
2. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro experimental Butalcura, Casilla 24-O, Chiloé, Chile.

### INTRODUCCIÓN

El gen *PRNP*, situado en el cromosoma 13 ovino (Castiglioni *et al.*, 1998) es un gen de copia única que codifica la proteína priónica PrP. Esta proteína tiene la cualidad de poder plegarse de manera errónea, dando lugar a una glicofoma anormal y patógena, denominada PrP<sup>Sc</sup>, cuyo cúmulo en el tejido nervioso provoca la encefalopatía espongiforme conocida con el nombre de tembladera o scrapie (Baylis y Goldmann, 2004).

El gen priónico ovino tiene un tamaño de 31 kb, tres exones y dos intrones, estando la región codificante ORF en el último de los exones (Comincini *et al.*, 2000). Esta región tiene una longitud de 771 pares de bases y muestra una elevada variabilidad, habiéndose encontrado hasta el momento 42 mutaciones, de las cuales 4 son silentes, en 32 codones.

En el ganado ovino, se ha demostrado la influencia del gen *PRNP* sobre el desarrollo del scrapie (Goldmann, 1993). Aunque por el momento son únicamente tres los codones (136, 154 y 171) que parecen mostrar influencia sobre la susceptibilidad a esta patología, la aparición de nuevas mutaciones con efectos sobre el tiempo de incubación, así como sobre la facilidad de conversión de la proteína fisiológica a patógena, obligan a ampliar el estudio de la variabilidad en esta región.

La raza ovina criolla negra Chilota, tiene su origen en un reducido grupo de ejemplares ovinos ibéricos, introducidos por los españoles en 1568, en el archipiélago de Chiloé (formado por unas 40 islas ubicadas en el extremo sur de Chile, entre los paralelos 41°44' y 43°17' De latitud sur). El censo actual se cifra en unos 40.000 ejemplares aislados reproductivamente. Los factores climáticos, geográficos y antropológicos han definido un tipo de animal pequeño, de líneas rectas, de variada policromía de lana, miembros y cara cubierta y apreciable rusticidad, marcada especialmente por gran resistencia podal a la humedad y tolerancia a parásitos gastrointestinales. En Chile no se ha diagnosticado scrapie hasta el momento. Nuestro objetivo ha sido identificar la variabilidad del gen *PRNP* en una oveja, la chilota, originada de ovinos ibéricos sin identificar y desarrollada en un ambiente exento de scrapie y aislada reproductivamente.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de 34 muestras de sangre de animales de la raza Chilota, procedentes de diferentes rebaños localizados en la isla de Chiloé (la mayor del archipiélago). Una vez aislado el ADN mediante procedimientos estándar, se amplificó un fragmento de 989 pb que contenía las 771 pb de la región codificante del gen *PRNP*. Para ello se utilizó la siguiente pareja de cebadores: EIII-ORF-up (5'-AACTTTGTCCTTAGAGGAGAAAGAG-3') y EIII-ORF-dn (5'-ATGAAAACAGGAAGGTTGCC-3'), diseñada a partir de la secuencia del gen *PRNP* tomada de la base de datos GeneBank (U67922). Tras la comprobación de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificó el producto de PCR y se secuenció en sus dos cadenas, utilizando el kit BigDye Terminators v.3.1 (Applied Biosystem), en un secuenciador automático ABI3130. Una vez obtenidos los electroferogramas, se analizaron utilizando el software “Sequencing Analysis 5.2” y “SeqScape 2.5” de Applied Biosystem. Con objeto de obtener una mayor calidad de resultados, únicamente se han analizado secuencias con alto índice de calidad (QV>20) en las dos cadenas del producto amplificado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polimorfismos en los codones 136, 154 y 171: en la población de 34 ovejas Chilota, se han encontrado 4 de los 5 haplotipos considerados básicos en la susceptibilidad al scrapie (ARQ, ARR, AHQ y VRQ), no apareciendo el alelo ARH. Como se puede apreciar en la Tabla 1, el alelo salvaje ARQ fue el más frecuente (69,11%), seguido del alelo resistente ARR (26,48%). Únicamente se localizaron 2 animales heterocigotos para el alelo AHQ y uno para el haplotipo susceptible VRQ.

Respecto a los genotipos, la forma ARQ/ARQ fue la más frecuente. La frecuencia del genotipo resistente ARR/ARR fue del 23,53%, pudiéndose considerar alta en una población sin incidencia de scrapie (en las razas españolas la frecuencia de este genotipo ronda el 6%). Los otros 3 genotipos (VRQ/ARR, AHQ/ARQ y AHQ/ARR) aparecieron en un solo animal.

Haplotipo	Frecuencia (%)	Genotipo	Frecuencia (%)
ARQ	69,11	ARQ/ARQ	67,65
ARR	26,48	ARR/ARR	23,53
AHQ	2,94	AHQ/ARR	2,94
VRQ	1,47	AHQ/ARQ	2,94
ARH	0	VRQ/ARR	2,94

Tabla 1.- Frecuencias haplotípicas y genotípicas para los codones 136, 154 y 171 del gen *PRNP* obtenidas en nuestra población ovina Chilota.

En cuanto a las frecuencias alélicas, responden a valores comparables con los encontrados en razas ibéricas, si bien la frecuencia de los alelos ARR y ARQ son ligeramente superiores y el resto inferiores (Álvarez, 2007). Las frecuencias genotípicas, en desequilibrio Hardy-Weinberg, responden claramente al efecto de la consanguinidad. La población se formó a partir de un pequeño número de animales, que no ha podido ser determinado, pero nunca recibió nuevas aportaciones de animales.

Es de destacar el incremento que han sufrido las frecuencias de los alelos ARR (26,48% frente a 24,78% en las razas españolas y 20,98% en las portuguesas) y ARQ (69,11% frente a 65,68% en las razas españolas y 67,29% en las portuguesas), aunque sea ligero. Las diferencias en las frecuencias del resto de los alelos pueden ser debidas a los tamaños muestrales, tanto de la población de Chilotas como del resto de las razas (entre 9 y 20 muestras por raza). En ausencia de scrapie, el incremento de frecuencia de los dos alelos ARR y ARQ, ¿puede atribuirse únicamente a un efecto de deriva?

El gen *PRNP* produce una proteína que parece ser responsable de la aparición de un proceso patológico grave. Sin embargo, es un gen que muestra una enorme variabilidad, de forma que produce proteínas diferentes, algunas de las cuales presentan mayor facilidad para cambiar a proteínas patógenas (ARQ) y otras muestran mayor resistencia (ARR). Parece lógico que, en presencia de la enfermedad, se incremente la frecuencia de los alelos que producen proteínas más resistentes y en esto se ha basado la Comunidad Europea para promover por primera vez una selección hacia un genotipo concreto. Pero, en ausencia de la enfermedad, ambos alelos mantienen frecuencias altas.

La proteína PrP producida por el gen *PRNP*, además de estar implicada en el scrapie, cumple diversas misiones fisiológicas, entre las que podemos destacar su intervención en: procesos sinápticos (Brown, 2001), apoptosis (Thellung *et al.*, 2000), funciones de activación y transporte (Reilly, 2000) y un largo etc. En todo caso, parece que la conversión de la PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>, dirige a las células a la muerte por apoptosis. Es muy probable que la explicación a la enorme variabilidad que presenta este gen, a la evolución de las frecuencias alélicas, a la variabilidad alélica entre poblaciones y a otras muchas incógnitas que continúa suscitando este tema, no se encuentre únicamente en su relación con el scrapie.

Polimorfismos en toda la región codificante del gen PRNP: en la Tabla 2 se describen los polimorfismos localizados en la región codificante del gen PRNP en la población Chilota. El número total de polimorfismos fue de 9. Uno de ellos, el G145V, no está descrito en la literatura y se debió a una transversión g→t en la segunda base del codón 145, lo que produjo el cambio del triplete GGC (glicina) a GTC (valina). De los 9 polimorfismos, 2 resultaron silentes en los codones 231 y 237, no produciendo cambio aminoacídico.

Codón	Mutación	%	Codón	Mutación	%
Q101R	CAG-CGG	2,94	R154H	CGT-CAT	5,88
Q101	CAG	97,06	R154	CGT	94,12
M112T	ATG-ACG	5,88	Q171R	CAG-CGG	55,88
M112	ATG	94,12	Q171	CAG	20,59
A136V	GCC-GTC	2,94	R171	CGG	23,53
A136	GCC	97,06	R231	AGG-CGG	17,64
L141F	CTT-TTT	2,94	R231	AGG	82,36
L141	CTT	91,18	L237	CTC-CTG	17,64
F141	TTT	5,88	L237	CTC	82,36
G145V	GGC-GTC	5,88			
G145	GGC	94,12			

A=alanina, F=fenilalanina, G=glicina, H=histidina, L=leucina, M=metionina, Q=glutamina, R=arginina, T=treonina, V=valina

Tabla 2.- Lista de polimorfismos encontrados en la región codificante del gen PRNP en nuestra población de 34 ovejas Chilota.

La variabilidad encontrada en la región codificante del gen PRNP en la oveja Chilota puede considerarse elevada. Aunque el total de mutaciones descritas hasta ahora es de 42, en un estudio realizado con 25 razas ibéricas (Álvarez, 2007), se identificaron un total de 15 puntos polimórficos. Todos los detectados en la oveja Chilota, salvo el anteriormente citado correspondiente al codón 145, se han encontrado también en las razas ibéricas.

A modo de conclusión podríamos afirmar que la estructura del gen PRNP en la raza Chilota se encuentra muy próxima al conjunto de razas ibéricas, que la frecuencia del alelo ARR es alta y la del alelo VRQ es baja, a pesar de no haberse diagnosticado scrapie y que la población, a pesar de su aislamiento reproductivo, mantiene una alta variabilidad en este gen.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, L. 2007. Variabilidad en el gen PRNP ovino y su relación con la producción de leche y el scrapie. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Baylis, M., Goldmann, W. 2004. The genetics of scrapie in sheep and goats. *Current Molecular Medicine*, 4: 385-396.
- Brown, D.R. 2001. Prion and prejudice: Normal protein and the synapse. *Trends of Neuroscience*, 24: 85-90.
- Castiglioni, B., Comincini, S., Drisaldi, B. 1998. Comparative mapping of the prion gene (PRNP) locus in cattle, sheep and human with PCR-generated probes. *Mammalian Genome*, 9: 853-855.
- Comincini, S., Castiglioni, B., Del Vecchio, I., Foti, M.G., Ferretti, L. 2000. Structure and comparative analysis of the bovine prion gene locus. *Current Genomics*, 1: 313-321.
- Goldmann, W. 1993. PrP gene and its association with spongiform encephalopathies. *British Medical Bulletin*, 49 (4): 839-859.
- Reilly, C.E. 2000. Nonpathogenic prion protein (PrPc) acts as a cell-surface signal transducer. *Journal of Neurology*, 247: 819-820.
- Thellung, S., Florio, T., Villa, V., Corsaro, A., Arena, S., Amico, C., Robello, M., Salmona, M., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., Schettini, G. 2000. Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126. *Journal of Neurobiology Diseases*, 7: 299-309.