

ISBN: 970-9825-00-3



VI Simposio Iberoamericano
sobre Conservación y Utilización
de Recursos Zoogenéticos

MEMORIAS

8, 9 Y 10 DE NOVIEMBRE DE 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
INSTITUTO DE ESTUDIOS INDÍGENAS

SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS, CHIAPAS MEXICO



Fundación
PRODUCE
Chiapas, a.c.



ASOCIACIÓN DE ÍNDICES INFECCIOSOS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA A RECEPTORES CELULARES EN EL GANADO CRIOLLO BON

ASSOCIATION OF INFECTIOUS INDEXES OF FOOT & MOUTH DISEASE VIRUS TO CELLULAR RECEPTORS IN CREOLE BON CATTLE

Alejandra Rodríguez-M, Gloria P. Barrera, Jaime Gallego, Rodrigo Martínez, Ligia Jimenez*, Carlos Manrique* y Fernando Ariza-Botero

Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, CORPOICA,
fariza@aolpremium.com

*Universidad Nacional de Colombia, FMVZ

Resumen

Los miembros de la familia de receptores celulares, integrinas ($\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 6$), han sido identificados como factores de adhesión de diferentes virus a las células del hospedero. Para el virus de la Fiebre Aftosa éstas integrinas se unen al sitio de reconocimiento celular en la secuencia tripeptídica Arg-Gly- Asp (RGD). Evidencia genética de esta interacción ha sido obtenida mediante la mutación de la secuencia RGD en clones infecciosos de cDNA, identificando partículas virales no infectivas incapaces de adsorberse a células susceptibles. Cierta clase de resistencia genética natural al virus de la Fiebre Aftosa ha sido descrita en el ganado bovino Blanco Orejinegro, considerándose que podría ser causada por mutaciones en estos receptores celulares. En el presente estudio un total de 106 individuos pertenecientes al núcleo de ganado criollo colombiano Blanco Orejinegro (perteneciente al banco de germoplasma bovino de Corpoica) fueron genotipificados con dos marcadores tipo microsatélite (ILST030 y BM2113) y dos SSCPs (SLC11A1 y ITGB6) asignados al cromosoma dos bovino. Estos genotipos fueron asociados a índices de infecciosidad, obtenidos a partir de la infección de cultivos BHK-21 y de fibroblastos bovinos, con los serotipos O1 Campos y A24 Cruzeiro, para cada uno de los individuos. Dos de los cuatro marcadores (ITGB6 e ILST030) se asociaron significativamente con el fenotipo Índice de Resistencia mostrando efecto aditivo ($p \leq 0,025$ y $\leq 0,001$ respectivamente). Los hallazgos iniciales del presente estudio permitirán identificar aquellas líneas familiares que segregan aquellos alelos benéficos asociados a resistencia a la enfermedad.

Palabras clave: Integrinas, Marcadores moleculares, adhesión

Abstract

Family members of cellular receptors, integrins ($\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ $\alpha V\beta 6$) have been identified as adhesion factors of different virus to host cells. In case of Foot and Mouth Disease Virus, these integrins are bound to the cellular recognition site in the tripeptidic sequence Arg-Gly-Asp (RGD). Genetic evidence for this interaction has been obtained through mutation of RGD sequence in infectious clones of cDNA, identifying noninfective viral particles, unable to be adsorbed to susceptible cells. Some kind of natural genetic resistance to FMD virus has been described in the Colombian Creole cattle Blanco Orejinegro, considering that certain degree of this resistance could be caused by mutations in these cellular receptors responsible for virus adhesion. In the present study a total of 106 individuals belonging to the Creole cattle nucleus (Bovine Germoplasm Bank, Corpoica), were genotyped for the microsatellite markers ILST030 and BM2113 and two SSCP (SLC11A1 y ITGB6) assigned to the bovine chromosome 2. These genotypes were associated to infectious indexes obtained by BHK21 and fibroblast cultures infection with the O1 Campos and A24 Cruzeiro serotypes of FMD virus. Two out of four markers (ITGB6 e ILST030) were significantly associated with the Resistance Index phenotype showing additive effect ($p \leq 0,025$ and $\leq 0,001$ respectively). The initial findings from the present study will allow identifying those familiar lines segregating those beneficial alleles associated for disease resistance.

Key words: Integrins, Molecular markers, adhesion.

INTRODUCCIÓN

Estudios sobre la estructura del virus de la Fiebre Aftosa muestran un bucle altamente inmunológico entre las cadenas G y H de la proteína VP1 (G-H), la cual contiene una secuencia conservada de Arginina, Glicina y Ácido Aspártico (RGD), esta última ha sido propuesta como el sitio del receptor de unión entre la célula y los siete serotipos del virus (Jackson *et al.*, 1997).

Se ha observado que ciertos virus que presentan una única variación aminoacídica en la secuencia RGD son incapaces de adherirse a la superficie celular, indicando que dicha secuencia es necesaria en tal unión. El ingreso del aftovirus a la célula se da por endocitosis; en un comienzo es necesaria la mediación de un receptor en el proceso de adhesión celular a la integrina $\alpha V\beta 3$ (V3) en el virus tipo A. Para el virus O1 la mediación inicial está dada por el receptor Heparan sulfato (HS) localizado en la superficie celular, el cual facilita la adsorción a un segundo receptor integrina $\alpha V\beta 6$, ruta necesaria para la entrada del virus a la célula huésped. En los dos casos anteriormente descritos se hace evidente para la internalización y replicación del virus, la presencia de un receptor del grupo de integrinas αV . Para O1 Campos es $\alpha V\beta 6$ el receptor que presenta una mayor eficiencia de adhesión (Duque and Baxt, 2002).

Existe evidencia de un tipo de resistencia en la raza BON contra el virus de la fiebre aftosa, serotipos A24 Cruzeiro y O1 Campos (Balsero, 2000). Aunque se han desarrollado estudios con el fin de detectar la interacción virus-agente hospedero, no es claro qué proteínas intervienen en el mecanismo de adhesión del virus a las células del huésped para continuar con el proceso infeccioso de replicación viral. En el presente estudio se pretende evaluar el efecto directo o indirecto de marcadores tipo microsatélite y SSCP, cuando son asociados a títulos infecciosos de cultivos de fibroblastos y células BHK21 con el virus de la fiebre aftosa en una población de BON.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las bases de datos de una evaluación preliminar de resistencia a los serotipos O1 Campos y A24 Cruzeiro (Balsero, 2000), donde se identificaron las razas BON y San Martinero como las más resistentes en las pruebas in-vitro. Se utilizaron los índices de resistencia a la fiebre aftosa (IDR) correspondientes a la raza BON hallados por Balsero, (2000), categorizándolos en tres subgrupos discriminados por rangos de resistencia.

Para comprobar la homogeneidad de los nuevos grupos se le empleó una prueba χ^2 de bondad de ajuste ($\alpha \leq 0,05$). Para genotipificar la población se emplearon 2 marcadores tipo microsatélite (BM2113 y ILST030) y dos SSCP (SLC11A1 y ITGB6). Se efectuaron las PCR's siguiendo el protocolo descrito en Ariza *et al.* (2001), variando exclusivamente las temperaturas de anillamiento. Para visualizar los productos de amplificación se emplearon geles de agarosa al 1,5 % teñidos con Bromuro de Etidio y posteriormente se visualizaron los genotipos en geles de poliacrilamida denaturantes y no denaturantes teñidos con nitrato de plata y los genotipos verificados por dos integrantes del laboratorio con el fin de confirmar los genotipos correctos.

Finalmente se aplicó el método ANOVA de asociación simple de cada marcador al fenotipo y descrito por Zeng, (2000), en donde se evaluaron las diferencias entre el valor de la característica para cada grupo de marcadores moleculares dentro de una población, para un marcador en particular empleando un *t*-test. La hipótesis nula a probar es que el promedio del valor del fenotipo (índice de resistencia) es independiente del genotipo para un marcador en particular.

RESULTADOS

Los índices infecciosos correspondientes a los 106 miembros de la raza BON, fueron reagrupados por su nivel de resistencia y se corroboró su homogeneidad (χ^2), lo que facilitó la asociación entre la característica fenotípica (Índice de resistencia) y los genotipos. Se utilizó un método de asociación simple de cada marcador a los índices de resistencia generados por el serotipo O1 Campos. El *t*-test utilizado reveló un efecto aditivo significativo asociado con los índices de resistencia para los marcadores ITGB6 e ILST030 (Tabla 1).

Tabla 1. *t*-test de asociación simple de cada marcador con la característica índice de resistencia.

	SLC11A1			LST030			LST030			BM2113			ITGB6			ITGB6		
ALELO	(1/1)	(2/2)	(1/2)	(1/1)	(2/2)	(1/2)	(2/3)	(3/3)	(1/3)	(2/3)	(3/3)	(1/3)	(1/1)	(2/2)	(1/2)	(2/3)	(3/3)	(1/3)
N° Indiv	54	4	2	12	4	30	12	2	44	36	2	20	20	21	8	4	21	21
Promedio	0,82	0,80	0,86	0,76	0,98	0,82	0,76	0,73	0,80	0,78	0,72	0,74	0,75	0,91	0,82	0,84	0,91	0,91
Σ	0,23	0,13	0,27	0,18	0,11	0,16	0,18	0,08	0,23	0,20	0,28	0,20	0,23	0,24	0,27	0,18	0,24	0,24
σ^2																		
Varianza	0,05	0,02	0,07	0,03	0,01	0,03	0,03	0,01	0,05	0,04	0,08	0,04	0,05	0,06	0,07	0,03	0,06	0,06
Prueba <i>t</i>	-0,18618			2,29208			-0,18684			-0,45979			2,18796			3,01640		
GL	57			15			13			37			40			54		
valor p	NS			0,025			NS			NS			0,01			0,001		

DISCUSIÓN

Para la penetración del virus O1 Campos a la célula, este se une al HS localizado en la superficie celular y posteriormente se adhiere mediante la RGD, a una integrina, la $\alpha V\beta 6$ (Jackson *et al.*, 1997). Por lo tanto se propone a $\alpha V\beta 6$ (ITGB6) como gen candidato para la unión del virus de la fiebre aftosa (O1 Campos) a la célula. Estudios preliminares realizados por Balsero (2000) identificaron valores promedio de los índices de resistencia al virus O1 Campos para las clases denominadas como menor resistentes al virus de la FA a las razas Casanareño y Costeño con Cuernos; como medianamente resistentes al Hartón del Valle y altamente resistentes a las razas San Martinero y BON.

Por esta razón se decidió en este estudio investigar la raza BON y su comportamiento para el virus O1 campos. Con el método de asociación simple utilizando ANOVA se identificaron los marcadores ITGB6 e ILST030, revelando un efecto aditivo para el fenotipo de resistencia. ITGB6 presentó una asociación significativa para los índices de resistencia tanto para el sistema alélico (11, 22, 12) como para el sistema alélico (22, 33, 23), lo que refuerza la idea de que el serotipo O1 Campos, posiblemente utiliza el gene candidato ITGB6 como receptor *in vitro* tal como lo propone Duque and Baxt, (2002).

La potencial resistencia al virus de la Fiebre Aftosa por parte de la raza BON es una característica de interés económico que estimula la búsqueda de nuevas alternativas, que reemplacen procesos costosos dentro de la producción ganadera, abriendo la posibilidad de efectuar programas de selección por marcadores para incrementar la resistencia genética a una enfermedad

BIBLIOGRAFÍA

- Ariza, F., Harrison, B. and R. Drinkwater. 2001. The assignment by linkage mapping of four genes from human chromosome 22 to bovine chromosome 5 and 17. *Animal Genetics*. 32: 371-374.
- Balsero, P. 2000. Evaluación de la resistencia genética a fiebre aftosa en siete razas criollas colombianas mediante pruebas cuantitativas *in vitro*. Trabajo de grado para optar al título de microbiólogo agrícola. Universidad Javeriana. Colombia, Bogota D.C.
- Duque, H. and Baxt, B. 2002. Foot-and-Mouth Disease Virus receptors: Comparison of Bovine α Integrin Utilization by type A and O Viruses. *Journal of Virology*. 77: 2500-2511.
- Jackson, T., Sharma, A., Abu, R., Blakemore, W., Ellard, F., Simmons, D., Newman, J., Stuart, D and King, A. 1997. Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Specific Binding by Foot-and-Mouth Disease viruses to the Purified Integrin $\alpha V\beta 3$ *In Vitro*. *Journal of Virology* 71: 8357-8361.
- Zeng, Z. 2000. *Statistical Methods for Mapping Quantitative Trait Loci*. North Carolina State University.

