

**Designação do projeto** | PeXPTPrionGoat - Prevenção de futuros focos de EET: Explorando a diversidade do gene codificante da proteína do príão para resistência em caprinos portugueses

**Código do projeto** | 2023.14526.PEX

**Objetivo principal** |

1. Definir a frequência dos polimorfismos do gene da proteína priónica (*prnp*) nas raças portuguesas e raças exóticas mais utilizadas;
2. Estimar estes polimorfismos na população caprina em geral;
3. Identificar raças de caprinos criadas em Portugal resistentes ao tremor epizoótico (TE);
4. Determinar o genótipo completo *prnp* nos casos caprinos de TE.

O conhecimento mais profundo destes aspetos poderá responder a muitas das questões ainda em aberto no que concerne às encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs), doenças neurodegenerativas progressivas e fatais.

Estes novos dados, que serão divulgados no âmbito de uma plataforma de trabalho colaborativa, serão imprescindíveis para o delineamento de programas de seleção genética para a resistência às EETs, de importância fundamental para o controlo destas afeções.

**Região de intervenção** | Nacional

**Entidade beneficiária** | Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.)

**Data da aprovação** | 22/11/2024

**Data de início** | 02/01/2025

**Data de conclusão** | 01/07/2026

**Custo total elegível** | 49.965,00€

**Apoio financeiro total da União Europeia** | Apoio OE | 49.965,00€

**Objetivos, atividades e resultados esperados**

**Tarefa 1: Colheita de amostras e extração de DNA genómico caprino (INIAV/DGAV/EURL-TSEs)**

Para definir a frequência dos alelos do gene da proteína priónica (*prnp*) em Portugal, pretendemos analisar todas as raças caprinas nativas portuguesas e exóticas mais utilizadas em Portugal, bem como uma amostra de animais negativos para EETs da população caprina em geral e rebanhos afetados por tremor epizoótico (TE). Todos os casos de TE em caprinos detetados no nosso país (n = 23) serão também genotipados através da sequência de toda a sequência codificante do *prnp*. Nas raças puras, o ADN será extraído do sangue; em caso de EET negativo será utilizado tecido do tronco cerebral ou do pavilhão auricular dos caprinos. Nos rebanhos afetados por TE, o sangue será recolhido em animais vivos e do tronco cerebral ou do pavilhão auricular em caprinos encontrados mortos na exploração. Existem 352 000 cabras em Portugal, representando o sexto país da União Europeia em termos de



Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia

população caprina Eurostat ([https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?oldid=427096#Livestock\\_population](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?oldid=427096#Livestock_population), 2023).

**Resultados esperados:** [1] Detetar mutações/polimorfismos com um nível de confiança de 95% quando atingem uma frequência mínima de 3,6%; [2] Estimar a proporção de cada polimorfismo detetado com uma precisão na gama de 7-11%, dependendo dos diferentes cenários (respetivamente se as mutações variarão entre 3,6% a 50%). O DNA de alguns caprinos já está disponível no Banco Português de Germoplasma Animal, sediado no INIAV. Para garantir a representatividade, aplicaremos uma estratégia de amostragem semelhante à utilizada em Torricelli et al., 2021, considerando a dimensão da exploração e tentando apanhar, proporcionalmente, a mesma percentagem de animais em todas as explorações.

### **Tarefa 2: Determinação de genótipos *prnp* na população caprina nacional e casos positivos de EET**

Nesta tarefa iremos realizar a sequenciação de todo o gene *prnp* no DNA extraído na Tarefa 1. As amostras serão submetidas a PCR com *primers* específicos para *prnp* de acordo com Van Poucke et al. (24). Após confirmação do sucesso da amplificação por eletroforese em gel de agarose (BIO\_RAD), o produto de PCR será purificado com Exo-Sap (ExoSap-IT; USP Corporation, #78201) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos e primers obtidos serão enviados para sequenciação bidirecional para um serviço de sequenciação externo. As sequências de nucleótidos obtidas serão editadas e alinhadas com *prnp* caprino utilizando um software adequado para a obtenção de sequências de consenso para cada amostra. Para identificar picos heterozigotos, serão adicionalmente verificados eletroferogramas em cada ponto de mutação investigado. A análise estatística está descrita na tarefa 4.

Após a identificação da localização da mutação, iremos compará-las com as mutações já descritas e procurar possíveis novas.

Os dados obtidos nesta Tarefa permitirão o desenvolvimento de um método baseado em PCR (Tarefa 3), baseado na metodologia de extensão de *primers* para identificar os SNPs relevantes.

**Resultados esperados:** Esperamos determinar a frequência dos alelos já reportados na população caprina em Portugal e, eventualmente, identificar novas mutações específicas do efetivo caprino nacional, representado por 6 raças caprinas nativas e 3 exóticas e também em todos os casos de tremor epizoótico caprino detetados em Portugal até ao momento. A natureza e localização das variantes serão identificadas. Estes resultados permitirão, em primeiro lugar, verificar se existe uma correspondência entre os alelos reportados por diferentes autores em todo o mundo e as nossas raças caprinas nativas. Com estes dados, poderemos implementar novos ensaios multiplex (Tarefa 3), de forma a identificar as mutações *prnp* relevantes detetadas, de forma simultânea, rápida e eficaz.

### **Tarefa 3: Implementação de uma metodologia rápida para a genotipagem de *prnp***

Após a extração do DNA genómico, dois fragmentos (acesso à sequência de referência: #X74758 e #GQ267530.1), incluindo as mutações do SNP alvo no *prnp*, serão amplificados por PCR utilizando um par de iniciadores adequadamente desenhados. A amplificação será confirmada por eletroforese em gel de agarose e os produtos de PCR serão purificados com Exo-Sap. Posteriormente, será utilizado um sistema SNaPshot Multiplex customizado (Snapshot; Applied Biosystems, #4323154) semelhante ao previamente implementado pela nossa equipa para a genotipagem de *prnp* de ovinos, e atualmente em utilização no Laboratório de Genética Molecular (LGM, INIAV). Assim, será realizada uma segunda PCR com *primers* específicos desenhados de acordo com as sequências de referência *prnp* de cabra do GeneBank identificadas acima, para hibridizar antes de cada posição polimórfica,



Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia

correspondentes aos códons 127, 142, 143, 146, 154, 211, 222 em *prnp*. Este procedimento permitirá a inclusão de novas mutações eventualmente detetadas (Tarefa 2).

Os produtos de PCR são fragmentos fluorescentes de 30-60 pb, resultantes da extensão do *primer* de um ddNTP marcado com fluorescência de base única que deve ser novamente purificado com SAP para remover os ddNTPs não incorporados. Após desnaturação térmica, estes fragmentos serão submetidos a eletroforese capilar (analisador genético ABI3130) com tamanho padrão interno (120 LIZ). O resultado desta análise será interpretado com o software GeneMapper (Applied Biosystems), permitindo a identificação de SNPs.

**Resultados esperados:** Espera-se implementar uma metodologia rápida e fiável baseada em PCR para detetar simultaneamente o polimorfismo de nucleótido único (SNP's) previamente identificado (Tarefa 2) no *prnp* caprino português utilizando um procedimento de extensão de primers. Esta metodologia estará disponível para futuras genotipagens de raças caprinas.

#### **Tarefa 4: Análise estatística de dados e definição de supostos grupos caprinos de risco para tremor epizoótico clássico e atípico**

As sequências obtidas a partir da Task2 serão alinhadas entre si, e com as de outras sequências genéticas recuperadas das bases de dados GenBank utilizando o programa Clustal W (Ver.1.83), e DnaSP, DNA - para a análise de polimorfismo de nucleótidos a partir de dados de sequências de DNA alinhadas. A análise filogenética será realizada através dos métodos de junção de vizinhos (NJ) e de máxima parcimónia (MP). A árvore filogenética será desenhada com o TreeView 68 K.

O software GeneMapper será utilizado para a determinação de alelos. Os parâmetros de diversidade genética serão estimados utilizando programas de software adequados (por exemplo, Genalex, GDA ou Genetix). A diversidade genética será quantificada: Taxa de polimorfismo ( $P_j$ ); Proporção de lociRicheza polimórfica das variantes alélicas (A), Número médio de alelos por locus; Heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ). A diferenciação populacional será estimada com base na estatística F ou em métodos bayesianos com software Structure. Os desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) das frequências genotípicas em cada locus ou combinação populacional serão avaliados por análise de qui-quadrado e/ou por outras abordagens disponíveis, nomeadamente pelo software Genepop.

Para comparar com estudos anteriores noutras raças caprinas, os alelos *prnp* mais prováveis serão calculados nas frequências alélicas observadas nas populações/raças objeto deste estudo, com base na inferência estatística e em eventos probabilísticos. Além disso, as distâncias genéticas entre as raças estudadas serão estimadas com base nas frequências alélicas *prnp*.

**Resultados esperados:** Através de uma análise integrada de todos os dados obtidos, pretendemos:

- a) identificar frequências genotípicas *prnp* na população caprina portuguesa;
- b) determinar os genótipos completos do *prnp* dos caprinos afetados pelo TE;
- c) definir grupos de risco putativos em caprinos tanto para o TE clássico como para o TE atípico.

#### **Tarefa 5: Divulgação dos resultados e criação de uma plataforma de trabalho colaborativo e de uma base de dados sobre EET em caprinos.**

Os resultados e os dados obtidos neste projeto, assegurando princípios de proteção de dados, serão incluídos na já estabelecida plataforma online gerida pelo INIAV, dedicada aos animais domésticos de Portugal – a rede temática AniDop(<https://anidop.inia.pt/index.php>) em estreita ligação com o Centro de Competências de Caprinicultura (CCC (<http://www.caprinicultura.pt>)) de forma a estar



Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia

disponível aos principais intervenientes como as associações nacionais de criadores, a Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia e a “Sociedade Portuguesa de Recursos Genéticos Animais”, bem como a nossa instituição colaboradora - DGAV, Autoridade Veterinária Nacional.

Este CCC tem como missão promover o desenvolvimento e a sustentabilidade da indústria caprina em Portugal, através do reforço da investigação, da promoção da inovação e de boas práticas na produção de caprinos e da transferência e difusão de conhecimento. Este projeto irá fornecer novos dados sobre a população caprina nacional, que são importantes para o controlo das EET, com aplicabilidade e divulgação adequadas nesta plataforma colaborativa no interesse da produção caprina nacional.

Através da outra Instituição Colaborativa-EURL-TSE, este projeto obterá uma internacionalização que será alargada a outros grupos de investigação internacionais que trabalham nesta temática para partilhar os resultados obtidos e contribuir para enriquecer o conhecimento da EET em caprinos.

Para além disso, propomos também a divulgação dos resultados em revistas científicas internacionais e nacionais, através de comunicações em encontros internacionais e nacionais e através da organização de seminários/conferências.

**Resultados esperados:** Divulgação Nacional e Internacional dos dados