

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

**Desarrollo de vectores para la construcción de
recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de
Anticarsia gemmatalis (oruga de las leguminosas)**

AUTOR: Eloísa Irene Arana

DIRECTOR: Víctor Romanowski

LUGAR DE TRABAJO:

Instituto de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

TESIS
Nº 976

TESIS DOCTORAL

2003

DONACION.....

A.....

Fecha.....

Inv..... Inv.....

B.57013



976



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
UNLP

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Victor Romanowski.

DEPOSICION.....

▲.....

Fecha

28-04-03

nv. R.....

Inv.....

■.....

57013



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

Para Facu, de una tía babosa

TESIS
N.º 976

DONACION.....
*.....
Fecha 28-04-03.....
Inv. s..... Inv..... B. 57013.....

Mi reconocimiento:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

A la Fundación Antorchas-British Council, por financiar todos mis viajes y estancias en Londres.

Gracias a,

Mi Director, Dr. Víctor Romanowski, por su confianza, por dirigir mi trabajo, por haberme brindado las oportunidades que tuve, y por sobre todo por su apoyo y comprensión en los buenos y malos momentos. También por su paciencia y moderación, espero haber aprendido también al menos un poquito de eso! (Los dos sabemos que la transformación completa de este carácter impulsivo es imposible).

A los Dres Daniel Ghiringhelli y César Albariño, por haberme guiado, brindado su experiencia y contagiado su entusiasmo, en mis primeros pasos en estas lides.

En Inglaterra, a los Dres David O'Reilly y Julie Olszewski, por su invaluable ayuda y desinteresada supervisión, estaré siempre en deuda.

A mis compañeros de laboratorio, Alejandra M, Alejandra T, Alejo, Alina, Diego, Cristina, Claudia, Ramiro y los 'nuevitos', Marina y Agustín. A Ale T, por tantas y tantas horas compartidas en el laboratorio. A AM, más o menos lo mismo, o extendido, también compartimos mucho fuera del lab. A Marina, va agradecimiento doble por seguir intentando la infructuosa estrategia de fusión de los vectores. A Alina...qué puedo decir, diosa? Además de darme una mano gigante en el tema de inyectar bichos feos, se convirtió en amiga, confidente, compinche, etc..A Alicia, por ser macanuda.

A mis compañeros de laboratorio en Londres, Teresa (irá agradecimiento doble), Lluisa y Delia (por conformar, entre todas, el equipo hispanoparlante más bullicioso y divertido del IC), Jim (por su paciencia y siempre buena disposición, digna de todo lord inglés que se precie), Reneé (por su forma de ser, la compañía, el aguante, el carnaval brasileiro!), Isabelle (otra macanuda), J-Ho (o como sea, otra vez por la paciencia, esta vez digna de un oriental!) y Elisabeth (por los crepes, entre otras cosas). Todos me han hecho sentir como en casa a lo largo de mis distintas visitas.

A mis compañeros del IBBM. Por cercanía física, empiezo por 'los Verdes', Selma (por sus largas charlas sobre cualquier tema, su ayuda siempre desinteresada..se extraña, una chica de diez), Verónica El Mujtar (por las secuencias!), Silvia, Laura García, Gonzalo, Cecilia Z y Eduardo. Los 'del medio', Cecilia M, Katy López, Juan Carlos, Daniel, Mónica, Omar, Pablo, Pedro y Tirso. Los 'del fondo', Picho, Mariano, Julieta y Fede, Laura Balagué, Pity, Aníbal y

Daniela (por la onda y el aguante, sobre todo las pilas) Florencia, Nacho, Walter, Elías y Matías. Se les debe a todos reactivos, aparatos y por sobre todo las risas, el calor, las fiestas...(supieron ser buenas.. hasta que algunos superaron la barrera de los 30!).

A Caty (por autoclavadas, LB, competentes y etc), Carlitos (por arreglar todo!) y a Rubencito (por los viajes del retro y otras cosas a la cátedra).

Los que siguen, quizás no hayan tenido una incidencia tan directa en este proyecto, a los ojos de quien lea...Pero a quien escribe, le costó encontrar palabras en el diccionario para agradecer sus respectivos aportes!! Sin ellos, ni hubiera terminado esto, ni probablemente nada! Los que se repiten..por algo será! Así que paciencia, porque son muchos...

En primer lugar, a mi mamá Lili.. por todo.. sin palabras. A mi papá, calculo que de él heredé no sólo la devoción por los libros sino también el idealismo que impulsa este tipo de empresas y la terquedad necesaria para llevarlas a buen puerto, pese a todo y a todos. Ojalá estuviera.

A mis hermanos, por estar siempre, por las discusiones, las bromas...en fin, por ser como son, por aguantarme (aunque es mutuo) y ayudarme (cuando quieren, que al final es casi siempre). A Beli un agradecimiento especial por mis sobrinos, lo mejor que nos ha pasado.

A mis abuelos vivos. A Chicha, otra vez, sin palabras para la incondicionalidad para con 'su' princesita, tan desatenta. A mi abuelo Aba (o Pipi, o Abuelo, según la generación de nietos), por su interés en 'mis temas', su increíble lucidez en la comprensión de los mismos, su preocupación y ocupación.

A mis amigas de toda la vida, María Sol y la Negra. Por bancarme, sacarme, llamarme, interesarse en lo que no les interesa ni ahí (bichos, virus, clones)...en fin, por quererme todavía pese a tanta dejadez. A la Negra, por mi ahijado...Un poco más lejos, a Fer, Nacho y Eduardo.

A mis amigas de más grande, pero no por ello menos cercanas, María y Paula R.

A mis amigas más compinches y cotidianas, Paula S. y Alina, ídolas totales, hay cosas que sólo ellas entienden por estar tan piruchas como yo.

A Teresa y Salvi, porque jamás hubiera sobrevivido en Londres sin su amistad. Han sido mi familia allá, les estaré siempre agradecida. También le debo a Teresa la ayuda en el lab, y a Salvi el Gen Clean y las secuencias del Museo!

And last but not least... y porque los últimos serán los primeros..y los más importantes... a los que les cabe el final rimbombante...a mi Gustito, por haberme devuelto el amor, la risa, los mimos, las ganas, ..en fin, la vida! Le debo TODO estos últimos meses...(hasta el tipeo de la bibliografía, un par de tablas y el aguante en la compu!!)

INDICE

	Página
Resumen	1
Presentación de la información	3
Abreviaturas	4
<u>CAPÍTULO I</u> Introducción	6
<u>CAPÍTULO II</u> Materiales y Métodos	55
<u>CAPÍTULO III</u> Estudios preliminares del sistema de trabajo	
Introducción	73
Resultados	75
Conclusiones y Discusión	83
<u>CAPÍTULO IV</u> Generación de un rAgMNPV/ <i>lacZ</i> ⁺ / <i>polh</i> ⁻ y establecimiento del sistema de expresión de proteínas heterólogas	
Introducción	84
Resultados	86
Conclusiones y Discusión	99
<u>CAPÍTULO V</u> Construcción de vectores para el desarrollo de AgMNPVs recombinantes	
Introducción	102
Resultados	104
Discusión	137
<u>CAPÍTULO VI</u> Generación de AgMNPVs de mayor eficacia bioinsecticida contra una plaga de la soja	
Introducción	140
Resultados	142
Discusión	174
<u>CAPÍTULO VII</u> Conclusiones Generales	182
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	187

RESUMEN

La "oruga de las leguminosas" *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) es una plaga con amplia difusión geográfica, que afecta principalmente al cultivo de soja. En Brasil se desarrolló un bioinsecticida en base al baculovirus AgMNPV para el control de esta plaga, y su aplicación exitosa en más de un millón de hectáreas de soja, representó un ahorro significativo del presupuesto utilizado anteriormente en insecticidas químicos (Moscardi, 2002).

En Argentina, esta plaga ha sido controlada durante las últimas décadas mediante el uso de insecticidas piretroides. En la actualidad, se han debido incrementar las dosis y el número de aplicaciones (de una a dos o tres por campaña), lo cual estaría indicando la aparición de variedades resistentes a estos pesticidas (Gamundi, com. pers.). En tales circunstancias, existe una creciente demanda de productos alternativos para su control.

El inconveniente más significativo que limita la utilización más amplia de AgMNPV es su baja velocidad de acción, aspecto negativo que se acentúa en regiones templadas como nuestro país (Moscardi, 1999).

Otro aspecto que genera interés en relación al estudio de los baculovirus, es su utilidad como vectores muy eficientes para la expresión de genes heterólogos (Luckow y Summers, 1988, O'Reilly *et al.*, 1992; King y Posse, 1992). El gran tamaño del genoma viral requiere la utilización de la recombinación homóloga para introducir cambios dirigidos (Kitts y Possee, 1993; Pfeifer *et al.*, 1997).

Recientemente, esta metodología se utilizó con el objetivo de incrementar la potencia insecticida de los baculovirus salvajes. Se ensayaron distintas alternativas, que incluyen la expresión de toxinas específicas para insectos, hormonas de insecto o enzimas o deleciones de genes virales que afectan la metamorfosis (Wood y Granados, 1991, O'Reilly *et al.*, 1991; Chejanovsky *et al.*, 1995, Bonning y Hammock, 1996). En 1994 Cory *et al.* publicaron el primer trabajo en el que se utilizaron baculovirus mejorados genéticamente en un ensayo de campo.

En este contexto, se inició el presente proyecto de Tesis, con el objeto de desarrollar un sistema de producción de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (rAgMNPV) que permitiera tanto la generación de AgMNPVs

con mayor eficacia bioinsecticida contra plagas de la soja, como su utilización para la expresión de genes foráneos en un ambiente eucariota.

Para ello, se localizó, clonó y secuenció el gen de la poliedrina (*polh*) de AgMNPV y sus regiones flanqueantes; se construyeron vectores de transferencia para la recombinación homóloga con el locus *polh* y se desarrolló el primer sistema de expresión basado en AgMNPV (Arana *et al.*, 2001). Por otra parte, se demostró la eficacia del sistema para la expresión de genes foráneos, a niveles muy altos y biológicamente activos (Arana *et al.*, 2001; Arana *et al.*, 2002).

Mediante la utilización de dicho sistema se aislaron y caracterizaron recombinantes de AgMNPV que expresan una proteína neurotóxica (T_{xp} I), específica de insectos. Los resultados obtenidos a partir de insectos tratados con estos recombinantes demostraron la eficacia de la modificación genética realizada. Se comprobó una disminución del 55-60% en el tiempo de muerte de larvas infectadas por el virus recombinante, en comparación con el producido por el virus silvestre.

Los objetivos alcanzados sientan las bases para posteriores estudios de impacto ecológico del recombinante obtenido, con el fin de cumplimentar los requisitos imprescindibles para el registro del rAgMNPV como insecticida biológico de utilidad en esta región.

Finalmente, los vectores de transferencia generados en el marco del proyecto permiten la potencial utilización del sistema para la expresión de dos o más genes con funciones relacionadas (subunidades proteicas). Este tipo de construcciones podría resultar importante desde el punto de vista biotecnológico para la producción masiva de estructuras proteicas complejas (antígenos, complejos multienzimáticos, etc.).

PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Para facilitar la lectura de este trabajo de Tesis resultó conveniente la división en capítulos cuyo contenido se resume a continuación.

En el primer capítulo, se realiza una introducción general sobre los baculovirus, su ciclo de vida, los distintos aspectos de su biología molecular y sus distintas aplicaciones.

En el segundo capítulo se describen los materiales y la metodología general utilizada en el desarrollo de este trabajo.

En el tercer capítulo se expone la optimización del sistema de cultivo de AgMNPV y su caracterización genómica. Asimismo, se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la localización, clonado y secuencia del gen de la poliedrina del virus.

En el cuarto capítulo se describe el establecimiento del primer sistema de recombinación homóloga para la generación de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (rAgMNPV).

En el quinto capítulo, se refiere todo lo concerniente a la elección de la estrategia para mejorar genéticamente el virus (elección de la toxina a expresar; diseño del vector de transferencia; localización, clonado y secuenciación de las regiones virales a incluir en el nuevo vector, etc) y al análisis del modo de acción de la toxina seleccionada.

En el sexto capítulo, se describe la obtención del AgMNPV destinado al control biológico y los resultados obtenidos con el mismo.

En el séptimo capítulo, se establecen las conclusiones generales de este trabajo de Tesis.

Finalmente, se listan las referencias bibliográficas relacionadas con la información proporcionada en los capítulos anteriores.

ABREVIATURAS

% p/p	porcentaje peso en peso
% p/v	porcentaje peso en volumen
μCi	microcurie
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
BSA	seroalbúmina bovina
BV	viriones brotantes (<i>budded viruses</i>)
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
DNAasa	desoxorribonucleasa
dNTP	2' desoxirribonucleósidos 5' trifosfatos
DL ₅₀	dosis letal media
DO	densidad óptica
DOWN	<i>downstream polyhedrin</i>
DUM	<i>dorsal unpaired median neurones</i>
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
GV	virus de la granulosis (<i>granulosis viruses</i>)
h	hora(s)
HVACC	<i>high-voltage activated calcium channels</i>
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KAc	acetato de potasio
kDa	kilodaltons
kpb	kilopares de bases
LVACC _M	<i>maintained low-voltage activated calcium channels</i>
LVACC _T	<i>transient low-voltage activated calcium channels</i>
M	molar
mg	miligramo
min	minuto(s)
ml	mililitro
mM	milimolar
MOI	multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	RNA mensajero
NaAc	acetato de sodio
ng	nanogramo
NPV	virus de la poliedrosis nuclear (<i>nuclear polyhedrosis viruses</i>)
nt	nucleótidos
NTP	ribonucleósidos trifosfatos
OB	<i>occlusion bodies</i>
ODV	<i>occlusion derived virions</i>
ORF/s	<i>open reading frame</i>
p.i.	post infección

PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>polyacrylamid gel electrophoresis</i>)
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
pfu	unidades formadoras de placas (<i>plaques forming units</i>)
<i>Pfu</i> pol	Polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>polh</i>	gen de poliedrina (<i>polyhedrin gene</i>)
PM	peso molecular
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo(s)
SBF	suero bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)
SSC	sal-citrato de sodio (Salt Sodium Citrate)
<i>Taq</i> pol	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TL ₅₀	tiempo letal medio
Tris	tris-(hidroximetil)- aminometano
tRNA	RNA de transferencia
TXP I	<i>Pyemotes tritici</i> toxin
UPS	<i>upstream polyhedrin</i>
VDCC	voltage-dependent calcium channels
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

El virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis*, AgMNPV, es un baculovirus y de todos los virus conocidos por el hombre, los baculovirus son una de las especies más benéficas, desde un punto de vista antropocéntrico. Mientras que otros virus son estudiados porque causan problemas, las bases del estudio de los baculovirus fueron estimuladas por el potencial uso de estos organismos para controlar plagas de insectos. Asimismo, el uso actual de los baculovirus como eficientes vectores de expresión de genes eucariotes, evolucionó a partir del estudio de la biología molecular de esta familia viral. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, intentamos integrar estos dos aspectos, para el caso particular de AgMNPV.

Por consiguiente, la finalidad del presente Capítulo es suministrar las bases teóricas para la comprensión del fundamento y los objetivos de los estudios encarados en el proyecto.

Con ese propósito, esta Introducción General fue dividida en apartados, debido a la diversidad de aspectos a abordar. En el apartado I.1, se proporciona información general sobre el estado actual del conocimiento de la familia *Baculoviridae*; se describe la estructura de las partículas virales, la secuencia de etapas de la infección, la interacción del virus y sus productos génicos con el huésped tanto a nivel celular y como con el organismo multicelular desde una perspectiva bioquímica, molecular y celular. El apartado I.2 se refiere específicamente a los baculovirus como sistemas de expresión, diseño de vectores de transferencia, virus parentales, etc. El penúltimo apartado está relacionado con el uso de los baculovirus para el control de plagas, las modificaciones posibles para mejorar su eficacia, pros y contras. Por último, en el apartado I.4 se describe específicamente la experiencia brasileña de empleo de AgMNPV como bioinsecticida, las dificultades que presenta su expansión comercial, y las posibles soluciones.

I.1 LA FAMILIA *BACULOVIRIDAE*

Los baculovirus comprenden una familia numerosa de virus que infectan exclusivamente a artrópodos, exhibiendo, salvo contadas excepciones, un rango de huéspedes muy estrecho. Su patrón de replicación es complejo e incluye la producción de prole con dos fenotipos diferentes, que poseen la misma información genética.

La producción de los fenotipos se encuentra regulada y ocurre en sitios y etapas diferentes de la infección. Los primeros viriones que se producen durante el ciclo de infección brotan de la membrana plasmática y reciben el nombre de virus brotantes (*budded virus*, BV), mientras que en etapas tardías se observa la formación de viriones rodeados por una matriz proteica pseudocristalina, que se acumula en la célula como cuerpos de inclusión que contienen una o más nucleocápsides envueltas (*occluded virus*, OV). En función de la morfología de los cuerpos de inclusión (**Figura I.1**) y de algunas características diferenciales en la biología de la infección se distinguen dos géneros en la familia Baculoviridae: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), cuyos cuerpos de inclusión se encuentran en el núcleo de la célula infectada, son poliédricos y pueden contener uno o más viriones (los tamaños publicados varían entre 0,5 y 15 μm , pero la mayoría de los NPVs tienen poliedros de 0,8-2,0 μm), y *Granulovirus* (GV), cuyos cuerpos de inclusión son ovoides, de menor tamaño (ovoides de 0,15-0,30 μm x 0,30-0,50 μm), y se detectan en las células infectadas que ya han perdido la integridad de la membrana nuclear (Federici, B.A., 1986). Dado que los estudios de los GVs se han visto entorpecidos por la dificultad en el desarrollo de sistemas de cultivos celulares susceptibles, la mayor parte de los conocimientos en biología molecular y celular deriva de las investigaciones focalizadas en los NPVs. AgMNPV, es un nucleopoliedrovirus cuyos cuerpos de inclusión contienen múltiples nucleocápsides (MNPV). En esta Introducción, se utilizará como modelo de referencia el nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV), extensamente estudiado en diferentes planos desde los años 70, debido a la facilidad en su propagación en diferentes insectos huésped (es el baculovirus de mayor rango de huéspedes conocido) y líneas celulares. La secuencia nucleotídica de su genoma fue la primera en ser determinada en forma completa, permitiendo una aceleración en el conocimiento de la complejidad de la organización genética y la detección de nuevos genes y funciones en los 134 kb (kilo pares de bases) de DNA.

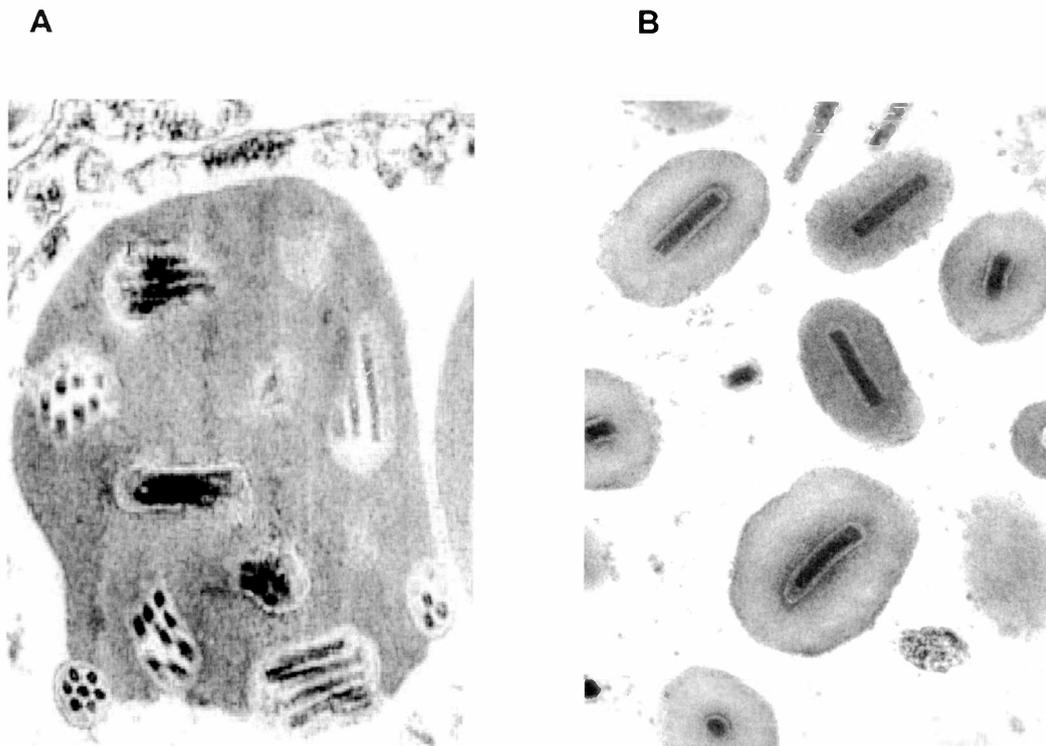


Figura I.1. Ultraestructura de los cuerpos de oclusión. Observaciones al microscopio electrónico de transmisión de un poliedro (panel A) y gránulos (panel B), con las nucleocápsides incluidas.

Estructura molecular de los viriones

Los genomas de los diferentes baculovirus son de DNA circular de doble cadena (dsDNA) de 78 a 200 kb y se encuentran asociados con proteínas básicas constituyendo nucleocápsides con forma de bastón de 40 x 200-400 nm (Tweeten *et al.*, 1980; Wilson *et al.*, 1987). Las nucleocápsides se encuentran envueltas, a su vez, por una membrana lipídica que contiene proteínas codificadas por el virus.

En este punto cabe diferenciar los dos fenotipos virales que constituyen una característica única de la familia Baculoviridae: virus brotantes (BV, *budded virus*; NOV, *non-occluded virus*, son denominaciones equivalentes) y virus ocluidos (OV, *occluded virus*; OB, *occlusion body*; PIB, *polyhedral inclusion body*). Los viriones brotantes se producen en la fase tardía de la infección, cuando las nucleocápsides brotan por la membrana plasmática modificada con proteínas codificadas por el genoma viral. Por el contrario, en la fase muy tardía de la infección se forman los cuerpos de inclusión rodeando a las nucleocápsides, que adquieren su membrana en

el núcleo. La matriz proteica de estas inclusiones está formada por el acúmulo de una proteína mayoritaria denominada poliedrina o granulina, según el género de baculovirus, NPV o GV, respectivamente.

En la mayoría de los OBs de NPVs se observan varios viriones por poliedro y en algunas especies denominadas MNPVs (*Multiple nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus*) se ven varios manojos de nucleocápsides envueltas en una membrana, mientras que los gránulos de los GVs, generalmente, poseen un solo virión (Granados & Federici, 1986). El huésped, el tipo celular y las condiciones de la infección influyen sobre el número de nucleocápsides que se rodean por una misma membrana (1-10), en ocasiones, un MNPV puede comportarse como un SNPV (*Single enveloped nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus*). Eventualmente, pueden observarse algunos cuerpos de inclusión sin viriones (poliedros vacíos). El empaquetamiento de múltiples nucleocápsides por ODV acelera la infección sistémica en larvas (Washburn *et al.*, 1999)

La disolución de la matriz proteica de los cuerpos de inclusión libera viriones denominados ODV (*occlusion derived virions* o PDV, *polyhedra derived virions*) con una envoltura diferente a la de los BV. En la **Figura I.2** se esquematizan los viriones y se indican las similitudes y diferencias de sus estructuras moleculares. La participación de los ODV y BV en el ciclo de infección se resumen en las secciones que siguen, en las que también se indican los roles de algunos productos génicos virales en su interacción con el organismo huésped.

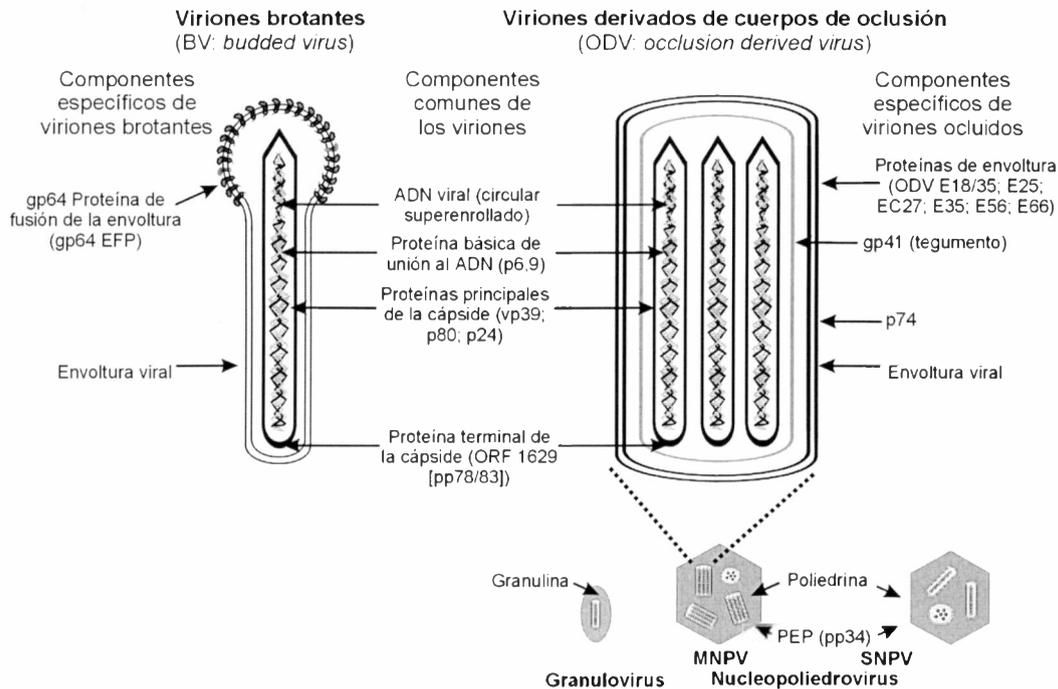


Figura I.2. Componentes estructurales básicos de los dos fenotipos virales. En forma esquemática se representan las estructuras de los viriones brotantes (BV) y de los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV). El esquema de los ODV corresponde a la estructura de una multicápside de nucleopoliedrovirus (MNPV). La estructura de los SNP y GV probablemente es equivalente a la representada con la única diferencia del número de cápsides por cuerpo de oclusión. Los componentes específicos de los BV o de ODV están indicados a la izquierda y a la derecha de los diagramas, respectivamente. Los componentes comunes se indican en la región central. La naturaleza polar de las cápsides se indica con diferente forma en sus extremos. Referencias de las proteínas estructurales: P6,9 (Wilson *et al.*, 1987); VP39 (Pearson *et al.*, 1988; Blissard *et al.*, 1989; Thiem y Miller, 1989; Russell *et al.*, 1991); P80 (Müller *et al.*, 1990; Lu y Carstens, 1992); PP78/83 (Vialard y Richardson, 1993; Russell *et al.*, 1997); poliedrina (POLH) (Hooft van Iddekinge *et al.*, 1983); PEP (PP34) (Gombart *et al.*, 1989b; Russell y Rohrmann, 1990b); ODV-E25 (Russell y Rohrmann, 1993); ODVE66 (Hong *et al.*, 1994); ODVE56 (Braunagel *et al.*, 1996a, Theilmann *et al.*, 1996); ODVE18, E35 y EC27 (Braunagel *et al.*, 1996b); GP41 (Whitford y Faulkner, 1992a y b); P74 (Kuzio *et al.*, 1989); GP64 (Blissard y Rhormann, 1989; Whitford *et al.*, 1989)

Infección primaria y secundaria.

El ciclo de infección comienza cuando los cuerpos de oclusión son ingeridos por larvas al alimentarse, continúa con la dispersión de la enfermedad dentro del insecto y finaliza tras la muerte del mismo con la liberación de nuevos cuerpos de oclusión que contienen partículas infectivas (**Figura I.3**) (Caballero *et al.*, 2001).

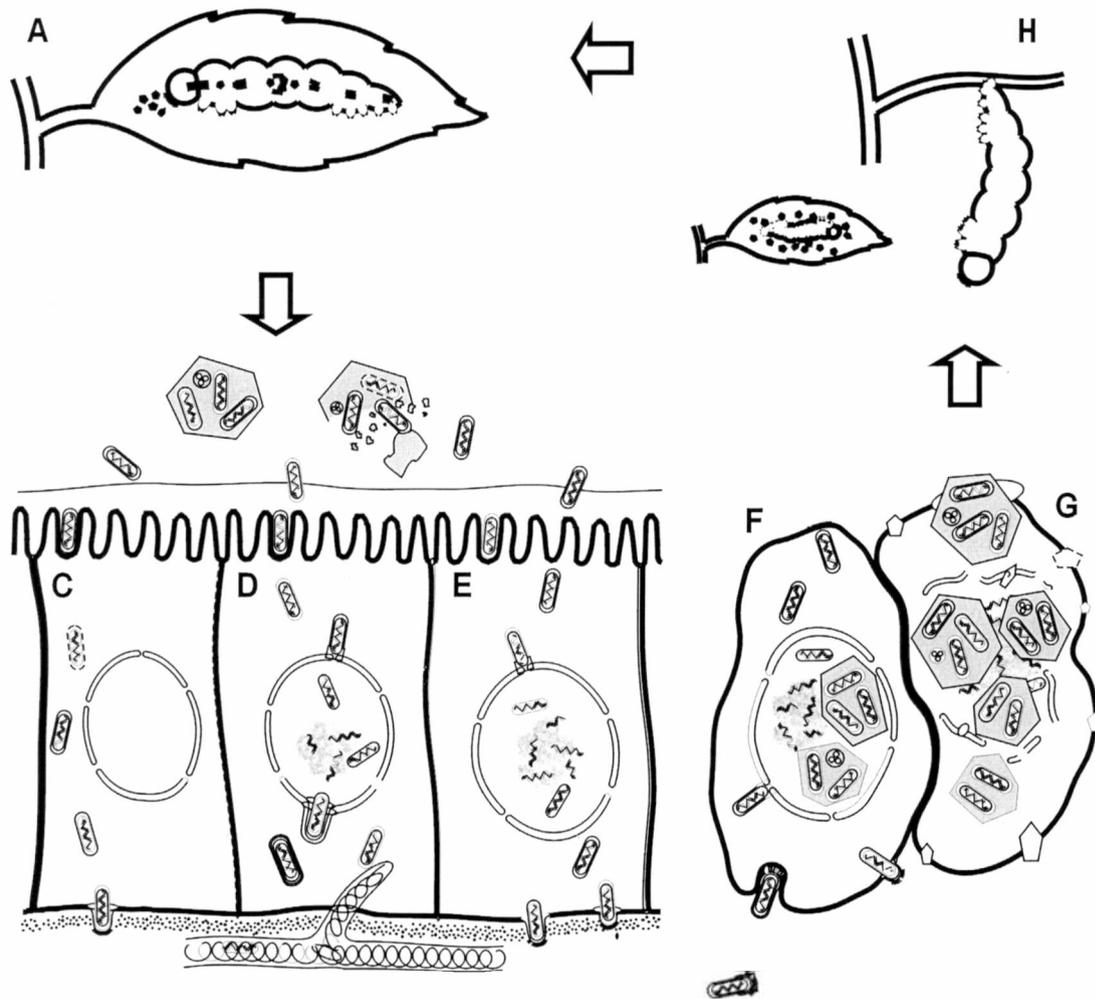


Figura I.3. Esquema del ciclo biológico de un NPV. (Los tamaños dibujados no guardan proporción con los tamaños reales). A: La larva ingiere los cuerpos de inclusión al alimentarse. B: En el intestino medio se disuelven los cuerpos de inclusión y quedan así liberados los viriones (ODV) que luego de atravesar la membrana peritrófica, se unen por fusión a las microvellosidades del intestino. A partir de este estado, han sido descritas vías de infección hacia el hemocele. C: Las nucleocápsides pueden pasar directamente a través de la célula atravesando la lámina basal y brotando hacia la hemolinfa. D: el ciclo inicial de replicación ocurre en las células columnares del intestino medio y la progenie viral brota hacia los traqueoblastos diseminándose la enfermedad a través del sistema traqueal. E: Luego de la replicación en las células del intestino, los viriones brotan hacia la hemolinfa. Los viriones brotantes (BV) causan la infección secundaria dentro del hemocele. F: las partículas virales (BV) entran a los tejidos susceptibles por endocitosis; las nucleocápsides se dirigen al núcleo y allí liberan el DNA; se inicia un nuevo ciclo de replicación que culmina en la formación de nuevos BV y de viriones que se ocluyen en los poliedros. G: Se produce la lisis nuclear y celular. H: Finalmente, se rompe el tegumento larval y quedan liberados los cuerpos de oclusión en el ambiente, que al ser ingeridos por otras larvas comenzarán un nuevo ciclo de infección.

Como se mencionó más arriba, los OB son ingeridos junto con el follaje que es consumido por un nuevo huésped y disueltos en su intestino medio, donde el pH es alcalino. A pH 9-10 se activa una proteasa de origen celular que acelera el proceso de disolución de la proteína de oclusión y liberación de los ODV. Estos ODV infectan las células epiteliales del intestino con gran eficiencia (Volkman & Summers, 1977; Engelhardt *et al.*, 1994; Flipsen *et al.*, 1995; Washburn *et al.*, 1995; ver review de Volkman, 1997).

No se ha demostrado la existencia de interacciones específicas virus - receptor, aunque algunos estudios sugieren un proceso de unión de viriones con sitios saturables en los microvilli de las células epiteliales del intestino (Horton & Burand, 1993). Las evidencias de los estudios de microscopía electrónica y de inhibidores de la endocitosis sugieren que las nucleocápsides de los ODV entran por fusión de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula epitelial (Granados, 1978; Horton & Burand, 1993).

La membrana de los ODVs contiene varias proteínas: ODV E25, ODV-E66, ODV-E56 (ODVP-6E) y P74 (Theilmann *et al.*, 1996; Braunagel *et al.*, 1996a, 1996b; Braunagel & Summers, 1994; etc. pag. 76 Vlak, Faulkner *et al.*, 1997 P74; Braunagel *et al.*, 1999). Además, por debajo de la membrana del virión, en el llamado tegumento se localiza la GP41 (Liu & Maruniak, 1995, Whitford & Faulkner, 1992a, 1992b.). No se conoce la función de las diferentes proteínas, aunque se ha demostrado que las mutaciones que inactivan al gen p74 de AcMNPV conducen a la formación de ODVs no infecciosos (Faulkner *et al.*, 1997).

Por otra parte, la membrana lipídica posee una estructura típica de bicapa, que posiblemente sea derivada de las microvesículas que se forman a partir de la membrana nuclear interna de las células infectadas y en las que se ha detectado la proteína ODV-E66 (Hong *et al.*, 1994; Fraser, 1986). Sin embargo, si esto es cierto, las membranas de los ODV deben sufrir bastantes modificaciones en la composición lipídica, ya que difieren de las proporciones encontradas en las membranas nucleares (Braunagel & Summers, 1994).

Infección secundaria

Los BV son el producto de la replicación viral en la etapa tardía y contienen una sola nucleocápside envuelta en una membrana, que proviene de la brotación de la membrana plasmática de la célula infectada. En la infección de una larva de

lepidóptero el ciclo de replicación que inician los ODV en la célula epitelial produce una progenie de BV, que brota de la membrana basolateral e infecta otros tejidos (**Figura 2A**). En uno de los extremos del virión se destacan unas estructuras protuberantes o peplómeros (*spikes*), formadas por la proteína de fusión GP64 (*envelope fusion protein*: GP64 EFP), que no se encuentra en los ODVs (Oomens *et al.*, 1995; Blissard & Rohrmann, 1989; Whitford *et al.*, 1989; Volkman, 1986; **Figura 2**).

Granados y Lawler (1981) propusieron un mecanismo alternativo de producción de BV, que no requiere de la replicación y consiste en una rápida conversión de ODVs en BVs (**Figura 2B**). Esto es coherente con el hecho de que GP64 EFP se expresa tanto en la fase temprana (antes de la replicación del DNA viral) como en la tardía (Blissard & Rohrmann, 1989 y 1991; Jarvis & García, 1994; Whitford *et al.*, 1989). Este mecanismo puede haber sido seleccionado por presentar una ventaja evolutiva. De hecho, las células epiteliales del intestino medio infectadas se descaman más rápidamente y se eliminan. Con el fin de que la infección pase rápidamente a otros tejidos, en forma previa a la descamación de las células, deben producirse en un tiempo muy corto los BVs capaces de infectar a otras células que se encuentran en las proximidades o pasar a los conductos traqueales y la hemolinfa. Por ello, es muy favorable para la propagación de la infección que una parte de las nucleocápsides que entraron a la célula se desnuden y expresen GP64, en tanto que otras migran a la porción basal para brotar por esa membrana, en la que se inserta GP64 (y, eventualmente, otros productos génicos recién sintetizados). Este mecanismo no provee las ventajas de amplificación viral asociada a la replicación, pero asegura un rápido movimiento del virus desde la capa epitelial hacia otros tejidos internos. Parece razonable la coexistencia de ambos mecanismos para asegurar la propagación del virus.

En contraste con los ODV, los BV entran a la célula huésped por endocitosis mediada, probablemente, por interacción de GP64 con un receptor aún no identificado (Volkman & Goldsmith, 1985; Wickham *et al.*, 1990; Wickham *et al.*, 1992) (**Figura 2C**). La homología de GP64 con la glicoproteína de envoltura de los orthomyxovirus Thogoto y Dhori sugiere que esta proteína desempeña la función mencionada más arriba, pero no existen datos experimentales directos sobre la interacción con un receptor específico y no podrían excluirse otras proteínas de la membrana viral.

En forma coherente con el modelo descrito, se ha observado que la GP64 permanece en la membrana endosómica luego de ocurrir la fusión dependiente del pH, que conduce a la liberación hacia el citosol de las nucleocápsides, que migran hacia la membrana nuclear. El bloqueo de la infección mediante el uso de agentes como el

cloruro de amonio y la cloroquina (que impiden la acidificación del interior del endosoma) confirman la entrada de los BV por la vía de la endocitosis y fusión con la membrana endosómica dependiente del pH bajo (Charlton & Volkman, 1993). Cabe aclarar que algunos baculovirus (como XcGV y LdMNPV) no poseen un gen gp64, aunque seguramente que alguna otra proteína integral de membrana desempeña una función similar.

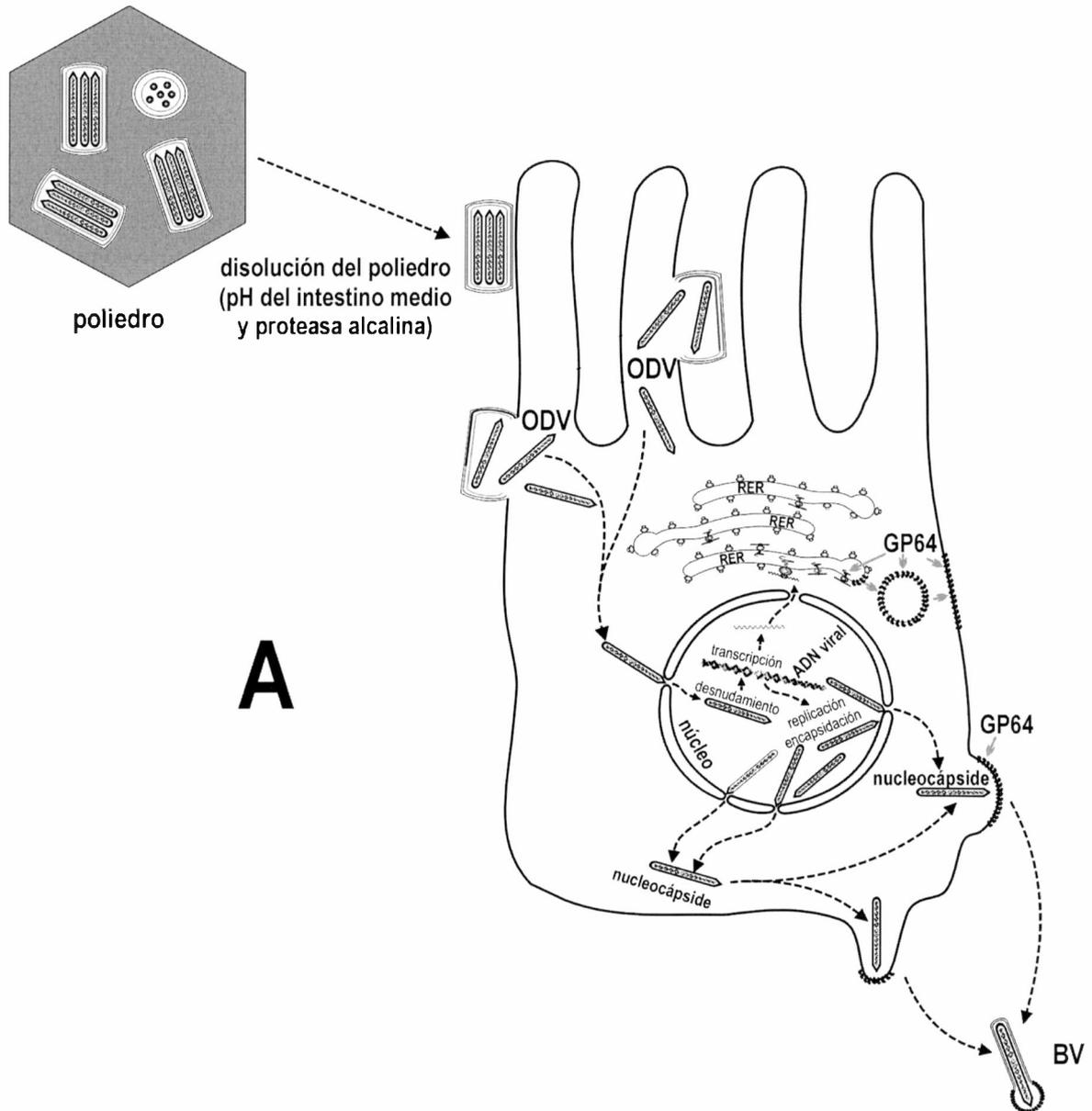


Figura 2.A. Infección primaria y producción de BVs. Los cuerpos de inclusión (OB, poliedros de NPV o gránulos de GV) liberados al ambiente como consecuencia de la muerte y lisis de insectos infectados, son ingeridos junto con el follaje por un nuevo huésped y disueltos en su intestino medio. Estos ODV infectan las células epiteliales del intestino con gran eficiencia. Una vez ingresadas en la célula, las nucleocápsides migran hacia el núcleo, donde se produce el desnudamiento del DNA y la cascada de eventos moleculares asociados con la transcripción/replicación. En la fase tardía de la infección, se produce el ensamblaje de nuevas nucleocápsides dentro del núcleo. Las mismas salen del núcleo por los poros nucleares y migran hacia la porción basal de la célula para brotar por la membrana, en la que existen los conjuntos de GP64 (región basal/basolateral) sintetizados en el RER y, eventualmente, otros productos génicos. Este mecanismo provee las ventajas de la amplificación viral asociadas a la replicación, aunque no asegura un rápido movimiento del virus desde la capa epitelial hacia otros tejidos internos. Con el fin de clarificar la interpretación del mecanismo, no se han respetado las proporciones correspondientes en algunos detalles.

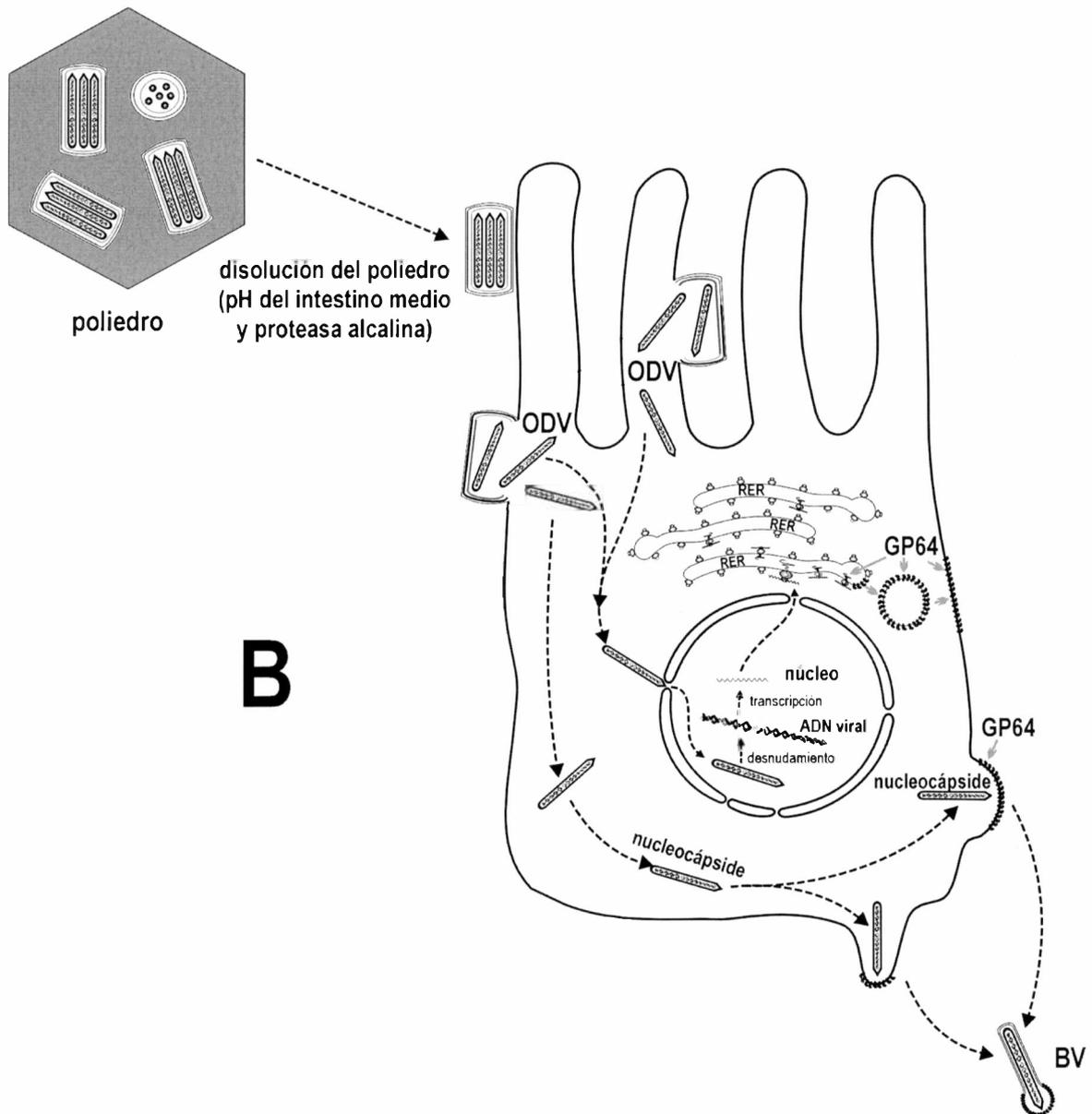


Figura 2.B. Infección primaria y producción rápida de BVs. Los cuerpos de inclusión (OB, poliedros de NPV o gránulos de GV) liberados al ambiente como consecuencia de la muerte y lisis de insectos infectados, son ingeridos junto con el follaje por un nuevo huésped y disueltos en su intestino medio. Estos ODV infectan las células epiteliales del intestino con gran eficiencia. Granados y Lawler (1981) propusieron un mecanismo de producción de BVs, que no requiere de la replicación y consiste en una rápida conversión de ODVs en BVs. Una vez ingresadas en la célula, algunas de las nucleocápsides migran hacia el núcleo, donde se produce el desnudamiento del DNA, la transcripción, esencialmente, de *gp64* y, posteriormente, la síntesis activa de GP64 en el RER (retículo endoplásmico rugoso) y su transporte a la membrana plasmática, donde se forman conjuntos en la región basal/basolateral. Por otra parte, muchas nucleocápsides enteras migran a la porción basal de la célula para brotar por la membrana, en la que existen los conjuntos de GP64 y, eventualmente, otros productos génicos recién sintetizados. Este mecanismo asegura un rápido movimiento del virus desde la capa epitelial hacia otros tejidos internos. Con el fin de clarificar la interpretación del mecanismo, no se han respetado las proporciones correspondientes en algunos detalles.

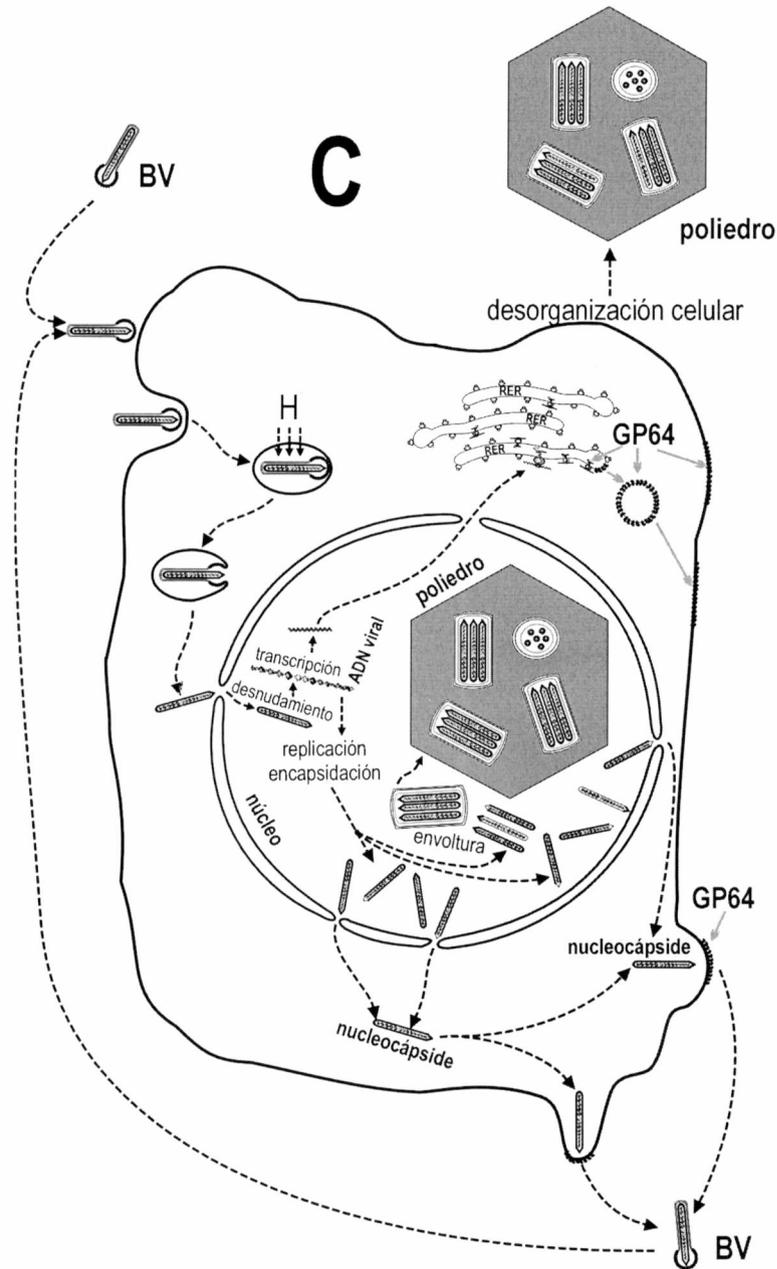


Figura 2.C. Infección secundaria y producción de OBs. Los BVs generados en las células epiteliales (o células infectadas de otros tejidos) entran a una nueva célula huésped por endocitosis, probablemente mediada por interacción de GP64 con un receptor. Una vez liberada la vesícula endosomal en el citosol, se produce la acidificación del contenido vesicular llevando a la fusión de las membranas viral y endosomal, en la cual permanece GP64. Esta fusión dependiente del pH, conduce a la liberación hacia el citosol de las nucleocápsides, que migran hacia la membrana nuclear, e ingresan por los poros nucleares. En la fase tardía de la infección, se produce el ensamblaje de nuevas nucleocápsides dentro del núcleo. Las mismas salen del núcleo por los poros nucleares y migran hacia la porción basal de la célula para brotar por la membrana (región basal/basolateral). En la fase muy tardía de la infección, las nucleocápsides son envueltas, en conjuntos (MNPVs) o individualmente (SNPVs y GVs), con membranas derivadas de la membrana nuclear. Finalmente, las nucleocápsides envueltas quedan atrapadas en la matriz pseudocristalina de poliedrina (o granulina), constituyendo los cuerpos de inclusión (OB, poliedros de NPV o gránulos de GV). Los cuerpos de inclusión se acumulan en el núcleo en las NPVs o en el citoplasma (o región nuclear desorganizada?) en las GVs. La fase muy tardía y la acumulación de cuerpos de inclusión lleva a la apoptosis celular y su desorganización, produciéndose la liberación de los OBs. Con el fin de clarificar la interpretación del mecanismo, no se han respetado las proporciones correspondientes en algunos detalles.

Progreso de la infección en cultivo celular. Regulación de la transcripción.

La expresión de genes virales está regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía (**Figura I.4**). Durante la fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral. Por su parte, la replicación del DNA viral es un paso necesario para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. En la fase tardía se producen proteínas virales estructurales y se ensamblan y liberan al medio extracelular viriones infectivos, mientras que la etapa muy tardía está dedicada a la producción de los cuerpos de inclusión.

Se considera que el mecanismo más importante en el control de la expresión génica consiste en la regulación a nivel de la iniciación de la transcripción, es decir en la etapa de reconocimiento de los promotores. Sin embargo, también se especula sobre la regulación negativa (*downregulation*) de la transcripción de los mRNAs tempranos por los procesos de transcripción de genes tardíos; en particular, cuando los productos de transcripción corresponden a regiones parcialmente superpuestas pero de sentido opuesto (efecto de RNA *antisense*, Ooi & Miller, 1990) o a transcriptos tardíos que se inician *upstream* de transcriptos tempranos dando lugar a un efecto de ocultamiento del promotor temprano (Friesen & Miller, 1986).

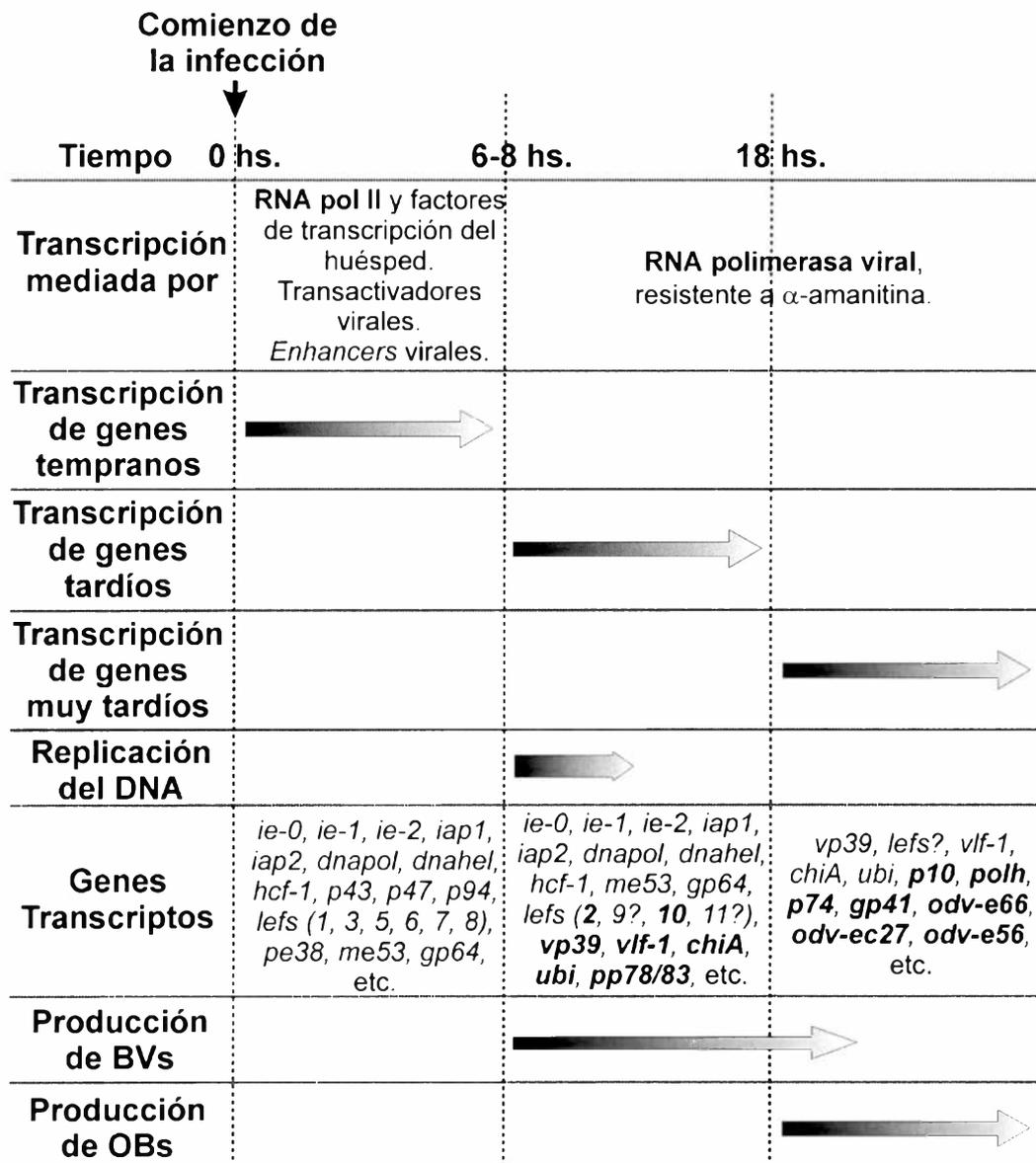


Figura 3. Diagrama de los principales eventos transcripcionales relacionados con el ciclo viral. La expresión de genes virales parece estar regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía. Durante la fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral y muchos de los transactivadores necesarios para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos. Por otra parte, la replicación del DNA viral es un paso necesario para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. En la fase tardía se producen, principalmente, proteínas virales estructurales y se ensamblan y liberan al medio extracelular viriones infectivos, mientras que en la etapa muy tardía se producen las proteínas necesarias para la generación de los cuerpos de inclusión. En el diagrama se mencionan algunos ejemplos de genes activos durante las distintas etapas. En las etapas tardía y muy tardía, se señalan en negrita algunos genes que se activan especialmente en la etapa respectiva. Esta figura sólo tiene una finalidad ilustrativa. En la realidad, las divisiones temporales no son tan netas como las indicadas. (Romanowski y Ghiringhelli, 2001).

Expresión de genes tempranos (utilización de la maquinaria celular).

Luego del desnudamiento, algunos genes del DNA viral son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula huésped. Por lo tanto, en esta etapa, la transcripción es sensible a la inhibición por α -amanitina.

Los genes de transcripción temprana pueden subdividirse en dos clases, que difieren en sus promotores y *enhancers*. La transcripción de los genes tempranos inmediatos (*immediate early*) tales como *ie-1* no requiere proteínas virales adicionales ni elementos de *enhancers*, mientras que los tempranos retrasados (*delayed-early*) son transcritos a niveles basales en ausencia de factores virales, pero requieren de la unión del transactivador IE-1 a los *enhancers* para llegar a los niveles de expresión máximos (Pullen & Friesen, 1995a; Guarino & Smith, 1992; Guarino & Dong, 1991; Hoopes & Rohrmann, 1991).

Muchos de los promotores tempranos se parecen a los promotores de la RNA polimerasa II (**Figura I.4**) y contienen un *TATA box* típico aproximadamente 30 nucleótidos antes (*upstream*) del sitio de iniciación de la transcripción. La unión de la TBP (*TATA box binding protein*) a las secuencias TATA recluta al complejo de la RNA polimerasa II, que inicia la transcripción unos 30 nucleótidos más adelante (*downstream*). Los elementos basales de los promotores tempranos, tales como el *TATA box*, pueden encontrarse combinados y reiterados en algunos genes de baculovirus de expresión temprana (Guarino & Smith, 1992; Kogan *et al.*, 1995; Pullen & Friesen, 1995b). También se han encontrado algunos promotores tempranos que no contienen el motivo TATA. Frecuentemente, se encuentra la secuencia conservada CAGT, similar a la de genes de insectos transcritos por la RNA polimerasa II, siendo el nucleótido A el correspondiente al inicio de la transcripción (Blissard & Rohrmann, 1990, Cherbas & Cherbas, 1993). En la mayoría de los casos en que se ha definido un CAGT funcional, también se observa la presencia de una secuencia TATA. Se ha demostrado que la secuencia CAGT desempeña un importante papel en la eficiencia de transcripción, probablemente influyendo sobre la afinidad por el factor de transcripción TFIID (Guarino & Smith, 1992; Kogan *et al.*, 1995; Pullen y Friesen, 1995b, Purnell *et al.*, 1994).

Si bien la transcripción de los genes tempranos de baculovirus ocurre en el núcleo de la célula huésped mediante la participación de la RNA polimerasa II, el proceso de *splicing* no es común para los mRNAs de baculovirus. Solamente en el producto de transcripción del gen *ie0* se identificó el *splicing* de un intrón, responsable de la producción de un mRNA que se traduce a una proteína que contiene 54 aminoácidos extra en el extremo N de la secuencia de IE1 (Kovacs *et al.*, 1991a).

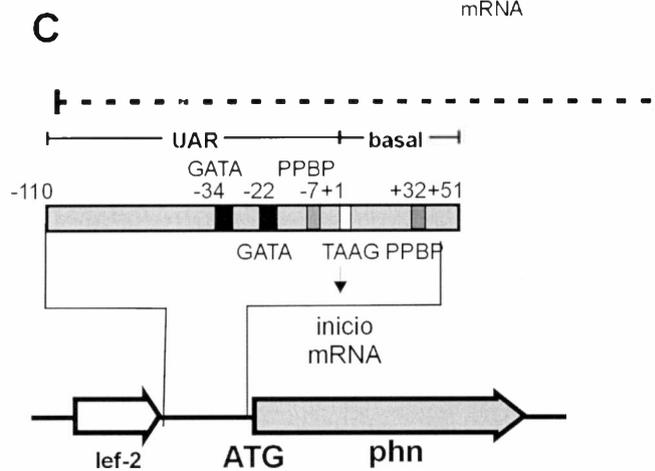
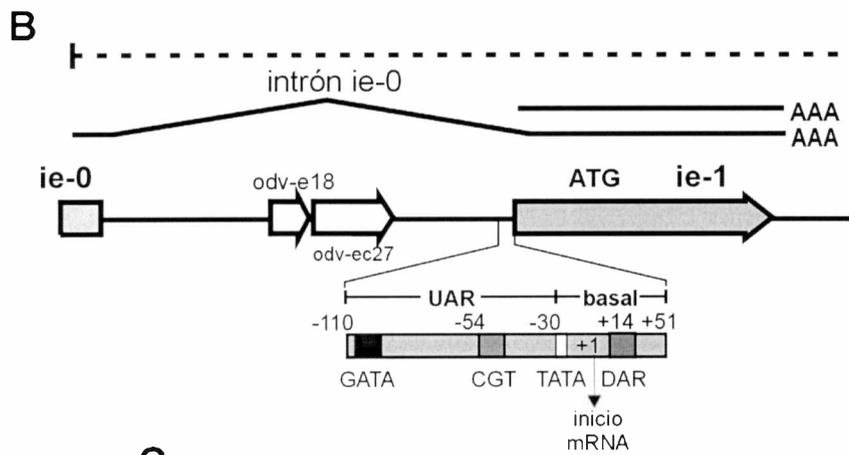
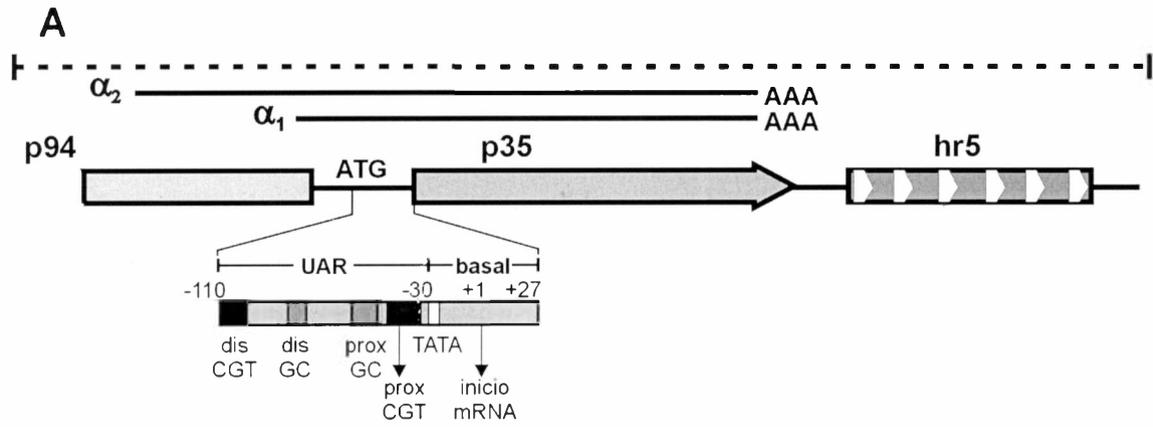
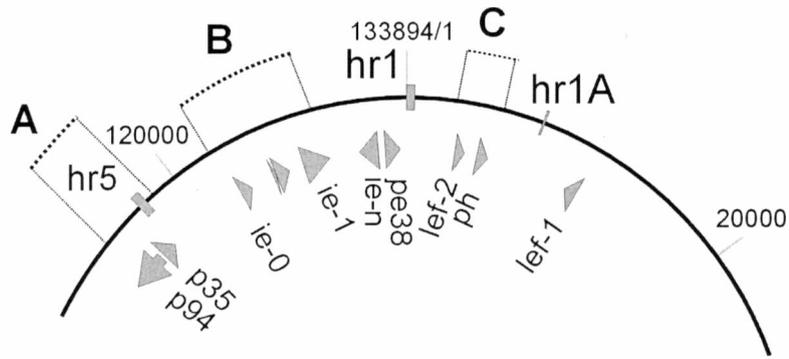


Figura I.4. Organización de los elementos regulatorios de la transcripción en promotores tempranos y muy tardíos. En los promotores de los baculovirus se pueden diferenciar dos regiones asociadas con la regulación de la transcripción **basal** (*core promoter*) y una región con elementos regulatorios adicionales llamada **UAR** (*upstream activating factors*). Muchos de los promotores de genes de transcripción temprana se parecen a los promotores de la RNA polimerasa II eucariótica y son transcritos por ella. La transcripción de los genes tempranos inmediatos (*immediate early*) tales como *ie1* no requiere proteínas virales adicionales y son suficientes los elementos presentes en la región **basal** y **UAR** para asegurar la transcripción en los niveles necesarios. La región basal del promotor *ie-1* contiene un *TATA box* típico (unión de TBP, *TATA box binding protein*), un INR (*initiator*) con la secuencia CAGT (donde la A es el +1 de transcripción) importante para la interacción con el factor de transcripción TFIID y una zona llamada **DAR** (*downstream activating region*), cuya secuencia responde al consenso (A/T)CACNG, asociada con la estabilización de la interacción del complejo transcripcional con la zona INR. La región **UAR** del promotor de *ie-1* contiene un elemento GATA (T/A GATA A/G) y un elemento CGT (CACGTG), los cuales son reconocidos por grandes familias de factores de transcripción eucarióticos, (los factores GATA y las proteínas B-HLH-Zip). En el caso de los genes tempranos retrasados (*delayed-early*), la transcripción se realiza a niveles basales en ausencia de factores virales y requiere de la unión del transactivador IE-1 a los *enhancers* para llegar a los niveles de expresión máximos. La región **basal** del promotor de *p-35* contiene un *TATA box* típico y un INR con la secuencia TGAG (donde el primer G es el +1 de transcripción). Antes del INR temprano presenta, además, un elemento INR correspondiente a promotores tardíos y muy tardíos (TAAG, donde el primer A es el +1 de transcripción), que asegura la continuidad de la expresión de P35 durante el ciclo viral. La región **UAR** del promotor *p-35* carece de elementos GATA y presenta tres elementos CGT y dos elementos GC (*GC box*) típicos, los cuales son reconocidos por factores de transcripción del hospedador. Por otra parte, salvo raras excepciones, la transcripción de genes tardíos y muy tardíos se inicia en el primer A de la secuencia conservada TAAG, que constituye el límite de la región **basal**. En los promotores tardíos sólo los 6-8 nucleótidos adyacentes al elemento central TAAG parecen ser responsables del nivel transcripcional adecuado. Mientras que en los promotores muy tardíos, las secuencias ricas en AT inmediatamente *downstream* del sitio de iniciación de la transcripción parecen influir también en la eficiencia de la actividad del promotor. En los promotores muy tardíos, como el de poliedrina (*polh* o *phn*), el nivel de expresión depende de la naturaleza de la secuencia nucleotídica situada entre el sitio de iniciación de la transcripción y el codón de iniciación de la traducción. Esta secuencia *leader* no traducida de los mRNAs es requerida para la hiperexpresión y se la conoce con el nombre de "*burst sequence*" (responsable de la expresión explosiva de los genes muy tardíos). En la *burst sequence* se encuentran elementos de unión tanto a factores virales (VLF-1) como celulares (PPBP, *polyhedrin promoter binding protein*), existen evidencias experimentales de la importancia de ambos tipos de factores en la hiperexpresión del gen *phn* (Yang y Miller, 1999; Ghosh, *et al.*, 1998). En la región **UAR** del gen *phn* se encuentran dos elementos GATA típicos y un elemento PPBP adicional, los cuales interactúan con un factor celular no identificado de aproximadamente 200 kDa. Es de destacar que la ausencia de estos elementos no afecta significativamente los niveles de transcripción del gen *phn*. (Romanowski y Ghiringhelli, 2001).

Transición de la fase temprana a la tardía (replicación del DNA)

El DNA desnudo resulta infeccioso, hecho que demuestra que no se requiere ninguno de los componentes asociados con el virión maduro, pero es dependiente de la síntesis de proteínas codificadas por el virus (Burand *et al.*, 1980; Wang & Kelly, 1983; Lu & Miller, 1997). Las proteínas responsables de la replicación del genoma viral se

expresan en la etapa temprana de la infección. En células de *Spodoptera frugiperda* infectadas con AcMNPV la replicación se detecta a las 6 hs postinfección y continúa hasta alrededor de las 18 hs postinfección, declinando posteriormente (Tjia *et al.* 1979).

Se han identificado elementos de secuencia nucleotídica que son requeridos *in cis* para una replicación eficiente del DNA viral que pueden funcionar como orígenes de replicación. Se trata de regiones homólogas con palíndromos imperfectos (*hrs*) y otro tipo de secuencias denominadas *non-hrs* (Kool *et al.*, 1995). Los orígenes de replicación *hrs* contienen grupos de 1 a 8 secuencias palindrómicas de unas 28 pb repetidas en forma dispersa en el genoma (**Figura I.5**; Cochran & Faulkner, 1983) y también funcionan como *enhancers* (Guarino & Summers, 1986). Los orígenes de replicación *non-hrs* son de estructura más compleja: contienen regiones ricas en AT, repeticiones directas y palíndromos no relacionados con los *hrs* (Kool *et al.*, 1994a; Pearson *et al.*, 1993; Heldens *et al.*, 1997).

La replicación del DNA es aparentemente un requisito para el inicio de la expresión de genes tardíos de los baculovirus, dado que la inhibición de la replicación del DNA por aphidicolina también bloquea la transcripción este grupo de genes (Miller *et al.*, 1981; Rice & Miller, 1986).

A diferencia de los genes de expresión temprana, los genes tardíos y muy tardíos son transcritos por una RNA polimerasa codificada por el virus y resistente a la α -amanitina (Gula *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1991; Glocker *et al.*, 1993).

En experimentos de expresión transiente se ha identificado una serie de diecinueve productos génicos necesarios para la transcripción de genes tardíos de AcMNPV. De estos productos génicos denominados *lef* (*late expression factors*), una parte está relacionada con la replicación del DNA viral, en tanto que el resto parece afectar la transcripción de los genes tardíos de una manera más directa (Todd *et al.*, 1995; Kool *et al.*, 1994b; Lu & Miller, 1995; Rapp *et al.*, 1998).

Los genes *ie-1* (transactivación de genes tempranos), *ie-2* (transactivación de genes tempranos y bloqueo del ciclo celular), *lef-1* (DNA primasa?), *lef-2*, *lef-3*, *p143* (*dnahel*, helicasa), *dnapol* (DNA polimerasa), *p35* (inhibidor de caspasa), *pe38* y *lef-7* son requeridos para una replicación óptima de plásmidos dependientes de *hr* en células Sf-21. Algunos de estos productos génicos no son esenciales en diferentes líneas celulares (Rapp *et al.*, 1998; Kool *et al.*, 1994b; Kool *et al.*, 1993; Lu & Miller, 1995). En particular, la DNA polimerasa viral ha sido purificada y estudiada a nivel bioquímico

(Hang & Guarino, 1999; McDougal & Guarino, 1999).

Por otra parte, más recientemente se han identificado genes adicionales que influyen sobre la expresión de genes tardíos (Li *et al.*, 1999). El efecto de todos estos genes surge de experimentos de replicación transientes, pero su delección en el genoma de *Bombyx mori* NPV ha permitido evaluar su real importancia *in vivo* (Gomi *et al.*, 1997). En esos experimentos se determinó que los genes *39K*, *ie-2*, *lef-7* y *p35* no son esenciales para la replicación viral, si bien es cierto que estas conclusiones son estrictamente válidas para el sistema particular de interacción virus-huésped (por ejemplo: como la infección con BmNPV no induce un efecto de apoptosis notable, el inhibidor de apoptosis *p35* no es esencial para la replicación viral).

Las subunidades de la RNA polimerasa viral, resistente a la α -amanitina, se encuentran codificadas por cuatro genes virales (*lef-8*, *lef-4*, *lef-9* y *p47*) que son esenciales para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos (Guarino *et al.*, 1998a; Guarino *et al.*, 1998b).

Salvo raras excepciones, la transcripción de genes tardíos y muy tardíos se inicia en la primer A de la secuencia conservada TAAG (sitio de iniciación transcripcional), que muy frecuentemente se encuentra precedida por una A (menos frecuentemente, por una T o G, que corresponden a promotores menos fuertes que los que contienen la secuencia ATAAG). El análisis del promotor tardío del gen de la proteína de la cápside *vp39* mediante mutagénesis demostró que sólo los 6-8 nucleótidos adyacentes al elemento central TAAG son responsables del nivel transcripcional (Morris & Miller, 1994).

Además de los genes *lef*, se ha identificado un gen de expresión tardía denominado *vlf-1* (*very late factor 1*), que afecta específicamente la hiperexpresión de los genes muy tardíos *p10* y *polh* (poliedrina) interactuando con secuencias no codificantes (específicas de los genes muy tardíos) que se encuentran entre el elemento TAAG (común a los genes tardíos y muy tardíos) y el codón de iniciación de la traducción (ver más adelante).

En la etapa tardía de la infección, simultáneamente con la replicación del DNA viral se observa una disminución en la síntesis de mRNAs celulares (Ooi & Miller, 1988). Asimismo, se ha demostrado una disminución de la síntesis de proteínas celulares luego de 6 horas postinfección y la total detención de la traducción de las mismas a las 24 horas del inicio de la infección con AcMNPV de células Sf9 (Carstens *et al.*, 1979; Wood, 1980).

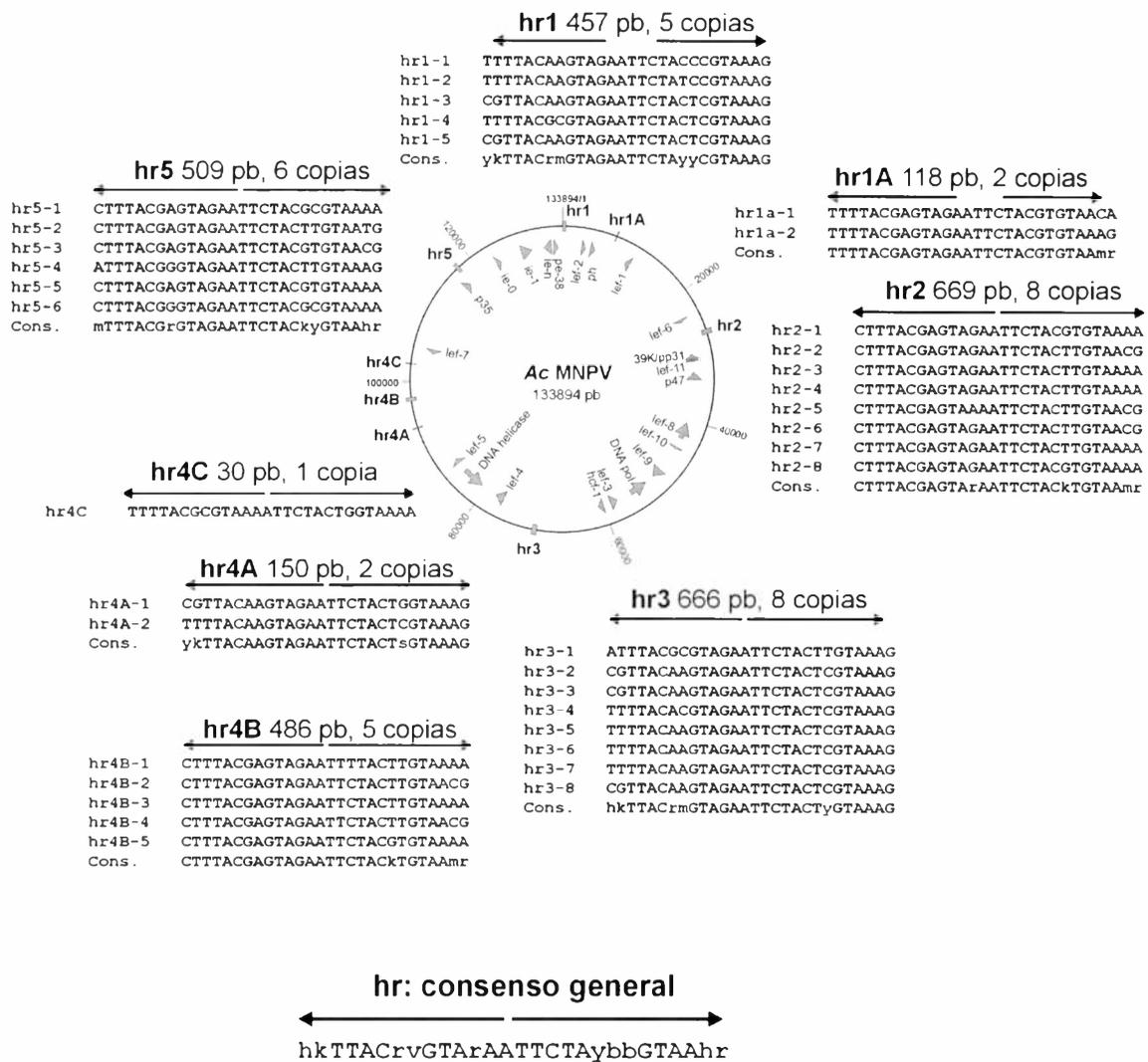


Figura I.5. Ubicación genómica y estructura de los hrs (homologous regions) de AcMNPV. Los genomas de los baculovirus contienen múltiples copias de secuencias repetitivas muy conservadas, que funcionan como *enhancers* transcripcionales y, en algunos casos, como orígenes de replicación. En el genoma de AcMNPV se han identificado 8 hrs, llamados *hr1*, *hr1A*, *hr2*, *hr3*, *hr4A*, *hr4B*, *hr4C* y *hr5*, cuyas posiciones y secuencias se identifican en la figura. Los diferentes hrs presentan un número variable (1 a 8) de secuencias de 28 pb que constituyen palíndromes imperfectos (llamados 28-mer, y divididos en 28hs y 28hs), en la mayor parte de los cuales el hexanucleótido central corresponde al sitio de reconocimiento para la endonucleasa *EcoRI*. Una característica distintiva de estos palíndromes imperfectos es la gran conservación de secuencia que se observa cuando se comparan tanto los palíndromes de un mismo hr como los palíndromes de todos los hrs. La organización palindrómica de los 28-mers está asociada con su naturaleza de *enhancers* independientes de orientación y posición, y sirve para la unión de dímeros de transreguladores virales como IE-1. Por otra parte, aún cuando un 28-mer independiente posee actividad de *enhancer*, los niveles de transcripción alcanzados son sensiblemente menores a los que se logran con la hr respectiva completa, esto puede deberse a la estructura modular de los hrs. Además de los 28-mers, en los hrs existen repeticiones directas perfectas de diferente longitud, características de un único hr (por ej.: un 24-mer presente dos veces en *hr1*, AGTTTCGGTTATGAGCCGTGTGCAA) o comunes a varios hrs (por ej.: un 18-mer presente tres veces en *hr2*, una vez en *hr4B* y dos veces en *hr5*, GATGATGTCATTTGTTTT).

Códigos de ambigüedad utilizados: R=A, G; Y=C, T; M=A, C; K=G, T; S=C, G; W=A, T; H=A, C, T; B=C, G, T; V=A, C, G; D=A, G, T; N=A, C, G, T

En el mapa de AcMNPV se indica, además, la posición de la mayor parte de los genes virales cuyos productos están asociados con la regulación de los procesos de transcripción/replicación

Fase muy tardía (producción de cuerpos de inclusión)

La fase muy tardía de la infección se caracteriza por la reducción o suspensión de la transcripción de muchos de los genes tardíos y por la hiperexpresión de genes tales como poliedrina (*polh*), que forma los cuerpos de inclusión y de la proteína P10, que interviene en el proceso de formación de los cuerpos de inclusión (Kuzio *et al.*, 1984; Van-Oers *et al.*, 1994; Zuidema *et al.*, 1993). Asimismo, algunas otras proteínas parecen ser necesarias para la formación eficiente de los viriones ocluidos (Faulkner *et al.*, 1997; Braunagel *et al.*, 1999)

En los promotores muy tardíos, las secuencias ricas en AT inmediatamente *downstream* del sitio de iniciación de la transcripción parecen influir también en la eficiencia de la actividad del promotor (Weyer y Posse, 1989; Luckow y Summers, 1989; Ooi *et al.*, 1989; Rankin *et al.*, 1988; Rohrmann, 1986). En los promotores muy tardíos (a diferencia de los tardíos como el de *vp39*), el nivel de expresión no depende solamente del contexto inmediato en que se encuentra el elemento TAAG, sino también de la naturaleza de la secuencia nucleotídica situada entre el sitio de iniciación de la transcripción y el codon de iniciación de la traducción. Esta secuencia líder no traducida de los mRNAs se requiere para la hiperexpresión de los genes *polh* y *p10*. Esta región se conoce por el nombre de “*burst sequence*” (responsable de la expresión explosiva de los genes muy tardíos) y las mutaciones en la misma reducen la expresión de *polh* en 10-20 veces, mientras que las mutaciones *upstream* de elemento TAAG del promotor sólo resultan en efectos moderados (Ooi *et al.*, 1989; Possee y Howard, 1987; Rankin *et al.*, 1988).

Un factor de transcripción (*vlf-1*; *very late expression factor 1*), necesario para la “expresión explosiva” de los genes muy tardíos fue identificado por rescate de un mutante termosensible incapaz de producir cuerpos de inclusión (OB) a la temperatura no permisiva. Este fenotipo resultaba en una marcada disminución en el nivel de transcripción del gen de *polh* y, en menor medida, del gen *p10* (McLachlin y Miller, 1994). El efecto de VLF-1 sobre la transcripción de los genes *polh* y *p10* fue confirmado por experimentos de expresión transiente (Yang y Miller, 1998).

Utilizando experimentos de mutagénesis dirigida, análisis de retardo de movilidad electroforética y de protección a DNasa I, Yang y Miller (1999) demostraron que la interacción de VLF-1 con la *burst sequence* constituye la base bioquímica de la transactivación de la transcripción de los genes muy tardíos. La expresión del gen *vlf-1* está bajo el control de un promotor tardío con un motivo TAAG.

Además, VLF-1 posee motivos de secuencia aminoacídica conservados en proteínas con actividad integrasa-resolvasa, cuya mutación conduce a virus inviables, sugiriendo que se trata de una función separada de la transactivación transcripcional pero esencial para la replicación viral (McLachlin y Miller, 1994; Yang & Miller, 1998). Por otra parte, la región que incluye la *burst sequence* interactúa con proteínas de la célula huésped, algunas de las cuales parecen ser esenciales para asegurar los altos niveles de expresión de los genes muy tardíos (Ghosh *et al.*, 1998; Jain & Hasnain, 1996; Burma *et al.*, 1994; Ooi *et al.*, 1989).

La proteína de inclusión se asocia y cristaliza alrededor de los viriones envueltos en el núcleo. Este proceso se completa con la envoltura compuesta por glicoproteína (*polyhedral envelope protein* PEP o PP34; Gombart *et al.*, 1989, Rohrmann, 1992; Whitt & Manning, 1988). La maduración y liberación de los cuerpos de inclusión (OB) requiere de P10, que forma estructuras fibrilares en el núcleo y en el citosol. La delección del gen *p10* conduce al agregado defectuoso de la envoltura de los cuerpos de inclusión, producción de poliedros frágiles, bloqueo de la desintegración del núcleo y lisis celular deficiente (Van-Oers *et al.*, 1994).

Interacciones moleculares virus-huésped a nivel celular

Si bien no se conocen en detalle las respuestas celulares a la infección por baculovirus, un mecanismo general que interviene tanto en la eliminación de células infectadas o dañadas como en la proliferación de tejidos consiste en la “muerte celular programada” o apoptosis. Este proceso se caracteriza por la disminución del tamaño de las células (*shrinkage*) de las células, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la degradación del DNA cromosómico para dar fragmentos de longitud oligonucleosómica, un profuso “*blebbing*” de la membrana plasmática y el desprendimiento de vesículas hacia el medio. Luego de la infección viral muchos tipos de células son capaces de inducir una cascada de eventos moleculares que conducen a la apoptosis como medida de defensa del organismo (Vaux & Strasser, 1996; Clem, 1997).

Como una respuesta evolutiva para contrarrestar este mecanismo de defensa de la célula, muchos virus poseen genes que codifican para inhibidores de la apoptosis. La inducción de la apoptosis en células de insecto infectadas por baculovirus se observó por primera vez en células Sf21 infectadas con un AcMNPV que carecía del gen *p35* funcional (Clem *et al.*, 1991). Numerosos estudios demostraron que el producto del

gen *p35* es capaz de inhibir apoptosis en una gama de células, incluso de mamíferos; sin embargo, el inhibidor de apoptosis de mamíferos *bcl-2* no es capaz de complementar la falta de P35 en los sistemas de baculovirus y células de insecto.

En otros baculovirus (Birnbaum *et al.*, 1994; Crook *et al.*, 1993) se identificaron productos de genes capaces de complementar funcionalmente la falta de P35 en mutantes de AcMNPV que se denominaron IAP (*inhibitor of apoptosis*). Estos polipéptidos son homólogos funcionales de P35 pero no presentan una homología de secuencia con éste. En AcMNPV se encontraron dos genes, *iap-1* e *iap-2*, con alta homología de secuencia con los *iap* de CpGV y OpMNPV, aunque no pueden sustituir funcionalmente a *p35* (Crook *et al.*, 1993; Ayres *et al.*, 1994; Griffiths *et al.* 1999). Sin embargo, los IAP de CpGV y OpMNPV presentan una homología significativa con un inhibidor de la apoptosis neuronal (NIAP, Roy *et al.*, 1995).

Los inhibidores de apoptosis de los baculovirus tienen la obvia misión de proveer un medio intracelular propicio para evitar el aborto de la infección y facilitar así la producción de una progenie abundante. Muy probablemente, los genes con homología a *p35* o *iap* son el resultado de la adquisición por intercambio de información genética con huéspedes diferentes a lo largo de la evolución o de la duplicación de un gen ancestral similar a *iap* y su posterior evolución divergente, dando genes funcionales o no. De hecho P35 es funcional en las células de *Spodoptera frugiperda*, en las que replica perfectamente, pero no es suficiente para bloquear la apoptosis en *Spodoptera littoralis*, dando una progenie muy disminuida (Chejanovsky & Gershburg, 1995; Griffiths *et al.* 1999). Sin embargo, la delección del gen *p35* no afecta la replicación normal de AcMNPV en una serie de huéspedes como *Trichoplusia ni*, *Mamestra brassicae* y *Panolis flammea*. Asimismo, se han documentado casos de líneas celulares semipermisivas, en las cuales el producto del gen *p35* solo no es suficiente para inhibir totalmente la apoptosis. Estos resultados, junto con el concepto de que los diferentes IAPs actúan bloqueando diferentes etapas del mecanismo de apoptosis en diferentes organismos, sugieren que los genes *iap* son uno de los componentes genéticos que definen el rango de huéspedes de los baculovirus (Clem *et al.*, 1996; Chejanovsky & Gershburg, 1995; Griffiths *et al.* 1999). Se ha hipotetizado que AcMNPV posee un rango muy amplio de huéspedes precisamente por poseer un gen antiapoptótico *p35* y genes de la familia *iap*, comparado con los NPVs que poseen sólo uno u otro tipo de inhibidores de apoptosis.

En el genoma de los baculovirus existe una serie de genes que codifican para polipéptidos con gran homología con proteínas eucarióticas conocidas; sin embargo,

existen muchos interrogantes sobre la posible función y los resultados de la delección de algunos de ellos sugieren que no se trata de genes esenciales para el desarrollo y capacidad infectiva del virus (O'Reilly, 1997).

Interacciones moleculares virus-huésped a nivel de organismo multicelular

Además de productos génicos que interactúan con componentes celulares, los baculovirus codifican una serie de productos que funcionan a nivel de organismo y, de esta manera, alteran o manipulan la fisiología y estructura del animal infectado.

Uno de ellos, el producto del gen *egt* (*ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*) extiende el estado larval al inactivar los ecdisteroides del huésped, que actúan como hormonas que regulan la muda del insecto (O'Reilly *et al.*, 1992; O'Reilly & Miller, 1990; O'Reilly & Miller, 1989). Las células infectadas secretan la EGT codificada por el virus a la hemolinfa, donde esta enzima cataliza la transferencia de glucosa y/o galactosa a la ecdisona produciendo un conjugado inactivo de la hormona. De esta manera, la EGT viral impide la acumulación de ecdisona activa a niveles suficientes para disparar la muda hacia el estadio pupal. Así se establece una feroz competencia entre el baculovirus y el insecto: ¿disponibilidad de recursos para producir una polilla o más virus?

Las células infectadas producen OBs en las etapas muy tardías de la infección y las larvas infectadas se convierten en una masa amorfa repleta de cuerpos de inclusión encerrada en la cutícula en el momento de la muerte. Poco tiempo después, el insecto infectado se licúa produciendo un inóculo fresco para infectar otros huéspedes (Volkman & Keddie, 1990). Los productos de los genes virales *chiA* (*chitinase A*, quitinasa) y *cath* (*cathepsin*, catepsina) proveen las actividades enzimáticas necesarias para la liberación de la progenie de los OBs a partir de los cadáveres de las larvas infectadas y, de esta manera, facilitan la propagación del virus a nivel de poblaciones de insectos (Hawtin *et al.*, 1997). Posiblemente, la quitinasa que se encuentra asociada con la matriz proteica de los cuerpos de inclusión ayude a los baculovirus en el proceso de infección primaria, en el que los ODVs deben atravesar la membrana peritrófica, constituida, en parte por compuestos quitinosos. En este sentido, el producto del gen *chiA* (a diferencia de otras quitinasas) sería perfectamente activo en las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas de lepidópteros. Sin embargo, la delección del gen *chiA* en AcMNPV no causó efectos notorios sobre los parámetros de la infección DL_{50} (dosis letal 50%) y TL_{50} (tiempo letal 50%) en *Trichoplusia ni* (Hawtin *et al.*, 1997).

Los *enhancins* o *viral enhancing factors* (*vef*) son un grupo de proteínas que se encuentran en los cuerpos de inclusión de ciertos baculovirus y son capaces de incrementar significativamente la eficacia de la infección viral en los insectos (ver review Corsaro *et al.*, 1993). Estudios sobre el *enhancin* del virus de la granulosis de *Trichoplusia ni* (TnGV), indican que degrada proteínas de la membrana peritrófica del intestino medio y facilita el pasaje de virus desde el lumen del intestino medio a las células epiteliales del mismo (Derksen & Granados, 1988; Wang *et al.*, 1994; Wang & Granados, 1998). Los resultados más dramáticos se observaron en larvas de *T. ni* infectadas con AgMNPV en presencia de este mismo *enhancin*, donde la eficiencia de infección fue 16 veces mayor y el TL₅₀ (tiempo letal 50%) se redujo en 55 hrs. (Corsaro *et al.*, 1993). Más recientemente, también se identificaron por primera vez dos genes *vef* en el genoma de un NPV (Bischoff & Slavicek, 1997; Kuzio *et al.*, 1999). La delección de ambos genes en el DNA de LdMNPV resulta en una disminución de 1000 veces de la DL₅₀ mientras que la inactivación de uno solo de los genes *vef* no tiene efecto sobre el fenotipo (Jim Slavicek comunicación personal).

Rango de huéspedes

El rango de huéspedes de un virus se debe, en términos generales, a la especificidad de la interacción con el huésped en diferentes etapas de la infección (liberación de ODVs, entrada a las células de los ODVs y BVs, mecanismos de defensa celulares, expresión regulada de genes virales, etc.) y a las restricciones en distintos niveles (filum, especie, tejido).

Los baculovirus infectan sólo a artrópodos. Además, la mayoría de los baculovirus parecen replicar en un número muy limitado de especies de insectos; sin embargo, algunos son capaces de infectar un amplio rango de especies, aunque la eficiencia puede variar ampliamente con la especie de insecto. Por otra parte, los virus pueden mostrar una especificidad a nivel de tejido, de manera que un baculovirus particular puede tener un tropismo tisular determinado, dependiendo del huésped. Para definir las bases moleculares de la especificidad del huésped es necesario caracterizar las limitaciones al proceso de infección. Probablemente, la matriz proteica que rodea a los virus no incida en la restricción de los huéspedes, pero seguramente impide el contacto con las células de los vertebrados. En el caso de las células de insectos, es más plausible que los mecanismos moleculares que restringen el rango de huéspedes dependa de la interacción de productos génicos virales con componentes celulares. Para lograr una replicación exitosa, los baculovirus deben sortear o bloquear uno o

más mecanismos de defensa celular y expresar sus genes esenciales (Miller & Lu, 1997).

En general, los baculovirus son capaces de entrar a un rango amplio de células, pero no son capaces de llegar al núcleo de la mayoría de las células de vertebrados, con la notable excepción de los hepatocitos de mamíferos (Boyce & Bucher, 1996; Hofmann *et al.*, 1995). La expresión de genes virales en células de insectos no permisivos o semi-permisivos parece estar bloqueada en diferentes puntos. Generalmente, la expresión de genes tempranos, dependiente de la transcripción por la RNA polimerasa II, no se ve entorpecida, pero la expresión de los genes tardíos se ve disminuida o anulada. Se han encontrado varios genes que influyen sobre la capacidad de replicación de AcMNPV y otros baculovirus en ciertas líneas celulares: los inhibidores de apoptosis (*p35* y varios miembros de la familia *iap*), la helicasa (*dnahel* o *p143*), el factor de la célula huésped 1 (*host cell factor 1*, *hcf-1*) y el factor de rango de huéspedes 1 (*host range factor 1*, *hrf-1*).

El efecto de mutaciones en diferentes genes puede afectar el rango de huéspedes en forma indirecta al influir sobre la replicación del DNA viral o la expresión de genes tardíos o muy tardíos o impidiendo el bloqueo de la síntesis de proteínas de la célula huésped. etc. (Clem & Miller, 1994 J.Virol 68:6759; Lu & Miller, 1995. J.Virol 69, 6265)

En particular, la replicación del DNA puede requerir de la interacción de los productos virales con factores de la célula huésped. Estas interacciones pueden ser afectadas de manera diferencial en diferentes tipos celulares por mutaciones en los genes virales implicados, dando lugar a efectos especie-específicos o específicos de tipo celular.

El rol de los genes antiapoptóticos se discutió brevemente más arriba y, su función esencial consiste en impedir el comienzo de una respuesta de defensa celular, que abortaría el desarrollo de la infección viral.

El producto del gen *hcf-1* de AcMNPV es necesario para la replicación del virus en un amplio rango de líneas celulares y larvas. Su delección o mutación por inserción del gen *lacZ* en AcMNPVs (mutantes *hcf-1'*) conduce a una restricción del rango de huéspedes, de tal manera que el fenotipo viral parece indistinguible del virus silvestre (*wt* AcMNPV) en ciertos insectos y líneas celulares (permisivas), mientras en otros huéspedes se manifiesta el fenotipo mutante (Lu & Miller, 1996 J.Virol. 70, 5123-5130). Otros factores, como *ie-2* y *lef-7*, que controlan la replicación del DNA viral y la expresión tardía, también han sido implicados en la restricción del rango de huéspedes (Chen & Thiem, 1997; Virology 227, 88-95; Miller & Lu, 1997).

Thiem y colaboradores (1996) identificaron el gen *hrf-1* en LdMNPV, que le confiere a AcMNPV la capacidad de replicar en larvas y en líneas celulares de *Lymantria dispar*, normalmente no permisivas para *wt* AcMNPV.

AcMNPV no es capaz de replicar en *Bombyx mori* ni en células BmN y BmNPV no replica en células Sf21. Por cotransfección de células Sf21 con los DNAs de ambos virus se obtuvieron variantes de AcMNPV con inserciones de porciones del DNA de BmNPV, capaces de replicarse en células BmN (Kondo & Maeda, 1991; Mori *et al.*, 1992). En estudios sucesivos se pudo atribuir la expansión del rango de huéspedes a la sustitución en el genoma de AcMNPV de una región de la DNA helicasa (*p143*) por la correspondiente a los aminoácidos 413-602 de la región homóloga de BmNPV, luego a los aminoácidos 550 a 576, siendo un solo cambio de aminoácido el responsable de la expansión del rango de huéspedes (Maeda *et al.*, 1993; Croizier *et al.*, 1994; Kamita & Maeda, 1997).

El mecanismo molecular de este efecto no es del todo claro, pero se ha demostrado que la helicasa (una proteína que participa no solamente en la replicación del DNA) de AcMNPV ejerce un efecto tóxico para las células BmN, bloqueando la síntesis de proteínas (Kamita & Maeda, 1993), aunque el efecto no es tan marcado con cepas de AcMNPV diferentes a las utilizadas en estos estudios. Estudios adicionales realizados seleccionando los recombinantes de AcMNPV capaces de replicar en larvas de *B. mori* han definido que los aminoácidos en posición 564 y 577 de la DNA helicasa son los responsables de matar a este insecto (Argaud *et al.*, 1998). Por lo tanto, el reemplazo de estos residuos de aminoácidos en la helicasa de AcMNPV amplía su rango de huéspedes a *B. mori*.

Si bien estos resultados son extremadamente interesantes, los hallazgos de las investigaciones sobre los determinantes moleculares del rango de huéspedes no son directamente extrapolables a sistemas virus-huésped diferentes a los ensayados. La complejidad del problema limita por ahora los diseños racionales de modificaciones genéticas dirigidas a su aplicación como medio de control biológico de plagas.

I.2 BACULOVIRUS COMO SISTEMAS DE EXPRESIÓN

La utilización de sistemas heterólogos de expresión para producir elevadas cantidades de proteínas, se ha convertido en una herramienta extraordinariamente útil, tanto en investigación científica como en aplicaciones biotecnológicas.

En este sentido, el empleo de sistemas de expresión con capacidad para llevar a cabo las modificaciones postraduccionales características de ciertos genes eucarióticos, es de particular importancia si se desea obtener proteínas biológicamente activas.

Los sistemas de expresión en células de mamíferos constituyen el paradigma en cuanto a la producción de enzimas biológicamente activas y proteínas eucarióticas. Sin embargo, el uso de este tipo de sistemas resulta costoso, es de bajo rendimiento y supone cierto riesgo biológico (por ej., vectores virales de mamíferos e incluso humanos).

Una de las mejores alternativas a la expresión en células de mamíferos es la expresión en células de insecto, mediante el uso de baculovirus. Este sistema de expresión provee de un contexto eucariótico más evolucionado en comparación con el de levaduras y conduce, en general, a un plegamiento proteico adecuado; a la correcta formación de puentes de disulfuro, oligomerización y/o otras modificaciones postraduccionales requeridas para la actividad biológica de ciertas proteínas eucarióticas.

Los vectores baculovirales de expresión (BEV, *baculovirus expression vector*) son baculovirus recombinantes, con un DNA genómico que ha sido genéticamente modificado para incluir al gen heterólogo de interés. Los BEVs, son viables y poseen la habilidad de infectar huéspedes susceptibles, líneas celulares de insecto o larvas, sin necesidad de sistemas *helper*. Así, los BEVs tienen la capacidad de transferir de manera eficaz, genes foráneos en estos huéspedes eucarióticos. El gen insertado es usualmente una construcción quimérica que comprende la secuencia codificante para la proteína de interés, bajo el control de un promotor viral. Este arreglo de secuencias permite la transcripción del mencionado gen, durante la infección viral. El mRNA resultante es traducido, y la proteína es modificada por la maquinaria biosintética de la célula huésped. De esta manera, el BEV y su célula huésped son dos componentes separados de un sistema de expresión binario, que designaremos como BEVS (*BEV system*) en los siguientes apartados de esta sección.

La utilidad del BEVS se extiende actualmente a la expresión de proteínas citosólicas,

nucleares, de membrana y de secreción (Kost y Condreay, 1999).

Más aún, en los últimos años se ha incrementado notablemente el empleo del BEVS para el desarrollo de vacunas basadas en la producción de *virus like particles*; (VLPs; Newcomb *et al.*, 1996; Goldmann *et al.*, 1999; Ke *et al.*, 1999; Casal, 1999) y en antígenos recombinantes convencionales (Mottershead *et al.*, 2000; Golden *et al.*, 1998). Asimismo, la exposición de proteínas heterólogas en la superficie de partículas virales (en este caso particular, *baculovirus surface display*) se halla en continua evolución y es un instrumento fundamental para el análisis y diseño de biomoléculas y sus interacciones (Grabherr *et al.*, 2001). Por último, una aplicación innovadora de los baculovirus modificados con promotores de mamíferos, es la transferencia génica transitoria y expresión en células de mamíferos, principalmente en aquellas de origen hepático (Kost y Condreay, 1999).

En resumen, la ventaja más significativa del BEVS con respecto a otros sistemas de expresión, es que puede ser utilizado para producir cantidades excepcionalmente importantes de la proteína heteróloga funcionalmente activa. Los niveles de producción que se obtienen mediante los BEV es comparable con los de los sistemas procarióticos (Miller, 1998). Sin embargo, a diferencia de los sistemas de expresión procarióticos, el BEVS posee capacidad de procesamiento proteico eucariótico. Así, el potencial del sistema es proveer una producción proteica de nivel comparable al de un sistema de expresión procariótico, en un contexto eucariótico. Otro aspecto fundamental que vuelve al sistema atractivo para la producción industrial de proteínas de importancia farmacológica, es la no infectividad de los BEVS para vertebrados, que les confiere la característica de 'biológicamente seguros', de la cual carecen otros tipos de sistemas.

No obstante, el sistema posee ciertas limitaciones que probablemente sean superadas a través de posterior investigación y desarrollo en el tema. Por ejemplo, se han detectado variaciones en cuanto al nivel de productividad para algunas proteínas. En general, los casos de menor nivel de expresión se han registrado con proteínas de membrana y glicoproteínas de secreción (Miller, 1998). Además, las vías metabólicas de procesamiento proteico en células de insecto, no son necesariamente idénticas a aquellas de eucariotes superiores. Por consiguiente, las modificaciones covalentes producidas en este sistema pueden diferir con respecto a las de la proteína nativa. Sin embargo, ya se han logrado mediante técnicas de ingeniería genética, nuevas líneas celulares transgénicas de insecto, capaces de modificaciones postraduccionales complejas, principalmente en las rutas de glicosilación típicas de mamíferos (Hollister *et al.*, 2002; Breitbach *et al.*, 2001). Por último, el BEVS provee sólo una expresión

transitoria, dado que el gen foráneo es introducido en la célula huésped a través de un virus que finalmente, la matará. Un problema relacionado a ello es que ciertas vías de procesamiento proteico están comprometidas por la infección viral.

Los fundamentos y métodos del sistema de expresión en baculovirus

Como ya mencionamos anteriormente en esta sección, los genomas de los baculovirus son de tamaño considerable (100-200 kpb) y usualmente contienen varios sitios de restricción para las endonucleasas conocidas. Por ello, no es sencillo insertar el gen a expresar por clonado directo en el genoma.

Cuando se desarrolló el sistema de expresión en células de insecto, basado en AcMNPV, se adoptó el reemplazo alélico como método de inserción de genes foráneos en dicho genoma. Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente estrategias alternativas al reemplazo alélico. Sin embargo, la metodología clásica continúa siendo de preferencia para la inserción de genes heterólogos en el genoma de las baculovirus. Asimismo, el sistema de expresión basado en AgMNPV, generado en el marco de este proyecto de Tesis Doctoral como se detalla en el Capítulo IV, se fundamenta en el reemplazo alélico dirigido al locus de poliedrina (ver más adelante). Por todo ello, en este apartado se discutirán aspectos importantes de la reacción de reemplazo alélico, las propiedades generales de los plásmidos de transferencia que facilitan la inserción y expresión del gen foráneo y los factores que pueden influenciar la frecuencia de formación de virus recombinantes.

La estrategia metodológica para el reemplazo alélico es la inserción del gen de interés en un plásmido de transferencia bajo el control del promotor viral seleccionado, flanqueado en ambos extremos (5' y 3'), por secuencias virales que dirigirán al gen y su promotor a una región particular del genoma viral. Posteriormente, el plásmido de transferencia y el DNA viral parental son cotransfectados en células de insecto y las enzimas celulares producen la recombinación entre los DNAs (**Figura I.6**). El tipo de recombinación es, principalmente, recombinación homóloga. No obstante, ocasionalmente ocurre recombinación no-homóloga, pero es comparativamente escasa, a menos que el evento de recombinación homóloga afecte la viabilidad del virus. Así, las reacciones de recombinación ocurren mayoritariamente entre las secuencias virales del plásmido y sus correspondientes regiones homólogas en el genoma viral parental.

Una reacción de reemplazo alélico involucra dos eventos distintos de recombinación homóloga, uno en cada una de las regiones virales flanqueantes del gen foráneo en el plásmido de transferencia (Figura 1.6). Estas dos reacciones ocurren en forma independiente una de otra.

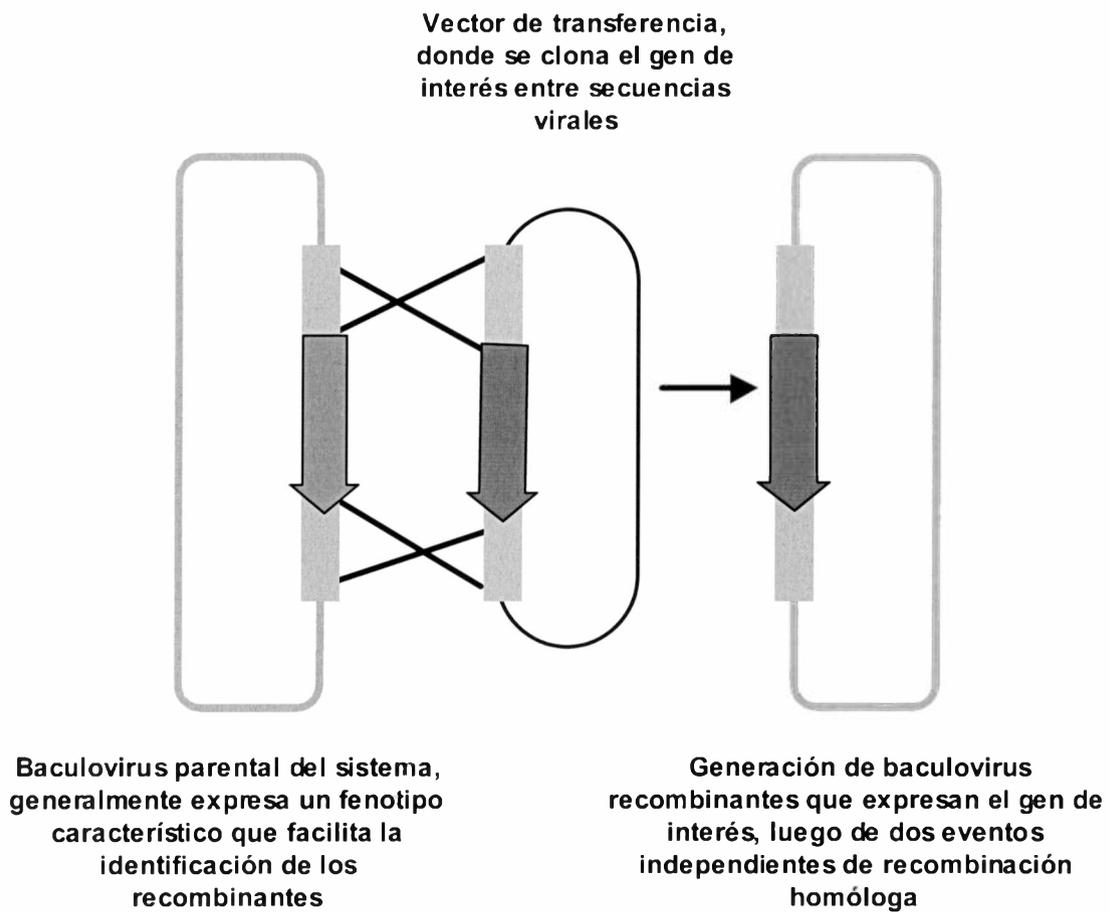


Figura 1.6. Construcción de baculovirus recombinantes mediante recombinación homóloga.

De esta manera, el tipo de recombinante viral más frecuente en los sobrenadantes de cotransfección, es el resultante de un único evento de recombinación homóloga (*single crossover*), en el cual el plásmido entero ha sido insertado en el genoma viral. Tales recombinantes son inestables, debido a que contienen porciones del genoma viral

duplicadas (las regiones virales flanqueantes del plásmido de transferencia). En ocasión de un único evento de recombinación, no se altera la función del gen viral presente en el sitio de inserción del plásmido, si el vector posee suficientes secuencias flanqueantes como para suministrar una copia intacta del gen viral en alguno de los extremos de la inserción. Dependiendo de la ubicación en que se produzca el segundo evento de recombinación, el virus *single-crossover* dará lugar a un verdadero reemplazo alélico (recombinante doble o *double-crossover*) o al virus de partida (parental). En la **Figura I.7**, se esquematizan todas las situaciones posibles.

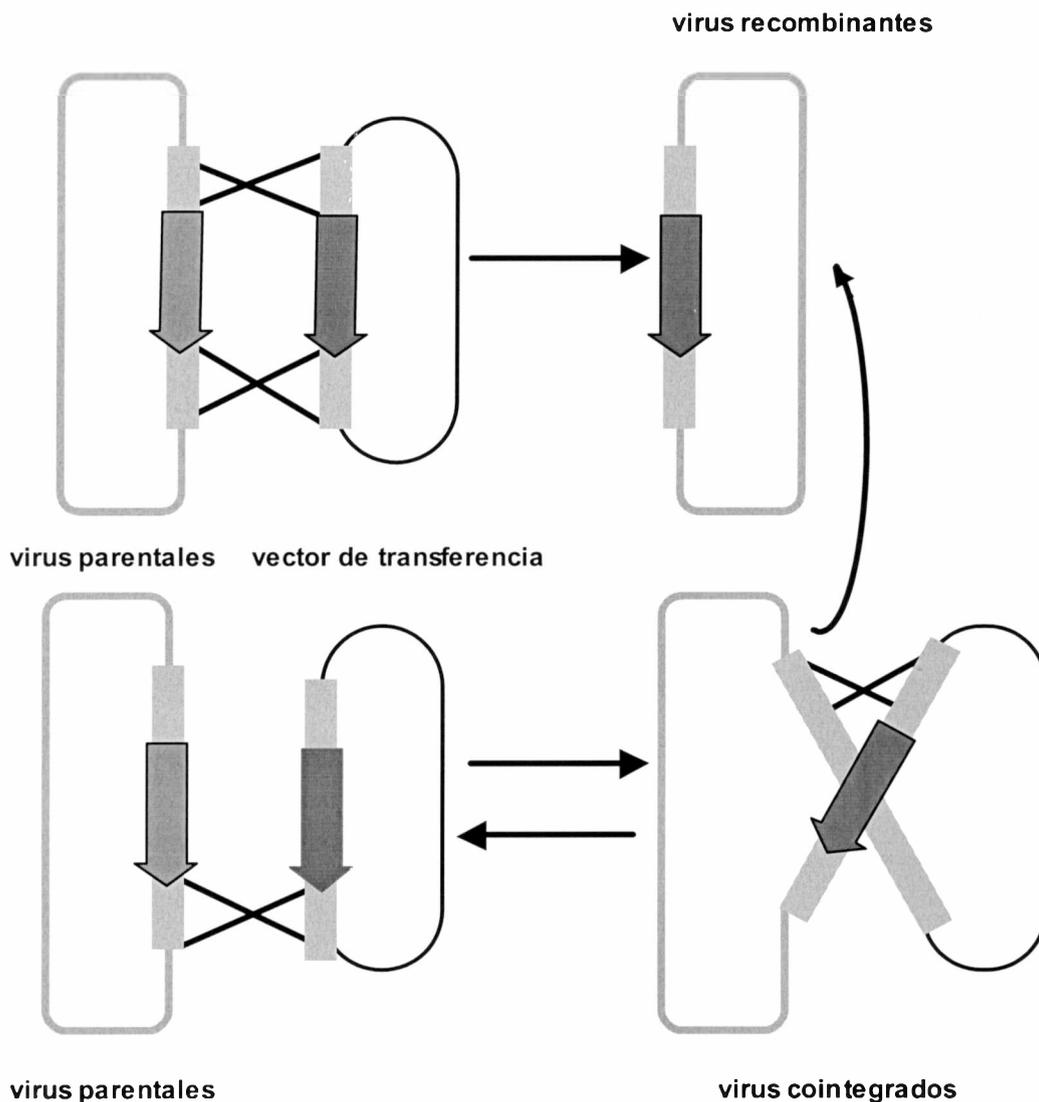


Figura I.7. Progenie viral resultante de un ensayo de cotransfección.

Debido al predominio y a la inestabilidad de los mutantes *single-crossover*, lo ideal es diseñar el sistema de forma tal que sea posible distinguir los recombinantes dobles de los simples y del virus parental (O'Reilly, 1992). La forma más directa de alcanzar tal objetivo es la utilización de un virus con un gen marcador que confiera un fenotipo claro de placa, como parental del sistema de expresión.

El sistema de expresión basado en AgMNPV generado en el marco de esta Tesis Doctoral, incluye como virus parental un AgMNPV/ *polh*⁻/ *lacZ*⁺ y un vector de transferencia con el gen *polh*. De esta manera, los recombinantes deseados, *polh*⁺/ *lacZ*⁻, pueden distinguirse de los simples recombinantes, *polh*⁺/ *lacZ*⁺, y del virus parental *polh*⁻/ *lacZ*⁺.

La elección de los promotores virales para conducir la expresión del gen heterólogo

Los promotores de los genes inmediatos tempranos y tempranos, son muy débiles y generalmente no se utilizan en los BEVS. Los promotores de genes tardíos, como el de la proteína 39 K y otras proteínas básicas, son moderadamente fuertes y expresan sus productos en la fase tardía de la infección, cuando la maquinaria celular de modificación postraducciona aún no está demasiado afectada. De esta manera, es importante considerar este tipo de promotores cuando la proteína a expresar en el sistema debe ser fosforilada o glicosilada para conservar su funcionalidad.

Como se indicó anteriormente, los promotores de los genes *polh* y *p10*, son extremadamente fuertes y sus productos son expresados en etapas muy tardías de la infección ('promotores muy tardíos'). Son no competitivos y constituyen las secuencias promotores más utilizadas en los BEVS basados en AcMNPV.

El hecho de que los promotores más utilizados en el BEVS sean aquellos designados como 'muy tardíos', guarda relación con la que señalamos como una de las mayores ventajas de este sistema: los niveles de producción de los genes bajo el control de tales promotores son comparables con los de los sistemas procarióticos. La poliedrina representa, por lo menos, entre un 25 y un 40% de la producción proteica total de la célula infectada en las etapas muy tardías de la infección. Esta proteína constituye la única forma de protección de los viriones, sumamente sensibles a los rayos ultravioleta, al ser liberados al medio ambiente. Así, hacia el final del ciclo de replicación del baculovirus en cultivo celular, se observa el volumen celular ocupado

casi completamente por el núcleo hipertrófico, literalmente repleto de poliedros.

La capacidad para producir tales cantidades de poliedrina refleja la disponibilidad de un *pool* de mRNA de poliedrina, que representa alrededor del 25 % del RNA poliadenilado total de la célula durante las etapas muy tardías de la infección (Adang y Miller, 1982). El promotor *polh* contiene la secuencia consenso crítica TAAG, como indicamos oportunamente. El motivo TAAG está conservado en los promotores baculovirales tardíos y muy tardíos. Sin embargo, los promotores muy tardíos producen mayores cantidades de mRNA y son transcritos en forma retrasada con respecto a los tardíos. Por consiguiente, los promotores muy tardíos y/o los complejos transcripcionales muy tardíos deben tener características adicionales que justifiquen las mencionadas diferencias. De hecho, se ha identificado tanto una región en el promotor de *polh* (Ooi *et al.*, 1989) como un factor codificado por AcMNPV (McLachlin y Miller, 1994) que incrementan específicamente la transcripción muy tardía.

Por todo lo expuesto anteriormente, el sistema de expresión basado en AgMNPV que se presenta en el Capítulo IV, y cuya ampliación y aplicación se detalla en las siguientes secciones de esta Tesis, utiliza los promotores de *polh* y *p10* para dirigir la expresión del gen foráneo. No obstante, como se señala oportunamente en el Capítulo V, el diseño de los vectores de transferencia del sistema permite el intercambio por otros promotores, según las exigencias del gen a expresar.

I.3 BACULOVIRUS EN EL CONTROL DE PLAGAS AGRONÓMICAS

Las pérdidas de producción y calidad de productos agrícolas son generadas, principalmente, por la acción de insectos plaga. El control de tales plagas se realiza, en la generalidad de los casos, mediante el uso de insecticidas químicos de amplio espectro y alta toxicidad, con el consiguiente daño para el ecosistema, el riesgo asociado para la salud humana y la dificultad para acceder a ciertos mercados internacionales con altos estándares de calidad.

Muchos de estos inconvenientes podrían solucionarse mediante un Manejo Integrado de las Plagas, basado en el control biológico, biotecnológico y cultural, de manera que se vayan eliminando gradualmente el uso de insecticidas tóxicos.

En 1966, el comité de expertos de FAO, definió al Manejo Integrado de Plagas (MIP) como el sistema que, teniendo en cuenta el ambiente y la dinámica de la plaga, utiliza todos los medios apropiados disponibles, en forma conjunta y compatible, para

mantener las poblaciones de las plagas por debajo de los niveles de daño económico. Así, la estrategia global del MIP consiste en maximizar la acción de los factores de mortalidad natural (por ej. patógenos de las especies plaga) y minimizar el uso de insecticidas químicos. Asimismo, con la reducción de la dependencia de químicos, se espera una beneficiosa reducción en los costos de los insumos.

Los enemigos naturales de los artrópodos plaga se pueden clasificar en tres grandes grupos: parásitos, parasitoides, predadores y patógenos.

Los parásitos son insectos entomófagos que atacan a una sola presa u huésped. Los parasitoides son aquellos insectos cuyo desarrollo tiene lugar sobre o dentro de otro insecto fitófago. Es una relación de parasitismo que sólo se presenta en insectos. El parasitoide se come vivo al insecto plaga, rompe el tegumento, la larva se convierte en pupa y de aquí en adulto. Ejercen un papel muy importante en el control de plagas.

Los predadores son insectos o ácaros que no causan daño al cultivo pero capturan y se alimentan de insectos y ácaros fitófagos que sí se presentan como plagas. Difieren de los parasitoides porque atacan a varias presas durante su vida.

Los entomopatógenos son microorganismos que producen patologías en insectos, siendo el agente causal muy diverso (bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos). Penetran en la especie plaga a través del tubo digestivo o del tegumento dando lugar a la expresión de la enfermedad que provoca la muerte del huésped. Los entomopatógenos son los únicos que no buscan de forma activa a sus presas, a excepción de los nematodos.

Con respecto a los virus entomopatógenos, agentes causales que nos interesan a los fines de esta Introducción, se han encontrado hasta 450 especies de virus patógenos de insectos y ácaros. En la tabla que sigue, se resumen las características de las familias más importantes de virus entomopatógenos.

Tipos de virus entomopatógenos

Familia	Ácido Nucleico	Forma de la partícula	Cuerpo de inclusión	Huéspedes
<i>Baculoviridae</i>	DNA	varilla	SI	Neuroptera, Trichoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera y Acari. No infectan vertebrados ni plantas.
<i>Poxviridae</i>	DNA	ovoide	SI	Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera y Diptera. Infectan vertebrados, no plantas.
<i>Reoviridae</i>	RNA	icosaedro	SI	Lepidoptera y Diptera. Infectan vertebrados y plantas.

Los Baculovirus constituyen la familia de virus entomopatógenos de uso más extendido como insecticidas microbianos, respecto de todos los virus de insectos conocidos. Las causas de dicho predominio se resumen a continuación.

- Persistencia en el medio: el hecho de estar ocluidos hace que sean capaces de permanecer en la naturaleza durante largos períodos e incluso facilitan la aparición de epizootias.
- Alta producción de virus por larva: facilita la transmisión horizontal.
- Alta virulencia: bajas dosis producen alta mortalidad larval.
- Específicos: muchos son específicos para muy pocas especies lo cual representa una ventaja en términos de bioseguridad ya que no se ven afectadas las plantas, los vertebrados e insectos benéficos.
- Fácil aplicación a campo.
- Alto poder de dispersión: pueden infectar larvas en sitios donde no se aplicó el producto. No sólo por la dispersión de los cuerpos de inclusión que pueden provocar factores abióticos (*i.e.* lluvias, vientos, etc) sino que también se han descrito mecanismos de transmisión vertical para algunas especies que

afectan plagas migratorias (Mazzone, 1985) y a través de parasitoides que actúan como vector (Harper, 1986).

En la Tabla que sigue, se resumen las especies de baculovirus silvestres que han sido desarrollados como bioinsecticidas y registrados para su comercialización.

Cultivos	Insectos plaga	Virus usados	Registrado en
Manzana, pera, ciruela y nogal	<i>Cydia pomonella</i>	CpGV	Argentina, UE, USA,
Col, tomate y algodón	<i>Plutella xylostella</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Phthorimaea operculella</i> y <i>Endopiza viteana</i>	PxyGV, PhopGV, HearNPV..	UE, Israel, Africa, Asia
Algodón, maíz y tomate	<i>Spodoptera littoralis</i>	SlitNPV	UE, Africa
Algodón y hortalizas	<i>Helicoverpa zea</i> y <i>Heliothis virescens</i>	HzeaNPV	USA
Hortalizas y flores	<i>Spodoptera exigua</i>	SeNPV	USA, UE
Hortalizas	<i>Anagrapha falcifera</i>	AfaNPV.	USA
Alfalfa y otros cultivos	<i>Autographa californica</i> <i>Anticarsia gemmatalis</i>	AcMNPV, AgMNPV	USA, Brasil
Especies forestales	<i>Orgyia pseudotsugata</i>	OpNPV	USA, Canadá
Especies forestales	<i>Lymantria dispar</i>	LdNPV	USA, Canadá, UE

No obstante todas las ventajas antes mencionadas, en general, el prolongado tiempo letal de los baculovirus salvajes (6-12 días) y la necesidad de ingestión de una cantidad suficiente de partículas infectivas para ejercer su efecto (a diferencia de los insecticidas químicos de acción por contacto); conspiran contra el uso masivo de estos microorganismos, y aún resultan poco atractivos para los productores agrícolas (Moscardi, 1999; Moscardi y Lobo de Souza, 2002).

La presencia de una cantidad suficiente de virus activo en el cultivo puede ser mejorada usualmente por ajustes en la formulación del bioinsecticida para incrementar su resistencia al UV y otros factores ambientales dañinos (Shapiro, 1992, 1995).

Sin embargo, el tiempo letal depende de la interacción del virus con su insecto hospedero y del mecanismo de infección. Tales aspectos están determinados, en última instancia, por cada genoma y la respectiva expresión del mismo.

En este sentido, la modificación del genoma baculoviral presenta una solución posible

a las cuestiones planteadas en el párrafo anterior. Así, en los apartados que siguen, se discutirá la aplicación de la tecnología desarrollada para la expresión de genes heterólogos descrita en 1.2, para la generación de baculovirus genéticamente modificados más competitivos en el mercado.

Las alternativas ensayadas hasta la fecha incluyen la expresión de toxinas específicas para insectos, hormonas y enzimas de insectos o deleciones de genes virales que afectan la metamorfosis (Inceoglu *et al.*, 2001). En 1994, Cory *et al.* publicaron el primer trabajo en el que se utilizaron baculovirus mejorados genéticamente en un ensayo de campo y, en la actualidad, existen baculovirus modificados genéticamente que cuentan con registro para el uso experimental en diversos países.

En la Tabla que sigue se presentan ejemplos de baculovirus genéticamente modificados, que han culminado sus fases de ensayos a campo.

Baculovirus genéticamente modificados desarrollados como bioinsecticidas

Virus	Modificación Genética	Ensayos Laboratorio		Ensayos de Campo (uso experimental)
		Huésped	% Reducción LT ₅₀	
Delección de genes				
AcMNPV	Δegt	<i>T. ni</i> <i>S. frugiperda</i>	25 – 30 % 30 %	EE.UU.
AgMNPV	Δegt	<i>A. gemmatalis</i>	30 %	
SpliSNPV	Δegt	<i>S. litoralis</i>	23 %	
LdMNPV	Δegt	<i>L. dispar</i>	15 – 20 %	EE.UU. (forestales)
Inserción de genes				
AcMNPV	Hormona Juvenil (JHE)	<i>T. ni</i>	30 %	Inglaterra (<i>T. ni</i> en repollo) EE.UU (<i>Heliotis</i> spp. en algodón, repollo, lechuga y tabaco)
	Toxina de <i>Androctonus australis</i> (AaIT)	<i>T. ni</i> <i>H. virescens, H. zea</i>	20 – 30 % 22 – 36 %	
	Toxina de <i>Leirus quinquestriatus lebraeus</i> (LqhIT2)	<i>T. ni</i> <i>S. exigua</i> <i>H. armigera</i>	50 – 56 % 37 – 47 % 24 – 32 %	
	Toxina de <i>Pyemotes tritici</i> (TxP-I)	<i>T. ni</i> <i>S. frugiperda</i>	25 – 53 % 39 – 59 %	
	Toxina de <i>Anemonia sulcata</i> (AsII)	<i>T. ni</i>	38 %	
HzSNPV	LqhIT2	<i>H. zea</i>	30%	EE.UU (<i>Heliotis</i> spp. en algodón)
BmNPV	Hormona diurética (DH5)	<i>B. mori</i>	20 %	
	AaIT	<i>B. mori</i>	40 %	
Delección/Inserción				
HearNPV	Δegt / Toxina de <i>Androctonus australis</i> (AaIT)	<i>H. armigera</i>	32 %	
HzSNPV	Δegt / Toxina de <i>Pyemotes tritici</i> (TxP-I)	<i>H. zea</i>	35 – 47 %	EE.UU (<i>Heliotis</i> spp. en algodón, repollo, lechuga y tabaco)

Estrategias para el aumento de los efectos biológicos de los baculovirus en sus hospederos naturales.

El incremento de la actividad insecticida de un baculovirus particular sobre su huésped natural puede lograrse a través modificaciones genéticas dirigidas, o bien a la reducción de la dosis de virus necesaria para matar el insecto (LC_{50} , LD_{50}); o bien a la reducción del tiempo para matar la plaga (LT_{50}) o para detener el daño causado por la plaga (*feeding time* 50: FT_{50}); o bien a una conjunción de ambos factores.

Con el fin de garantizar el efecto deseado, deben considerarse las siguientes variables en cuanto al diseño de la modificación genética:

- promotores: temporalidad y nivel de expresión (tempranos-débiles vs. muy tardíos-fuertes).
- eficiencia de la traducción, uso de codones adecuado.
- estabilidad de la proteína.
- sitio de acción del producto del gen foráneo: proteínas de fusión (por ej. Bt: intestino), proteínas secretadas/ péptidos señal (neurotoxinas).

Las modificaciones pueden ejercer su efecto sobre el proceso de infección, o estar orientadas a un efecto tóxico adicional. Las primeras, consisten en la inserción de genes sin actividad tóxica inherente, que actúen potenciando el proceso de infección natural del baculovirus (proteasas, *enhancins*, etc.). Las últimas, se fundamentan en la introducción de genes de toxinas específicas para insectos.

Modificaciones orientadas al proceso de infección.

Ciertos Granulovirus codifican para dos clases de proteínas (*synergistic factors*, SFs; y *virus enhancing factors*, VEFs; Tanada, 1985; Derksen & Granados, 1988; Wang & Granados, 1998) que forman parte de los cuerpos de inclusión e incrementan sensiblemente la eficacia de la infección viral en los insectos (ver review Corsaro *et al.*, 1993).

Se verificó que SF provoca un aumento en la adhesión del virus a las células, en tanto que VEF (también designada, *enhancin*) es una metaloproteasa que degrada la membrana peritrófica – primera barrera del insecto contra la infección del virus. Más

recientemente, se comprobó que los genes *vef* no son exclusivos de ciertos GVs, sino que están presentes también en algunos NPVs (LdMNPV, Bischoff & Slavicek, 1997, Popham *et al.*, 2001). La homología entre las diferentes proteínas VEF es baja, y es por ello que se supone que los diferentes virus deben tener productos génicos pertenecientes a varias familias de este tipo de factores sinérgicos.

La delección de dos genes *enhancin* del genoma de LdMNPV, reduce la potencia viral en unas 12 veces. Por otra parte, la inserción del gen *vef* de TnGV en AcMNPV bajo el control del promotor de p10, reduce la LC₅₀ a menos del 50% y la LT₅₀ en un 22%, con respecto al AcMNPV silvestre (Corsaro *et al.*, 1993).

Otra alternativa ensayada para mejorar la actividad insecticida de los baculovirus, es la eliminación de las membranas basales (barrera física contra la infección sistémica) mediante la construcción de recombinantes de AcMNPV que expresan distintas proteasas. Harrison & Bonning (2001) comprobaron que cuando infectaban *Heliothis virescens* con dichos mutantes, alcanzaban una disminución de 26 veces en el consumo de lechuga en relación al consumo de las larvas infectadas con el virus silvestre. Asimismo, redujeron el tiempo de muerte en forma significativa, incluso con respecto a un virus también genéticamente modificado para la expresión de una neurotoxina de escorpión selectiva de insectos.

Alteraciones en el balance hormonal y el desarrollo del insecto.

La mayoría de los baculovirus expresan un gen, el *egt*, que codifica para una enzima que inactiva la ecdisona, la hormona de la muda, mediante glicosilación.

La existencia del gen *egt* confiere al virus una estrategia biológica, genéticamente determinada, para incrementar la progenie viral. La expresión de la mencionada enzima durante la infección con un baculovirus silvestre, retrasa la muda. Así, el insecto continúa alimentándose, lo que aumenta la sobrevivencia viral (normalmente, insectos no infectados dejarían de comer durante el periodo que precede a cada evento de muda).

Por consiguiente, una delección del gen *egt*, conduciría en teoría, a eventos de muda más tempranos, con la correspondiente disminución en el consumo de alimento (cultivo afectado). En efecto, en ensayos realizados con un recombinante AcMNPV/ δ *egt*, se comprobó una reducción del 20 y 40 % en LT₅₀ y consumo de

alimento, respectivamente (O'Reilly y Miller, 1991). Se han obtenido resultados similares con otros NPVs (LdMNPV, ref int capII AM; SpliMNPV, idem; AgMNPV, Ribeiro y Pinedo, 2001) y con CpGV (ref).

La inserción de la hormona esterasa juvenil (*juvenile hormone esterase*, JHE) en AcMNPV no tiene ningún efecto sobre la LT_{50} y la LD_{50} en larvas de *T. ni*, respecto del virus silvestre. Sin embargo, se detectó una reducción en el consumo de alimento. Aparentemente, los mecanismos de control homeostático de la larva eliminan el exceso de JHE, probablemente mediante ubiquitinación y proteólisis. La expresión de una JHE modificada, resistente a la degradación, condujo tanto a una reducción significativa de la TL_{50} como a una disminución del daño de 36-50% (Bonning & Hammock, 1996).

No obstante, los resultados obtenidos con la mayoría de los recombinantes con diferentes genes de hormonas de insecto, no están a la altura de las expectativas.

El sistema de regulación homeostática del insecto consigue compensar los excesos o defectos en el nivel de hormonas, contrarrestando, de esta manera, las variaciones debidas a la expresión por el baculovirus.

Toxinas específicas de insecto

La expresión de genes de toxinas no debería presentar los mismos problemas de compensación por parte del insecto. Sin embargo, la expresión de este tipo de genes puede impedir la continuación del ciclo de vida del virus, si la toxina producida tiene un efecto letal sobre la célula que la alberga. El compromiso de la replicación viral no sólo afecta la producción de los inóculos virales necesarios, sino también el progreso de la infección en larvas.

Por ello, la expresión de toxinas secretadas y con un modo de acción específico de tejido, solucionaría el problema. Las primeras toxinas utilizadas para generar este tipo de recombinantes AcMNPV, fueron las del escorpión *Butus eupeus* y de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. En ninguno de los dos casos se logró demostrar una disminución de la TL_{50} . En el caso de la toxina *Bt*, el tejido blanco es el epitelio intestinal, que es difícilmente alcanzado desde los tejidos infectados; en el caso de la toxina *Butus*, el producto del gen carecía de secuencia señal.

Las modificaciones de las cualidades insecticidas de los baculovirus más exitosas,

fueron logradas a principios de los '90, mediante la inserción de genes de neurotoxinas específicas de insecto, aisladas del escorpión *Androctonus australis* (denominada AalT) y del ácaro depredador *Pyemotes tritici* (denominada TxP I). Ninguna de ellas tiene efecto alguno en ratones, incluso al ser inyectadas intracerebralmente a altas concentraciones. Sin embargo, la infección de larvas con los respectivos recombinantes de AcMNPV, dio por resultado la reducción más importante en la TL₅₀ registrada hasta ese momento.

En los casos mencionados arriba, las larvas cesan de alimentarse debido a la parálisis causada por la neurotoxina. Correcciones posteriores en el uso de codones y señales de secreción, mejoraron aún más los resultados (Stewart *et al.*, 1991; Inceoglu *et al.*, 2001).

I.4 EL CASO PARTICULAR DE AgMNPV.

El virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) es un patógeno específico de la 'oruga de las leguminosas' (*Anticarsia gemmatalis*). Esta plaga afecta leguminosas de importancia económica como la soja, el maní y la alfalfa, entre otras.

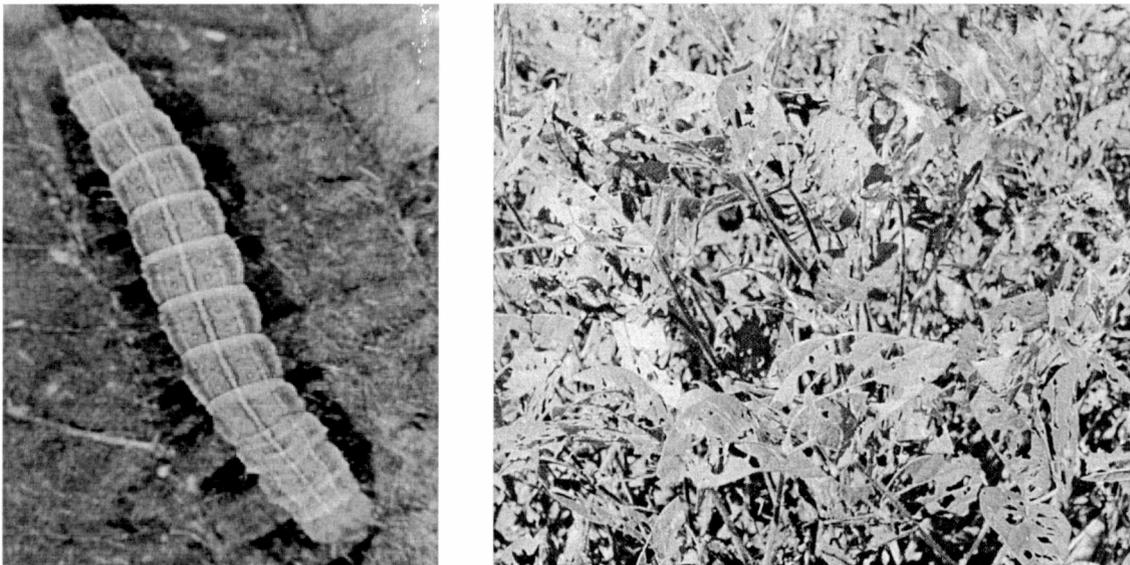


Figura I.8. Acción de *Anticarsia gemmatalis* en cultivos de soja. En el panel de la izquierda, larva de *Anticarsia gemmatalis* sobre hoja de soja. En el panel de la derecha, aspecto de un cultivo afectado por la plaga.

Anticarsia gemmatalis pertenece a la familia *Noctuidae*, ubicada dentro del orden *Lepidóptera*, que abarca un total de 20.000 especies y se caracterizan porque sus adultos vuelan de noche y son de colores grisáceos u oscuros.

En particular, el adulto de *A. gemmatalis* puede tener varios colores desde café-púrpura hasta amarillo-café pálido moteado de negro y a menudo, con una línea diagonal pálida de bordes oscuros, que atraviesa las alas anteriores y posteriores. El adulto pone los huevos solos o en grupos en el envés de las hojas.

Las larvas de esta especie son delgadas, de color verde pálido a café oscuro, con líneas laterales amarillas o pálidas y líneas dorsales delgadas; los segmentos a menudo están separados por bandas amarillas delgadas, de textura aterciopelada en la piel. Son masticadoras voraces del follaje y de las vainas y al presentarse en altas densidades pueden defoliar un cultivo en poco tiempo.

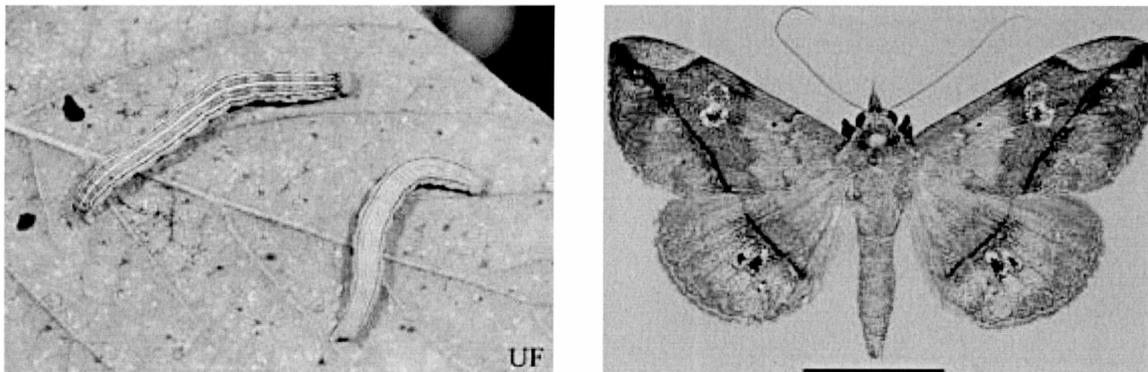


Figura I.9. Ejemplares de *Anticarsia gemmatalis*. En el panel de la izquierda, *Anticarsia gemmatalis* en estadio larval. El en panel de la derecha, ejemplar adulto.

Las larvas de *A. gemmatalis* pasan por 6 estadios que pueden durar de 5 a 20 días. El daño que le producen al cultivo es Durante los tres primeros estadios se alimentan poco, en comparación con la ingestión foliar de los estadios más avanzados, que puede alcanzar hasta el 75% de las hojas trifoliadas. Las orugas comienzan alimentándose de las hojas en la parte superior de la planta. Luego de que estas hojas han sido destruidas, las hojas más maduras (parte inferior) son devoradas. Después de eliminar todo el follaje, se comen la parte más suculenta del tallo. En altas infestaciones, la planta entera es atacada hasta ser completamente destruida.

A. gemmatalis es nativa de regiones tropicales y subtropicales del hemisferio occidental (Bolivia, Norte de Paraguay, Estado de Paraná-Brasil, Estado de Florida-Estados Unidos), donde se encuentra activa durante todo el año. Al ser una especie migratoria de grandes distancias, inicia la colonización anual de las zonas templadas al comienzo del verano. Así, constituye una amenaza muy importante en los cultivos de soja del litoral y norte argentino. De hecho, representa una de las plagas principales para dicho cultivo en nuestro país (www.saenzpe.inta.gov.ar/Cereales/soja.htm).

El programa de aplicación de AgMNPV silvestre, para el control de la plaga descrita más arriba en Brasil, representa uno de los casos más exitosos de control biológico en el mundo. Constituye el esquema más importante de control de poblaciones de insectos mediante baculovirus, en función del área tratada (Caballero *et al.*; 2001).

En los apartados que siguen, se describirán los resultados de dicho programa, desde sus comienzos hasta la actualidad, como así también las dificultades para la expansión de una experiencia similar con el virus silvestre, a regiones de climas más templado como nuestro país.

Implementación inicial del Programa para el uso de AgMNPV. Uso en granjas.

Durante las temporadas de 1980/1981 y 1981/1982, el gobierno brasileño estableció un programa piloto de utilización de AgMNPV en 21 granjas en los estados de Paraná y Río Grande do Sul. El resultado fue un control eficiente de las poblaciones de *A. gemmatalis* en las parcelas tratadas con el formulado del baculovirus, en comparación con parcelas tratadas con insecticidas y no tratadas (Moscardi y Correa Ferreira, 1985; Moscardi, 1989; Moscardi, 1999).

La implementación del Programa en sí, se inició en la temporada 1982/1983 cuando fueron tratadas 2000 ha de soja. En un principio, se produjeron pequeñas cantidades

de AgMNPV en larvas criadas en dieta artificial. Las larvas muertas por poliedrosis fueron congeladas y sirvieron tanto para la demostración de la eficacia del tratamiento ante las autoridades competentes, como para la producción de virus para la siguiente temporada.

Desde entonces, mediante pruebas a campo, los investigadores brasileños han demostrado el valor de AgMNPV como bioinsecticida.

Consolidación del Programa para el uso de AgMNPV.

Inicialmente el NPV se aplicó como una preparación cruda a partir de macerados de larvas muertas.

La consolidación del uso de AgMNPV para el control de la *Anticarsia gemmatalis*, se produjo con el advenimiento de una formulación viral en forma de polvo humectante con base de caolina, en 1986 (Moscardi, 1989; Moscardi, 1999). No se profundizará en los detalles de la aplicación del bioinsecticida (dosis, equipamiento, etc) pero sí en el alcance del Programa hasta la actualidad.

A mediados del '90, el uso de AgMNPV alcanzó alrededor de 1000000 ha anuales, y en la temporada 2001/2002 el área tratada con el patógeno comprendió más de 1500000 ha, equivalente al 11% de la soja cultivada en Brasil. Más aún, la demanda es del orden de los 4000000 ha, es decir que superó en unas 2500000 equivalentes de ha (HEQ), la disponibilidad del producto en el mercado.

El incremento en la demanda se dio principalmente en el área central de Brasil, en los estados de Mato Grosso-MT, Mato Grosso do Sul-MS y Goiás-GO, donde es producida más del 50% de la soja de ese país. La utilización de AgMNPV en esa región solía ser escaso en temporadas anteriores, sin embargo, aumentó drásticamente en los periodos 2000/2001 y 2001/2002. El uso del virus en Paraguay también ha sido significativo, y actualmente representa unas 150000 ha anuales.

El virus ya es producido por varias empresas privadas bajo un convenio con EMBRAPA, la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria. El único método de producción del virus en parcelas de productores de soja; se realiza una aplicación del virus a una parcela con buena infestación de *A. gemmatalis* y una colecta posterior de larvas infectadas, las cuales se almacenan en cámaras entre -4 y -8 °C, hasta su procesamiento y formulación. Actualmente, se emplean alrededor de 30000 ha de soja para la producción del virus (Caballero *et al.*, 2001).

anteriormente, no arrojaron los resultados esperados.

La falta de control de calidad de las preparaciones virales y del ajuste de la metodología de aplicación según la dinámica poblacional de la plaga en las diferentes zonas ecológicas, influyeron en el fracaso del programa de incorporación de esta herramienta de biocontrol en el manejo de plagas de soja (Sosa-Gómez y Moscardi, 1991). Sin embargo, la desventaja más significativa que limitó la utilización de AgMNPV fue su baja velocidad de acción. Con temperaturas medias inferiores a las de Brasil (20-25 °C; dependiendo de la región), el tiempo requerido por el virus para ejercer su acción letal resulta aún mayor que los 5-6 días registrados en aquella región (entre 8-10 días). Como consecuencia de las mismas condiciones climáticas, el desarrollo de la planta también es más lento y por consiguiente, el cultivo no es capaz de tolerar los niveles de defoliación producida por el insecto en el tiempo comprendido entre la aplicación del virus y el cese de la alimentación, sin pérdida de rendimiento. Asimismo, las erupciones de insectos son más frecuentes.

Ahora bien, si se tienen en cuenta los beneficios económicos, ecológicos y sociales que ha generado la utilización de AgMNPV en Brasil, es de esperar que, si se logran superar los aspectos negativos que han conducido al fracaso de la aplicación de AgMNPV en Argentina, dicho virus constituiría un excelente componente de una estrategia de manejo integrado de plagas para un cultivo tan extendido en nuestro país como lo es la soja.

A modo de ejemplo, desde el comienzo del programa para el uso de AgMNPV implementado por el Embrapa, se evitó la aplicación de más de 17 millones de litros de insecticidas químicos (Moscardi *et al.*, 2002). Otro aspecto importante del programa fue su contribución para un cambio en el tipo de insecticidas utilizados para el control de larvas de *A. gemmatilis* en soja. En el estado de Paraná, mediante estudios conducidos por agencias gubernamentales a lo largo de cinco zafras (1992/1993 hasta 1996/1997), se evidenció un viraje general en el perfil de sustancias empleadas, de insecticidas muy tóxicos, de amplio espectro hacia el uso de productos basados en AgMNPV en conjunción con reguladores del crecimiento de insectos (IGRs), en las últimas temporadas relevadas.

Los beneficios se han extendido a zonas sojeras del litoral de nuestro país. En los últimos años, asociado al intenso uso de AgMNPV en las regiones tropicales vecinas, se ha detectado una menor o tardía migración de las poblaciones de adultos hacia estas zonas más templadas y por consiguiente, niveles inferiores de ataques en comparación con temporadas anteriores (www.e-campo.com).

Es en este contexto que se enmarcan los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral. Con el fin de atacar el problema de la acción lenta de AgMNPV, planteamos el desarrollo de un sistema eficiente para la generación de AgMNPV recombinantes con el propósito de introducir modificaciones genéticas que apuntan a optimizar sus cualidades insecticidas, estrategia de comprobada eficacia conforme lo expuesto oportunamente en apartados anteriores de esta Introducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

PRODUCTOS QUÍMICOS Y ENZIMAS

Se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Alemania), Sigma (USA), Fluka (Suiza), Carlo Erba (Italia) o Mallinkrodt (USA). Los reactivos y enzimas usados en los experimentos de manipulación de genes fueron de grado Biología Molecular de Sigma (USA), Boehringer Mannheim (Alemania), Stratagene (USA), Promega (USA), New England Biolabs (USA) o Invitrogene (USA).

Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (USA). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Gibco BRL (USA) y los sueros fetales por Bioser (Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Dinamarca) y Corning (USA).

El agua utilizada fue destilada, deionizada y esterilizada por autoclave a 121 °C, dado el requerimiento de una máxima calidad y pureza en los protocolos de biología molecular.

MATERIAL RADIATIVO

Los nucleótidos radiactivos utilizados en las reacciones de marcación de ácidos nucleicos, se sintetizaron en nuestro laboratorio a partir de γ [³²P]ATP provisto por New England Nuclear (NEN, USA).

El dosaje de material radiactivo se realizó por medición con un contador Geiger.

Para las autorradiografías se usó película X-OmatTM K de Kodak revelándose con revelador manual para placas radiográficas.

BACTERIAS Y PLÁSMIDOS

En los experimentos de clonado de los fragmentos de la digestión con HindIII del genoma viral, se usó el vector pZErO-2 (Invitrogene, USA). La poliedrina y sus regiones flanqueantes fueron subclonadas en pcDNA II (Invitrogene, USA).

El gen lacZ truncado, destinado al vector de transferencia para proteínas de fusión, fue preparado por digestión de pAcDZ1 (Zuidema *et al*, 1990). El gen lac Z completo, destinado al vector de transferencia para la generación del AgMNPV *polh/lacZ*⁺ se preparó por digestión del pCH110 (Amersham-Pharmacia, Suecia).

Para la generación de los vectores de transferencia se usaron los vectores Bluescript (Stratagene, USA), pGEM-T (Promega, USA) y y las cepas de *E. coli* DH5 α F' y TOP 10.

Para los experimentos de recombinación homóloga en células de insecto se utilizaron vectores de transferencia originales, cuyo diseño se describe en los respectivos capítulos.

CÉLULAS Y VIRUS

La línea celular utilizada para la propagación de los virus AgMNPV silvestre y recombinantes fue *Anticarsia gemmatalis* UFL-AG-286 (Sieburth y Maruniak, 1988a), mantenida a 28°C en incubadora de cultivo. En los comienzos del proyecto, se ensayó asimismo el crecimiento de AgMNPV en células de *S. frugiperda* IPLB-SF21 (SF-21, Vaughn, 1977).

Como cepa viral silvestre de AgMNPV se utilizó el aislamiento AgMNPV-2D (Sieburth y Maruniak, 1988b), cedido por B. Ribeiro (Universidade de Brasilia). Como se indicará puntualmente, se ensayó también una formulación viral de AgMNPV cedida por J. Claus (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina y S. Lorenzatti, INTA-Oliveros, Argentina).

El laboratorio de cultivo celular está equipado con una primer cámara con las estufas de cultivo y el flujo laminar y una segunda cámara con las centrifugas y una antecámara de entrada.

SOLUCIONES USADAS EN EL CULTIVO DE CÉLULAS

***BUFFER* FOSFATO SALINO *PBS* 10 X (POR LITRO)**

KCl	2 g	
PO ₄ H ₂ K	2 g	Se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C y en un autoclave.
NaCl	80 g	
PO ₄ HNa ₂	11,5 g	

MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

MEDIO PARA DESARROLLO LB (POR LITRO)

Extracto de levadura	5 g	Se ajusta el pH a 7,6 y se esteriliza durante 15 min a 121 °C y 1 atmósfera en un autoclave. Para los medios sólidos: se agrega 15 g de agar/litro.
Triptona	10 g	
NaCl	10 g	

MEDIOS PARA DESARROLLO DE COMPETENCIA

MEDIO SOB (POR LITRO)

Extracto de levadura	5 g	Se ajusta el pH a 7,5 con KOH y se esteriliza durante 15 min a 121°C y en un autoclave. Inmediatamente antes de utilizar, se agregan 20 ml 1 M MgSO ₄ esterilizado en autoclave.
Triptona	20 g	
NaCl	0,5 g	

MEDIO PARA SELECCIÓN

Se utilizó como medio base LB con el agregado de ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) como antibióticos de selección.

En el caso que el sistema utilizado permita emplear el ensayo de α -complementación es posible discriminar entre los clones transformados con plásmidos sin inserto (α -complementación positiva) y los clones transformados con plásmidos que contienen inserto (α -complementación negativa). Para ello, el medio de cultivo se adiciona con el inductor IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido) y con el reactivo cromogénico X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-galactósido).

El sistema de clonado en pZErO-2/*E. coli* TOP 10, posee la ventaja de minimizar la obtención de colonias no recombinantes debido a la presencia del gen letal para *E. coli*, *ccdB*. El vector de clonado pZErO-2 contiene el gen *ccdB* fusionado al C-terminal de la proteína LacZ α . La inserción de DNA foráneo impide la expresión del gen de fusión lacZ α -*ccdB*, permitiendo el crecimiento de las bacterias recombinantes.

**SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS SEGÚN EL PROTOCOLO DE
LISIS POR ÁLCALI**

ALCOHOLES

etanol 96 % y 70 %.

BUFFER TE 1 X

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

10 % SDS

10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. Se mantiene a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN I

Glucosa	50 mM	Se esteriliza por filtración. Se mantiene a 4 °C.
Tris-HCl pH 8,0	25 mM	
EDTA	10 mM	

SOLUCIÓN II

NaOH	0,2 N	La solución se prepara en el momento de uso, a partir de soluciones concentradas de NaOH y SDS.
SDS	1 %	

SOLUCIÓN III

AcK 5 M, pH 4,8.

La solución es 5 M con respecto al acetato y 3 M con respecto al potasio.

SOLUCIONES PARA LA BÚSQUEDA DE CLONES RECOMBINANTES POR HIBRIDACIÓN DE COLONIAS

SSC 20 X

NaCl	3 M
Citrato de sodio pH 7,0	0,3 M
Se esteriliza por autoclave.	

DENHARDT'S 50 X

Ficoll	1 % p/v
polivinilpirrolidona	1 % p/v
seroalbúmina	1 % p/v

BUFFERS UTILIZADOS EN REACCIONES ENZIMÁTICAS

LIGACIÓN 10 X

Tris-HCl pH 7,8	300 mM
MgCl ₂	100 mM
Dithiotreitol	100 mM
ATP	5 mM

KLENOW 10 X

Tris-HCl pH 7,2	500 mM
MgCl ₂	100 mM
Dithiotreitol	1 mM

FOSFATASA ALCALINA 1 X

Tris-HCl pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

TRANSFERASA TERMINAL 10 X

Cacodylate K	1 M
CoCl ₂	2 mM
Dithiotreitol	1 mM

PCR 10 X (Taq Pol)

Tris-HCl pH 9,0	100 mM
KCl	500 mM
Tritón X-100	1 %

PCR 10 X (Pfu Pol)

Tris-HCl pH 8,8	200 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
BSA	1 mg/ml
Tritón X-100	1 %

SOLUCIONES PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

GELES DE POLIACRILAMIDA TRIS-GLICINA-SDS

GEL SEPARADOR: 10 %. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* de separación 1 X: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS.

GEL CONCENTRADOR: 5 %. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30;0,8) diluyendo en *buffer* concentrador 1 X: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS.

BUFFER DE CORRIDA 1 X

Tris base	25 mM
glicina pH 8,3	250 mM
SDS	0,1 %

SOLUCIÓN PARA SIEMBRA DE MUESTRAS 4 X

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
glicerol	40 %
SDS	8 %
β -mercaptoetanol	20 %
azul de bromofenol	0,1 %

SOLUCIÓN DE TINCIÓN

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	0,25 % p/v
metanol	45 % v/v
ácido acético	10 % v/v

SOLUCIÓN DE DESTINCIÓN

etanol	30 % v/v
ácido acético	10 % v/v

SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE β -GAL

BUFFER Z

a. Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0.06M
b. NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.04M
c. KCl	0.01M
d. MgSO ₄ .7H ₂ O	0.001M
e. β mercaptoetanol	0.05M

Se ajusta el pH a 7.0.

SOLUCIÓN DE LAVADO

1 X *PBS*.

SOLUCIÓN DE LISIS

- a. CHCl₃
- b. SDS 0,1 %

1 X ONPG (ORTONITRO β -DGALACTOPIRANÓSIDO)

Se prepara el ONPG (4 mg/ml) en *buffer* 1 X *PBS*. Se fracciona y se almacena a -20 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN STOP

CO₃Na₂ 1 M

MÉTODOS

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, 1 ó 2 % (P/V) en *buffer* TAE 1 X. Las bandas de DNA se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y transiluminación con luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, USA).

PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (*GENECLEAN™, Bio 101 Inc.*).

La banda correspondiente al fragmento de DNA a purificar, se cortó del gel y se incubó en 500 µl de NaI saturado durante 5 min a 60 °C. Posteriormente, se agregó 5 µl de polvo de sílice y se incubó con agitación constante durante 15 min. Se centrifugó 10 s a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó 3 veces con 400 µl de solución *New Wash* (NaCl, etanol y agua). El *pellet* se resuspendió en 20 µl de agua y se incubó 20 min a 60 °C.

Finalmente, la mezcla se centrifugó 4 min a 14000 rpm y el sobrenadante conteniendo el DNA de interés se transfirió a otro tubo que se guardó a -20 °C hasta su uso.

REACCIÓN DE LIGACIÓN

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando: *buffer* de la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 1 X; 1,5 unidades de la enzima y relación molar de inserto:vector desde 2:1 hasta 10:1 -según el experimento- en un volumen final de 10-15 µl. La mezcla se incubó a 16 °C toda la noche y se utilizó para transformar bacterias competentes DH5αF', ó Top10.

PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Una alícuota de un *stock* congelado de *E. coli* DH5 α F' se tomó con la punta de una espátula, y se cultivó en 4 ml de medio SOB con 20 mM MgSO₄ con agitación durante toda la noche. El cultivo se diluyó en 400 ml de medio SOB fresco conteniendo 20 mM MgSO₄ y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5.

Las bacterias se dejaron en hielo durante 15 min. Posteriormente, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm. El sedimento se resuspendió en 80 ml de FSB. Luego de 10 min en hielo la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C. Las células recuperadas, se resuspendieron en 16 ml de FSB, y esta mezcla se dejó 10 min en hielo. Las células se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. El mismo método se utilizó en la preparación de bacterias competentes TOP 10.

TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI*

Las bacterias competentes se descongelaron, y se mantuvieron durante 10 min en hielo. Se agregaron 10 μ l de la mezcla de ligación a 50 μ l de bacterias competentes y la preparación resultante se mantuvo 30 min en hielo.

Posteriormente, se incubó a 42 °C durante 90 s, en hielo 2 min y, luego de agregar 200 μ l de medio LB, la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h.

Las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina para la selección de recombinantes. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C.

PREPARACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

Se inoculó 1 l de medio LB con 10 ml de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* DH5 α crecido durante una noche. Las células se incubaron a 37°C con agitación, hasta alcanzar una DO₆₀₀=0,5 (la mayor competencia se logra en la fase de crecimiento exponencial temprana a media). En este punto, el cultivo se enfrió en agua-hielo durante 30 min y se centrifugó 15 min, en alícuotas de 200 ml, a 4.000 rpm (rotor Kontron A.6.14), a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 1 l de glicerol 10% estéril (helado). Se realizaron tres rondas adicionales de centrifugación-resuspensión en glicerol 10%, pero disminuyendo progresivamente los volúmenes de resuspensión hasta 2-3 ml finales. Las suspensiones de bacterias así obtenidas se guardaron en alícuotas a -70°C para ser usadas inmediatamente después de ser descongeladas.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES.

Se empleó el sistema de electroporación utilizando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cuarenta microlitros de bacterias electrocompetentes se mezclaron con 1 μ l de reacción de ligación y se sometieron a un pulso de 2,5 kV en una cubeta de 0,2 cm de distancia entre electrodos. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 μ F y 200 Ω , respectivamente. El procedimiento se efectuó en frío, y una vez descargado el voltaje, las bacterias se resuspendieron con 960 μ l de SOC, y se incubaron 1 h a 37, antes de ser sembradas en placa.

TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES

Después de la transformación, 100 μ l de la suspensión de bacterias se sembraron en placas con agar LB conteniendo ampicilina (100 μ g/ml), 40 μ l de X-gal (20 mg/ml, en *N, N*-dimetilformamida) y 4 μ l de IPTG (200 mg/ml). Las placas se incubaron una noche, a 37°C. Las colonias portadoras de plásmidos recombinantes se identifican por su color blanco (en ellas no se manifiesta actividad β -galactosidasa debido a la inactivación insercional del péptido de complementación α), mientras que las colonias transformadas con plásmidos no recombinantes desarrollan color azul. El IPTG actúa como inductor no metabolizable de la enzima, y el X-gal como sustrato cromogénico. No fue posible identificar todos los plásmidos recombinantes de esta manera, dado que en los clonados secuenciales, ya se partía de plásmidos que contenían insertos, por lo tanto, la actividad β -galactosidasa había sido inactivada en forma previa. Es por ello que debieron analizarse por las técnicas que siguen, que también fueron utilizadas para confirmar aquellos clones que podían ser identificados por la interrupción del péptido de complementación α .

PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de la transformación y cada una se depositó en la pared de un tubo. El material que quedaba en el palillo se utilizó para realizar una estría en medio selectivo LB-agar con antibiótico a la concentración apropiada.

Las bacterias depositadas en el tubo se resuspendieron en 10 μ l de *buffer* de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 % Tween 20; 0,5 % NP-40; 1 mM EDTA) y se hirvieron durante cinco minutos. Cada tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min.

La reacción de amplificación se realizó utilizando: 1 μ l de este sobrenadante en *buffer* de PCR 1 X; 1,5 mM MgCl₂; 1 mg/ml BSA; 0,2 mM de cada dNTP; 1 μ M de *primer* 5' y 3' (*primers* comerciales del bacteriófago M13, -20 directo ó -24 reverso o específicos) y 0,25 unidades de la enzima *Taq* polimerasa en 10 μ l de volumen final. Las colonias que daban una señal positiva de amplificación, se cultivaron en medio líquido, para purificar sus plásmidos y analizarlos por digestión con endonucleasas de restricción.

HIBRIDACIÓN DE COLONIAS

Las colonias resultantes de la transformación se repicaron por duplicado en medio selectivo LB-agar con antibiótico. Una de las réplicas obtenidas se usó para detectar clones recombinantes por el método de hibridación de colonias.

Las colonias desarrolladas sobre agar se transfirieron a papel de filtro Whatman 541 y se trataron por imbibición sucesiva durante 5 min en las siguientes soluciones (dos veces en cada una): 0,5 M NaOH, 1 M Tris-HCl pH 7,5 con agitación, 2 X SSC y, finalmente, en etanol absoluto.

Una vez seco, el filtro se pre-hibridó durante 2 hs a 65 °C en 5 X Denhardt, 6 X SSC, 0,1 % SDS, 200 μ g/ml RNA de levadura y se hibridó en las mismas condiciones durante 12 a 16 hs con el agregado de una sonda radiactiva.

Los filtros se sometieron a lavados sucesivos de 15-20 min con 6 X SSC, 0,1 % SDS a temperatura ambiente, 2 X SSC, 0,1 % SDS a 50°C y con agitación en ambos casos. Posteriormente los filtros fueron expuestos para obtener las autorradiografías correspondientes. Las colonias positivas por hibridación se cultivaron en medio líquido para purificar sus plásmidos y analizarlos por digestión con endonucleasas de restricción.

PREPARACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS DE DNA POR EXTENSIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Las sondas de DNA utilizadas durante todo este trabajo de tesis se marcaron radiactivamente con α [³²P]dATP (6000 Ci/mmol) por la técnica de *random priming* (Feinberg *et al.*, 1983).

Las reacciones de marcación se realizaron utilizando: *buffer* Klenow 1x, 200 a 500 ng de molde purificado, 100 ng de *random primers* pdN₆, 0,1 mM de 3 dNTPs (-dATP), 30 μ Ci de α [³²P]dATP y 3 unidades del fragmento de Klenow de la DNA polimerasa en un volumen final de 50 μ l. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 hs.

El DNA marcado se separó del nucleótido radiactivo libre, mediante filtración en gel usando una columna de Sephadex G-50 equilibrada con *buffer* TE 1 X.

ANÁLISIS DE LOS CLONES RECOMBINANTES

PREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO Y DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS

El DNA plasmídico se aisló por el método de lisis alcalina (Birnboim *et al.*, 1979). Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el molde de DNA a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el *buffer* de digestión recomendado por el proveedor.

SECUENCIACIÓN

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el sistema *Taq* DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) en un ciclador Perkin Elmer 9600, según las instrucciones del fabricante. El mismo se basa en el método de terminación de las cadenas mediada por la incorporación de dideoxynucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). En este caso, cada ddNTP está marcado con uno de los cuatro colorantes fluorescentes de tipo rodamina: ROX, TAMRA, JOE y FAM. El ciclado amplifica las cadenas en forma lineal. Como *primers* se usaron los oligonucleótidos complementarios a los promotores de los fagos T7 y SP6, que flanquean al sitio de clonado múltiple del plásmido, en reacciones separadas (secuencias directa y reversa). La cantidad de molde por reacción fue de 250 ng de plásmido. Los datos del gel se analizaron con los programas Sequencing Analysis y SeqEd 675 DNA Sequence Editor (Applied Biosystems).

**TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA GENERACIÓN Y ANÁLISIS
DE BACULOVIRUS VIRUS RECOMBINANTES**

TITULACIÓN POR ENSAYOS DE PLACAS

Las titulaciones de los *stocks* virales se realizaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro, utilizando células UFL-AG-286 o IPLB-SF-21. En cada placa se sembraron $1,5 \times 10^6$ células y se incubaron de 2 a 4 horas para permitir la adhesión. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se infectaron con 200 μ l de diluciones seriadas del inóculo viral (cada dilución por duplicado). Se dejó una hora a temperatura ambiente para favorecer la adsorción. Luego se retiró el inóculo viral y se agregaron 2 ml de la preparación agarosa/TC-100 (1,5% agarosa Sea Plaque-FMC Bioproducts, ME, USA- 0,5 X TC100 completo). Una vez solidificado se agregó 1 ml de TC100 completo por caja y se incubó entre 4 y 6 días a 28°C. La tinción se realizó con rojo neutro (O'Reilly *et al*, 1992).

INFECCIÓN VIRAL

Las infecciones de cultivos en suspensión se realizaron a densidades celulares en el rango de 5×10^5 y 1×10^6 células por ml con una mdi de 0,1 pfu/célula. Las infecciones en monocapa se hicieron con la misma multiplicidad en frascos de 175 cm² que contenían 6×10^7 células. Las células infectadas se incubaron a 28°C. Los controles de infección negativos se trataron de la misma manera excepto que el inóculo fue medio de cultivo sin virus. Los efectos citopáticos de la infección se monitorearon por microscopía de contraste de fase.

OBTENCIÓN Y DIGESTIÓN DE DNA VIRAL A GRAN ESCALA

Los BV (*budded viruses*) se aislaron del sobrenadante del medio de cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 1000xg durante 5 minutos a 4°C. La precipitación de los viriones se llevó a cabo por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa (O'Reilly *et al*, 1992). El *pellet* de viriones se resuspendió en un *buffer* de lisis (10mM Tris-HCl de PH 7,6, 10mM EDTA, 0,25% SDS) y se agregó

proteínasa K (500µg/ml) incubando a 37°C toda la noche. La purificación del DNA genómico se realizó de acuerdo a las metodologías estándar (Sambrook *et al*, 1989).

OBTENCIÓN Y DIGESTIÓN DEL DNA VIRAL EN PEQUEÑA ESCALA (MÉTODO 'MINIPREP')

Las partículas virales (*budded viruses*) se aislaron del sobrenadante del medio de cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 1000xg durante 5 minutos a 4°C. La precipitación de los viriones se realizó por centrifugación de 1,5 ml de sobrenadante clarificado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. El *pellet* de viriones se resuspendió en un *buffer* de lisis (10mM Tris-HCl de PH 7,6, 10mM EDTA, 0,25% SDS) y se agregó proteínasa K (500µg/ml) incubando a 37°C toda la noche. La purificación del DNA genómico se realizó de acuerdo a las metodologías estándar (Sambrook *et al*, 1989).

ENSAYOS DE COTRANSFECCIÓN

Se realizaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células. Se incubaron de 2 a 4 horas para favorecer la adhesión a la superficie. Posteriormente se retiró el medio sobrenadante y se cotransfectaron con la mezcla de DNA viral, el plásmido que se indica oportunamente en las respectivas secciones de resultados y Tfx¹⁰ según las indicaciones del proveedor de Tfx¹⁰ (Promega, WI, USA). A los cuatro días de incubación se retiró 1 ml de sobrenadante (que se conservó a 4°C) y se lo reemplazó por 1 ml de medio fresco. A los 7 días se colectó el sobrenadante total.

ENSAYO DE PLACAS PARA LA DETECCIÓN DE RECOMBINANTES

Se realizó en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro, en forma equivalente a la titulación. Con el fin de detectar los recombinantes positivos, se agregaron 120 µg/ml de Xgal a la mezcla agarosa/medio. Se ensayaron las siguientes diluciones: 10^{-1} del sobrenadante retirado a los cuatro días, la misma del sobrenadante de 7 días de

incubación y una 10^{-2} del mismo período de incubación. Dependiendo de la cotransfección en cuestión, se escogieron las placas azules (Capítulo IV) o las blancas (Capítulo VI):

ENSAYOS DE DILUCIÓN TERMINAL PARA PURIFICACIÓN Y/O DE VIRUS RECOMBINANTES.

El método consiste en el *screening* de 96 fosas infectadas con diluciones seriadas de los *stocks* virales a purificar. Se utilizó en conjunto con otros métodos de *screening*, como PCR y expresión de *LacZ*. Se diluyeron las células a una concentración de 10^5 células por ml con medio completo. Se diluyeron los *stocks* virales a purificar a una concentración de 2×10^3 pfu/ml. Se mezcló 1ml de los virus diluidos con 10 ml de células y se alicuoteó dicha mezcla en las fosas de una placa de 96, a razón de 110 μ l por fosa. Se incubó la placa a 27°C durante 5 días. Para detectar las fosas que estaban infectadas con la población viral deseada se agregó X-gal al medio de dilución. Se escogieron varias fosas según fuera el recombinante analizado (azules en el caso del Capítulo IV, blancas en el caso del Capítulo VI) y para cada uno de estos aislamientos se prepararon diluciones seriadas (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}). Se repitió el procedimiento, y al cabo de los 5 días de incubación, se obtuvieron en las placas de mayor dilución, fosas sin infectar, y fosas infectadas sólo por una única población viral. El sobrenadante de estas últimas se amplificó para tener un *stock* de trabajo de rAgMNPV puro.

REACCIONES DE PCR PARA EL ANÁLISIS DE PROGENIES VIRALES.

En el caso de análisis de muestras virales provenientes de ensayos de dilución terminal, se tomaron 25 μ l del sobrenadante de las fosas y se agregaron 25 μ l de un *buffer* de lisis con proteinasa K (400 μ g/ml en 20 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 0,5% SDS). Se incubó 6 horas a 37°C. Posteriormente se hirvió durante 10 minutos y se agregaron 200 μ l de H₂O bidestilada estéril a la mezcla. Se usaron 5 μ l como molde para 100 μ l de reacción de PCR.

En el caso de análisis de muestras virales provenientes de placas, se amplificaron por reinfección en placas de 96 fosas, 100 μ l de la resuspensión del taco de agarosa en TC-100, una fosa por placa a amplificar. Al tercer día p.i., el sobrenadante de estas fosas se analizó como se describió más arriba.

REACCIÓN DE PCR PARA CONTROL DE LAS TRANSFECCIONES.

El resultado de las cotransfecciones se monitoreó por ensayos de PCR. Como molde de la reacción se usaron amplificaciones por reinfección de las progenies virales resultantes de la cotransfección. No se utilizaron en forma directa los sobrenadantes de cotransfección porque los mismos podían contener DNA plasmídico que resultaría en falsos positivos. Se tomaron 25 μ l del sobrenadante de infección y se agregaron 25 μ l de un *buffer* de lisis con proteinasa K (400 μ g/ml en 20 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 0,5% SDS). Se incubó 6 horas a 37 $^{\circ}$ C. Posteriormente se hirvió durante 10 minutos y se agregaron 200 μ l de H₂O bidestilada estéril a la mezcla. Se usaron 5 μ l como molde para 100 μ l de reacción de PCR.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

ENSAYOS DE MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β -GALACTOSIDASA (CINÉTICA DE EXPRESIÓN)

Se infectaron 1,5x10⁶ células UFL-AG-286 en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro, con el rAgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻ con una multiplicidad de infección de 20 pfu/ célula. Se tomaron muestras a diferentes tiempos post-infección (6, 12, 24, 31, 36, 48 y 72 horas). Se utilizó una caja por punto de tiempo para cada inóculo viral (AgMNPV-2D y rAgMNPV *LacZ*⁺/*polh*⁻). Para la toma de muestra, se resuspendió la monocapa de células infectadas en el medio sobrenadante y se recuperó el *pellet* de células luego de una centrifugación a baja velocidad. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se ensayó la expresión de β Galactosidasa.

Para ello, se trataron las células con 40 μ l de Buffer y 30 μ l de PBS. Posteriormente se agregaron 5 μ l de cloroformo y 10 μ l de SDS 0.1 %. Se agitó la suspensión durante un minuto, se agregaron 15 μ l de ONPG y se incubó a 28 $^{\circ}$ C durante 10 - 15 min. Se detuvo la reacción con 50 μ l de CO₃Na₂ (1 M), se centrifugó a 14000 rpm durante 4 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 420 nm usando como blanco el control hecho con medio de cultivo.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

La infección y recolección de muestras para el análisis de proteínas se realizó esencialmente como se describió en el apartado anterior. Se tomaron muestras a diferentes tiempos post-infección (12, 24, 36, 48, 55, 60, 65, 72 y 80 hours p.i.). Se resuspendió la monocapa de células infectadas en el medio sobrenadante y se recuperó el *pellet* de células luego de una centrifugación a baja velocidad. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en 400 μ l del mismo *buffer*.

Cada muestra se alicuoteó en 200 μ l y se centrifugó durante 1 minuto a 14,000 rpm. Estos *pellets* se resuspendieron en 40 μ l de *buffer* de siembra 1X, y 5 μ l de cada muestra se resolvió por SDS-PAGE.

El gel separador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) 10 % en *buffer* de separación 1 X. El gel concentrador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) 5 % en *buffer* concentrador 1 X. Los geles se tiñeron con la solución de tinción durante 30 min a 65 °C. La tinción no específica se eliminó con lavados en una solución 30 % etanol, 10 % ácido acético.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TXP I

BIOENSAYOS POR INYECCIÓN

Se inyectaron larvas de *Anticarsia gemmatalis* del segundo y cuarto estadio con las dosis de virus brotantes (AgMNPV *wt*, AgMNPV/ *lacZ⁺/ polh⁻*, AgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁻* y AgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺*), en pfus totales, indicadas oportunamente en las secciones de Resultados.

Se ensayó cada dosis sobre un mínimo de 30 individuos, y se realizaron dos repeticiones por tratamiento. Una vez inyectadas, las larvas se transfirieron a recipientes individuales conteniendo dieta artificial libre de virus, se incubaron en una cámara climatizada a 28 \pm 1 °C, 50% de H.R. y 14:10 horas F/E, y se examinaron en los intervalos de tiempo indicados en cada caso.

Las larvas se consideraron paralizadas cuando fueron incapaces de reincorporarse en 30 segundos una vez dispuestas de cúbito ventral.

Los insectos control, inyectados con medio de cultivo, empuparon entre 5 y 7 días post inyección

BIOENSAYOS POR INGESTIÓN

Se realizaron bioensayos en larvas neonatas, según la metodología descrita por Hughes y Wood (1986), utilizándose sacarosa al 1% como fagoestimulante y Coomassie Brilliant Blue al 0,1%, como colorante para la verificación final de la ingesta.

En primer lugar, se determinó la cantidad de suspensión ingerida por cada larva, por diferencia de peso de las larvas antes y después de la ingestión.

Tanto para dicha estimación como para la selección de los individuos en los bioensayos, se escogieron aquellos en los que se observó el contenido de suspensión hasta la mitad del tracto digestivo (una sola ingestión completa), siendo descartados los restantes. Los ensayos se condujeron en una cámara climatizada a 28 ± 1 °C, 50% de H.R. y 14:10 horas F/E.

Una vez ingerida la dosis correspondiente, las larvas se transfirieron a recipientes individuales conteniendo dieta artificial libre de virus y se examinaron en los intervalos de tiempo indicados en cada caso.

El cálculo de los respectivos tiempos medios de muerte se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa Statistix for Windows Copyright (C) 1985, 96 Analytical Software.

ESTUDIOS PRELIMINARES

CAPITULO III

ESTUDIOS PRELIMINARES

INTRODUCCIÓN

Una fuente de DNA viral de alto rendimiento y reproducibilidad constituía un condición esencial para cumplir con los objetivos primarios del presente proyecto de Tesis Doctoral.

Si bien existen protocolos optimizados para la obtención de DNA viral a partir de larvas infectadas de *Anticarsia gemmatalis*, los mismos son largos y laboriosos, con el agravante de que los resultados son poco reproducibles, y la calidad del DNA obtenido resulta variable. Es frecuente, por ejemplo, la rápida degradación del producto por la presencia de contaminaciones con microorganismos adventicios y enzimas del insecto. Además, la productividad guarda estrecha relación con el estado fisiológico del huésped, de difícil control.

La alternativa a la producción de baculovirus en larvas infectadas es su propagación *in vitro* en cultivos celulares. Este sistema permite crecimientos en pequeña y gran escala, además de resultados consistentes si no se alteran las condiciones de cultivo. En comparación con la producción *in vivo*, constituye un material de partida mucho más limpio. Así, es menor la cantidad de etapas necesarias para una purificación adecuada, disminución que trae aparejada un mayor rendimiento relativo.

La literatura resultó contradictoria en cuanto a la productividad de AgMNPV en cultivos de IPLB-SF-21, la línea celular de insectos más difundida para los sistemas de expresión baculovirales. Algunos autores informaron la obtención de altos rendimientos en ciertas condiciones de cultivo con la mencionada línea celular, aunque no analizaron el rendimiento en forma comparativa con el obtenido con una línea celular específica de *Anticarsia gemmatalis* (Claus *et al.*, 1997). Sin embargo, otros autores señalan que si bien las IPLB-SF-21 son permisivas para AgMNPV, su productividad es baja, resultando menos eficientes que la línea celular específica UFL-AG-286 (Castro *et al.*, 1997).

De esta manera, el primer paso del proyecto consistió, en la evaluación de la productividad viral en los distintos sistemas de cultivo disponibles en el laboratorio, resultados que se describen en la primera sección de este capítulo.

La caracterización a nivel de secuencia del gen de poliedrina y sus regiones

flanqueantes era necesaria para el desarrollo de la primera generación de plásmidos de transferencia para la recombinación homóloga con el locus *polh*.

La secuencia del gen de poliedrina de AgMNPV, clon 2D, fue publicada por Zanotto *et al.*, (1992). En el laboratorio, se utilizó el mencionado clon viral, generosamente cedido por B. Ribeiro, Univ de Brasilia. El clon 2D fue obtenido luego de tres pasajes sucesivos en placa, de un virus salvaje colectado a campo en 1979 (Zanotto *et al.*, 1992).

Los experimentos que se describen al final del capítulo fueron encarados con el fin de confirmar la estructura genómica correcta del aislamiento recibido, dado que luego de sucesivos pasajes en cultivos celulares, aún cuando las infecciones se hayan realizado a baja multiplicidad de infección, los aislamientos baculovirales suelen degenerar en virus defectivos en la formación de cuerpos de oclusión (O'Reilly *et al.*, 1992). Asimismo, la consecuencia del pasaje sucesivo a altas multiplicidades de infección, es la acumulación de partículas virales defectivas interferentes, con importantes deleciones en el genoma. Entre las regiones que suelen perderse o mutarse, se encuentra la que incluye el gen de poliedrina (O'Reilly *et al.*, 1992).

RESULTADOS

III.1 EFECTO CITOPÁTICO Y PRODUCCIÓN DE VIRUS INFECCIOSOS EN DOS LÍNEAS CELULARES DE INSECTO ENSAYADAS.

Evaluamos comparativamente la susceptibilidad a la infección por AgMNPV de dos líneas celulares de insecto, una de ellas derivada de *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21, ver capítulo II) (Vaugh et al., 1977) y la otra específica de *Anticarsia gemmatalis*, UFL-AG-286 (Sieburth y Maruniak, 1988). La morfología de estas líneas celulares es muy diferente. Las IPLB-SF-21 manifiestan una apariencia homogénea en cultivo, en relación a su forma y en menor medida al tamaño, de células redondeadas. En cambio, en los crecimientos de UFL-AG-286 se observan diferentes morfologías celulares (formas ahusadas, redondeadas, ver **Figura III.1**).

Notamos una marcada diferencia en cuanto a la susceptibilidad a la infección por AgMNPV, entre las dos líneas celulares ensayadas, de acuerdo con observaciones previas de Castro et al., 1997. A las 12 horas p.i., los cultivos de UFL-AG-286 infectados pueden distinguirse claramente por microscopía óptica de los no infectados. En el curso del proceso, las UFL-AG-286 pierden su típica heterogeneidad debido al redondeamiento que les provoca la infección viral, con una concomitante reducción en el tamaño y el número de las proyecciones celulares.

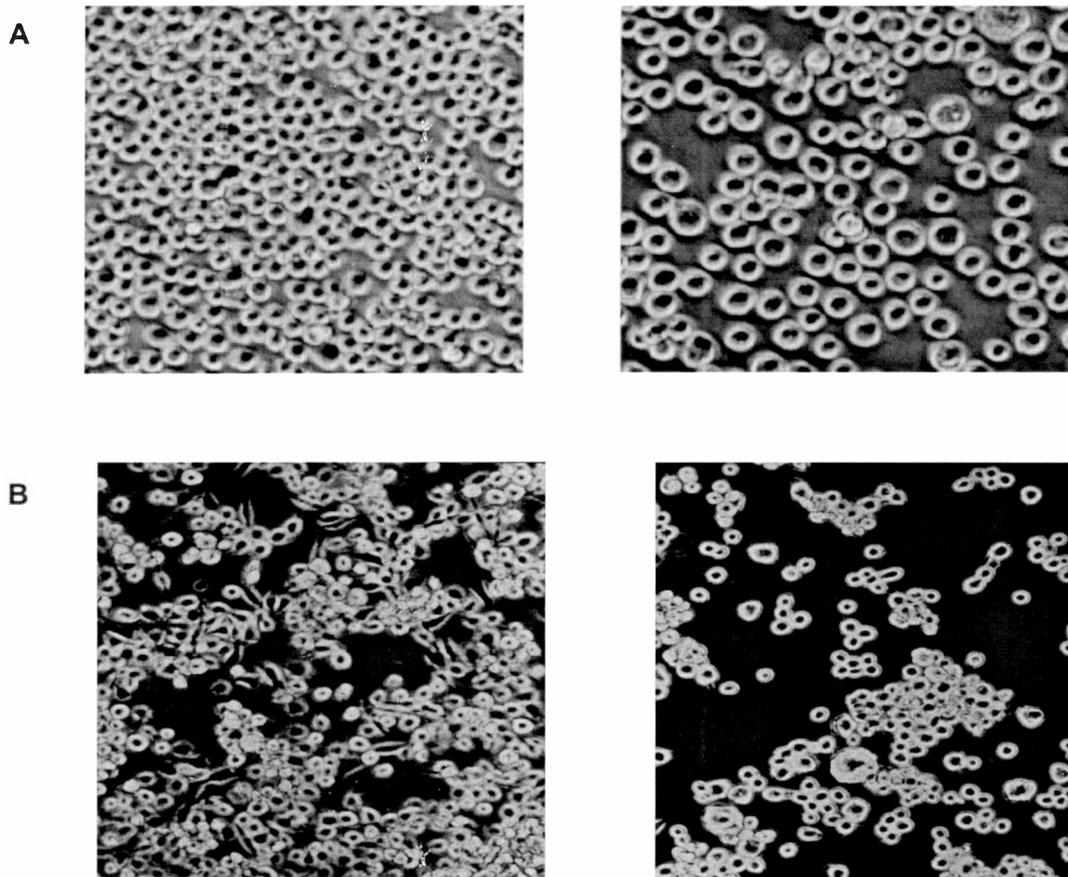


Figura III.1. Progresión de la infección en cultivos de células IPLB-SF-21 UFL-AG-286. En el Panel A, en la foto de la izquierda, células IPLB-SF-21 sin infectar. A la derecha, células IPLB-SF-21 infectadas. En el Panel B, la misma progresión en células UFL-AG-286. Las diferencias entre ambas infecciones se describen en el texto.

Estos efectos se intensifican con el avance de la infección, y a las 24 hs p.i. la gran mayoría de las células aparecen redondas, con una hipertrofia nuclear pronunciada. A las 48 hs p.i., el 90% de las UFL-AG-286 infectadas presenta poliedros en sus núcleos. Posiblemente debido a su forma, no fue posible detectar cambios morfológicos tempranos en los cultivos inoculados de IPLB-SF-21. Es decir que los efectos citopáticos de AgMNPV sobre IPLB-SF-21 fueron claros recién a las 96 hs p.i., cuando se empezaron a visualizar los poliedros en sus núcleos, de manera retardada en comparación con la línea celular específica de *Anticarsia gemmatalis*.

Con el fin de comprobar esta aparente menor infectividad de AgMNPV en IPLB-SF-21, titulamos distintos stocks virales, en forma simultánea, sobre monocapas de ambas líneas celulares (Tabla I). Los títulos obtenidos en UFL-AG-286 fueron en promedio unas 447 ± 23 veces mayores que los obtenidos en IPLB-SF-21.

	Log de los títulos obtenidos por ensayos de placas en las líneas celulares indicadas		
	<i>Stock 1</i>	<i>Stock 2</i>	<i>Stock 3</i>
IPLB-SF-21	5,47712125	5,255272505	4,301029996
UFL-AG-286	8,07918125	7,97312785	6,97772361
Relación	1,5	1,5	1,6

Tabla I. Títulos obtenidos en UFL-AG-286 y en IPLB-SF-21, de tres inóculos virales de trabajo diferentes. En la tabla se muestran los logaritmos de los títulos obtenidos en ambas líneas celulares para tres stocks virales diferentes y la relación entre los logaritmos para los tres casos.

Títulos en pfu obtenidos en UFL-AG-286	Sobrenadantes provenientes de las líneas celulares indicadas	
	IPLB-SF-21	UFL-AG-286
	7×10^6	7×10^7

Tabla II. Productividad de UFL-AG-286 y IPLB-SF-21. Tabla comparativa de los títulos obtenidos de infecciones en las dos líneas celulares con igual MOI. La titulación de los sobrenadantes provenientes de las líneas celulares indicadas en la tabla, se realizó sobre células UFL-AG-286.

Con el objeto de determinar si, a pesar de la menor infectividad, la producción de viriones brotantes no difería en ambas líneas celulares una vez establecida una infección productiva, titulamos en células UFL-AG-286, sobrenadantes de infección provenientes de IPLB-SF-21 y UFL-AG-286. El resultado se muestra en la **Tabla II** y de su análisis se desprende que no sólo los inóculos de AgMNPV son menos infectivos para células IPLB-SF-21, sino que también la replicación viral es menos eficiente en dicha línea celular.

III.2 LOCALIZACIÓN DEL GEN DE POLIEDRINA EN EL GENOMA DE AGMNPV-2D.

En la **Figura III.2** se muestra el resultado de la digestión el DNA viral con *HindIII*, indicándose el fragmento de dicha digestión que contiene el gen de poliedrina. Para una clara visualización de todos los fragmentos de digestión, los mismos se marcaron radiactivamente utilizando el fragmento Klenow y α [^{32}P]dATP. Así, los productos de digestión están marcados en forma proporcional a sus concentraciones molares y no a sus tamaños.

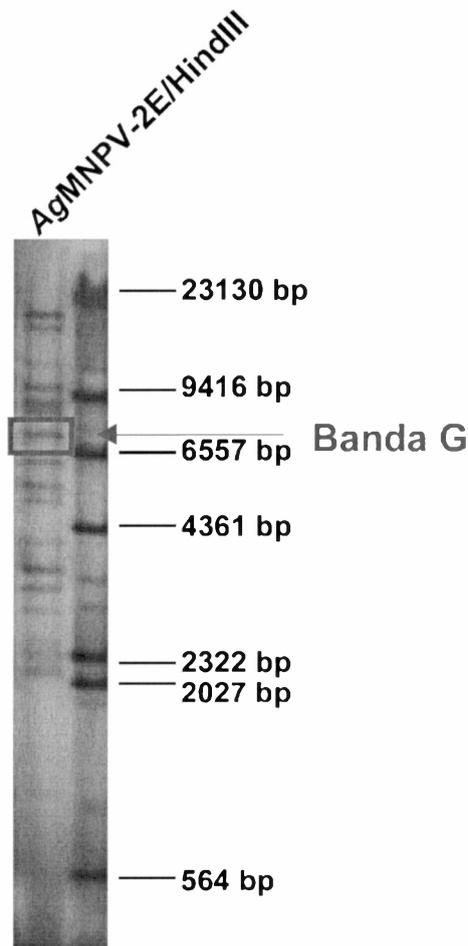


Figura III.2. Autorradiografía del Patrón de restricción de *HindIII* sobre DNA de AgMNPV. Los fragmentos de la digestión de AgMNPV con *HindIII* fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 0,5%. Una vez finalizada la corrida electroforética, el DNA se fijó por tratamiento del gel durante 1h con TCA 10%. Se expuso una placa radiográfica al gel deshidratado. Como indicador de peso molecular se utilizaron los fragmentos de la digestión con *HindIII* del DNA del fago λ , marcados con ^{32}P .

La detección del *locus* de poliedrina en la banda G se realizó por *Southern blot*, para el cual se usó una sonda heteróloga radiactiva.

La sonda se generó por *PCR* a partir de DNA genómico de AcMNPV, utilizando como *primers* 5' y 3' oligonucleótidos homólogos a los extremos del marco abierto de lectura de la poliedrina de AcMNPV. El producto de amplificación fue purificado a partir del gel de agarosa con *GENECLEAN™* y marcado con $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dATP}$ por la técnica de *random priming*.

III.3 CLONADO Y MAPEO DEL FRAGMENTO G DE LA DIGESTIÓN DE AGMNPV-2E CON *HIND*III.

El conjunto de fragmentos producto de la digestión completa del genoma de AgMNPV-2D con *Hind*III se ligó al vector pZErO-2. Los clones que contenían la banda G en la biblioteca genómica *Hind* III generada, fueron identificados mediante un *screening* de colonias por hibridización con la sonda heteróloga descrita en la sección III.2. (*colony blot*, **Figura III.3**).

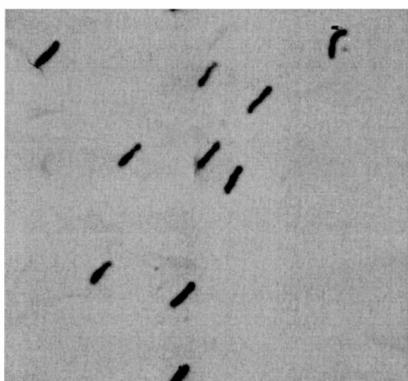


Figura III.3. *Colony blot*. Estrias provenientes de las colonias obtenidas de la transformación fueron transferidas a un papel Whatmann, presionando dicho soporte sobre el agar. Se embebió el papel en NaOH 0,5N para lisar las bacterias y posteriormente se transfirió el soporte a una solución 2xSSC. Por último se embebió el papel en EtOH 96%. Se dejó secar al aire y se incubó con la sonda radiactiva. Se detectaron los clones positivos por autorradiografía.

Con el fin de determinar con precisión la ubicación del *locus* de poliedrina dentro del fragmento de 7196 pb presente en los clones positivos, se mapeó el inserto clonado con distintas enzimas de restricción. Los productos de digestión se transfirieron posteriormente a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un *Southern blot* con la sonda ya descrita.

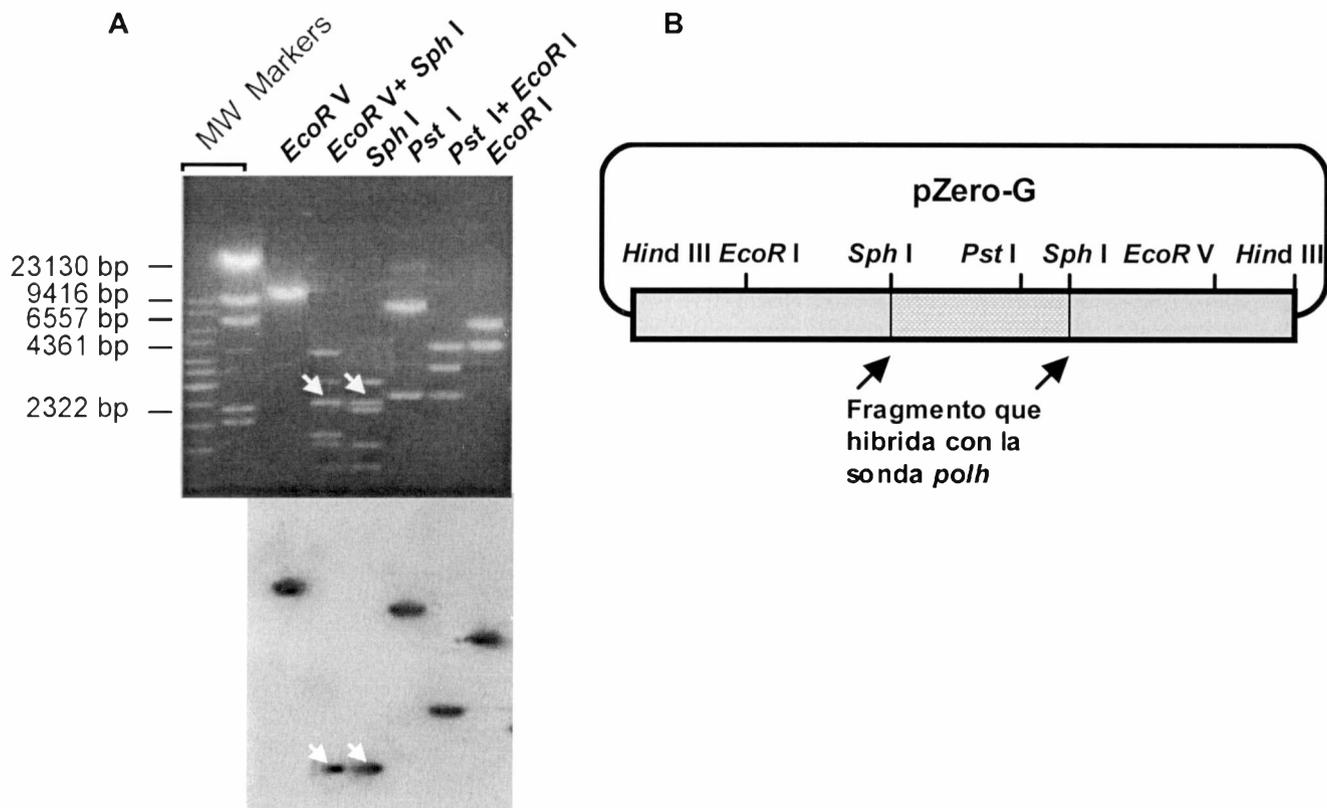


Fig. III.4. Mapeo del fragmento G. **A:** Los productos de la digestión del pZErO-2/bandaG con distintas enzimas de restricción, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Las enzima/s utilizadas en las digestiones se indican sobre cada carril. Notar que las bandas de menor tamaño (<2000 pb) se dejaron eluir al *buffer* para una mejor resolución de las bandas de mayor tamaño. El mismo gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa. Luego de la incubación con la sonda heteróloga, se obtuvo la autorradiografía que se muestra en la parte inferior del panel A. En la parte inferior, los productos que hibridaron con la sonda. Vale la misma aclaración que para el gel, no se incluyeron los fragmentos de menor tamaño. **B:** esquema del mapa del fragmento G. Para su deducción, contamos con la información adicional de los tamaños de los fragmentos menores y los sitios de restricción presentes en pZErO-2. En distinto color, el fragmento elegido para subclonar poliedrina y regiones flanqueantes acotadas. Dicho fragmento, se indica con flechas en el gel y en la autorradiografía.

Los resultados obtenidos Los mismos nos permitieron esbozar un mapa de los sitios de restricción presentes en el fragmento G de la genoteca *Hind III*, como el que se muestra en la misma figura. se muestran la **Figura III.4.**

III.4 SUBCLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE POLIEDRINA Y SUS REGIONES FLANQUEANTES.

Con el propósito de generar un plásmido que abarcara sólo el marco abierto de lectura de la poliedrina con regiones vecinas acotadas, las necesarias para establecer la recombinación homóloga entre el DNA parental y el vector de transferencia, el fragmento de aproximadamente 2500 nucleótidos, con extremos SphI (**Figura III.4**), se subclonó en pcDNA II. El clon resultante se denominó pAgPH.

Con el fin de confirmar la presencia de las regiones deseadas, como así también para obtener información de utilidad para el diseño de futuras construcciones, secuenciamos casi íntegramente el inserto presente en pAgPH.

Para este propósito, diseñamos dos oligonucleótidos en base a la secuencia de poliedrina de AgMNPV-2D publicada por Zanotto *et al*, 1992. Para una lectura precisa, se secuenciaron ambas cadenas, utilizándose los sitios M13 del pcDNAII para las hebras complementarias. La secuencia obtenida resultó ser muy similar a la previamente informada, pero no idéntica (ver **Figura III.5**).

Con respecto a las regiones flanqueantes del ORF de poliedrina, nuestros resultados indicaron un cambio de CTG a GCT en la posición -247 de la región *upstream* no codificante, y una inversión GC a CG en la -237. En las posiciones -214 y -212 encontramos dos inserciones, G y C, respectivamente. También en la región *upstream* poliedrina, en los nucleótidos -176 y -148, detectamos la inserción de una T.

Las regiones consenso halladas en la región 5' no codificante más próxima al gen de poliedrina resultaron muy similares a sus equivalentes para otros baculovirus. Las mismas incluyen la adenina en -3 (Kozak, 1983), el TAAG implicado en la iniciación de la transcripción (Rohrmann, 1986) y secuencias conservadas entre TAAG y el inicio de la traducción, subrayadas en la secuencia obtenida.

En relación a la región *downstream* poliedrina, la secuencia obtenida presentó 6 inserciones (de adeninas en 1612, 2010, y 1649; citosinas en 1639, 1712 y 2035; guanósina en 1961) y una inversión (GA a AG en la posición 1751). En esta región, encontramos también algunas deleciones de un nucleótido con respecto a la secuencia publicada por Zanotto *et al.*, 1992. Se indican en la **Figura III.5** las posiciones en que Zanotto informó un nucleótido adicional con - (sin aclarar cuál es el nucleótido).

En el marco abierto de lectura del gen de poliedrina detectamos cinco mutaciones, tres de ellas silenciosas. El cambio en los nucleótidos de las posiciones 14 y 15 (GC a CG)

dio por resultado un cambio conservativo, de un residuo aminoacídico *Ser*→*Thr* (posición 5 de la secuencia de aminoácidos). Sin embargo, el cambio en las posiciones 433 y 434 (TG a AT) resultó en un reemplazo no conservativo, de *Cys*→*Ile* en la posición 145 de la secuencia de aminoácidos. En la **Figura III.6** se muestra la comparación de las dos regiones codificantes, con los respectivos productos de traducción.



Figura III.5: SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL LAS SECUENCIAS VIRALES PRESENTES EN EL CLON PAgPH. El producto de traducción que se muestra en colores corresponde a la poliedrina. Sombreados en amarillo y verde, los codones de iniciación y stop del ORF. Subrayadas, las secuencias consenso conservadas entre los promotores de poliedrina de distintos baculovirus y el posible sitio de polyadenilación del gen de poliedrina. Los cambios entre esta secuencia y la anteriormente publicada están simbolizados con sombreado y_. Con _ las deleciones. Sombreadas en celeste, las inversiones e inserciones. Las mutaciones dentro del marco abierto de lectura de poliedrina se analizan en otra figura. Recuadrados, los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del inserto.

```

POLH LP ATGCCAGATTATACGTATAGGCCGACCATTGGTCGCACGTATGTGTATGATAACAAGTAT 60
      M E D Y T Y R P T I G R T Y V Y D N K Y
POLH GB ATGCCAGATTATAGCTATAGGCCGACCATTGGTCGCACGTATGTGTATGATAACAAGTAT 60
      M E D Y T Y R P T I G R T Y V Y D N K Y

POLH LP TACAAAACTTGGGTTCTGTGATTAAGAACGCCAAGCGCAAGAAGCACCTTCTTGAACAT 120
      Y K N L G S V T K N A K R K K H L L E H
POLH GB TACAAAACTTGGGTTCTGTGATTAAGAACGCCAAGCGCAAGAAGCACCTTCTTGAACAT 120
      Y K N L G S V T K N A K R K K H L L E H

POLH LP CAGGAGGAAGAAAAAGCCTAGATGGGCTAGATCATTACATCGTGGCCGAAAGACCATT 180
      Q E E E K S L D G L D H Y I V A E D P F
POLH GB CAGGAGGAAGAAAAAGCCTAGATGGGCTAGATCATTACATCGTGGCCGAAAGACCATT 180
      Q E E E K S L D G L D H Y I V A E D P F

POLH LP TTAGGGCCCGGCAAAAACCAAAAATTGACACTTTTTAAAGAAATCCGCAATGTAAAACCC 240
      L G P G K N Q K L T L F K E I R N V K P
POLH GB TTAGGGCCCGGCAAAAACCAAAAATTGACACTTTTTAAAGAAATCCGCAATGTAAAACCC 240
      L G P G K N Q K L T L F K E I R N V K P

POLH LP GACACGATGAAGCTCATTGTTAACTGGAGCGGTAAGAGTTTCTGCGGAAACTTGGACT 300
      D T M K L L V N W S G K E F L R E T W T
POLH GB GACACGATGAAGCTCATTGTTAACTGGAGCGGTAAGAGTTTCTGCGGAAACTTGGACT 300
      D T M K L I V N W S G K E F L R E T W T

POLH LP CGTTTGTGTAAGACAGCTTCCCATTTGTAACGACCAAGAAGTATGGATGTGTTTTTA 360
      R F V E D S E P I V N D Q E V M D V F L
POLH GB CGTTTGTGTAAGACAGCTTCCCATTTGTAACGACCAAGAAGTATGGATGTGTTTTTA 360
      R F V E D S E P I V N D Q E V M D V F L

POLH LP GTCATTAACCTCCGCCCAACTCGCCCTAACCGTTGCTACAAATTCCTGGCGCAACACGCT 420
      V I N L R P T R P N R C Y K F L A Q H A
POLH GB GTCATTAACCTCCGCCCAACTCGCCCTAACCGTTGCTACAAATTCCTGGCGCAACACGCT 420
      V I N L R P T R P N R C Y K F L A Q H A

POLH LP CTGCGTTGGGACATCGATTACGTGCCCCACGAGGTAATCCGCATTGTGGAGCCTTCTTAC 480
      L R W D C D Y V P H E V I R I V E P S Y
POLH GB CTGCGTTGGGACTGCGATTACGTGCCCCACGAGGTAATCCGCATTGTGGAGCCTTCTTAC 480
      L R W D C D Y V P H E V I R I V E P S Y

POLH LP GTGGGCATGAACAACGAGTACAGAATTAGCCTAGCCAAGAAAGGCGGTGGTTGCCCAATC 540
      V G M N N E Y R I S L A K K G G G C P I
POLH GB GTGGGCATGAACAACGAGTACAGAATTAGCCTAGCCAAGAAAGGCGGTGGTTGCCCAATC 540
      V G M N N E Y R I S L A K K G G G C P I

POLH LP ATGAACATCCACAGCGAGTATACCAACTCGTTTGAGTCTTTGTCAACCGCGTAATCTGG 600
      M N I H S E Y T N S F E S F V N R V I W
POLH GB ATGAACATCCACAGCGAGTATACCAACTCGTTTGAGTCTTTGTCAACCGCGTAATCTGG 600
      M N I H S E Y T N S F E S F V N R V I W

POLH LP GAAAACCTTTTACAAACCCATTGTGTACATTGGCACTGATTGGGGCAAGAAGAAGAAATT 660
      E N F Y K P I V Y I G T D S G E E E E I
POLH GB GAAAACCTTTTACAAACCCATTGTGTACATTGGCACTGATTGGGGCAAGAAGAAGAAATT 660
      E N F Y K P I V Y I G T D S G E E E E I

POLH LP CTTATTGAATTGTGTACATTGGCACTGATTGGGGCAAGAAGAAGAAATCTTATTGATT 720
      L I E L C T L A L I R A K K K K F L L I
POLH GB CTTATTGAATTGTGTACATTGGCACTGATTGGGGCAAGAAGAAGAAATCTTATTGATT 720
      L I E L C T L A L I R A K K K K F L L I

POLH LP ACCGGCCCCGCGTATTAA 738
      T G P A Y *
POLH GB ACCGGCCCCGCGTATTAA 738
      T G P A Y *

```

Figura III.6. Comparación de los marcos abiertos de lectura de poliedrina. AgMNPV LP corresponde a la secuencia obtenida en el laboratorio, AgMNPV GB, la secuencia del banco de genes. Sombreadas en celeste, las mutaciones detectadas, a nivel nucleotídico y de aminoácidos.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La optimización de las condiciones de cultivo y de infección es un requisito esencial para la implementación de un sistema de producción de baculovirus recombinantes.

Respecto a la multiplicación de AgMNPV en cultivos celulares, de los resultados experimentales presentados en esta sección, concluimos que las UFL-AG-286 son más eficientes en la producción de virus infectivos que las IPLB-SF-21. Es por ello que se escogió esta línea celular para desarrollar el presente trabajo de Tesis.

Una vez establecido el sistema de cultivo, se identificó y clonó el fragmento genómico de AgMNPV-2D conteniendo el gen *polh* (fragmento G de la digestión con *Hind* III). El clon generado se mapeó por restricción, y se subclonaron el *orf* de poliedrina y sus regiones flanqueantes. Posteriormente, se determinaron las correspondientes secuencias nucleotídicas.

Por causa de sus períodos de generación cortos, su importante progenie viral en cada ciclo de replicación y las posibilidades de recombinación en cada ciclo de replicación, los baculovirus se caracterizan por su diversidad y/o variabilidad intraespecífica, que se manifiesta en el DNA viral en forma de deleciones, reagrupaciones, inversiones y repeticiones. De esta forma, aunque se haya partido de DNA obtenido a partir de un genotipo purificado, durante la replicación viral se producen mutaciones en su secuencia, obteniéndose siempre una progenie que no es genéticamente idéntica a su DNA parental (Caballero *et al.*, 2001). La existencia de estas alteraciones genómicas quedó demostrada por la comparación entre las determinaciones de secuencia presentadas en los últimos apartados y las correspondientes secuencias previamente informadas para el aislamiento parental.

**GENERACIÓN DE UN rAgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻ Y
ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE
PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**

CAPITULO IV

**GENERACIÓN DE UN rAgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻ Y
ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN
DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS****INTRODUCCIÓN**

Ya se ha mencionado en las secciones previas de esta Tesis, el fundamento de la producción de proteínas recombinantes de nuestro sistema de expresión en células de insecto. Las células son cotransfectadas con el DNA del baculovirus parental y un vector de transferencia que contiene el gen a expresar, normalmente ubicado *downstream* un promotor viral tardío y flanqueado por secuencias virales, con el propósito de lograr, por recombinación homóloga, la inserción del gen foráneo (Luckow *et al.*, 1988; O'Reilly *et al.*, 1992; Posse *et al.*, 1997). En este contexto, los baculovirus que contienen genes marcadores se emplean para una rápida identificación de placas virales recombinantes, si son utilizados como el DNA parental en ensayos de cotransfección.

El análisis de la importancia de los genes marcadores, desde el punto de vista de la generación de baculovirus recombinantes para su uso como agentes de control biológico, requiere ciertas consideraciones teóricas. Previo a la liberación de un virus modificado al ambiente, es imprescindible hacer un estudio detallado para evaluar, al menos potencialmente, las consecuencias ecológicas de tal acontecimiento. Dicho estudio debería incluir, según el modelo propuesto por Richards *et al.*, 1998; tres componentes fundamentales. En la primera fase, la identificación del impacto (especies susceptibles, directas o indirectas) y de las rutas de exposición por las cuales una población susceptible no blanco estaría expuesta a una dosis infectiva del recombinante. El tercer componente, designado como evaluación del riesgo, es de carácter predictivo e intenta, mediante los datos obtenidos en la primera fase, formular predicciones verificables en cuanto a la forma en que un baculovirus recombinante se comportaría dentro y fuera del sitio de aplicación. De esta forma, la construcción de baculovirus con genes marcadores suministra un método para rastrear un virus modificado genéticamente en el ambiente (Posse *et al.*, 1997, Chaol *et al.*, 1996).

En este capítulo, se detalla el desarrollo del primer sistema de expresión de proteínas heterólogas basado en AgMNPV. En los primeros apartados se describen los

experimentos que condujeron al vector de transferencia, que designamos 'de primera generación', debido a que posteriormente se diseñaron otras construcciones (ver Capítulo V). La utilidad del vector quedó confirmada con la construcción de un AgMNPV recombinante, que expresa el gen marcador *lacZ* de *E. coli*. La expresión del gen heterólogo está bajo el control del promotor *polh*. Comprobamos la expresión eficiente de la proteína recombinante mediante ensayos de actividad biológica y de análisis de proteínas.

El rAgMNPV *lacZ⁺/polh⁻* generado y caracterizado como se describe en esta sección, se constituyó como el virus parental del sistema de expresión creado. Así, cuando en las siguientes secciones mencionemos esa designación, es de notar que ya no nos estaremos refiriendo al virus silvestre, sino al virus que se describe en esta sección.

RESULTADOS

IV.1 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE TRANSFERENCIA DE PRIMERA GENERACIÓN.

El primer vector de transferencia diseñado se utilizó para generar, por recombinación homóloga con el locus *polh* del virus salvaje, un recombinante AgMNPV *polh⁻*, que expresa un gen marcador (*LacZ*).

El esquema de la **Figura IV.1** sintetiza la estrategia que se siguió para su construcción.

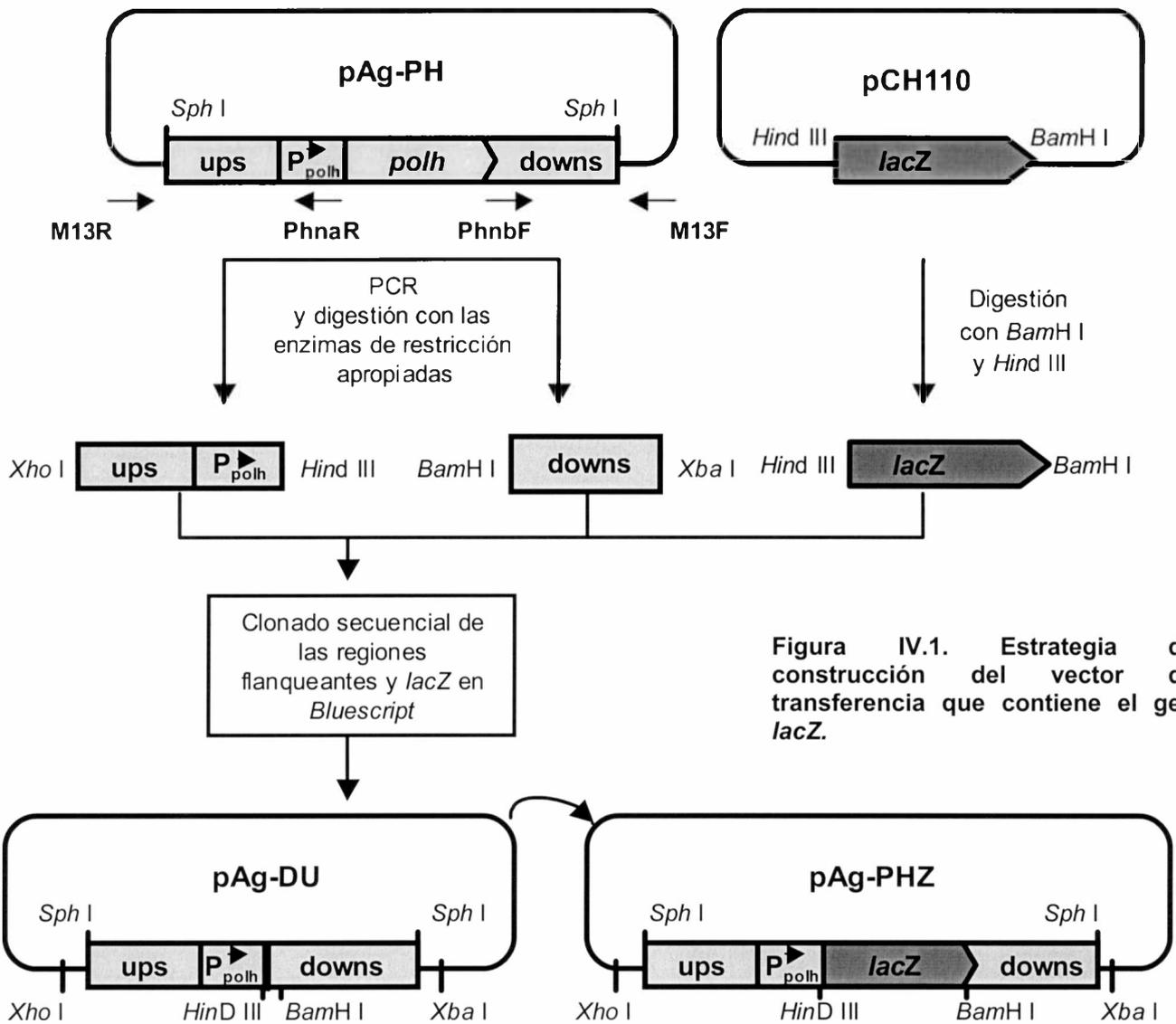


Figura IV.1. Estrategia de construcción del vector de transferencia que contiene el gen *lacZ*.

La región no codificante *downstream polh* se amplificó por PCR usando el plásmido pAgPH como molde. Los oligonucleótidos utilizados para dicha amplificación fueron el Phn B (D) 5'-GGCGGATCCGTATTAAGGCGCCGACAAATC-3' (el codón de terminación se indica en negrita y el sitio *Bam* H I está en rojo y subrayado) y el primer universal de M13, directo. El producto de PCR purificado del gel de agarosa y se digirió con *Xba* I y *Bam* H I. Posteriormente, se ligó al plásmido pBSSK (*Stratagene*, San Diego, CA, USA), previamente linealizado con *Xba* I and *Bam*H I.

La región río arriba del marco abierto de lectura del gen de poliedrina también fue amplificada por PCR (sobre el mismo molde: pAgPH) con los primers Phn A (R) 5'-CGGCAAGCTTAGTTATAGCAAATTTAC-3' (el sitio *Hind* III está en rojo y subrayado) y M13 reverso. Nuevamente, el fragmento de PCR purificado del gel de agarosa se digirió esta vez con *Xho* I y *Hind* III, insertándose en la construcción previa. Denominamos al plásmido resultante, pAgDU. En la **Figura IV.2** se muestra el resultado de las PCRs y un esquema en el cual se indican los sitios de hibridación de todos los oligonucleótidos antes mencionados.

El gen *lacZ* de *Escherichia coli* se escindió del pCH110 (*Amersham Pharmacia Biotech*, NJ, USA). El fragmento de 3.7 kpb *Bam*H I-*Hind* III eluído del gel, se ligó al pAgDU, previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante, denominado pAgPHZ, (**Figura IV.3**), primer vector de transferencia generado, tiene las siguientes características:

- expresión del gen marcador bajo el control de un promotor viral muy tardío y fuerte (poliedrina).
- regiones flanqueantes del gen de poliedrina que permiten la recombinación homóloga con el locus *polh*.

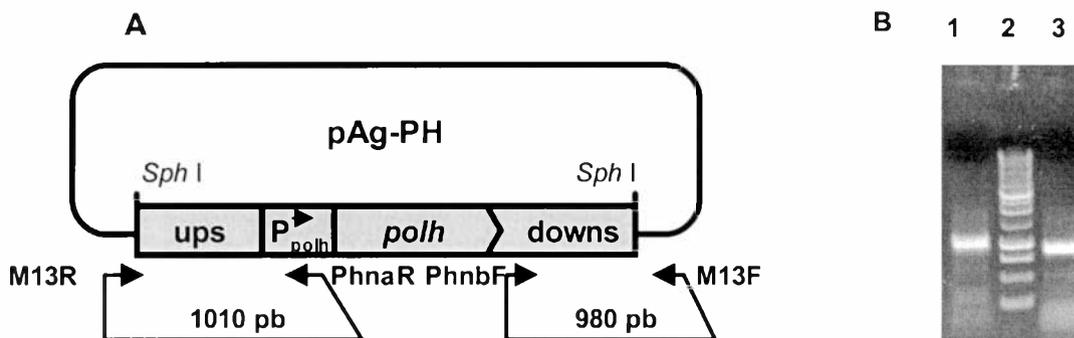


Figura IV.2. A: Esquema del inserto presente en pAgPH. Estrategia usada para amplificar las zonas flanqueantes (ups, down) del gen de poliedrina (indicado en forma de flecha). **B: Electroforesis de los productos de PCR.** Calle 1: producto de amplificación correspondiente a la zona *upstream* (ups) poliedrina. Calle 2: 1 kb *ladder* de *Promega* (250 bp, 500bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000bp, 6000 bp, 7000 bp, 8000 bp, 10000bp). Calle 3: producto de amplificación correspondiente a la zona *downstream* (downs) poliedrina.

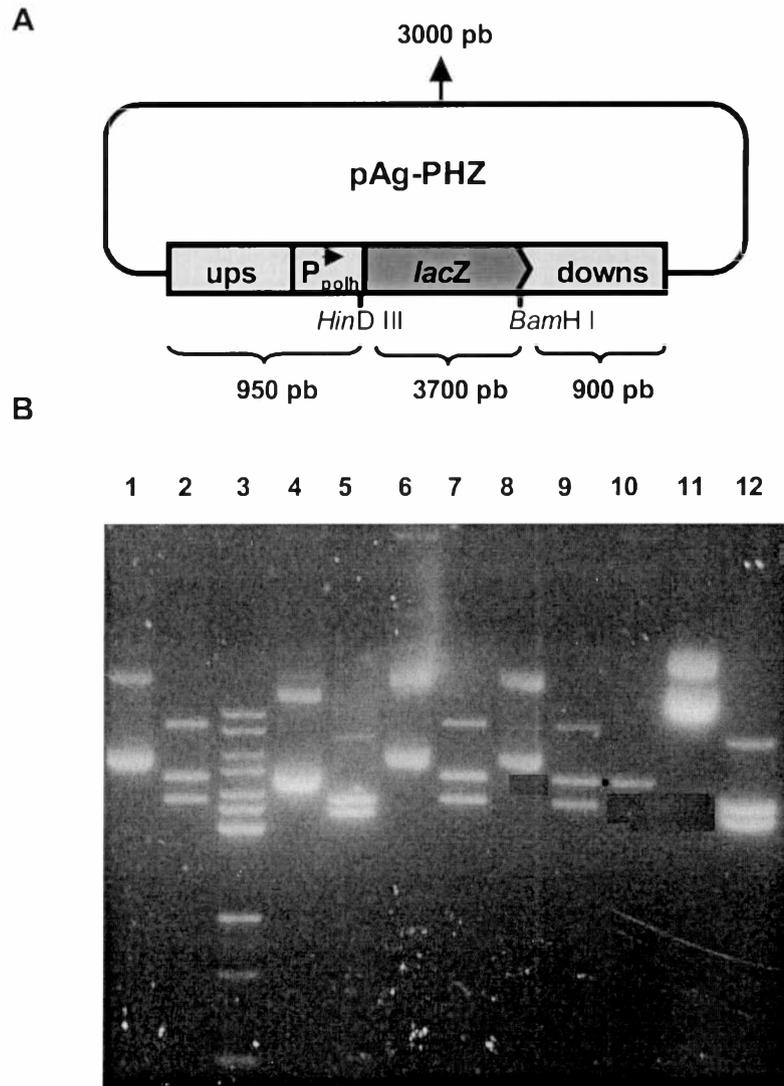
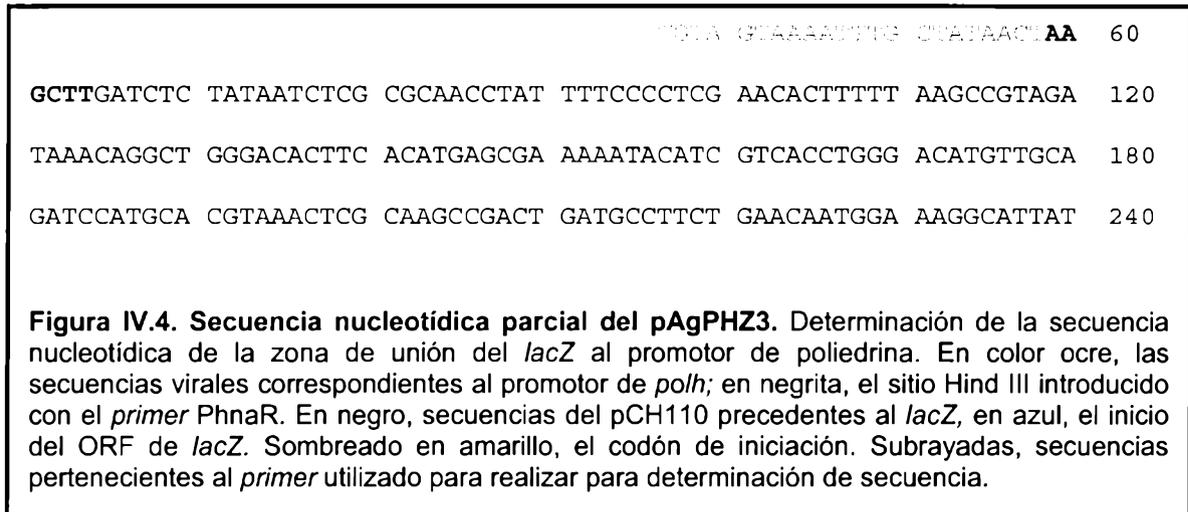


Figura IV.3. A: Esquema del plásmido utilizado como vector de transferencia para la inserción del gen *lacZ*. Indicadas en color ocre, las secuencias virales flanqueantes del gen de poliedrina, utilizadas para dirigir la recombinación homóloga al locus de ese gen. En azul, el gen *lacZ* de *E. Coli*. Indicados con llaves, los tamaños de todos los fragmentos clonados en el vector. Asimismo, se señalan los sitios de restricción utilizados para confirmar la identidad de los clones en el panel B. **B: Análisis por restricción de los clones obtenidos.** Calle 1: # 5 sin digerir. Calle 2: # 5 digerido con *BamH I / Hind III*, confirmado positivo en base al tamaño de los fragmentos producto de la digestión, uno de 3700 pb correspondiente al *lacZ*, y otro de aproximadamente 4850 pb correspondiente a la suma del plásmido base y las secuencias virales adicionales. El fragmento de mayor tamaño, corresponde al plásmido linealizado, producto de digestión parcial. Calle 3: marcador de peso molecular 1 kb *ladder* (1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 pb, 4000 bp, 5000bp, 6000 bp, 7000 bp, 8000 bp, 10000bp). Calle 4: # 6 sin digerir. Calle 5: # 6 digerido con *BamH I / Hind III*, negativo en base al tamaño de los fragmentos producto de la digestión, de patrón idéntico a la digestión del pCH110. Calles 6: # 7 s/d. Calle 7: # 7 *BamH I / Hind III*. Calles 8 y 9: lo mismo para el # 8. Los últimos clones también fueron confirmados positivos según el patrón observado. Calle 10: fragmento de 4850 pb correspondiente a la suma del plásmido base y las secuencias virales adicionales, utilizado en el último paso del clonado secuencial para la ligación del *lacZ* proveniente del pCH110. Calle11: pCH110 sin digerir. Calle 12: pCH110 digerido con *BamH I / Hind III*.

Con el propósito de confirmar la correcta del gen *lacZ*, se determinó la secuencia nucleotídica del pAgPHZ (Figura IV.4). Comprobamos así una correcta ligación entre el promotor del gen de poliedrina y el inicio de traducción del gen *lacZ*.



IV.2 GENERACION E IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DEL rAgMNPV *lacZ*⁺/*polh*⁻.

Una vez confirmada la secuencia correcta del vector de transferencia, iniciamos las etapas de generación del primer recombinante de AgMNPV.

Se cotransfectaron células UFL-AG-286 en monocapa a 50% de confluencia con el vector transferencia pAgPHZ y el DNA genómico de AgMNPV-2E (Figura IV.5) El sobrenadante de cotransfección se colectó a los seis días.

La progenie viral resultante de este tipo de cotransfecciones es heterogénea (ver apartado I.2.). Está presente el virus parental en altas proporciones, hay recombinantes derivados tanto de un único evento de recombinación homóloga (integran todo el plásmido de transferencia en su genoma y son inestables) como aquellos que son producto de un doble evento de recombinación (los que deben seleccionarse).

Con el fin de detectar los recombinantes *lacZ*⁺/*polh*⁻ entre las poblaciones virales contaminantes, se realizó un ensayo de placas (ver Cap.II) con el sobrenadante de cotransfección, utilizando 500 µg X-Gal por placa para identificar el fenotipo buscado mediante la selección de placas azules. El resultado de este ensayo se muestra en la Figura IV.5

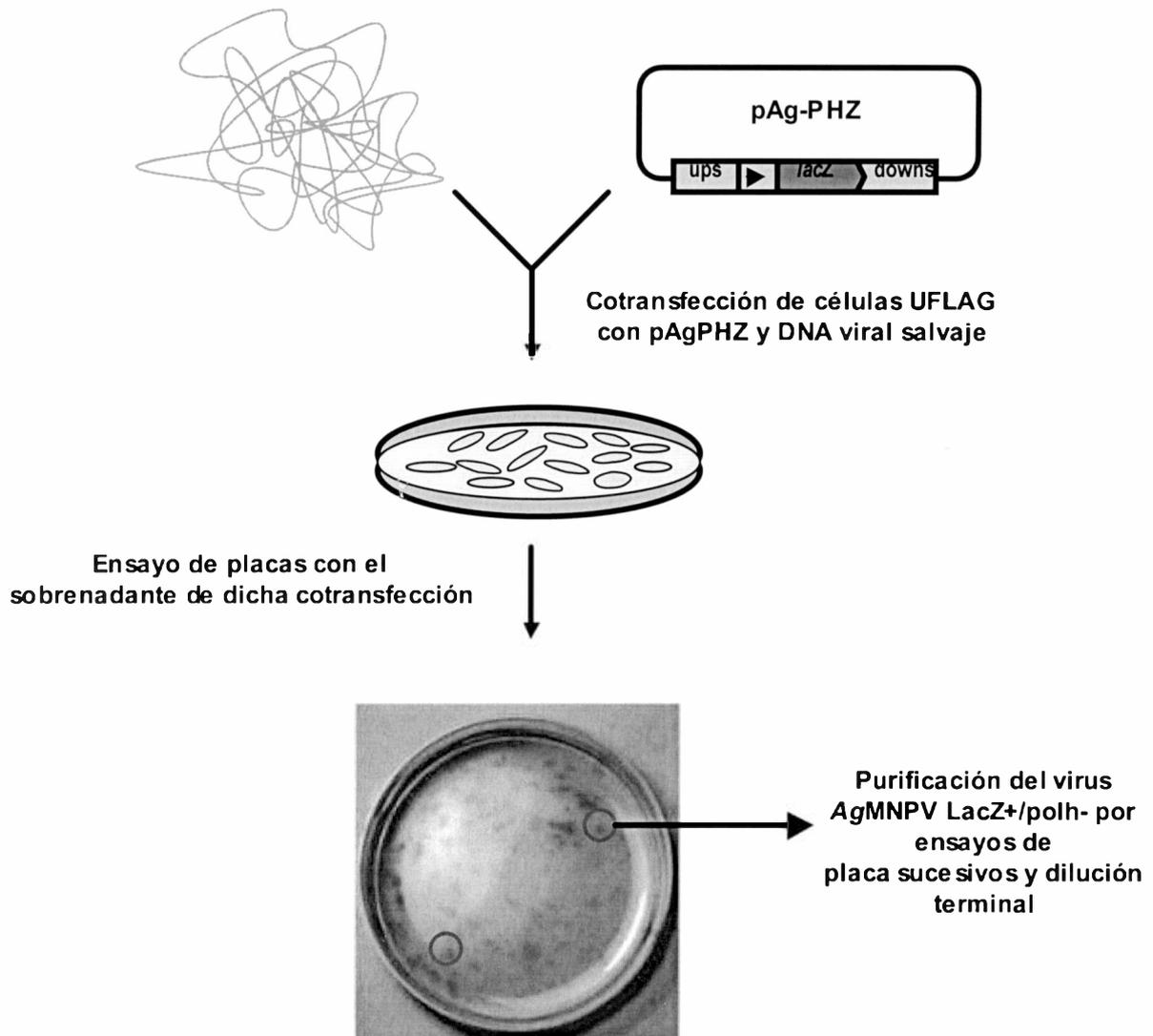


Figura IV.5. Cotransfección para la generación del rAgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻. Esquema de la estrategia de generación de recombinantes de AgMNPV por recombinación homóloga en cultivo celular de células de insecto. En la foto, placas azules producidas por la progenie viral resultante de la recombinación homóloga entre el vector de transferencia pAgPHZ y AgMNPV silvestre.

IV.3 AISLAMIENTO DEL rAgMNPV *lacZ*⁺/*polh*⁻.

Cada placa seleccionada se sometió a tres rondas de purificación por ensayos de placa. El proceso se completó con etapas adicionales de purificación por la técnica de dilución terminal (en presencia de X-Gal, ver Capítulo II).

En las fases iniciales de la purificación, la selección de clones se realizó exclusivamente en base al fenotipo observado en la placa (*lacZ*⁺/*polh*⁻). Culminando la purificación, los aislamientos seleccionados se verificaron por una PCR previa a la siguiente ronda.

La introducción de la reacción de PCR tuvo dos propósitos. El más urgente era la solución de un problema metodológico. Los clones que alcanzaron las etapas de dilución terminal tenían un alto título de rAgMNPV/ *lacZ*⁺, debido a los sucesivos pasajes por placa. La consecuencia de este incremento fueron pocillos excesivamente oscuros, en los cuales se dificultaba notablemente la discriminación entre el fenotipo *polh*⁻ y el *polh*⁺, producto de un único evento de recombinación. La PCR implementada proporcionó, entonces, la solución para la verificación de la correcta estructura de los recombinantes seleccionados. En forma adicional, el diseño experimental empleado y la sensibilidad de la técnica nos permitieron detectar de forma rápida aquellas muestras que no habían alcanzado aún la pureza genotípica.

La estrategia consistió en someter los sobrenadantes de los ensayos de dilución terminal a dos reacciones de PCR. En una de ellas utilizamos un par de oligonucleótidos (ORF i y ORF f, ver esquema **Figura IV.6**) que amplifican el marco abierto de lectura de poliedrina. En el recombinante requerido, *lacZ* debería reemplazar a *polh*. De este modo, en presencia de virus salvaje contaminante y / o de un simple recombinante en el pocillo de la multiplaca, se obtendría un producto de PCR de 740 pb. La ausencia de un producto de amplificación, en cambio, indicaría que tal muestra corresponde a la construcción esperada. Una mala preparación del DNA molde también resultaría en una amplificación negativa, por consiguiente incluimos para cada molde una segunda PCR, como control de la preparación. Para esta reacción diseñamos un segundo par de *primers*, que designamos UPS i y UPS f, y amplifican una región de aproximadamente 650 pb de las secuencias *upstream* del promotor de poliedrina (ver esquema **Figura IV.6**). Tales secuencias están presentes tanto en el virus salvaje, como en el recombinante. En la misma figura, se muestra a modo de ejemplo, el resultado de las reacciones antes descritas sobre uno de los recombinantes virales purificado hasta homogeneidad y de correcta estructura genómica, comprobada posteriormente por patrón de restricción y *Southern blot*.

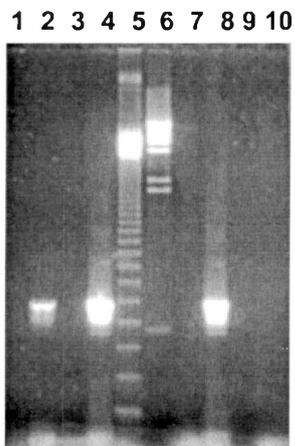
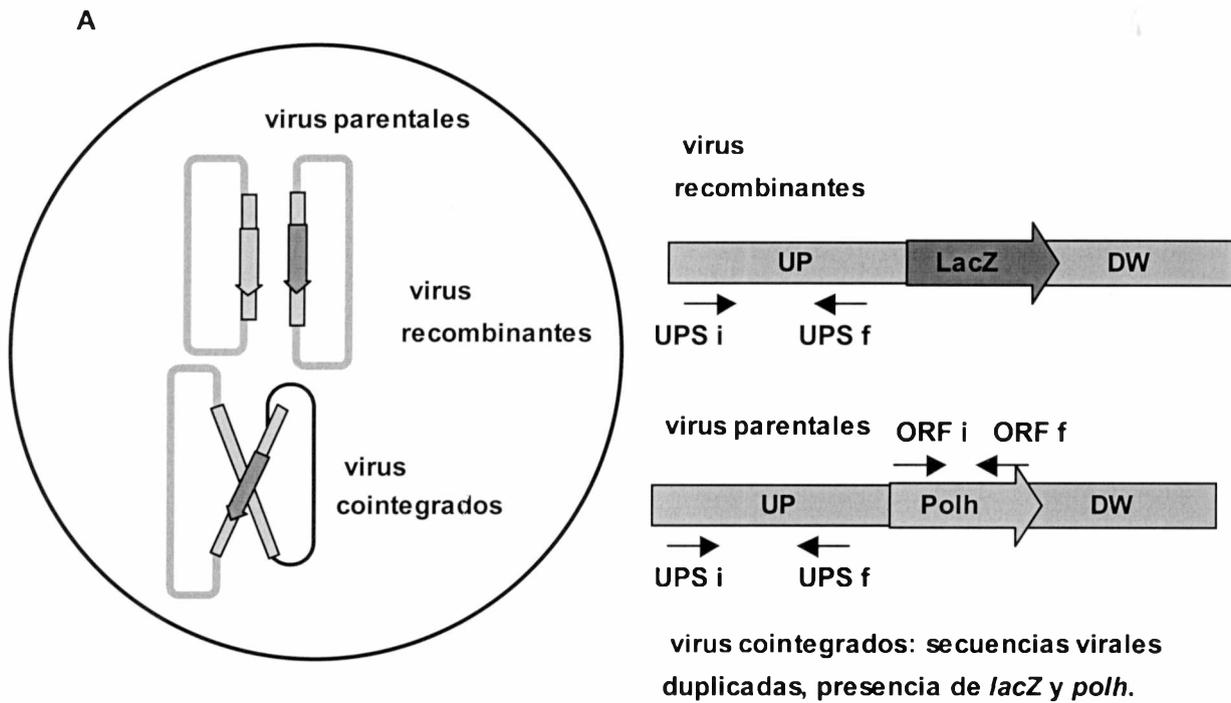


Figura IV.6. Identificación por PCR de los rAgMNPV/*lacZ*⁺/*polh*⁻. **Panel A:** esquema de los oligonucleótidos utilizados para distinguir entre las distintas posibilidades de progenie viral resultante. **Panel B:** calle 1: control negativo de la PCR con la combinación de *primers* ORF. Calle 2: combinación de *primers* ORF sobre DNA de AgMNPV silvestre. Calle 3: control negativo de la PCR con la combinación de *primers* UPS. Calle 4: combinación de *primers* UPS sobre DNA de AgMNPV silvestre. Calle 5: 100 pb *ladder*. Calle 6: λ *Hind* III (564 pb, 2027 pb, 2322 pb, 4361 pb, 6557 pb, 9416 pb, 23130 pb). Calle 7: combinación de *primers* ORF sobre rAgMNPV/*lacZ*⁺/*polh*⁻. Calle 8: combinación de *primers* UPS sobre rAgMNPV/*lacZ*⁺/*polh*⁻. Calles 9 y 10, controles negativos de las reacciones de las calles 7 y 8, respectivamente.

Programa de ciclado utilizado:

Desnaturalización	94 °C	45 segundos	
Desnaturalización	92 °C	15 segundos	
Hibridación	48 °C	15 segundos	40 ciclos
Extension	72 °C	1 minuto 30 segundos	
Extension final	72 °C	4 minutos	

IV.4 AMPLIFICACIÓN DE LOS RECOMBINANTES. TITULACIÓN DE LOS STOCKS RESULTANTES.

Las reacciones de PCR descritas en el apartado anterior fueron de gran utilidad para seleccionar los aislamientos puros de recombinantes de estructura potencialmente correcta. Sin embargo, las mismas no proporcionan mayor información acerca de posibles cambios en otras zonas del genoma, producto de eventos de recombinación inesperados, o cualquier otro suceso imprevisto. Por consiguiente, fue necesario realizar un análisis más exhaustivo de la estructura genómica de estos productos. Para ello, se amplificaron los clones virales seleccionados (generación de *stocks* de reserva y *stocks* de trabajo). De acuerdo a los protocolos de rutina para el trabajo con baculovirus, lo correcto es avanzar a la etapa de amplificación una vez que se cuenta, al menos, con tres aislamientos puros potencialmente correctos. La recomendación obedece a que ocasionalmente no hay expresión del gen heterólogo, incluso en clones de estructura genómica correcta. Si bien éste no era el caso, dado que podíamos observar la expresión y actividad de la enzima foránea con el agregado de X-Gal a los sobrenadantes de infección, se procedió a amplificar dos de los clones virales aislados, verificados por PCR.

Los *stocks* virales se prepararon simplemente infectando cultivos en monocapa y cosechando el medio sobrenadante cuatro o cinco días después. Así, el volumen de los pocillos provenientes del ensayo de dilución terminal, se llevó a 1 ml con medio de cultivo completo. Con 500 μ l de ese *stock* se infectó una caja de 35 mm (ver Capítulo II). Transcurrida la hora de agitación con el inóculo, se completó a 2 ml finales con TC-100 completo (ver Capítulo II para los detalles de la infección). Los 2 ml colectados a los 5 días, se denominaron Pasaje 1, para cada aislamiento. Se tomó 1ml del Pasaje 1, se llevó a 4 ml con medio de cultivo completo, y se infectaron cuatro placas de 100mm. Transcurrida la hora de agitación con el inóculo, se completó a 10 ml finales con TC-100 completo en cada caja. Los cuarenta mililitros resultantes de esa infección se denominaron Pasaje 2. A partir de este pasaje preparamos *stocks* de trabajo para las determinaciones que se describen en los siguientes apartados, mediante la infección de placas de 100 mm con una MOI de 0,1.

Los *stocks* de los recombinantes fueron titulados por dilución terminal. (Tabla I). Simultáneamente, se retituló el virus silvestre.

Tabla I

Stock viral	Título
AgMNPV silvestre	10 ⁹ pfus/ml
rAgMNPV lacZ ⁺ /polh ⁻ A7	9x10 ⁸ pfus/ml
rAgMNPV lacZ ⁺ /polh ⁻ B3	1,5x10 ⁹ pfus/ml

IV.5 ANÁLISIS DEL DNA DE LOS AgMNPV RECOMBINANTES: CONFIRMACIÓN DE LA SUSTITUCIÓN DE GENES POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

Como se señaló en el apartado anterior, la caracterización completa de un mutante baculoviral requiere, por lo menos, el análisis de un patrón de restricción del DNA genómico, con el fin de verificar si está de acuerdo con el predicho según las modificaciones introducidas.

Aislamos el DNA de los clones virales denominados A7 y B3 y analizamos su estructura por digestión con endonucleasas de restricción y *Southern blot*. Los resultados se muestran en la **Figura IV.7**.

Para la digestión se utilizaron *EcoR* I y *Hind* III. El patrón de fragmentos de restricción esperado para ambas enzimas, según las modificaciones introducidas, se muestra en la Tabla 2. Con el fin de verificar tanto la ausencia de virus parental contaminante, como el origen de las modificaciones observadas en el patrón de restricción, se realizó un *Southern blot*. La sonda utilizada, correspondiente a la zona *upstream* del gen *polh*, se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando el par de oligonucleótidos UPS (**Figura IV.6**) sobre el DNA de la construcción pAgPH (**Figura IV.2**) como molde. El producto de PCR se marcó de manera radioactiva con el sistema *BioPrime DNA Labeling System* (GIBCO Life Technologies).

La comparación entre los resultados experimentales (**Fig. IV.7**) y la Tabla 2 confirmó tres aspectos de la estructura del DNA de los recombinantes amplificados. El DNA obtenido presentó el inserto correcto en el sitio genómico adecuado; el inserto se situó en dicha localización mediante una reacción de reemplazo alélico (es decir que no ocurrió por inserción del plásmido de transferencia completo en el genoma viral); y no se detectaron otras alteraciones en el patrón de restricción de DNA (del cotejo con el patrón del DNA del AgMNPV silvestre).

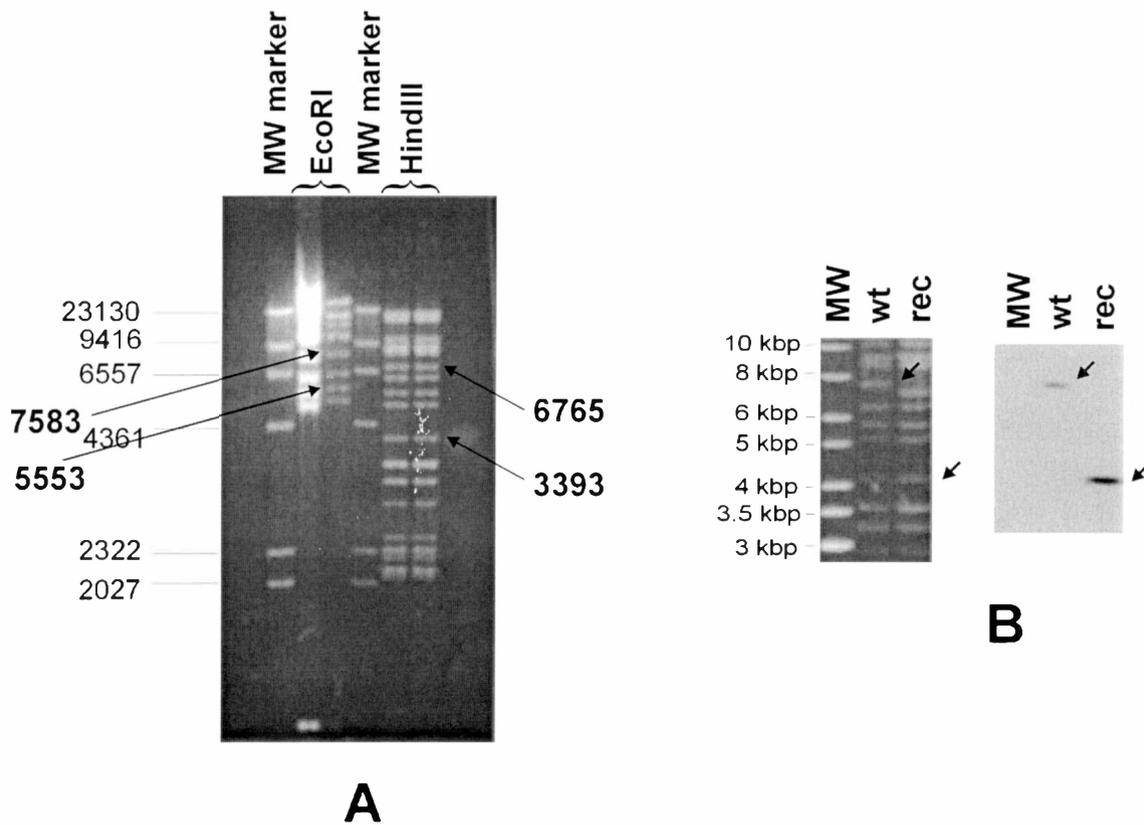


Figura IV.7. Análisis por patrón de restricción y *Southern blot* del rAgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻. **Panel A:** patrón de restricción de los aislamientos B3 y A7, con *EcoR* I y *Hind* III. La calle *EcoR* I de la izquierda está sobrecargada con el fin de permitir la visualización de los fragmentos de menor tamaño. Indicados con flechas, con sus respectivos tamaños (ver Tabla II), los nuevos fragmentos que diferencian el rAgMNPV del AgMNPV salvaje. **Panel B:** *Southern blot* del DNA de AgMNPV salvaje y recombinante digerido con *Hind* III (la sonda utilizada correspondió a las secuencias *upstream* poliedrina, ver texto). Las flechas indican los fragmentos de restricción de relevancia en el análisis.

Tabla II

	<i>Hind</i> III		<i>Eco</i> RI	
	<i>wt</i>	<i>rec</i>	<i>wt</i>	<i>rec</i>
A	19044	19044	38716	38716
B	16525	16525	18593	18593
C	10428	10428	17845	17845
D	9013	9013	13629	13629
E	8424	8424	10917	10917
F	8369	8369	10508	10508
G	7268		10174	
		6765 *		7583 *
H	6149	6149	6403	6403
				5553 *
I	5523	5523	5113	5113
J	4481	4481	1095	1095
K	4103	4103		
L	3399	3399		
		3393 *		
M	3318	3318		
N	3236	3236		
O	3231	3231		
P	2840	2840		
Q	2549	2549		
R	2410	2410		
S	2410	2410		
T	2244	2244		
U	2111	2111		
V	2111	2111		
W	2087	2087		
X	1101	1101		

Tabla II. Tamaño de los fragmentos producto de la restricción del DNA genómico de AgMNPV *wild type* y recombinante. Los fragmentos se denominaron con letras, desde A hasta X, de acuerdo a Johnson *et al.*, 1989. En negrita, los fragmentos G, de las digestiones con *Hind* III y *Eco*R I, modificados por los eventos de recombinación homóloga con la construcción pAgPHZ, resultaron en los fragmentos señalados con asteriscos (*).

IV.6 CINÉTICA DE EXPRESIÓN POR ACTIVIDAD DEL PRODUCTO DEL GEN HETERÓLOGO.

Con el propósito de evaluar la cinética y los niveles de expresión de β -galactosidasa, determinamos tanto la actividad de la enzima como la masa de proteína (en el siguiente apartado).

La cinética de expresión de *lacZ* bajo el promotor de poliedrina se estudió en lisados de cultivos de células UFL-AG 286. Como se muestra en la **Figura IV.8**, la actividad de β -galactosidasa comenzó a detectarse a las 12 horas p.i., alcanzando un *plateau* hacia las 30 horas p.i.

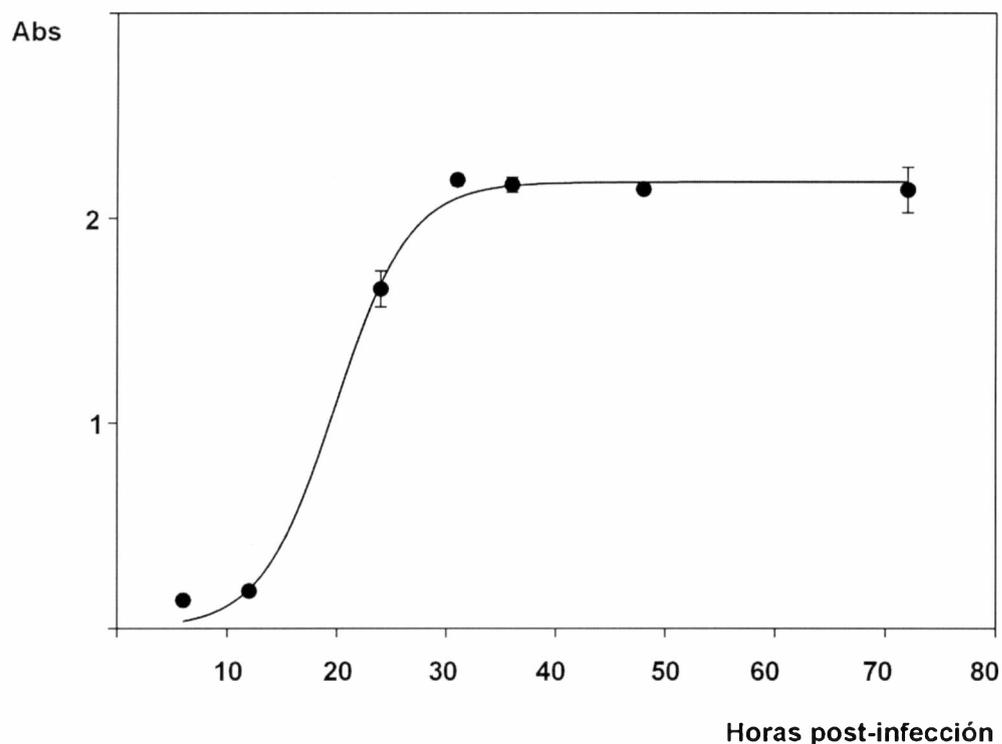


Figura IV.8. Cinética de expresión del gen heterólogo por ensayo de actividad enzimática de β -galactosidasa. La actividad enzimática se midió como se describió en el Capítulo II, en células UFL-AG 286 infectadas con AgMNPV silvestre (control) y con el rAgMNPV que expresa β -galactosidasa.

IV.7 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EXPRESADA.

La **Figura IV.8** muestra los niveles y la cinética de expresión de las proteínas totales de células UFL-AG 286 infectadas y control, resueltas por electroforesis en geles de poliácridamida con SDS y teñidas con Azul Brillante de Coomassie.

La expresión de β -galactosidasa se detectó a partir de las 48 h p.i. (sensibilidad del Coomassie= 1 μ g/banda). El incremento de su expresión resultó continuo hasta las 80 horas post infección. Sin embargo, de acuerdo a los resultados presentados en la **Fig IV.8**, la expresión del gen bajo el control del promotor de poliedrina ya representa un 50% de la producción proteica celular total a las 60 h p.i. Asimismo, conforme a lo esperado, el virus recombinante no expresó poliedrina.

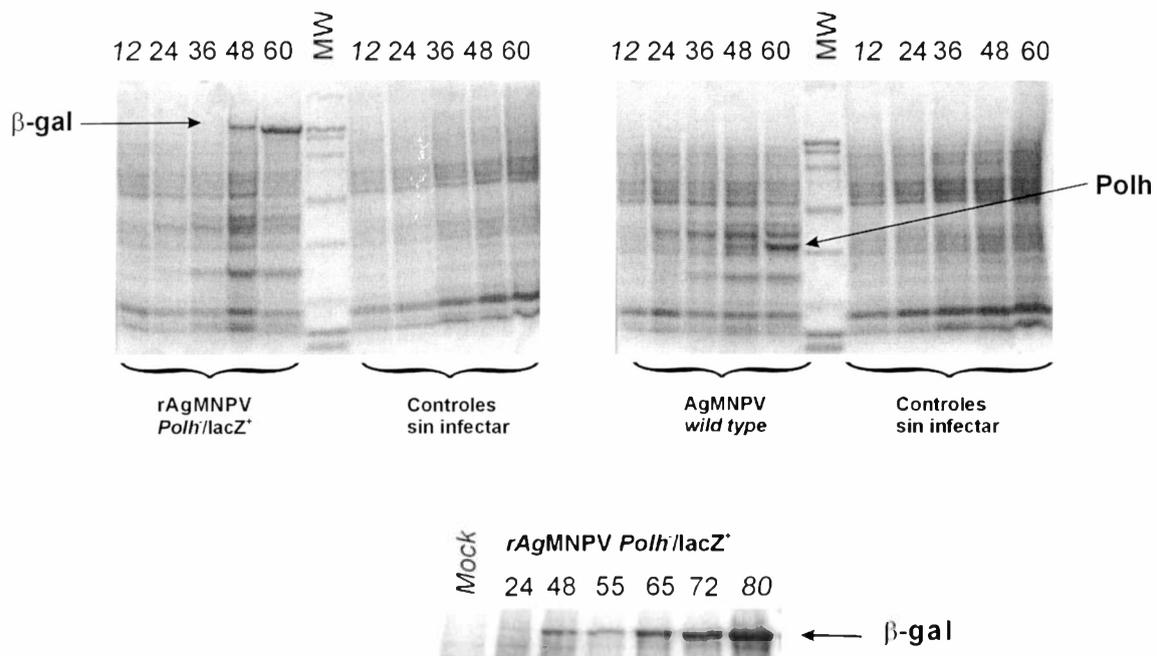


Figura IV.8. Cinética de expresión de β -galactosidasa por SDS-PAGE. Se infectaron monocapas de células UFL-AG 286, que posteriormente fueron procesadas a distintos tiempos, como se describió en el Capítulo II. Por encima de cada calle, está indicado el tiempo post infección correspondiente. Con el fin de demostrar la continuación del incremento de la expresión en forma posterior a las 30 horas, se muestra en el panel de abajo una cinética más prolongada. El patrón de acumulación observado está en contraste con el *plateau* observado en las medidas de actividad.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales presentados en el este Capítulo nos permiten concluir que desarrollamos una estrategia exitosa, basada en los eventos de recombinación homóloga, para introducir cambios genéticos en el ADN de AgMNPV. Asimismo, demostramos su utilidad mediante el clonado y la expresión del gen de β -galactosidasa. De esta manera, el recombinante rAgMNPV *lacZ*⁺/*polh*⁻ creado, puede ser usado como virus parental en la generación de otros recombinantes, objetivo final de este trabajo de Tesis. Así, la inserción del gen marcador en el genoma parental del sistema, es una valiosa herramienta para una identificación sencilla de los nuevos mutantes. La manifestación visual de la presencia de recombinantes en los sobrenadantes de cotransfección será, en este caso, la conversión de placas azules a placas blancas. Si se tiene en cuenta la ausencia de otras técnicas simplificadas para la generación de recombinantes de AgMNPV, como las disponibles para el prototipo de sistema de expresión en baculovirus, basado en AcMNPV; el método resulta especialmente conveniente.

Si bien el empleo del rAgMNPV *lacZ*⁺/*polh*⁻ como parental del sistema de expresión es su aplicación más inmediata y general, ésta no es la única utilidad potencial de este virus. Se ha señalado anteriormente que el principal propósito del presente trabajo de Tesis es la generación de recombinantes de AgMNPV más eficaces en el control del insecto plaga, mediante una modificación genética de este entomopatógeno. Un virus conteniendo un gen marcador, nos permitiría rastrearlo en el espacio y el tiempo, sin ninguna posibilidad de confusión con poblaciones virales naturales.

Como con cualquier nuevo insecticida, deben evaluarse previamente las consecuencias ecológicas de la liberación de un método de control como el que aquí se propone. Más aun, la creciente inquietud pública con respecto a los organismos genéticamente modificados, obliga a un estudio especialmente detallado. Tal inquietud abarca también a la comunidad científica, en particular en lo que respecta a la posibilidad del riesgo de la diseminación de transgenes, por recombinación, a otras especies (Daniell, 2002; Hare *et al.*, 2002). En el caso particular de los baculovirus, su potencial para la transferencia genética de una especie a otra, en cultivo celular a través de recombinación homóloga, ha sido demostrada (Claessen *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1991; Maeda *et al.*, 1993) y es motivo de parte de las controversias en cuanto a la introducción de baculovirus transgénicos en un esquema de manejo integrado de plagas. De cualquier manera, el evento requiere que los dos baculovirus se

RESULTADOS

V.1 ELECCIÓN DEL GEN TÓXICO: TOX-34. SECUENCIA Y SUBCLONADO EN pBSKS Y pAgDU.

Tox-34 es el cDNA que contiene el marco abierto de lectura que codifica para la toxina Txp-I (Tomalski *et al.*, 1991). El plásmido pEV-Tox-34 contiene un fragmento *EcoR* I de la genoteca de expresión de hembras grávidas de *Pyemotes tritici*, que comprende el Tox-34. Dicho plásmido nos fue gentilmente cedido por la Universidad de Georgia. El gen Tox-34 fue subclonado, en el sitio *EcoR* I del pBS KS (Fig. V.1).

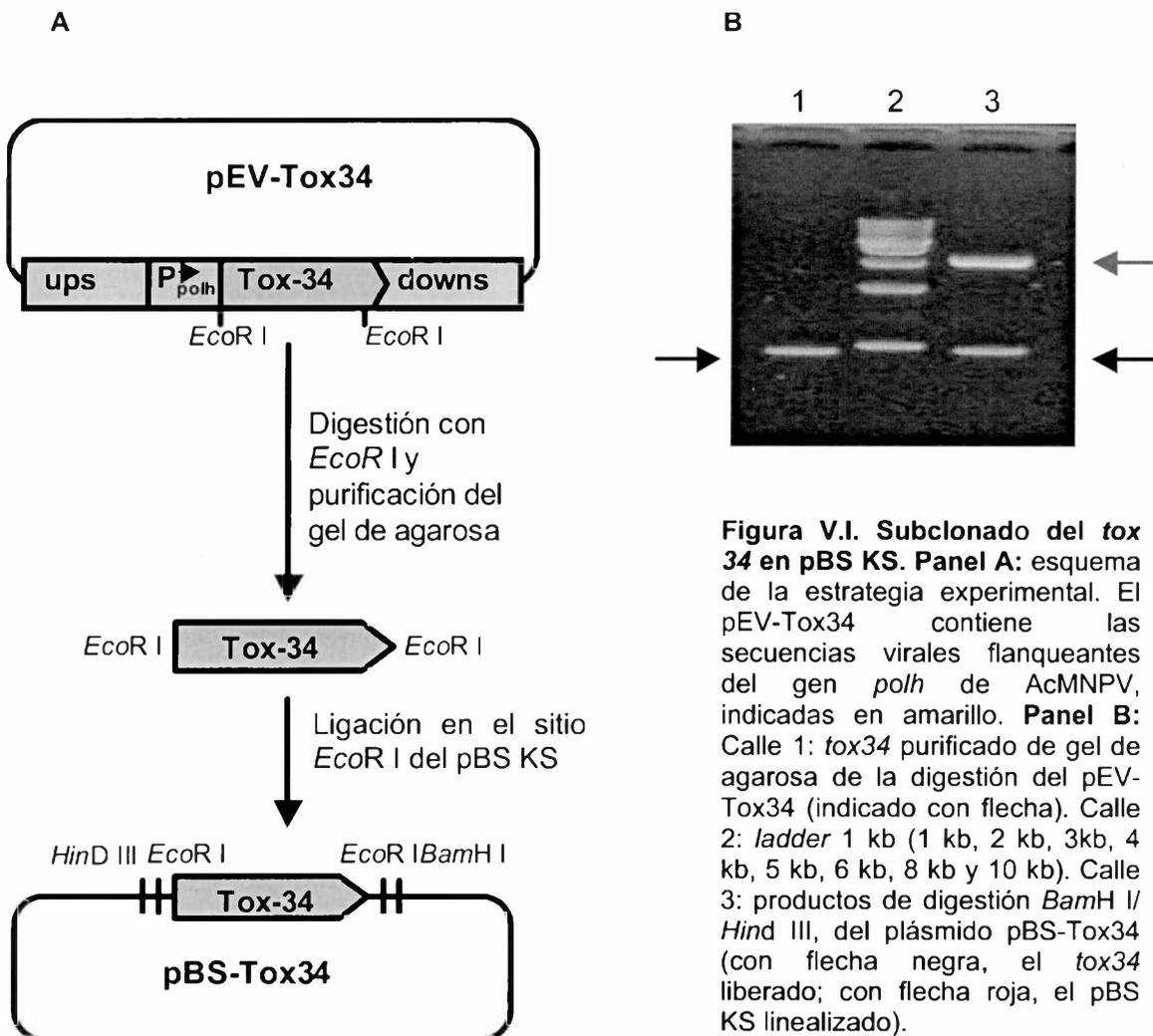


Figura V.1. Subclonado del tox 34 en pBS KS. Panel A: esquema de la estrategia experimental. El pEV-Tox34 contiene las secuencias virales flanqueantes del gen *polh* de AcMNPV, indicadas en amarillo. **Panel B:** Calle 1: *tox34* purificado de gel de agarosa de la digestión del pEV-Tox34 (indicado con flecha). Calle 2: *ladder* 1 kb (1 kb, 2 kb, 3kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 8 kb y 10 kb). Calle 3: productos de digestión *BamH* I/ *Hind* III, del plásmido pBS-Tox34 (con flecha negra, el *tox34* liberado; con flecha roja, el pBS KS linealizado).

Con el fin de verificar la secuencia del fragmento clonado, determinamos la secuencia nucleotídica completa del inserto, que resultó idéntica a la reportada por Tomalski *et al.*, 1991 (ver **Fig. V.2A**).

En la **Figura V.2B** se muestra la secuencia de la proteína predicha por traducción de la secuencia de nucleótidos. Comprende 291 aminoácidos, (M_r 33 KDa) e incluye una secuencia de 21 residuos (desde el nucleótido 40 al nucleótido 60) que se alinea con la secuencia N-terminal determinada para TxP-I (Tomalski *et al.*, 1989). Los primeros 39 aminoácidos son netamente hidrofóbicos y contendrían una señal para la secreción y/o un segmento de prototoxina. El clivaje proteolítico entre los aminoácidos 39 y 40 produciría un polipéptido de 28,5 KDa, de tamaño similar al estimado para TxP-I (Tomalski *et al.*, 1989).

1	CGCAATTAAT	GTGAGTTACC	TCACTCATT	GGCACCCAG	GCTTTACT	TTATGCTCC	GB
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LP
61	GGCTCGTATG	TTGTGTGGAA	TTGTGAGCGG	ATAACAATTT	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	GB
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LP
121	CCATGATTAC	GCCAAGCTCG	GAATTAACCC	TCACTAAAGG	GAACAAAAGC	TGGGTACCGG	GB
1	-----	-----	-----	-----	-----AGC	T-GGTACCGG	LP
181	GCCCCCCTC	GAGGTCGACG	GTATCGATAA	GCTTGATATC	GAATTCCTTA	TTAATTAATG	GB
13	GCCCCCCTC	GAGGTCGACG	GTATCGATAA	GCTTGATATC	GAATTCCTTA	TTAATTAATG	LP
241	AAAATTGTA	CATTTTTAT	TCCTTTATTC	AAAATGAAC	TGTTTTTTT	ATTATTATT	GB
73	AAAATTGTA	CATTTTTAA	TCCTTTATTC	CAAATGAAC	TGTTTTTTT	ATTATTATT	LP
301	CCAACAATTT	TAGCAGTTAA	ACCTTTTAGG	TCTTTAATA	ATATTCCTT	AATGATAAT	GB
133	CCAACAATTT	TAGCAGTTAA	ACCTTTTAGG	TCTTTAATA	ATATTCCTT	AATGATAAT	LP
361	GGCAATGTCG	AATCTGTAAG	AGCAGTAGTT	ATTGATTATT	GTGATATTAG	ACATCCAAAT	GB
193	GGCAATGTCG	AATCTGTAAG	AGCAGTAGTT	ATTGATTATT	GTGATATTAG	ACATCCAAAT	LP
421	AATTTATGTA	AAAAACATTT	TGAAATCGAT	TCATATTGGA	ATGATGATAC	GGATTGTTTT	GB
253	AATTTATGTA	AAAAACATTT	TGAAATCGAT	TCATATTGGA	ATGATGATAC	GGATTGTTTT	LP
481	ACAAATATTG	GATGCAAAGT	ATATGGAGGA	TTTGATATTA	TTGGTGGTCA	TACCCCTAAA	GB
313	ACAAATATTG	GATGCAAAGT	ATATGGAGGA	TTTGATATTA	TTGGTGGTCA	TACCCCTAAA	LP
541	GTTGGAAC	TATGTAGACT	TAAAAAAGGA	GAAAAATAAT	TTGGATATTG	TAATCAAAG	GB
373	GTTGGAAC	TATGTAGACT	TAAAAAAGGA	GAAAAATAAT	TTGGATATTG	TAATCAAAG	LP
601	GGAAATGCG	TTGAAAGAGA	TTTTAAAGAA	AGTTTGGAA	TATCTATAAA	AATAAAAGGA	GB
433	GGAAATGCG	TTGAAAGAGA	TTTTAAAGAA	AGTTTGGAA	TATCTATAAA	AATAAAAGGA	LP
661	ATTTCTAATA	AAGGAGATGA	TGAACCAGCA	TGTCCACAAT	ATAAAAATAC	TTGGATTAAT	GB
493	ATTTCTAATA	AAGGAGATGA	TGAACCAGCA	TGTCCACAAT	ATAAAAATAC	TTGGATTAAT	LP
721	TATGGGAAAT	GTAATGAACC	TTATTATTGT	GGAACAAATC	ATGGATTATT	TTATGCAAAC	GB
553	TATGGGAAAT	GTAATGAACC	TTATTATTGT	GGAACAAATC	ATGGATTATT	TTATGCAAAC	LP
781	AAAAGAAAAC	TCGATTACTT	TCCCACAGAC	GGTGAAAAAT	GTAATTCAAA	TAATATACCA	GB
613	AAAAGAAAAT	TCGATTACTT	TCCCACAGAC	GGTGAAAAAT	GTAATTCAAA	TAATATACCA	LP
841	TATGCTGTTT	GTTATTTAGG	AAGATGTCAT	ACAACAGGTG	GTTTTTTTAG	TGAATTTGGA	GB
673	TATGCTGTTT	GTTATTTAGG	AAGATGTCAT	ACAACAGGTG	GTTTTTTTAG	TGAATTTGGA	LP
901	ACTATTGTTA	AAAATGTCGA	AATCGTAAC	TTATCAGATG	GAAAGAACAG	TTCTAGAAGA	GB
733	ACTATTGTTA	AAAATGTCGA	AATCGTAAC	TTATCAGATG	GAAAGAACAG	TTCTAGAAGA	LP
961	GGAAAACATA	AAAATTTACC	TACTTCTAAA	GTATTTGATA	GTTATAGTAT	ATATGATATT	GB
793	GGAAAACATA	AAAATTTACC	TACTTCTAAA	GTATTTGATA	GTTATAGTAT	ATATGATATT	LP
1021	GATCCTAAAA	ATTGGAAAAAT	TGAAGATGAT	GATAAAGATG	TTACTGTTCA	TGAAAATACA	GB
853	GATCCTAAAA	ATTGGAAAAAT	TGAAGATGAT	GATAAAGATG	TTACTGTTCA	TGAAAATACA	LP
1081	TTAGATCCAA	AAAGTGATTC	AAGACTGTGT	TAAATTTTAA	AAAATTTGAT	TTTTTTTAAA	GB
913	TTAGATCCAA	AAAGTGATTC	AAGACTGTGT	TAAATTTTAA	AAAATTTGAT	TTTTTTTAAA	LP
1141	TAAATGTCAA	TCGGAATTCC	TGCAGCCCGG	GGGATCCACT	AGTCTAGAG	CGGCCGCCAC	GB
973	TAAATGTCAA	TCGGAATTCC	TGCAGCCCGG	GGGATCCACT	AGTCTAGAG	CGGCCGCCAC	LP
1201	CGCGGTGGAG	CTCCAASSCG	CCCTATAGTG	AGTCGTATTA	CAATTCCTG	GCCGTCGTTT	GB
1033	CGCGGT----	-----	-----	-----	-----	-----	LP

Figura V.2A. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DEL GEN Tox-34. LP corresponde a la secuencia obtenida para el clon pBS-Tox34, GB a la secuencia del Gen Bank (Acc #X58372). En negrita, el marco abierto de lectura de TxP I. Sombreado en amarillo, el codón de iniciación de la traducción; en verde, el de terminación. Subrayados, los sitios de restricción, *Hind* III, *Eco*R I y *Bam*H I.

Txp-I	MKICTFFI L FKMNLFFLFI I TILAVK F RSFNNISLI	<u>NGNVESVR</u> <u>AV VIDYCDIRH</u>	60
Txp-I	<u>NNLCKKHFEI</u> <u>DSYKDDTDC</u> <u>FTNIGCKVYG</u> <u>GFDIIGGHT</u>	<u>KVGTVCRLKK</u> <u>GENKFGYCNS</u>	120
Txp-I	<u>KGNCVERDFK</u> <u>ESFGISIKIK</u> <u>GISNKGDE</u> <u>AC QYKNTAI</u>	<u>NYGKCNE</u> <u>YY CGTNHGLFYA</u>	180
Txp-I	<u>NKRKLDYF</u> <u>T DGEKCNSNI</u> <u>YAVCYLGR</u> <u>HTTGGFFSEF</u>	<u>GTIVKNVEIV</u> <u>TLSDGKNSSR</u>	240
Txp-I	<u>RGKHKNL</u> <u>TS KVFDYSIYD</u> <u>ID KN.KIED</u> <u>DDKDVTVHEN</u>	<u>TLD KSDSRL</u> <u>C* 292</u>	

Figura V.2B. PRODUCTO DE TRADUCCIÓN PREDICHO PARA EL GEN TOX-34. Los 292 aminoácidos del marco abierto de lectura del Tox-34 se presentan en colores relacionados con sus características químicas. Los números en la columna de la derecha se refieren al número de residuos por línea. Subrayados, los aminoácidos que se corresponden con la secuencia amino-terminal determinada para Txp-I. Recuadrados, los residuos que constituirían una señal para la secreción y/o un segmento de prototoxina.

En la **Figura V.3A** se esquematiza el subclonado del Tox-34 en el vector de transferencia de primera generación, pAgDU (Cap. IV). Para ello, el gen Tox-34 se escindió del pBSKS con *BamH* I y *Hind* III y se insertó en forma orientada en pAgDU. Con el objeto de confirmar la identidad del producto de la ligación, el mismo fue digerido con *BamH* I y *Hind* III; *Xba* I y *Xho* I, *EcoR* I, y *Sph* I. El resultado se muestra en la **Figura V.3B**. Este plásmido, designado pVT-Tox-34, tiene entonces las siguientes características:

- expresión del gen tóxico bajo el control de un promotor viral muy fuerte (poliedrina).
- regiones flanqueantes del gen de poliedrina que permiten la recombinación homóloga con el DNA viral parental de nuestro sistema de expresión (rAgMNPV *lacZ*⁺/*polh*⁻).

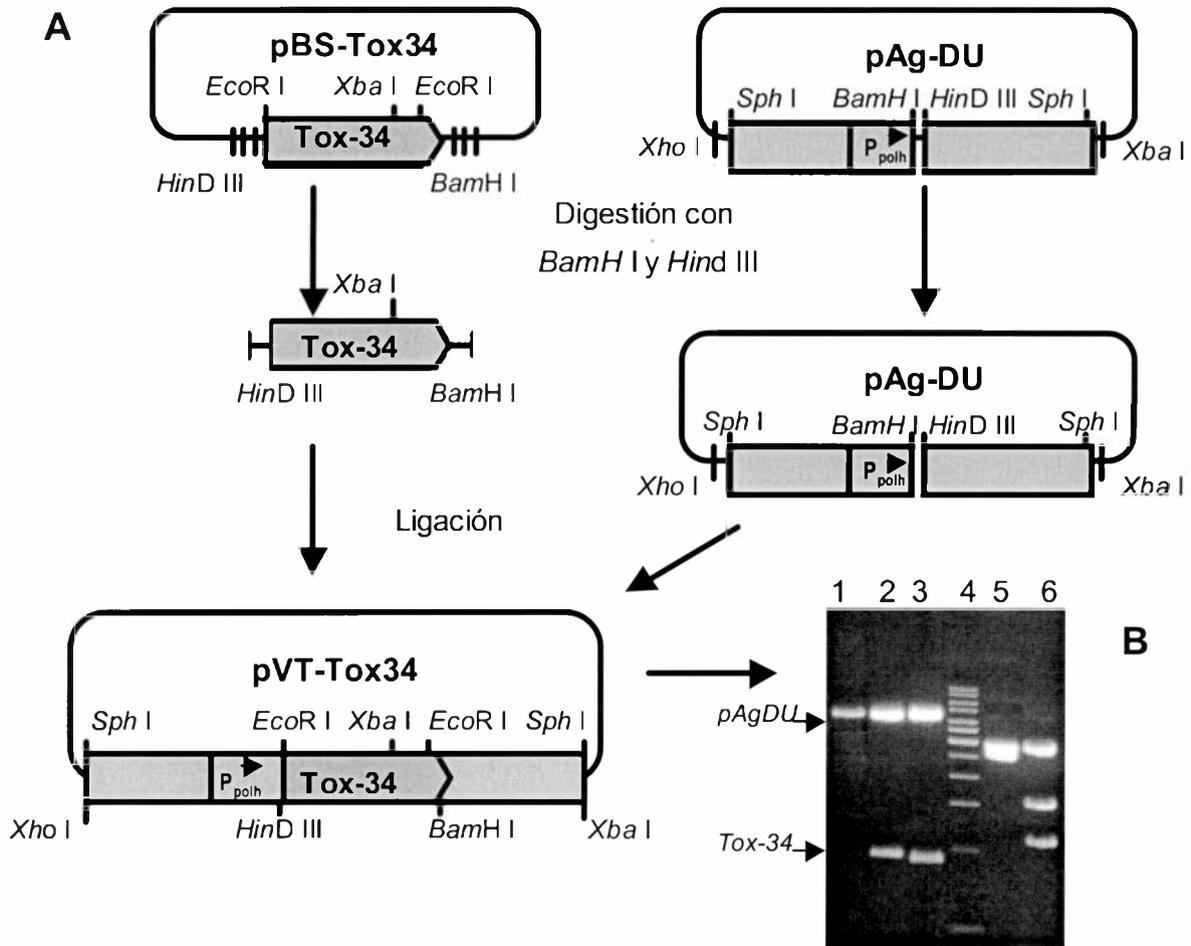
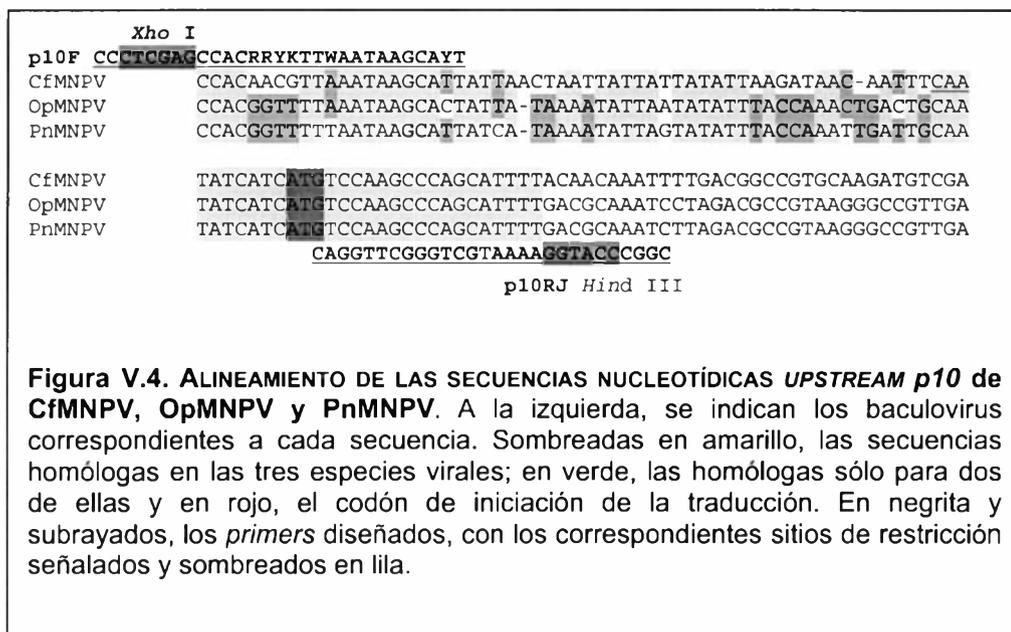


Figura V.3. Subclonado del tox 34 en pAgDU. Panel A: Esquema de la estrategia de clonado. En amarillo, las zonas *upstream* y *downstream polh* de AgMNPV, presentes en el vector de transferencia pAgDU (ver Cap.IV). **Panel B: Electroforesis en gel de agarosa, 1%, TAE 1X.** Calle 1: linealización del pAgDU resultado de la digestión con *BamH I* y *Hind III*. Calle 2: productos de la digestión con *BamH I* y *Hind III* del pVT-Tox34. Calle 3: productos de la digestión con *EcoR I* del pVT-Tox34. Calle 4: *ladder* 1kb. Calle 5: productos de la digestión con *Sph I* del pVT-Tox34. Calle 6: productos de digestión del pVT-Tox34 *Xho I* y *Xba I*.

V.2 IDENTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA PROTEÍNA p10 DE AgMNPV.

Con el propósito de construir un vector de transferencia con la capacidad de transferir dos genes al DNA viral parental (*i.e.* el gen *polh* y el gen *Tox-34*), encaramos el estudio del promotor de *p10* de AgMNPV (promotor fuerte viral tardío, de características similares al de poliedrina).

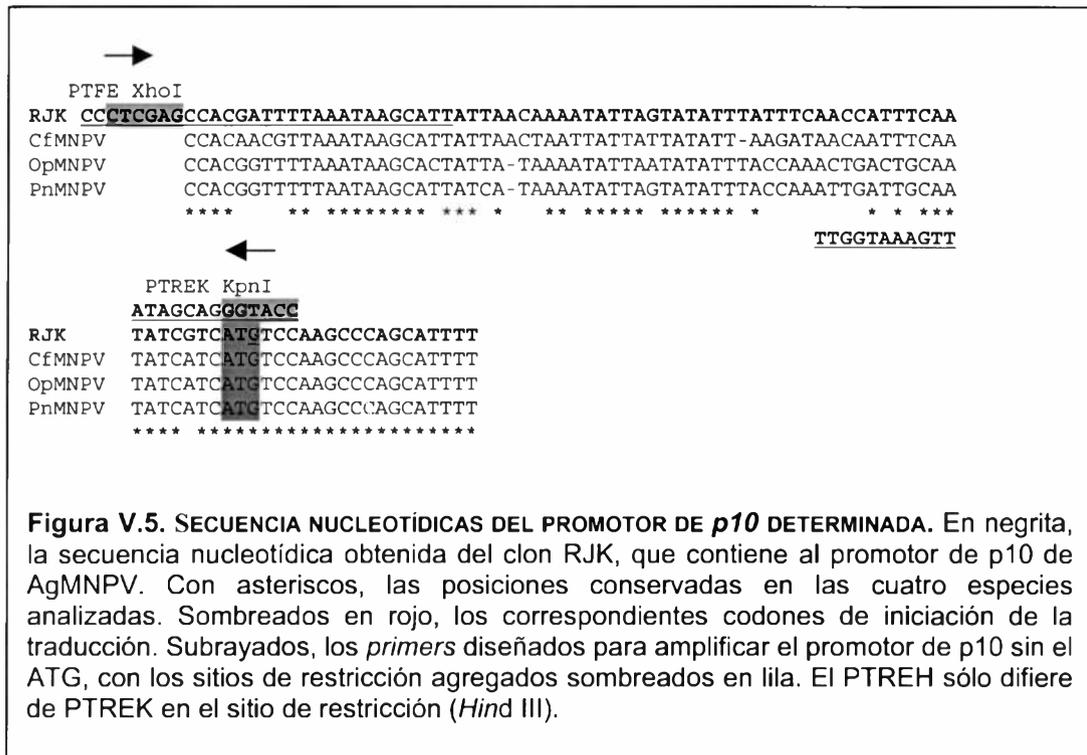
Dado que no se disponía de información publicada sobre la secuencia del gen de *p10* de AgMNPV ni sus regiones flanqueantes, se identificó y secuenció el promotor de dicho gen en AgMNPV. Para ello, se utilizaron las secuencias nucleotídicas de los genes de *p10* de los baculovirus más relacionados filogenéticamente con AgMNPV, de acuerdo a la similitud encontrada en otros genes ya secuenciados (como el de poliedrina). En base al alineamiento de esta región del genoma de CfMNPV (GB: #AY052388), OpMNPV (GB: #U75930) y PnMNPV (GB: #U50411), se establecieron dos zonas de alta homología de utilidad para el propósito perseguido. Una de ellas se encontró en la posición -67 hasta el nucleótido -46 y la siguiente desde la posición +3 hasta la +21 del marco de lectura del gen de *p10*. Se diseñaron en base a ellas los oligonucleótidos p10F (‘degenerado’) y p10RJ (ver **Figura V.4**).



Estos *primers* se ensayaron en una reacción de PCR sobre DNA viral de AgMNPV. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
<hr/>			
Desnaturalización	92 °C	10 segundos	
Hibridación	45 °C	10 segundos	35 ciclos
Extension	72 °C	15 segundos	
<hr/>			
Extension final	72 °C	4 minutos	

Se obtuvo un fragmento de amplificación de 100 nucleótidos que se clonó en pGEM-T *Easy Vector* (Promega, USA). La construcción obtenida, denominada RJK, fue secuenciada (**Figura V.5**). En la misma figura se observa el alineamiento con la misma zona de los tres baculovirus antes mencionados. La zona contiene todos los elementos de secuencia presentes en los promotores fuertes tardíos de las baculovirus. En base a la secuencia de este fragmento amplificado de AgMNPV se diseñaron nuevos *primers*, específicos, con el fin de amplificar sólo las regiones regulatorias comprendidas entre las posiciones nucleotídicas -67 y -1; de forma tal de no incluir el inicio de traducción de p10. Al oligonucleótido directo se le adicionó la secuencia de reconocimiento para *Xho* I, y se lo designó PTFE. Se diseñaron dos *primers* reversos, que sólo diferían en los sitios de restricción agregados a su secuencia específica, *Hind* III para PTREH y *Kpn* I para PTREK.



Con los nuevos oligonucleótidos, se ensayó un ciclado idéntico al que se indicó anteriormente, obteniéndose un fragmento del tamaño esperado (80 nt).

Finalmente, se clonó en *pGEM-T Easy Vector*, y se determinó nuevamente la secuencia nucleotídica para comprobar la ausencia de mutaciones introducidas en la amplificación con *Taq* polimerasa. Verificamos entonces, la presencia de los 67 nucleótidos de la secuencia promotora de p10, sin el inicio de traducción de p10. Dicha secuencia comprende el motivo baculoviral conservado de los promotores tardíos, TAAG, en la posición -54. Este motivo es el sitio de iniciación de la transcripción de p10, según el análisis transcripcional del gen de CfMNPV, SeMNPV, SpliMNPV y AcMNPV (Van Oers *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1995; Factor *et al.*, 1997; Zuidema *et al.*, 1993).

Una vez terminado el análisis de la secuencia, otro laboratorio publicó el gen de p10 de AgMNPV y sus regiones flanqueantes (Razuck *et al.*, 2002). La comparación de nuestra determinación y la suya, se muestra en la **Figura V.6**.

```
P10 LP -62 G AT TTTA AATAAGCATT ATTAACAAAA TATTAGTATA TTTATTCAA CCATTCAAT ATCGTC -1
P10 GB -65 GTTGGTATA ATTAAGCATT ATTAACAAAA TATTAGTATA TTTATTCAA CCATTCAAT ATCGTC -1
```

Figura V.6. ALINAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE p10 DE AgMNPV. P10 LP corresponde a la secuencia determinada en nuestro laboratorio para la región -67/-1 de AgMNPV. P10 GB corresponde a la secuencia del banco de genes (GB:# AY055828). Los números en la columna de la derecha se refieren al número de residuos por línea, y el signo indica su posición con respecto al ATG. Subrayadas, las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar p10.

El alineamiento entre ambas secuencias es idéntico desde la posición -1 hasta el nucleótido -54. No podemos precisar si las diferencias que se observan en el alineamiento en las posiciones anteriores al nucleótido 54 son tales, dado que las mismas se encuentran en la región de hibridación del *primer* utilizado en la amplificación.

V.3 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE TRANSFERENCIA DUALES.

Con la identificación y el clonado de un segundo promotor viral tardío de AgMNPV, que se describe en el apartado anterior, estábamos en condiciones de diseñar la estrategia de construcción de los vectores de transferencia duales.

En un principio, el propósito fue generar un plásmido que permitiera la construcción de vectores para la expresión de dos genes eucariotas cualesquiera, en cultivo celular. Es decir que el vector debía contar con sitios múltiples de clonado flexibles (o al menos un MCS, bajo uno de los promotores), que admitieran la fácil inserción de cualquier gen sin demasiada manipulación previa del inserto, y con los dos sitios de poliadenilación, necesarios para la estabilidad de ambos mensajeros.

Una pretensión adicional del diseño, fue la condición de que los dos promotores presentes en los vectores resultantes, estuvieran flanqueados por sitios de restricción únicos, con el fin de admitir, en el marco de futuros proyectos, el intercambio un

promotor tardío por uno temprano y ensayar así la expresión de genes bajo el control de una serie de combinaciones de promotores tempranos y tardíos.

El diseño final del primer vector de segunda generación, que denominamos pAgDUAL, se muestra en la Figura V.7.

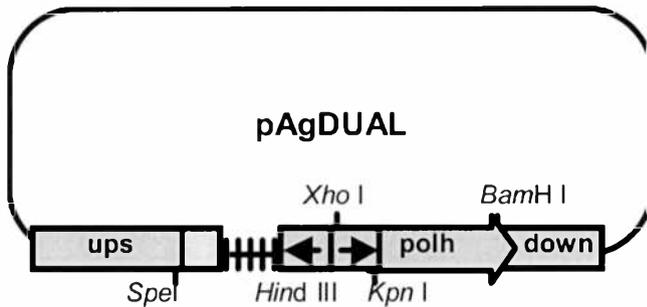


FIG. V.7. Esquema del vector de transferencia pAgDUAL. En color ocre, las secuencias virales de AgMNPV. *Ups* y *down* corresponden a las regiones anteriores y posteriores al gen de poliedrina; *polh* corresponde al marco abierto de lectura de la poliedrina. Con flechas se simbolizan los promotores virales (de poliedrina y de p10). En amarillo, la cola de poliadenilación de SV40. Se indican en el esquema los sitios de restricción únicos de utilidad para el intercambio de las secuencias mencionadas más arriba. Con barras verticales,

Para la construcción del pAgDUAL se diseñaron oligonucleótidos que permitieron la obtención por PCR, en forma separada, de todas las especies a clonar. El molde utilizado en esas reacciones de PCR fue, en la mayoría de los casos, el pAgPH (ver **Figura V.8**). En la Tabla I se resumen todos los *primers* utilizados para el diseño del pAgDUAL y sus posibles variantes, por ello en algunos de los casos aparecen en la tabla secuencias duplicadas, que sólo difieren en los sitios de restricción adicionados en sus extremos 5'.

En todas las reacciones de PCR del presente apartado, se utilizó el siguiente programa de ciclado general, a menos que se indique lo contrario.

Desnaturalización	94 °C	2 min	} 35 ciclos
Desnaturalización	92 °C	10 segundos	
Hibridación	Ver Tabla I	10 segundos	
Extension	72 °C	Ver Tabla I	
Extension final	72 °C	3 minutos	

Nombre del primer	Secuencia del primer	T _m	T _m [*]	Tamaño estimado (pb)	T de hibridación y tiempo de extensión utilizados
UPSi	GCTCTAGAGCATGCCGCTGTGCAT	66°C	58°C	690 (región upstream polh)	48°C 1 minuto
45°C UPSf	CGGACTAGTGTAATGCGGTCTACAAT	61°C	49°C		
Prom i	CCCTCGAGAAGTTGCAGCTCAAG	60°C	44°C	150 (promotor de polh)	44°C 15 segundos
Prom f	CGGGGTACCAGTTATAGCAAATTTTAC	57°C	38°C		
PhnA (R)	CGGCAAGCTTAGTTATAGCAAATTTTAC	56°C	38°C		
ORF i	CGGGGTACCATGCCAGATTATAG	57°C	33°C	750 (ORF de polh)	45°C 1 minuto
ORF f	GACTTGGATCCTTAATACGCGGGCCGGT	69°C	59°C		
Poly Ai	CGCGGATCCGAGATTTTCGATTCCA	63°C	42°C	380 (polyA de SV40)	45°C 30 segundos
PolyAf	CGGACTAGTCAGGCTTTACACTTTAT	58°C	45°C		
PTFE	CCCTCGAGCCACGATTTTAAATAAGCATT	62°C	49°C	70 (promotor de polh)	45°C 15 segundos
PTREK	CCGGTACCGACGATATTGAAATGGTT	62°C	46°C		
PTREH	CGGCAAGCTTGACGATATTGAAATGGTT	62°C	46°C		
PhnB (D)	GGCGGATCCGTATTAAGGCGCCGACAAATC	67°C	54°C	800 (region downstream polh)	45°C 1 minuto 30 segundos
M13 F	TGTA AACGACG GCCAGT	54°C	54°C		

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la construcción del pAgDUAL. Listado de los primers empleados según se muestra en la Figura V.8. T_m, es la temperatura de *melting* calculada con la totalidad de las secuencias del primer. T_m^{*} es la temperatura de *melting* calculada sólo con las secuencias virales específicas. Debajo de los tamaños de los productos de PCR se indican las respectivas regiones del vector, la secuencia completa de las mismas se muestra en la Figura V.9.

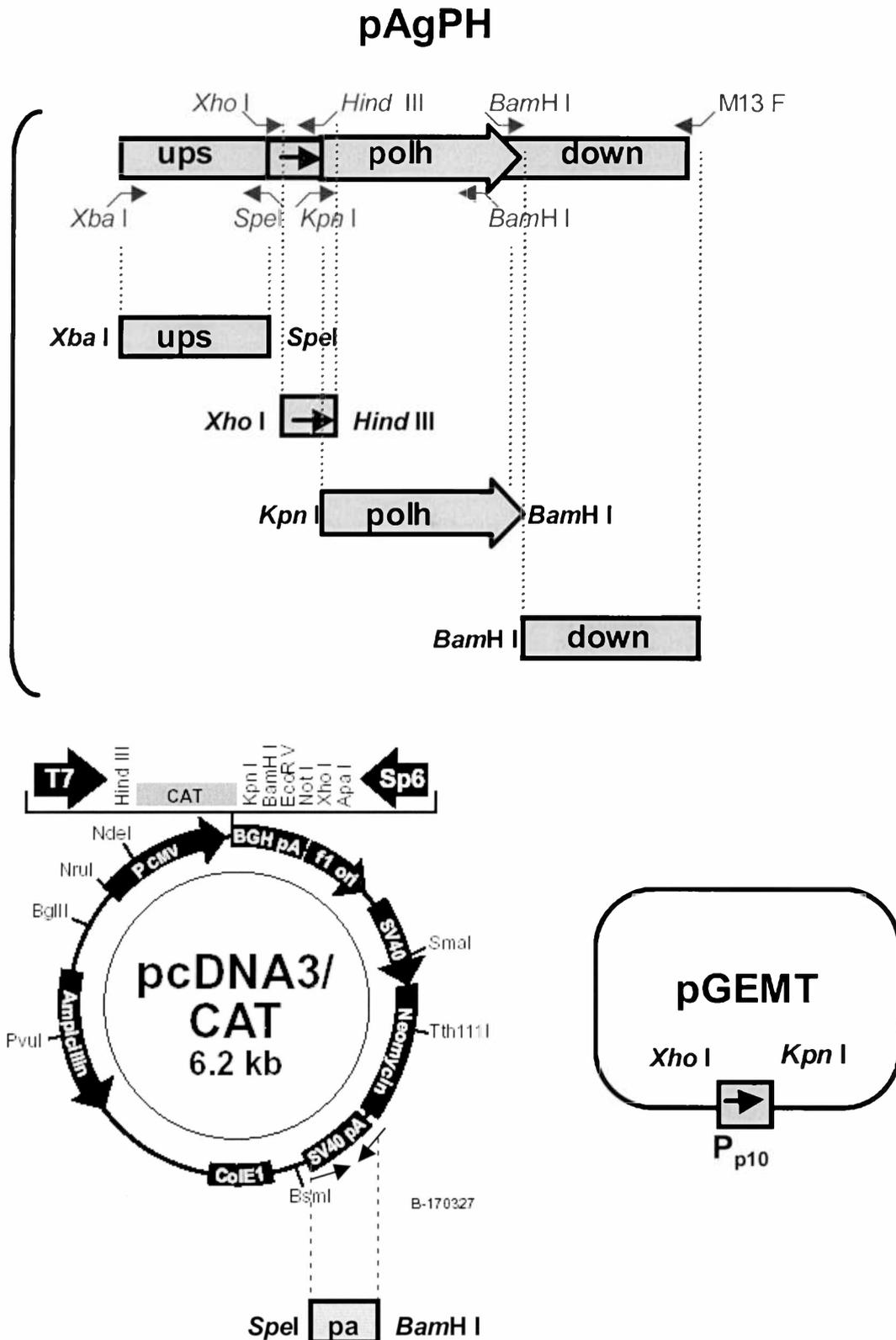


Figura V. . ESQUEMA DE LA ESTRATEGIA DE GENERACIÓN DE LAS DIFERENTES REGIONES A INSERTAR EN pAgDUAL. Las regiones *upstream* (UPS), promotora (se indica con flecha), *orf* (*polh*), y *downstream* (*down*) poliedrina se generaron por PCR, a partir del pAgPH, en las que los *primers* incorporaban los sitios de restricción deseados. La cola de poliadenilación de SV40 fue obtenida también por PCR a partir del vector de expresión eucariótico pcDNA 3 y la obtención del promotor de *p10* ya se describió en V.5. Las flechas indican el sentido de amplificación.

Como se indica en la **Figura V.8** y en la Tabla I, todos los *primers* incluyeron secuencias agregadas con sitios de restricción, conforme con la estrategia de clonado. Las exigencias descriptas más arriba en cuanto a la versatilidad pretendida para el pAgDUAL, obligaron a un cuidadoso estudio de los sitios de restricción a utilizar, dado que las secuencias a insertar eran varias y de apreciable longitud, lo que restringía considerablemente la selección. En la **Figura V.9** se muestra la secuencia del pAgPH y se indican los oligonucleótidos diseñados (sin sus correspondientes sitios de restricción).

UPS - i						
<u>GCATGCCGCT</u>	<u>GTGCATGGTT</u>	AAAATAATGA	CCGAATTGAG	CAACGCGTCG	GCGCCGCGCG	60
CGTACGGCGA	CACGTACCAA	TTTTATTACT	GGCTTAACTC	GTTGGCAGC	CGCGGCGCGC	60
GCGGAATGTA	CCGAAAACGC	TTTGAGTTTA	CTTGCTATTT	GGGCAACGTG	GTGTCGTGCA	120
CGCCTTACAT	GGCTTTTGCG	AAACTCAAAT	GAACGATAAA	CCCCTGTCAC	CACAGCACGT	120
CAAAATGCAA	GAGCGCGTGC	TTAATCGACG	CGCTTTTGCA	TTTTTACAAG	ATGGACCCCA	180
GTTTTACGTT	CTCGCGCAGC	AATTAGCTGC	GCGAAAACGT	AAAAATGTTT	TACCTGGGGT	180
AGTGCGTGGG	TGAAGTGATG	CATTTGTTGA	TCAAGGCGGA	GGACGTGTAC	AAGCCGTCTA	240
TCACGCACCC	ACTTCACTAC	GTAACAACCT	AGTTCCGCTT	CCTGCACATG	TTCGGCAGAT	240
ATTGCGTAAA	AATGAAGGCG	GTCATAAAC	TGTGTCCGAA	AGCGGGCAGC	TGCAAGGGCA	300
TAACGCATTT	TTACTTCCGC	CAGTTATTTG	ACACAGGCTT	TCGCCCGTGC	ACGTTCCCGT	300
AAAACCCCAT	TTGTAATTTT	TAATATTAAG	CACACGACGC	TTGCACAACA	TGGCCGATTC	360
TTTTGGGGTA	AACATTAAAA	ATTATAATTC	GTGTGCTGCG	AACGTGTTGT	ACCGGCTAAG	360
CATCAACAGG	ATTTTGGCAT	TGTTTTACCG	ATGGAGTTCC	AAAACGGGCG	CGAGCTTGGA	420
GTAGTTGTCC	TAAAACGCTA	ACAAAATGGC	TACCTCAAGG	TTTTGCCCGC	GCTCGAACCT	420
AAACCAAGCC	GATTTGGAGT	GTTTGTACGA	TTTGGAGCGA	TTTGTGGGCG	CGCACATGAA	480
TTTGGTTCCG	CTAAACCTCA	CAAACATGCT	AAACCTCGCT	AAACACCCGC	GCGTGTACTT	480
CAAGCAGATT	GAAGCGTCGT	GTA AAAAGAA	AAAACAGTCC	GAAGAGCGCG	CTGAAAAGC	540
GTTCTGCTAA	CTTCGAGCA	CATTTTCTT	TTTTGTGTCAGG	CTTCTCGCGC	GACTTTTTTCG	540
GGCATTGAAA	CGGGTTGAAT	TGGCAGCAGA	CCGTATGGCG	ATGCAAGCTA	AAGCCGCGCC	600
CCGTAACCTT	GCCCAACTTA	ACCGTCGTCT	GGCATAACCG	TACGTTTCGAT	TTCGGCGCGG	600
TCATTGCGAC	GATGACGGGC	ACTGGTCTAC	GCTTAGTCAG	CAGCACCTTG	AAGACATTGA	660
AGTAACGCTG	CTACTGCCCG	TGACCAGATG	CGAATCAGTC	GTCGTGGAAC	TTCTGTAAC	660
Prom - i						
TCGCAATAAA	GAAATGTAG	ACCGCATTTA	<u>CAAGTGCAG</u>	<u>CTCAAGCAGG</u>	ATTGTTTGT	720
AGCGTTATTT	CTTTAACATC	<u>TGGCGTAAAT</u>	<u>GTTCAACGTC</u>	<u>GAGTTCGTCC</u>	TAACAAAACA	720
UPS - f						
AAATAATAAA	AATGCTTTTT	AAATAAATT	TTGTATTTTT	ATTTACATTT	TAAATAGATA	780
TTTATTATTT	TTACGAAAAA	TTTATATTA	AACATAAAAA	TAAATGTA	ATTTATCTAT	780
ORF - 1						
ATAAGTATTT	TGCTGTTATT	GTAGCAACTT	TGTAGTAAAA	TTTGCTATAA	<u>CTATGCCAGA</u>	840
TATTCATAAA	ACGACAATAA	CATCGTTGAA	ACATCATTTT	<u>AAACGATATT</u>	<u>GATACGGTCT</u>	840
Prom - f						
TTATACGTAT	AGGCCGACCA	TTGGTCGCAC	GTATGTGTAT	GATAACAAGT	ATTACAAAAA	900
AATATGCATA	TCCGGCTGGT	AACCAGCGTG	CATACACATA	CTATTGTTCA	TAATGTTTTT	900
CTTGGGTTCT	GTGATTAAGA	ACGCCAAGCG	CAAGAAGCAC	CTTCTGTAAC	ATCAGGAGGA	960
GAACCAAGA	CACTAATTCT	TGCGGTTGCG	GTTCTTCGTG	GAAGAACTTG	TAGTCTCTCT	960
AGAAAAAGC	CTAGATGGGC	TAGATCATTA	CATCGTGGCC	GAAGACCCAT	TTTTAGGGCC	1020
TCTTTTTTCG	GATCTACCCG	ATCTAGTAAT	GTAGACCCGG	CTTCTGGGTA	AAAATCCCGG	1020
CGGCAAAAAC	CAAAAATTGA	CACTTTTTAA	AGAAATCCGC	AATGTAAAAC	CCGACACGAT	1080
GCCGTTTTTG	GTTTTTAACT	GTGAAAAATT	TCTTTAGGCG	TTACATTTTG	GGCTGTGCTA	1080
GAAGCTCATT	GTAACTGGA	GCGGTAAAGA	GTTTCTGCGC	GAACTTGGA	CTCGTTTTGT	1140
CTTCGAGTAA	CAATTGACCT	CGCCATTTCT	CAAAGACGCG	CTTTGAACCT	GAGCAAAAACA	1140

TGAAGACAGC	TTTCCCATTG	TAAACGACCA	AGAAGTGATG	GATGTGTTTT	TAGTCATTAA	1200
ACTTCTGTCG	AAAGGGTAAC	ATTTGCTGGT	TCTTCACTAC	CTACACAAAA	ATCAGTAATT	1200
CCTCCGCCCA	ACTCGCCCTA	A.CCGTTGCTA	CAAATTCCTG	GCGCAACACG	CTCTGCGTTG	1260
GGAGGCGGGT	TGAGCGGGAT	TGGCAACGAT	GTTTAAGGAC	CGCGTTGTGC	GAGACGCAAC	1260
GGACATCGAT	TACGTGCCCC	ACGAGGTAAT	CCGCATTGTG	GAGCCTTCCT	ACGTGGGCAT	1320
CCTGTAGCTA	ATGCACGGGG	TGCTCCATTA	GGCGTAACAC	CTCGGAAGGA	TGCACCCGTA	1320
GAACAACGAG	TACAGAATTA	GCCTAGCCAA	GAAAGGCGGT	GGTTGCCCAA	TCATGAACAT	1380
CTTGTGCTC	ATGTCTTAAT	CGGATCGGTT	CTTTCCGCCA	CCAACGGGTT	AGTACTTGTA	1380
CCACAGCGAG	TATACCAACT	CGTTTGAGTC	CTTTGTCAAC	CGCGTAATCT	GGGAAAACCT	1440
GGTGTGCTC	ATATGGTTGA	GCAAACCTCAG	GAAACAGTTG	GCGCATTAGA	CCCTTTTGAA	1440
TTACAAAACC	ATTGTGTACA	TTGGCACTGA	TTCGGGCGAA	GAAGAAGAAA	TTCTTATTGA	1500
AATGTTTGGG	TAACACATGT	AACCGTGACT	AAGCCCGCTT	CTTCTTCTTT	AAGAATAACT	1500
AGTCTCGCTC	GTGTTCAAGG	TGAAAGAGTT	TGCGCCCGAC	GCACCTCTGT	TTACCGGCC	1560
TCAGAGCGAG	CACAAGTTCC	ACTTCTCAA	ACGCGGGCTG	CGTGGAGACA	<u>AATGGCCGGG</u>	1560
Phn B (D)						
<u>CGCGTATTAA</u>	<u>GGCGCCGACA</u>	<u>AATCGTTGGT</u>	AATAGCCAAC	AAATTTTTTA	GTTTCACGTC	1620
<u>GCGCATAAAT</u>	<u>CGCGGCTGT</u>	TTAGCAACCA	TTATCGGTTG	TTAAAAAAT	CAAAGTGCAG	1620
ORF - f						
GTCGGGCGCG	TTGACCGCTT	GTATGAAAAG	CACGCGCTC	ATCATACCGG	CCCGGAAAA	1680
CAGCCCGCGC	AACTGGCGAA	CATACTTTTC	GTGCGCGCAG	TAGTATGGCC	GGGCGTTTT	1680
TTAAATCCTC	GATTTGTAAA	TAAACTTAG	ACGCGTCCGC	CGCGTACAGC	TCCAGAGGAG	1740
AATTTAGGAG	CTAAACATTT	ATTTTGAATC	TGCGCAGGCG	GCGCATGTCG	AGGTCTCCTC	1740
GCTGTTTGTG	TAATTCGTTT	TCGGGCAATA	CAACGTTTTT	TCTAAACAAA	TGTAAACTAT	1800
CGACAAACAG	ATTAAGCAAA	AGCCCGTTAT	GTTGCAAAAA	AGATTTGTTT	ACATTTGATA	1800
TTTTTGCCCT	TTCAACGTTT	TCGGCCGTTT	TGGGTTTTTC	TCTCAATAAA	TTGGAAACAT	1860
AAAAACGGAA	AAGTTGCAAA	AGCCGGCAAG	ACCCAAAAAG	AGAGTTATTT	AACCTTTGTA	1860
TTTGCAATAT	TTTTTCTAAT	TCTTTGTTTA	TAATATTTTG	ATTGTAAAAAC	AATTTGCTAT	1920
AAACGTTATA	AAAAAGATTA	AGAAACAAAT	ATTATAAAAC	TAACATTTTG	TTAAACGATA	1920
CTTTGGCAAA	ATTATAAAGG	TGCACTGCAA	ATTGTAAATC	GCGTTTGCTA	GCCTTTTTTG	1980
GAAACCGTTT	TAATATTTCC	ACGTGACGTT	TAACATTTAG	CGCAACGAT	CGGAAAAAAC	1980
TATCAAGGTC	ATCGTCAAAA	CCGCTGCCAG	ATTCGCTAAA	GTAGATCGGA	TTCTTCCGAC	2040
ATAGTTCCAG	TAGCAGTTTT	GGCGACGGTC	TAAGCGATTT	CATCTAGCCT	AAGAAGGCTG	2040
AACGCGCCAT	GCGCGCCTCG	GCGCTGCCT	AACGTGTGTA	TAACACACCC	AAAATCCTGC	2100
TTGCGCGGTA	CGCGCGGAGC	CGCGAGCGGA	TTGCACACAT	ATTGTGTGGG	TTTTAGGACG	2100
AGGAGGCGCC	TTTATGGGCT	TGCCAAAAAT	TTCGTTTTCA	AGCCTGCCGT	TTTTTTGAGG	2160
TCCTCCGCGG	AAATACCCGA	ACGGGTTTTA	AAGCAAAAGT	TCGGACGGCA	AAAAAACTCC	2160
GTTGCGCCAG	TTTTAATTTG	ATTTAACATG	TCAACGCGTG	GGTCCAACGG	CGGCTTTACG	2220
CAACGCGGTC	AAAATTAAC	TAAATGTAC	AGTTGCGCAC	CCAGTTGCC	GCCGAAATGC	2220
GTTCCACTTT	TTTGTAGTGA	GCTCCATTT	TAATCTCGTC	AAACAACGCG	CTCGATAATA	2280
CAAGTGAAA	AAACTCACAT	CGAGGGTAAA	ATTAGAGCAG	TTTGTGCGC	GACCTATTAT	2280
CGTCTTTGCG	CGGTTCTGAC	ACTATTGCGT	CTAACAAACA	ATCGTCAAGC	GGCG 2335	
GCAGAAACGC	GCCAAGACTG	TGATAACGCA	GATTGTTGTT	TAGCAGTTTCG	CCGC 2335	

Figura V.9. Diseño de los oligonucleótidos para la construcción del pAgDUAL. Secuencia nucleotídica de las hebras codificante y complementaria del inserto del pAgPH. Se indican en colores los productos de amplificación esperados. En rojo, la región *upstream* (ups) poliedrina; en azul, los 150 pb inmediatamente precedentes al ATG del *orf* del mismo gen, que incluyen todos los elementos de secuencia característicos de los promotores baculovirales tardíos. En verde, los 738 pb que conforman el marco abierto de lectura de poliedrina (polh). En negro, la región *downstream* (down). Subrayados, los *primers*, las flechas indican el sentido de amplificación y el nombre de los *primers* se indica por debajo o encima de las correspondientes secuencias (en las mismas no se incluyen los sitios de restricción incorporados para evitar confusión con las secuencias virales).

Los números en la columna de la derecha se refieren al número de residuos por línea.

Los productos de amplificación fueron purificados a partir de los geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (*GENECLEAN™*) y ligados al vector PGEM-T *Easy Vector*, pBSSK o pcDNA 2, dependiendo del caso particular (ver más adelante).

Con el fin de descartar clones que presentaran mutaciones introducidas por la *Taq* polimerasa, para cada fragmento de PCR a introducir en la construcción final, se secuenciaron entre dos y cuatro clones.

En resumen, la zona *upstream polh* se amplificó en forma de dos fragmentos separados; uno de ellos incluyendo los nucleótidos -150 a -1 de las secuencias 5' (designado promotor de *polh*, P_{polh}) y el otro abarcando las regiones más distantes (-829 a -150, designado 'ups'). El fragmento 'ups', previamente digerido con *Xba I* / *Spe I* fue clonado en pBSSK, linealizado con las mismas enzimas de restricción. El fragmento P_{polh} fue clonado en el PGEM-T *Easy Vector*.

El marco de lectura de poliedrina se amplificó con la combinación de *primers* ORF-i y ORF-f, utilizándose también el pAgPH como molde. El producto se clonó en PGEM-T *Easy Vector*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura V.10**.

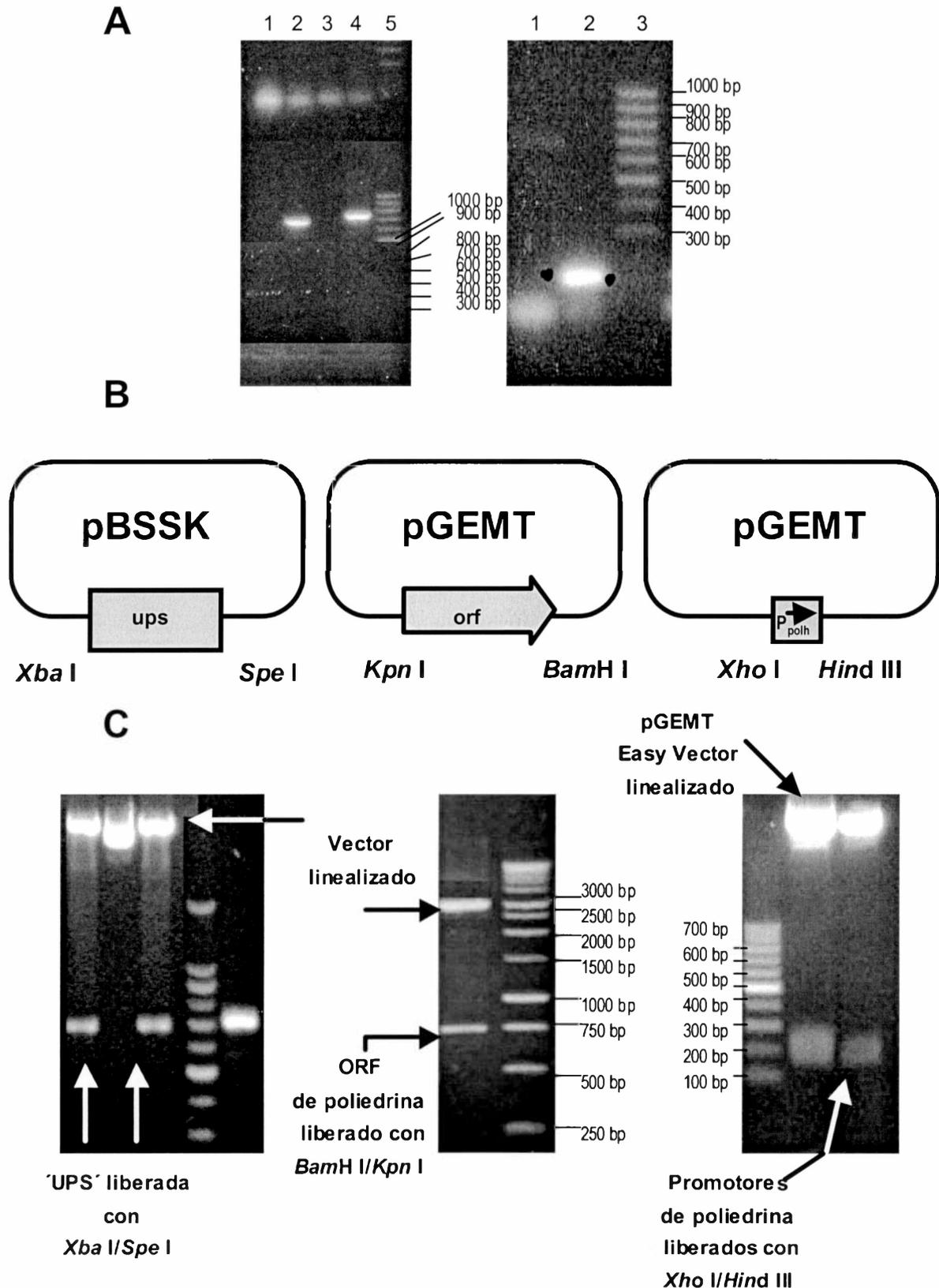


Figura V.10. Amplificación y clonado de secuencias constituyentes del pAgDUAL. Panel A: en el gel de la izquierda, electroforesis de los productos de las PCRs realizadas con las combinaciones de *primers* UPS y ORF. Calle 1: control (-) de la PCR con los *primers* UPS. Calle 2: resultado de la amplificación de los *primers* UPS sobre pAgPH. Calle 3: control (-) de la PCR con los *primers* ORF. Calle 4: resultado de la amplificación de los *primers* ORF sobre pAgPH. Calle 5: *ladder* Promega 100 bp. En el gel de la derecha, electroforesis del producto de la PCR realizada con las combinación de *primers* Prom i- PhnA (R). Calle 1: control (-) de la PCR. Calle 2: producto de PCR correspondiente al promotor de *polh*. Calle 3: *ladder* Promega 100 bp. **Paneles B y C:** esquemas del clonado de los productos de PCRs y resultados.

Para la generación de la cola de poly A (de SV40), se utilizó como molde el vector de expresión eucariote pcDNA 3 (**Fig.V.8**). La región de poliadenilación del sitio de clonado alternativo, es la propia del gen de poliedrina, presente en la región *downstream* ('down') dicho gen, que también fue amplificada por PCR y clonada en pcDNA 2. Los resultados de esta etapa se resumen en la **Figura V.11**.

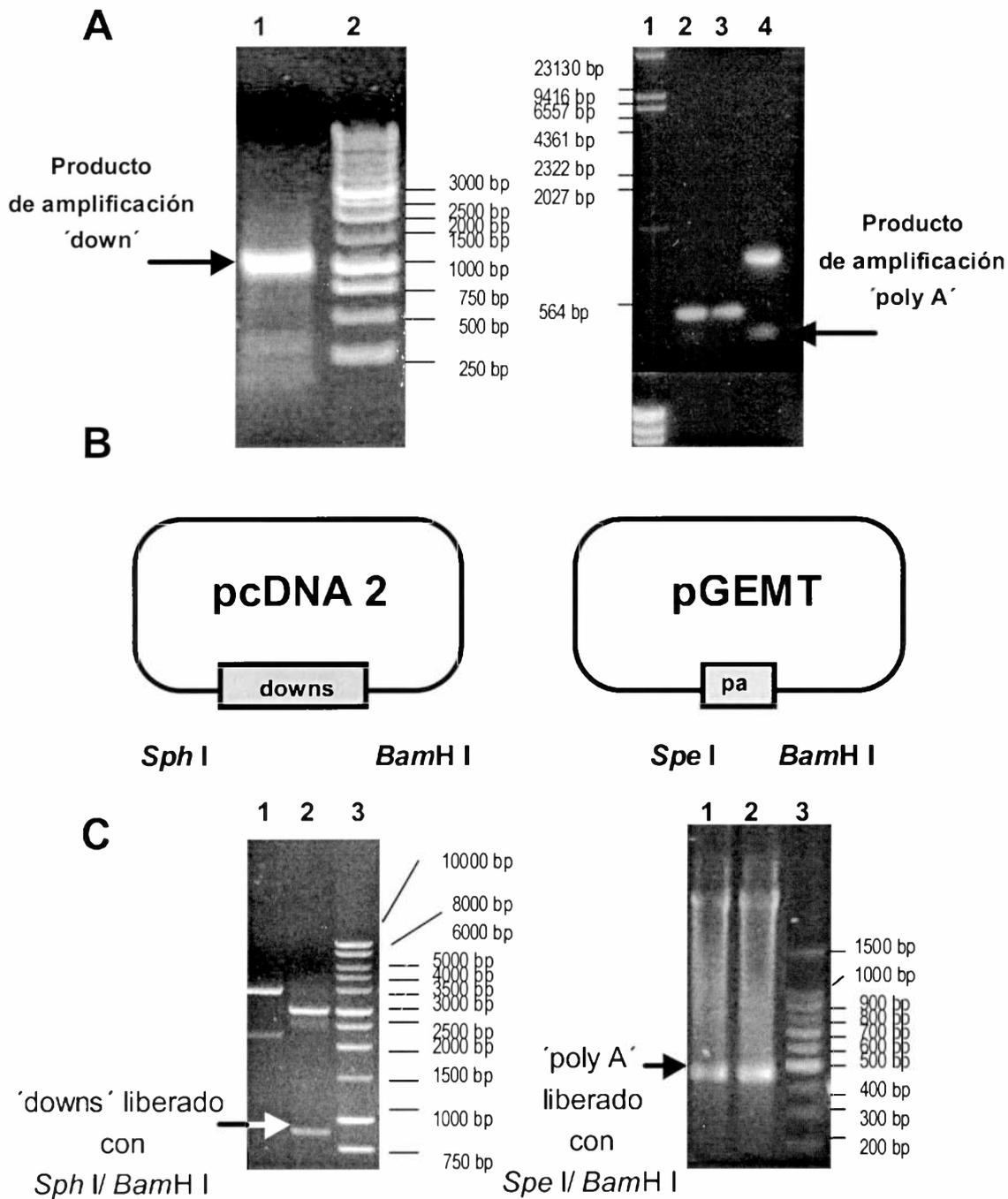


Figura V.11. Amplificación y clonado de las restantes secuencias constituyentes del pAgDUAL. **Panel A:** en el gel de la izquierda, indicado con flecha, electroforesis del producto de la PCR realizada con la combinación de *primers* PhnA (R) y M13 (Calle 1). Calle 2: *ladder* Promega 100 bp. En el gel de la derecha, resultados de las PCRs realizadas con las combinaciones de *primers* Proms y PolyA i- PolyA f. Calle 1: λ /HindIII. Calle 2: amplificación resultante de PhnA(R) y Prom i sobre pAgPH. Calle 3: amplificación resultante de Promf y Prom i sobre pAgPH. (estos dos insertos varían solamente en el sitio de restricción agregado). Calle 4: resultado de PolyA i y PolyA f sobre pcDNAIII. **Panel B:** esquema del clonado de las secuencias de PolyA y *downstream* poliedrina. **Panel C:** en el gel de la izquierda, los resultados del clonado de la región *downstream*. Calle 1: plásmido resultante de la ligación pcDNA2/ *downstream* sin digerir; calle 2: productos de la digestión del mismo plásmido con *BamH I* / *Sph I*. Calle 3: *ladder* Promega 100 bp. En el gel de la derecha, calles 1 y 2: productos de la digestión de dos plásmidos resultantes de la ligación del fragmento de PCR correspondiente a la cola polyA y el vector pGEMT, con *BamH I* / *Spe I*. Calle 3: *ladder* Promega 100 bp.

Finalmente, la fusión cola con cola de los promotores de p10 y poliedrina, se generó a partir del clon pGEM-T Easy Vector/ P_{p10}, obtenido como se describió en el apartado **V.2**, y del clon pGEM-T Easy Vector/ Ppolh (**Fig.V.10**). Los productos de digestión de dichos plásmidos recombinantes fueron purificados a partir del gel de agarosa con polvo de sílice (*GENECLEAN™*) y ligados entre sí. Esta ligación fue amplificada mediante la estrategia de PCR que se esquematiza en la **Figura V.12**. El procedimiento comprendió dos etapas de ciclado. El propósito de los primeros cinco ciclos fue unir, por hibridación de las secuencias *Xho* I de ambos promotores, y posterior extensión por polimerización con *Taq*, aquellas moléculas que no se hubieran ligado en la etapa previa. Posteriormente, se agregaron los oligonucleótidos que hibridaban en los extremos del fragmento de ligación y/o de hibridación/ extensión a amplificar, completándose la reacción de polimerización con treinta ciclos adicionales. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
<hr/>			
Desnaturalización	94 °C	15 segundos	
Hibridación	45 °C	15 segundos	5 ciclos
Extension	72 °C	45 segundos	



Finalizados los 5 primeros ciclos, agregado de los *primers* Prom f o PhnA (R) y PTREK o PTREH (ver **Figura V. 12**) e inicio de un nuevo ciclado.



Desnaturalización	94 °C	20 segundos	
<hr/>			
Desnaturalización	94 °C	10 segundos	
Hibridación	45 °C	10 segundos	30 ciclos
Extensión	72 °C	30 segundos	
<hr/>			
Extensión	72 °C	4 minutos	

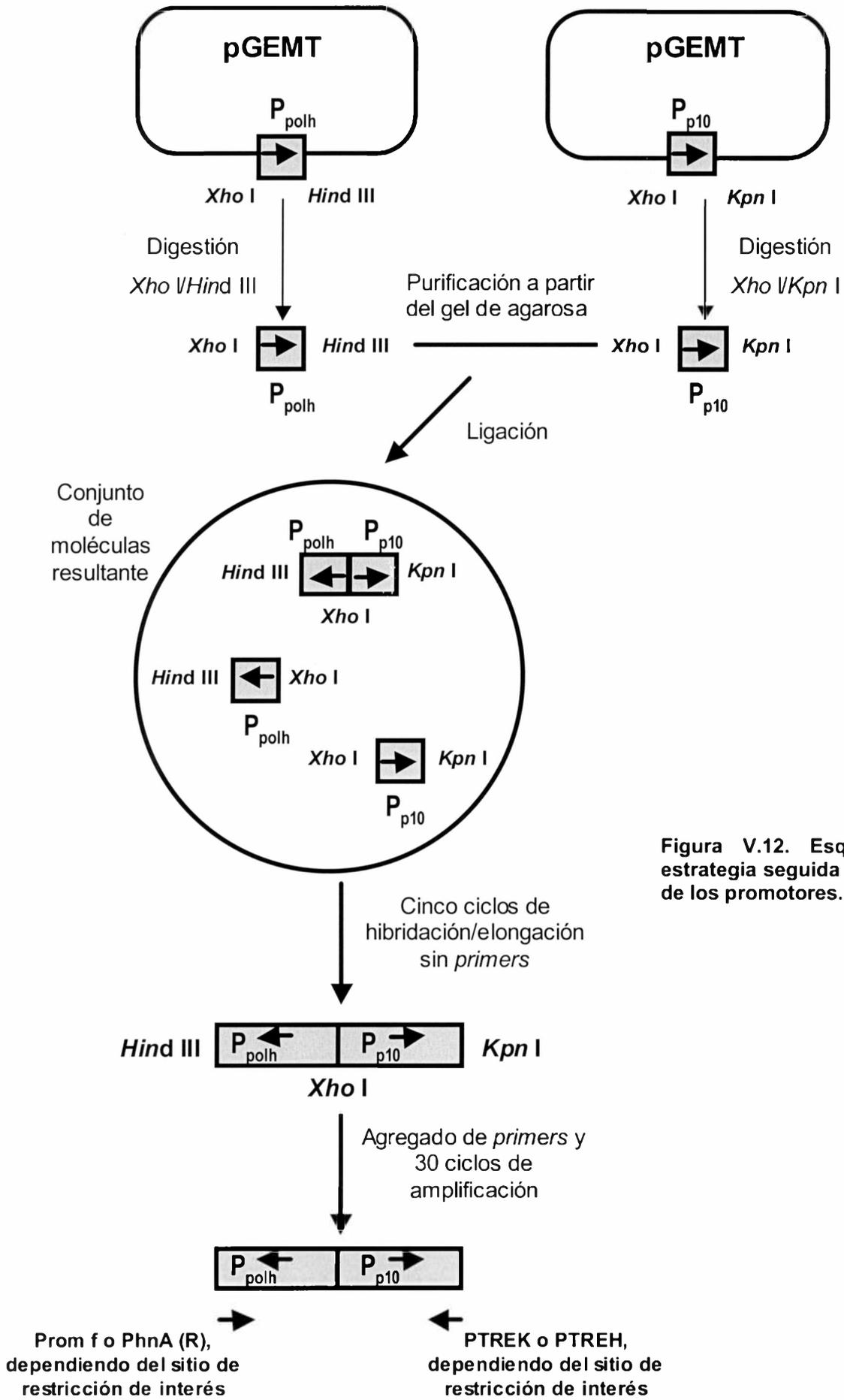


Figura V.12. Esquema de la estrategia seguida para la fusión de los promotores.

El producto de amplificación fue purificado a partir del gel de agarosa de la **Fig. V. 13A**, con polvo de sílice (*GENECLEAN™*) y ligado al PGEM-T Easy Vector. Con el propósito de verificar la adecuada fusión de los promotores, se determinó la secuencia nucleotídica del inserto presente en dichos clones. En la **Fig.V.13B** se muestra el resultado.



Figura V.13 A. Electroforesis en gel de agarosa, 2%, TAE 1X. Calle 1: promotor de poliedrina de AgMNPV, purificado a partir de gel de agarosa, de la electroforesis de los productos de la digestión del clon pGEM-T Easy Vector/ P_{polh}, con *Xho* I y *Hind* III. Para la ligación de los dos promotores *in vitro*, se utilizó una cantidad equivalente al doble de la que se observa en la foto. Calle 2: promotor de p10 de AgMNPV, purificado a partir de gel de agarosa, de la electroforesis de los productos de la digestión del clon pGEM-T Easy Vector/ P_{p10}, con *Xho* I y *Kpn* I. Para la ligación de los dos promotores *in vitro*, también se utilizó una cantidad equivalente al doble de la que se observa en la foto. Calle 3: *ladder* 100 pb (50 pb, 100pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb). Calle 4: producto de la PCR esquematizada en la **Figura V.12**. Calle 5: control negativo de la PCR.

GGTACCGACG	ATATTGAAAT	GGTTGAAATA	AATATACTAA	TATTTTGTTA	ATAATGCTTA	60
CCATGGCTGC	TATAACTTTA	CCAACTTTAT	TTATATGATT	ATAAAACAAT	TATTACGAAT	60
TTTAAATCG	TGGCTCGAGA	AGTTGCAGCT	CAAGCAGGAT	TGTTTGTTAA	ATAATAAAAA	120
AAATTTTAGC	ACCGAGCTCT	TCAACGTCGA	GTTTCGTCCTA	ACAAACAATT	TATTATTTTT	120
TGCTTTTTAA	ATATAATTTT	GTATTTTAT	TTACATTTTA	AATAGATAAT	AAGTATTTTG	180
ACGAAAAATT	TATATTAAAA	CATAAAAAATA	AATGTAAAAAT	TTATCTATTA	TTCATAAAAC	180
CTGTTATTGT	AGCAACTTTG	<u>TAGTAAAATT</u>	<u>TGCTATAACT</u>	<u>AAGCTT</u>		226
GACAATAACA	TCGTTGAAAC	ATCATTTTAA	ACGATATTGA	TTCGAA		226

Figura V.13 B. Determinación de la secuencia nucleotídica de la fusión de los promotores de p10 y poliedrina. En el extremo 5', en negrita, el promotor de p10, en orientación opuesta (ver **Figura V.12**). Sombreados en amarillo, los sitios de restricción (*Kpn* I, *Xho* I, *Hind* III). Como se mostró en el esquema de la **Figura V.12**, el sitio *Xho* I es la zona de fusión de los dos promotores. Subrayados, los *primera* PTREK y PhnA (R).

La estrategia de construcción del pAgDUAL se muestra en la **Figura V.14**. Debió recurrirse a un diseño basado en la fusión de dos vectores comerciales, pcDNA II y pBSSK, dada la cantidad de sitios de restricción necesarios para su composición. Por un lado se procedió al clonado secuencial de los insertos 'down', 'orf' y del *cassette* de promotores (orientados cola con cola) en el *polylinker* del pcDNA II. Por otro lado, se clonaron también en forma secuencial los insertos 'ups' y polyA de SV40, pero en pBSSK. Cada etapa del clonado secuencial se verificó por secuenciamiento, dado que cualquier mutación en alguna de las especies componentes del vector podía perjudicar la eficiencia del vector de transferencia.

Por último, se digirieron ambas construcciones con las enzimas de restricción *Sca* I y *Hind* III. El sitio *Sca* I se encuentra en el gen de resistencia a ampicilina, que según las secuencias disponibles de ambos vectores comerciales, son idénticos. Es así que nuestra estrategia se basó en la reconstitución de un gen de resistencia a ampicilina híbrido, producto de la ligación de los fragmentos correspondientes, provenientes de los dos plásmidos recombinantes. Los fragmentos compatibles a ligar consistían en unas 2213 pb provenientes del pBSSK/'ups' / polyA y 2985 pb provenientes del pcDNA II/ 'down' / 'orf' / promotores. El resultado de las respectivas digestiones *Sca* I / *Hind* III, se muestra en la **Figura V.15**. Los fragmentos señalados en la figura fueron eluidos del gel de agarosa y se ligaron.

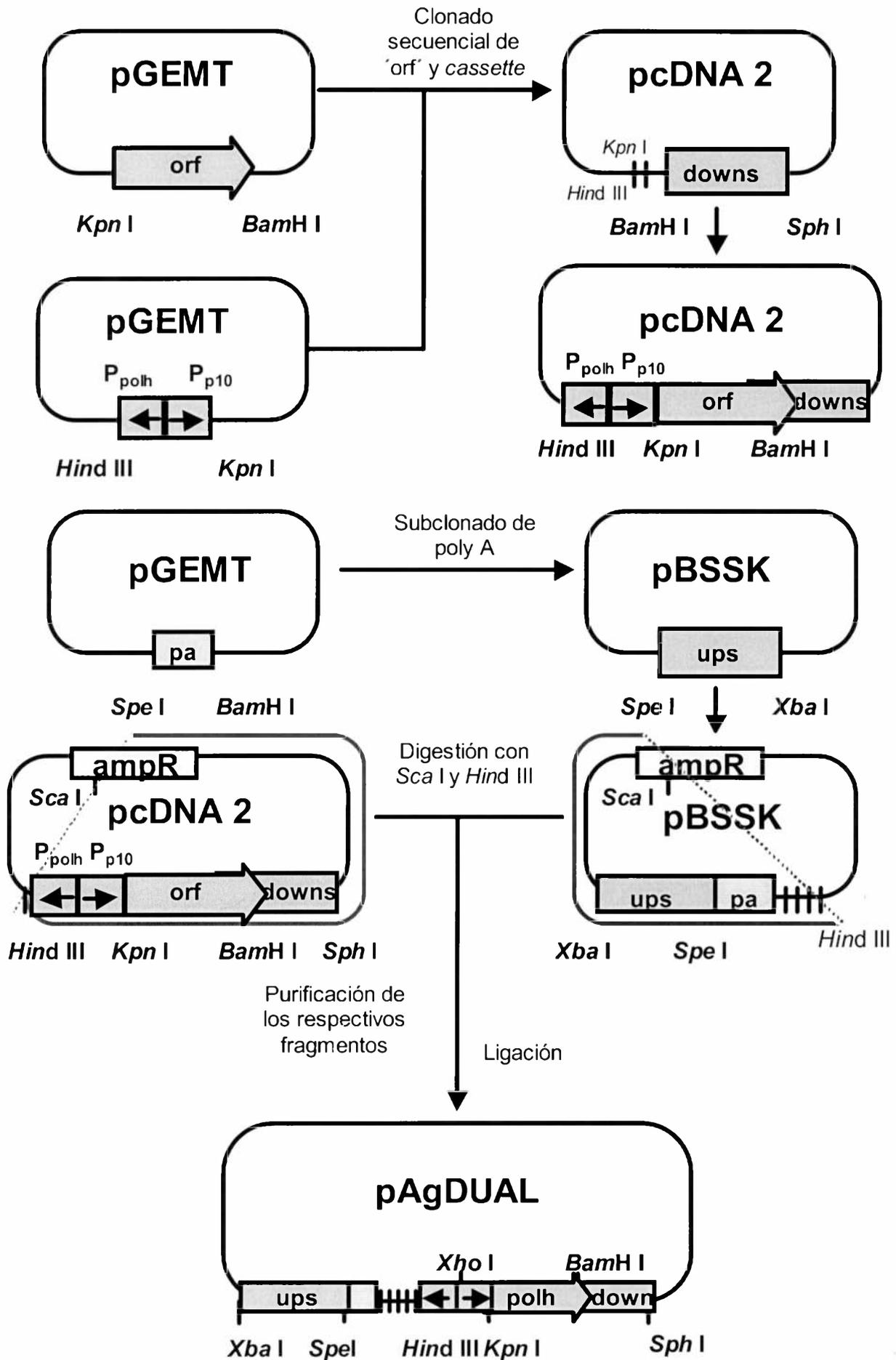


Figura V.14. Esquema de la estrategia para la construcción del pAgDual.

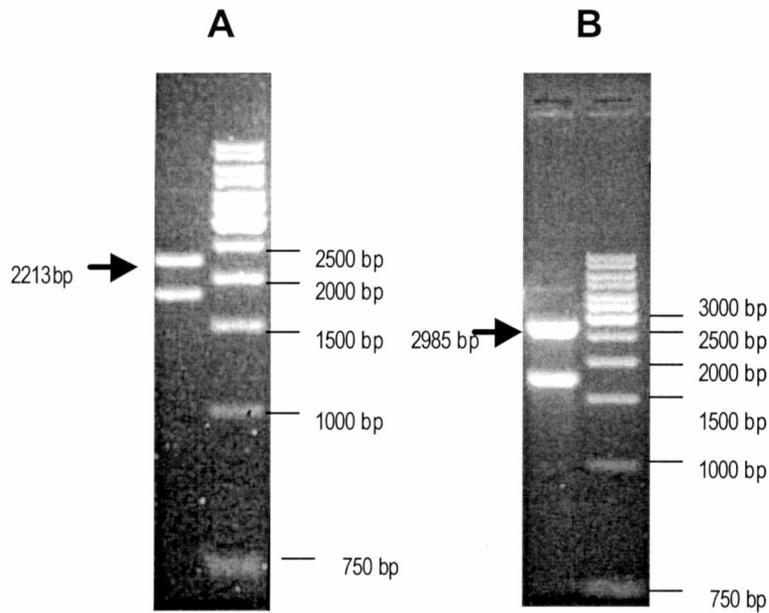


Figura V.15. Digestión *Sca* I/ *Hind* III de las construcciones parciales previas al pAgDUAL.

Panel A: calle 1: fragmentos de restricción provenientes del pBSSK/ ups/ polyA; calle 2: marcador de peso molecular.

Panel B: calle 1: fragmentos de restricción provenientes del pcDNA II/ down / orf/ promotores; calle 2: marcador de peso molecular.

En los dos paneles se indican con flechas los fragmentos compatibles para la reconstitución del gen de resistencia a ampicilina.

A pesar de sucesivos intentos, no se logró recuperar ninguna colonia resistente a ampicilina. Si bien en algunas oportunidades surgieron escasas colonias viables, resultaron productos de religación de los plásmidos parentales, que atribuimos a una probable contaminación con las bandas complementarias dado que aparecían al sobrecargar los gels de agarosa para eluir un exceso de ambos fragmentos. Descartamos la posibilidad de un problema de la mezcla de ligación, porque todos los intentos se realizaron con los correspondientes controles de religación de los plásmidos parentales a partir de los fragmentos eluidos de gel. Más aún, señalamos la presencia de algunas colonias producto de la mezcla de reacción en cuestión, que al ser analizadas resultaron ser productos de religación del pBSSK/ups/ polyA, no obstante la purificación a partir de gel, que indicaron una ligación eficiente aún en presencia de trazas de DNA contaminante (los productos de digestión *Sca* I/ *Hind* III de este plásmido tienen una estrecha diferencia de migración). No podemos descartar que la recuperación de colonias parentales se debiera a trazas de DNA superenrollado sin digerir, es por ello que intentamos, asimismo, no sólo ligaciones directas de las mezclas de ambas digestiones, sino también, de cada una de las digestiones con un exceso de la banda complementaria eluída de gel. Las colonias resultantes de estos experimentos se analizaron por PCR, alcanzando a 400 el número de muestras ensayadas por evento de ligación, sin resultados positivos. Reuniendo todos estos resultados experimentales, desistimos de la estrategia planteada, sospechando cierta incompatibilidad de secuencia nucleotídica entre los

genes de resistencia al antibiótico de pcDNAII y pBSSK, reservadas por ser útiles a fines comerciales.

Implementamos entonces una estrategia alternativa para la obtención de un vector de transferencia doble, particularmente orientada a la generación de recombinantes virales tóxicos que expresaran asimismo el gen de poliedrina; es decir que resultarían infectivos por vía oral, objetivo final de este proyecto de tesis. La misma se esquematiza en la **Figura V.16**.

Se prepararon por digestión de los clones de PGEM-T *Easy Vector* correspondientes, con enzimas de restricción compatibles (ver **Figura V.16**), el marco de lectura de la poliedrina y el *cassette* de promotores de p10 y polh. Ambos fragmentos fueron eluidos del gel de agarosa y ligados. El producto lineal de dicha ligación se amplificó por PCR, utilizándose una estrategia similar a la utilizada para la generación del *cassette* de promotores. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
<hr/>			
Desnaturalización	94 °C	15 segundos	
Hibridación	52 °C	15 segundos	5 ciclos
Extensión	72 °C	60 segundos	
<hr/>			
↓			
Finalizados los 5 primeros ciclos, agregado de los <i>primers</i> PTFBamH I y ORF f (ver Figura V. 16) e inicio de un nuevo ciclado.			
↓			
Desnaturalización	94 °C	20 segundos	
<hr/>			
Desnaturalización	94 °C	10 segundos	
Hibridación	52 °C	10 segundos	30 ciclos
Extensión	72 °C	55 segundos	
<hr/>			
Extensión	72 °C	2 minutos	

Como resultado de dicha reacción, se obtuvo una banda del peso molecular deseado (Figura V.17A) que se purificó nuevamente del gel de agarosa, se digirió con *Bam*HI y se clonó en el vector pVT-Tox34 (Fig. V.6), previamente digerido con *Bam*HI y defosforilado. Designamos a esta construcción pAg-DUALB.

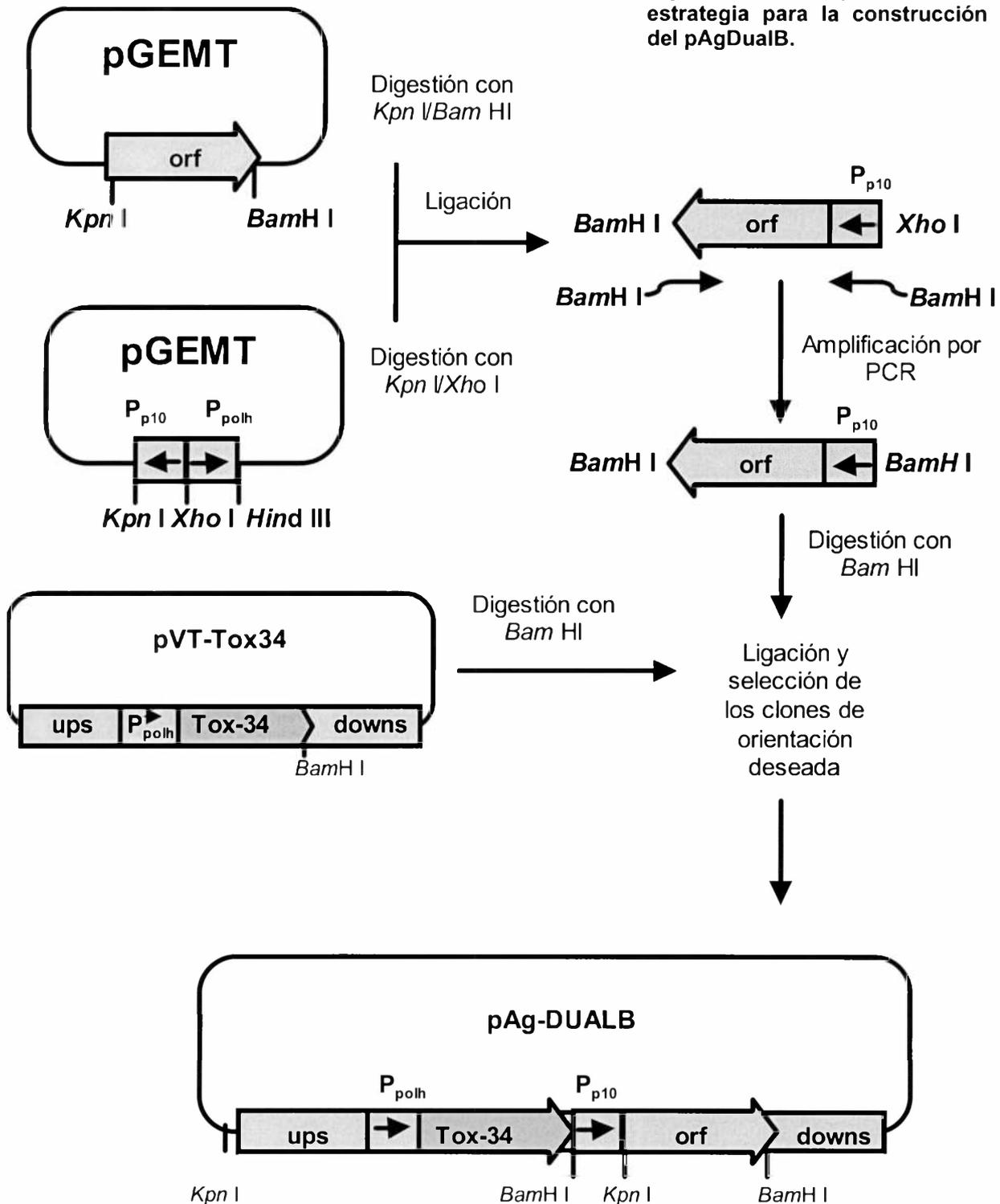


Figura V.16. Esquema de la estrategia para la construcción del pAgDualB.

La correcta orientación del inserto, en el pAg-DUALB, fue verificada por digestión con *Kpn* I. Como se señaló en la **Figura V.16**, el pAg-DUALB incluye dos sitios de restricción *Kpn* I, uno de ellos en las secuencias del plásmido inmediatamente anteriores a la región 'ups'; y el restante, adyacente al ATG de poliedrina. En la **Figura V.17.B** se muestra el resultado de la digestión *Kpn* I. El tamaño de los productos obtenidos (aproximadamente 1890 pb y 4480 pb), estaba de acuerdo con el deducido para un plásmido con el inserto en la orientación adecuada; es decir, con el 'orf' inmediatamente *upstream* de las secuencias *downstream* poliedrina. En caso contrario, la digestión *Kpn* I hubiera dado por resultado fragmentos de 2556 pb y 3809 pb.

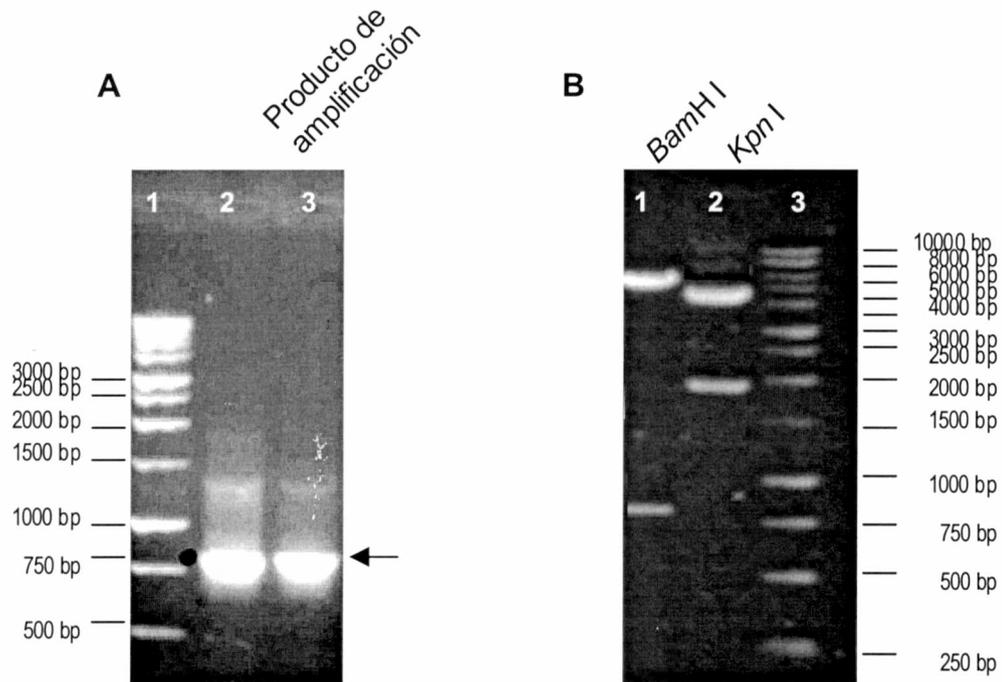


Figura V.17. Panel A: Electroforesis de los productos de la PCR de amplificación de la ligación. Calle 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Calles 2 y 3: fragmentos resultantes de la PCR descrita en el apartado V.3, correspondientes a la fusión del promotor de p10 y el *orf* de poliedrina. **Panel B: Análisis del pAgDUALB.** Calle 1: pAgDUALB digerido con *Bam*H I. Calle 2 pAgDUALB digerido con *Kpn* I. Calle 3: marcador de peso molecular 1 Kb.

V.4 VECTORES DE TRANSFERENCIA DE SEGUNDA GENERACIÓN COMPLEMENTARIOS.

Como complemento del sistema presentado en el Capítulo IV, desarrollamos otros vectores de transferencia, con la idea de expandir las posibilidades del pAg-DU y del pAgDUALB.

El pGEM T *Easy Vector* contiene sitios *EcoR* I flanqueando la región de clonado del fragmento de PCR, proveyendo una forma sencilla de liberación del inserto sin necesidad del agregado de sitios de restricción a los *primers*. Dada la cantidad de construcciones parciales generadas en pGEM T *Easy Vector* (ver **Figuras V.10, V.11, V.12 y V.19**), conteniendo secuencias virales de utilidad para estudios posteriores, se generó un pAgDU2, con un sitio único *EcoR* I entre los sitios *BamH* I y *Hind* III del pAgDU. Con ese propósito, digerimos con *EcoR* I el pVT-Tox-34. El fragmento de restricción de 5000 bp, que contiene las zonas flanqueantes del gen de poliedrina, fue eluído del gel de agarosa y sometido a una reacción de ligación (circularización). El esquema de la estrategia y sus resultados se muestra en la **Figura V.18**.

De esta manera, tanto cualquier *cassette* de promotores baculovirales, como cualquier promotor baculoviral, generados como fue descrito anteriormente para P_{polh} y P_{p10} (es decir, con sitios de restricción internos); puede ser liberado del vector de clonado de fragmentos de PCR, por digestión con *EcoR* I, y subclonado en el pAgDU2. Esta estrategia aporta una alternativa para el estudio de la expresión de genes bajo una serie de combinaciones de promotores baculovirales tempranos y tardíos, pretensión del vector ideado en un principio (pAgDUAL). En el esquema de la **Figura V.19** se muestran las diversas alternativas con las construcciones que se detallaron en los apartados anteriores.

A

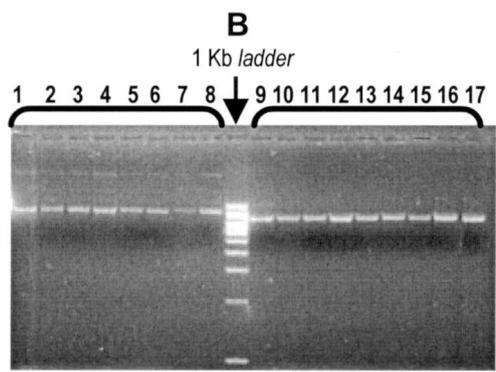
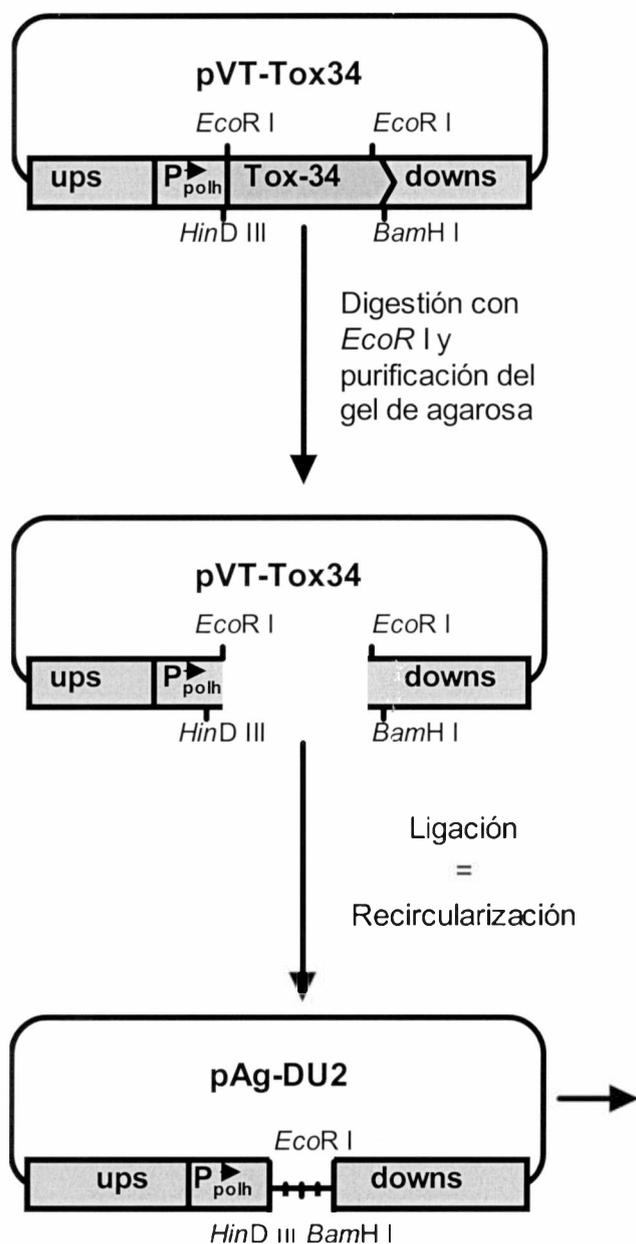


Figura V.18. Panel A: Esquema de la estrategia para la generación del pAgDU2. Panel B: Electroforesis en gel de agarosa, 1%, TAE 1X. Calles 1 a 8: plásmidos resultantes de la religación, sin digerir. Calles 9 a 17: los mismos clones, luego de la digestión con *EcoR* I. Marcador de peso molecular: 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000pb, 6000 pb, 8000 pb, 10000 pb.

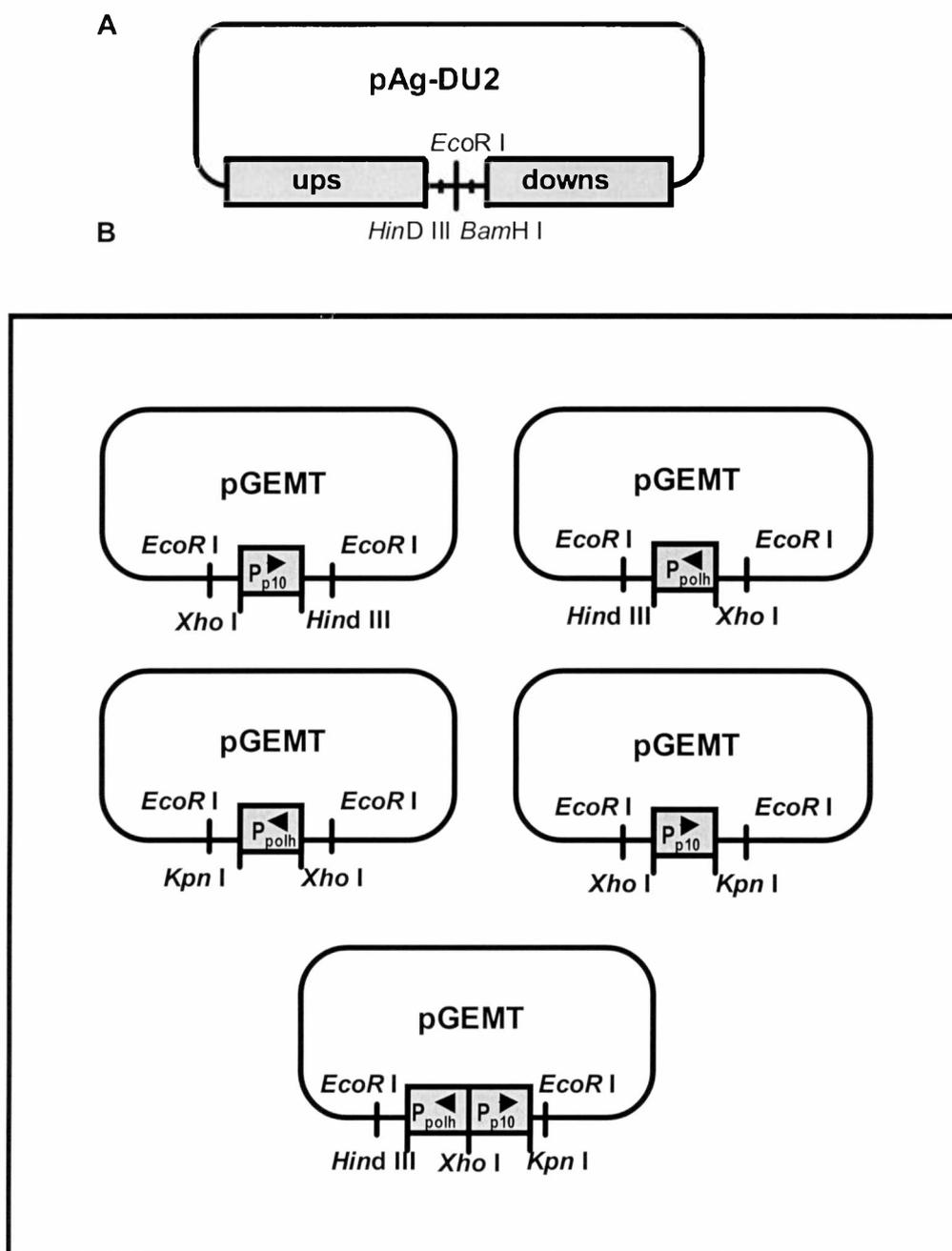


Figura V.19. Panel A: Esquema final del pAgDU. Panel B: Resumen de las construcciones parciales disponibles. Se esquematizan las diferentes construcciones plasmídicas, generadas en el marco del presente proyecto de Tesis, que pueden utilizarse para estudios de expresión de genes clonados bajo el control de distintos promotores, mediante el clonado de gen y promotores en pAgDU2.

Con el propósito de generar un vector de transferencia para la expresión de proteínas con una fusión C-terminal de *lacZ*, un gen *lacZ* truncado, sin los 27 aminoácidos N-terminales que conserva su actividad, fue preparado por digestión de pAcDZ1 (Zuidema *et al*, 1990) con *Hind* III-*Bam*H I . Asimismo, el pAgPHZ (ver Cap. IV) fue digerido con *Hind* III y *Bam*H I. De esta manera, los respectivos fragmentos de restricción de ambas digestiones fueron eluidos del gel de agarosa (ver **Fig. V. 20**) y ligados. Luego de la transformación, se determinó la secuencia nucleotídica del vector de transferencia de fusión, que designamos como pAgPHZF.

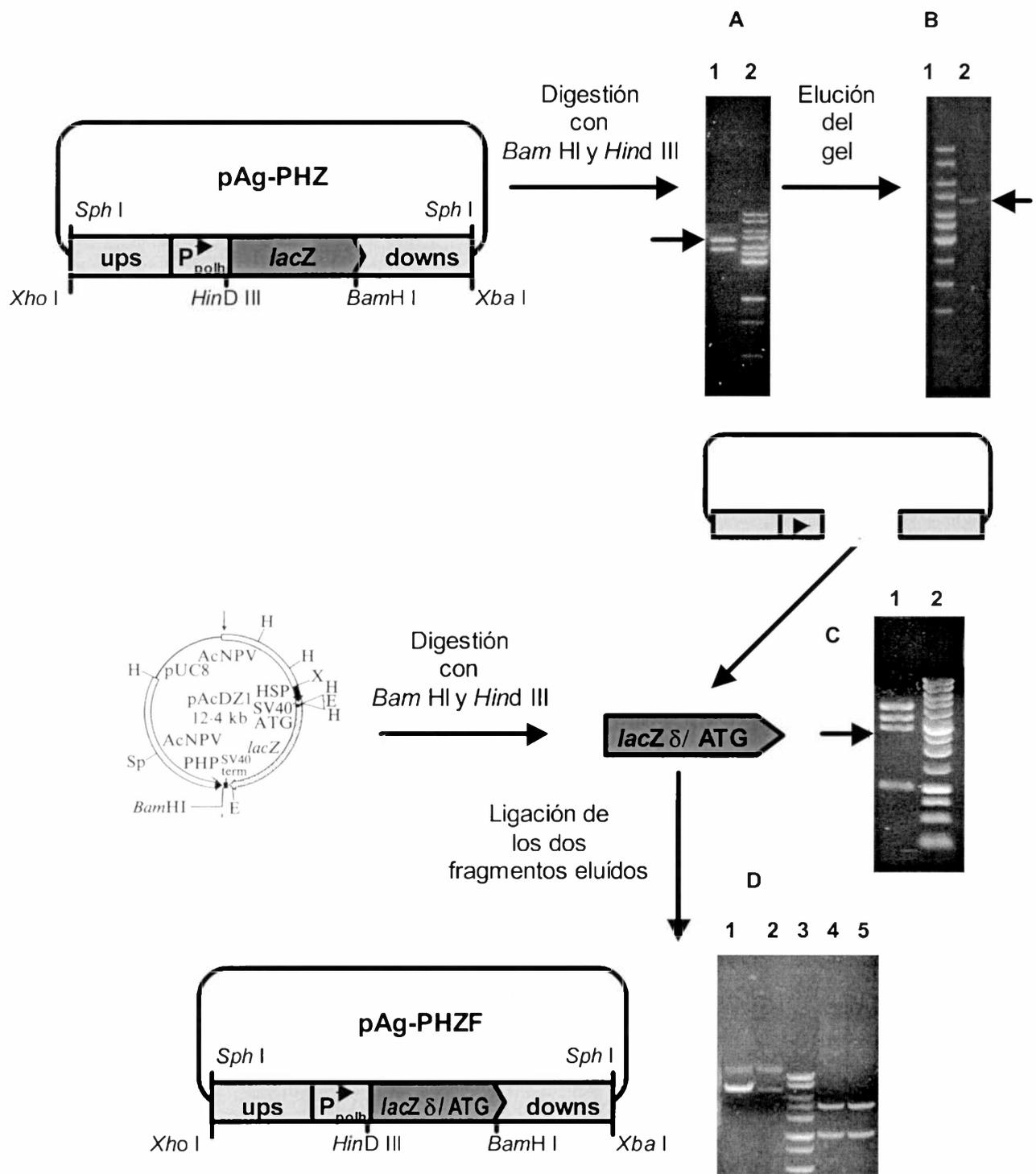


Figura V.20. Construcción del vector de transferencia para la expresión de proteínas para la expresión de una fusión C-terminal de *lacZ*. Panel A: Calle 1: productos de la digestión del pAg-PHZ con *BamH* I y *Hind* III. Indicado con flecha, el fragmento de 5000 pb, correspondiente al pAg-DU, que contiene las secuencias flanqueantes al gen de la poliedrina y fue posteriormente purificado a partir del gel de agarosa (panel B). Calle 2: marcador de peso molecular (1000 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb, 10000 pb). **Panel B:** Calle 1: el mismo marcador de peso molecular que el de panel A. Calle 2: resultado de la purificación del fragmento de aproximadamente 5000 pb. **Panel C:** Calle 1: productos de la digestión del pAc-DZ1 con *BamH* I y *Hind* III. Indicado con flecha, el fragmento de 3200 pb, correspondiente al *lacZ* truncado, y fue posteriormente purificado a partir del gel de agarosa y ligado al fragmento que se muestra en el panel B. Calle 2: marcador de peso molecular (250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb, 10000 pb). **Panel D:** Calles 1 y 2, plásmidos sin digerir, productos de la ligación del *lacZ* truncado al pAgDU. Calle 3: *ladder* 1 kb (2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb, 10000 pb). Calles 4 y 5: productos de la digestión con *BamH* I y *Hind* III de los plásmidos de las calles 1 y 2.

V.5 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA DE SEGUNDA GENERACIÓN.

Si bien a medida que eran realizados los clonados secuenciales, los productos de tales ligaciones parciales se verificaban por determinación de su secuencia, todos los productos finales se secuenciaron nuevamente en forma completa, con el fin de comprobar en forma precisa, la estructura final correcta de todas las construcciones descritas. Los resultados no se muestran. Ocasionalmente debieron diseñarse nuevos oligonucleótidos, para obtener mayor exactitud en la lectura de las zonas de ligación de las diversas especies. Así, se constató la correcta disposición y secuencia de todos los fragmentos presentes en todas los vectores generados.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Con el propósito de aprovechar el sistema creado como se describió en el Capítulo IV, se diseñaron y generaron diferentes vectores de transferencia, para la construcción de recombinantes de AgMNPV. Algunos de estos vectores resultaban necesarios para alcanzar los objetivos de esta Tesis. Otros, en cambio, serán de utilidad tanto en posteriores estudios de expresión y regulación, fuera del alcance del presente proyecto; como en la creación de nuevos recombinantes de AgMNPV con diversos propósitos (expresión de proteínas heterólogas para fines diagnósticos, formas alternativas de aceleración de la velocidad de acción del virus silvestre, etc). Se verificó la estructura y secuencia de todas las construcciones obtenidas.

En el marco del objetivo principal de este trabajo de Tesis, se clonó el gen Tox-34, que codifica para una proteína letal específica de insectos, en dos vectores de transferencia alternativos (**Figura V.3** y **Figura V.16**).

El uso de cualquiera de ellos en ensayos de cotransfección, resultaría en el reemplazo del gen indicador *lacZ* del virus parental por Tox-34 y/o poliedrina (según se utilice pAgDUALB o pVT-Tox-34, respectivamente).

La decisión con respecto a la toxina a expresar, Txp I, fue tomada en base a una serie de consideraciones. En primer lugar, la toxicidad específica para insectos de Txp I (Tomalski *et al.*, 1991). Si bien ya hemos indicado la especificidad de los baculovirus (rango de hospedador extremadamente estrecho), el hecho de que el mecanismo de acción de la toxina que expresaría el recombinante sea específico de insectos, ayuda a disipar inquietudes respecto de las potenciales consecuencias de la dispersión del gen heterólogo por recombinación o la contaminación de otros seres vivos con la proteína en cuestión, debido a la presencia de la misma en los cadáveres de las larvas del insecto plaga. Otra característica de la toxina elegida es que Txp I ejerce un efecto tejido-específico (sobre el SNC). Si la proteína a expresar interfiere con algún aspecto del metabolismo intermedio o de la fisiología celular común a todos los tipos celulares, sería imposible la generación del recombinante. Por último, el Tox-34 había sido expresado en AcMNPV y ensayado en larvas de *Trichoplusia ni* (Tomalski *et al.*, 1991), resultando la disminución en TL₅₀ informada, la más importante lograda hasta el momento, en comparación con cualquier otra toxina expresada en este tipo de sistemas.

En los vectores de transferencia pVT-Tox34 y pAgDUALB, el gen tóxico se ubicó bajo el control del promotor viral muy tardío de poliedrina. La elección de un promotor viral muy tardío para conducir la expresión de la proteína tóxica, no sólo se debió a la fuerza relativa de dicho promotor con respecto a los promotores virales tempranos. De hecho, como Txp I ejerce su acción a muy bajos niveles de concentración en hemolinfa, este aspecto no resultaba tan crucial. Se sabe que los baculovirus que normalmente infectan lepidópteros, pueden entrar en células de dípteros, de roedores (Carbonell *et al.*, 1985), o incluso humanas (Boyce y Bucher, 1996). En estas células, el virus es incapaz de completar su replicación y de producir viriones infecciosos. Estas observaciones demuestran la importancia de un cuidadoso diseño de los vectores de transferencia a utilizar para introducir las modificaciones genéticas deseadas al recombinante baculoviral, de modo tal de disminuir al máximo el posible impacto que tales modificaciones puedan causar en poblaciones de insectos no blanco. En células infectadas, la replicación de los baculovirus está sujeta a una cascada regulatoria dividida en cuatro fases: inmediata temprana, temprana, tardía y muy tardía (Miller, 1998). La expresión de los genes de la fase inmediata temprana y temprana, ocurre antes de la replicación del DNA viral, y para algunos genes, puede proceder sin la necesidad de otras proteínas virales (Richards *et al.*, 1988). Así, se ha detectado expresión de algunos promotores tempranos de AcMNPV en varias líneas celulares no permisivas, incluso de mamíferos y en insectos no específicos (Carbonell *et al.*, 1985; Carbonell y Miller, 1987; Morris y Miller, 1992; Thiem *et al.*, 1996). En cambio, la expresión de los genes de las fases tardía y muy tardía, es dependiente de la replicación del virus y requiere de factores derivados del mismo. De esta manera, la elección de promotores virales muy tardíos para conducir la expresión de genes, como es el caso de las construcciones descritas en este Capítulo, provee una poderosa herramienta para evitar impactos indeseados en especies benéficas de insectos.

La secuencia determinada para el promotor de *p10* de AgMNPV clonado en pAgDUALB, resultó idéntica a la publicada posteriormente en el Gen Bank (Acc # GB: AY055828) en las secuencias críticas para la expresión, las comprendidas entre el sitio TAAG de iniciación de la transcripción y el ATG.

Sin embargo, como puede advertirse en la figura que sigue, que muestra el alineamiento de los promotores de *p10* más relacionados filogenéticamente con AgMNPV, el promotor de AgMNPV determinado por Razuck *et al.*, (2002) y la secuencia que fue clonada en el pAgDUALB con el propósito de conducir la expresión de poliedrina, hay diferencias en las secuencias anteriores al TAAG. Estas diferencias se encuentran en la zona de hibridación del *primer*, es decir que las mutaciones

detectadas pueden ser resultado de la estrategia de PCR implementada para identificar el promotor de *p10*.

```

AgMNPV GB 1 CCAGGCCTCTTTTGTGGGTGGTTGGTATAATTAAGCATTATTAACAAAATATTAGTATA
AgMNPV LP 1 -----CCACGATTTTAATAAGCATTATAACAAAATATTAGTATA
CfMNPV 1 -----TGGCCACACCGTTAATAAGCATTATAACTAATTATTATTATA
OpMNPV 1 -----TTTAATAAGCACTATTA-TAAAATATTATTATA
PnMNPV 1 -----CCACGATTTTAATAAGCATTATCA-TAAAATATTAGTATA

AgMNPV GB TTTATTCAACCATTTC AATATCGTGC 85
AgMNPV LP TTTATTCAACCATTTC AATATCGTGC 67
CfMNPV TTAAGAT-AACAATTTC AATATCATC 69
OpMNPV TTTACCAAAC TGA CTGCAATATCATC 59
PnMNPV TTTACCAAATTCATTGCAATATCATC 66
    
```

Los nucleótidos inmediatamente anteriores el sitio TAAG del promotor de *p10*, podrían jugar algún rol importante en la regulación de este promotor (O'Reilly *et al.*, 1992). La mayoría de los transcritos de *p10* y *polh* analizados hasta la fecha (Kuzio *et al.*, 1999; Fielding y Davidson, 2000; Posse *et al.*, 1990; Scheper *et al.*, 1997; Zuidema *et al.*, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Faktor *et al.*, 1997), han sido mapeados dentro de una secuencia consenso común, ATAAG, que se encuentra en todos los genes tardíos y muy tardíos. Todos los RNAs tardíos y muy tardíos de AcMNPV, el prototipo de los baculovirus, se inician a partir de una secuencia ATAAG. Incluso, estudios realizados mutando esa secuencia consenso a TTAAG y GTAAG, han resultado en RNAs tardíos más débiles (Nissen y Friesen, 1989; Thiem y Miller, 1989; Tomalski *et al.*, 1991).

El resultado de la comparación entre las dos secuencias promotoras del *p10* de AgMNPV fue imprevisto. De acuerdo a la secuencia publicada por Razuck *et al.*, el mRNA de *p10* de AgMNPV se iniciaría en una secuencia TTAAG y no en una ATAAG como nosotros estimamos en base a nuestra detección por PCR. Esto podría tener como consecuencia una deficiente actividad del promotor de *p10* en el pAgDUALB, con la concomitante expresión anómala del gen de poliedrina, ubicado bajo el control de esas regiones regulatorias en el mencionado vector.

**GENERACIÓN DE AgMNPVs DE MAYOR EFICACIA
BIOINSECTICIDA CONTRA UNA PLAGA DE LA SOJA**

CAPÍTULO VI

GENERACIÓN DE AgMNPVs DE MAYOR EFICACIA BIOINSECTICIDA CONTRA UNA PLAGA DE LA SOJA

INTRODUCCIÓN

La aplicación del sistema creado para la modificación del genoma de AgMNPV (Cap. IV) en conjunción con algunas de las construcciones plasmídicas detalladas en el Capítulo V, resultaron en la generación de los recombinantes virales que se presentan en este Capítulo y que constituían el objetivo final de esta Tesis Doctoral.

De esta manera, en los apartados iniciales se describe la producción, detección, purificación y caracterización molecular de los recombinantes obtenidos, rAgMNPVs que expresan una neurotoxina específica de insectos (T_{xp} I) con el propósito de acelerar la velocidad de acción de este entomopatógeno. Asimismo, se presenta la caracterización de la actividad biológica de los rAgMNPV obtenidos.

Una comparación detallada de la acción de los virus recombinantes y silvestres exige estudios de laboratorio posteriores tales como medidas precisas de infectividad, productividad, efectos sobre el comportamiento y estudios histopatológicos de los cadáveres en diferentes estadios larvales de un número estadísticamente significativo de huéspedes susceptibles (Burden *et al.*, 2000). Esta profundización de los estudios ecológicos se encuentra fuera de los alcances del presente proyecto y de la disponibilidad de nuestro laboratorio, equipado principalmente para estudios moleculares. Así, la pretensión de los últimos apartados, es suministrar las evidencias comparativas preliminares que justifiquen el emprendimiento de estudios detallados, en el marco de futuras investigaciones y cooperaciones interdisciplinarias. Es en ese contexto que deben interpretarse los bioensayos presentados, que de todos modos fueron diseñados de acuerdo a la estandarización de este tipo de estudios propuesta por van Beek y Hughes, 1998, y analizados con rigor estadístico.

Los métodos utilizados en estos estudios para administrar las dosis virales a los insectos, pueden dividirse en dos grandes grupos:

- aquellos en que las larvas son continuamente expuestas al inóculo
- los de administración del inóculo durante un periodo discreto de tiempo

En los procedimientos del primer tipo (superficie contaminada e incorporación en dieta), las larvas están expuestas al inóculo durante todo el ensayo. Por consiguiente, la interacción del patógeno con la dieta y el comportamiento alimenticio del insecto influyen en la evaluación de la actividad biológica. Estos métodos, particularmente el de contaminación de superficie sobre hojas de la planta huésped, simulan las condiciones naturales de la interacción patógeno-huésped. De esta manera, constituyen una valiosa herramienta para evaluaciones avanzadas de biopesticidas. Sin embargo, mediante tales ensayos, es imposible determinar cuándo el insecto ha sido infectado, o estimar la dosis recibida. Es decir que no pueden extraerse conclusiones sobre la magnitud de la influencia de la manipulación genética realizada sobre el virus salvaje, sobre la infectividad o la velocidad de acción del virus.

El segundo tipo de ensayos, que incluyen el método de la gota y el de la inyección (ver Cap.II), minimizan o eliminan los efectos del comportamiento alimenticio o la interacción del inóculo con la dieta. El tiempo de adquisición de la infección puede ser fijado en minutos u horas, dependiendo de la técnica usada, y la dosis recibida puede ser estimada directamente por medición del inóculo inyectado o indirectamente por medición del volumen ingerido. Así, este tipo de ensayos permite estimar más apropiadamente los efectos de una manipulación genética sobre la infectividad y/o velocidad de acción de los virus (van Beek y Hughes, 1998). Por lo tanto, para la evaluación comparativa de baculovirus recombinantes, el segundo tipo de ensayo es el recomendado.

La inyección directa representa la forma de administración más precisa (van Beek y Hughes, 1998), siendo el método de elección para la evaluación inicial del éxito de la modificación realizada. Sin embargo, debe considerarse que difiere con la infección natural tanto en el fenotipo de viriones infectantes (brotantes vs. ocluidos) como en la vía de infección, hemocele vs canal alimentario. Por consiguiente, deben realizarse posteriormente los correspondientes ensayos por ingestión, mediante el método de la gota.

RESULTADOS

VI.1 GENERACIÓN DE LOS RECOMBINANTES rAgMNPV/ *tox 34*⁺

En el Capítulo V fueron descritos los vectores pVT-Tox34 y pAg-DUALB, contruidos para transferir el gen *tox 34* al genoma viral parental. De acuerdo a la estructura de dichos plásmidos, como resultado de los eventos de recombinación entre pVT-Tox34 y el DNA viral parental, se obtendrían recombinantes rAgMNPV/ *tox 34*⁺/ *polh*⁻, en tanto que la utilización del pAg-DUALB conduciría a la generación de virus de fenotipo rAgMNPV/ *tox 34*⁺/ *polh*⁺. Para ello, se realizaron cotransfecciones de células UFL-AG-286, con las construcciones plasmídicas y el genoma viral parental.

En un caso, se cotransfectaron células UFL-AG-286 en monocapa a 50% de confluencia con pVT-Tox34 y el DNA viral parental del sistema (AgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻). Fueron ensayadas seis relaciones diferentes de DNA plasmídico-DNA viral. El sobrenadante de las cotransfecciones mencionadas, se colectó a los seis días.

Al momento de generar los AgMNPVs recombinantes infecciosos por ingestión (*polh*⁺), ya se disponía en el laboratorio de un virus parental de segunda generación, derivado del rAgMNPV/*LacZ*⁺/*polh*⁻ que se presentó en el Capítulo IV. El genoma viral parental de segunda generación contiene dos secuencias de reconocimiento para *IPpo I*, de 15 pares de bases, flanqueando el gen *lacZ*. *IPpo I* es una endonucleasa codificada en un intrón, que digiere con una alta especificidad al reconocer las secuencias insertadas. Así, se cotransfectaron las células UFL-AG-286 con el virus parental, previamente linealizado con *IPpo I*, y el pAgDUALB. Mediante esta estrategia, se mejora notablemente la recuperación de recombinantes (los virus parentales linealizados no son viables), dado que se suprime el *background* de progenie viral no derivada de un evento de recombinación. En la **Figura VI.1** se muestra un esquema de la última estrategia y un resumen de las cotransfecciones realizadas con los resultados esperados.

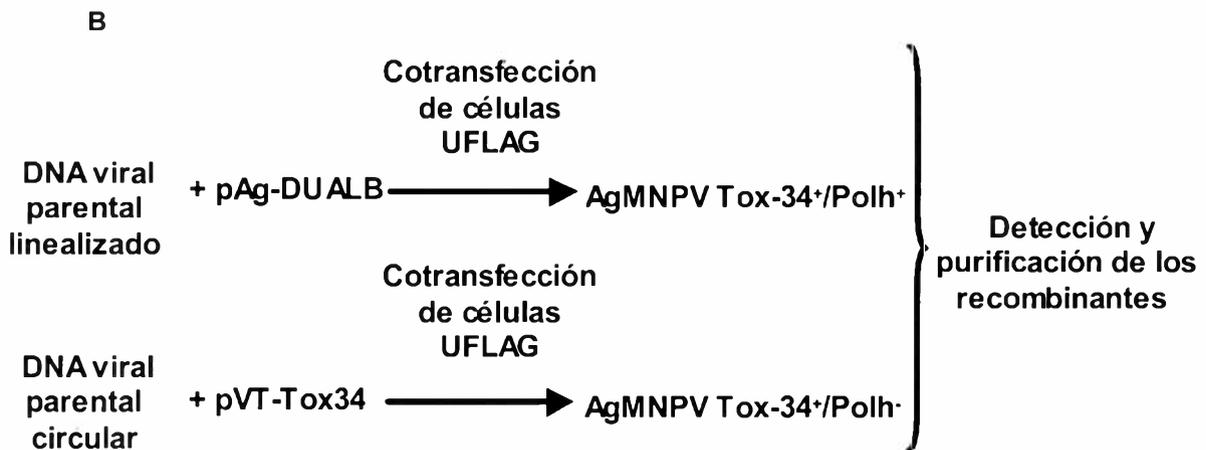
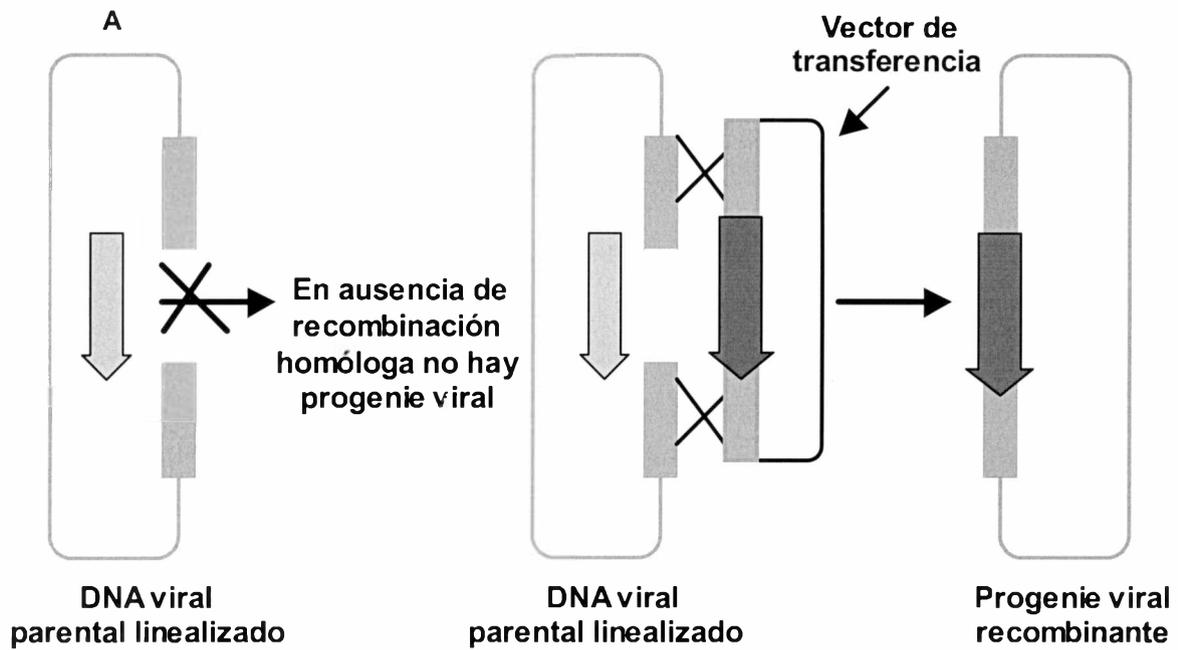


FIG. VI.1. Generación de rAgMNPVs que expresan TxP I. Resumen de las cotransfecciones realizadas. Panel A. Esquema de la estrategia implementada con el fin de disminuir el *background*. Panel B. Resumen de las estrategias de cotransfección ensayadas con el fin de generar los recombinantes con neurotoxicidad específica de insectos.

VI.2 DETECCIÓN GENOTÍPICA DE LOS rAgMNPV/ *tox 34*⁺ EN LOS SOBRENADANTES DE COTRANSFECCIÓN.

El medio de cultivo sobrenadante de los cultivos de células transfectadas, se ensayó por plaqueo (ver ensayo de placas, Cap. II).

En el caso de las cotransfecciones del virus parental de primera generación y el pVT-Tox34, el virus parental representaba una elevada proporción de la progenie viral obtenida, característica de este tipo de experimentos, como ya ha sido señalado oportunamente (ver apartado IV.3). Por el contrario, el sobrenadante resultante de la cotransfección con el DNA viral parental linealizado por digestión y pAg-DUALB, estaba constituido casi exclusivamente por progenie recombinante.

Así, el tratamiento inmediato de los sobrenadantes de los dos tipos de cotransfecciones para la detección de recombinantes, fue diferente.

Las seis muestras resultantes de la cotransfección tradicional, correspondientes a las seis relaciones DNA plasmídico-DNA viral ensayadas, se monitorearon por PCR en forma previa a los ensayos de placas, con el propósito de una identificación instantánea de aquellas con niveles aceptables de progenie recombinante.

Para ello, se utilizaron dos combinaciones de *primers* diferentes. Una de ellas, la de *primers* UPS, (UPS i-UPS f), se usó como control de la reacción PCR y para estimación del nivel de virus parental, dado que amplifica la secuencia *upstream* poliedrina, presente en ambos virus, parental y recombinante, de 650 bp. La otra combinación de *primers* (TOX, TOX i-TOX f) amplifica el marco de lectura del gen de la toxina, presente sólo en el recombinante. Así, en presencia de rAgMNPV/ *tox34*⁺/ *polh*⁺ y los primers TOX, se obtiene un fragmento de 900 bp. A su vez, en presencia de rAgMNPV/ *LacZ*⁺ (virus parental) y la última combinación de oligonucleótidos, no se obtiene producto de la reacción de PCR. Con respecto a los DNAs moldes de la reacción, se utilizaron alícuotas de amplificaciones de los sobrenadantes de cotransfección, luego del tratamiento que se describe en el Capítulo II para este tipo de muestras.

El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización	94 °C	2 min	
<hr/>			
Desnaturalización	92 °C	10 segundos	
Hibridación	50 °C	10 segundos	35 ciclos
Extension	72 °C	1 minuto	
<hr/>			
Extension final	72 °C	3 minutos	

El resultado (**Figura VI.2.**) demostró que, de los seis especímenes recolectados, dos resultaron positivos para el rAgMNPV/ *tox⁺/ polh⁻*. Las demás amplificaciones demostraron al parental como única población viral presente.

Por consiguiente, de las seis relaciones DNA viral-DNA plasmídico ensayadas para la cotransfección con el virus parental de primera generación, en cuatro de ellas la recombinación homóloga habría ocurrido a niveles por debajo de la sensibilidad del ensayo de PCR o nulos.

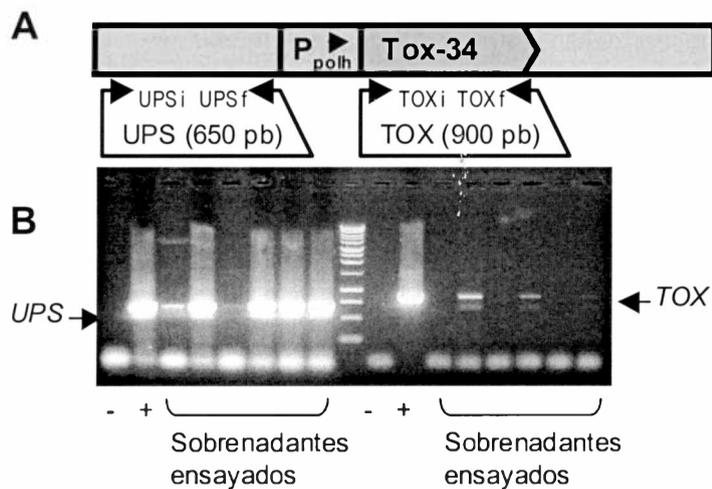


FIG. VI.2. Análisis por PCR de los sobrenadantes de cotransfección. Panel A: Esquema de la región genómica viral recombinante. Se señalan los sitios de hibridación de las combinaciones de *primers* y los tamaños de los fragmentos de amplificación esperados. **Panel B: Electroforesis en gel de agarosa, 1%, TAE 1X.** Señalados con flechas los productos de amplificación. (-) corresponde a los controles negativos de las correspondientes PCRs. (+) corresponde a los controles positivos (pVT-Tox34 sirvió de molde). Marcador de peso molecular 1 kb (0,5kb; 0,75kb; 1kb; 1,5 kb; 2kb; 2,5 kb; 3kb; 4kb; 5kb; 6kb; 8kb; 10kb).

De esta manera, sólo se realizaron ensayos de placas para la detección de los recombinantes rAgMNPV/ *tox⁺/ lacZ⁻/ polh⁻*, con los sobrenadantes de cotransfección confirmados como positivos por PCR.

Por último, como resultado del ensayo con el virus parental de segunda generación se esperaba una eficiencia mayor en la recuperación de recombinantes. Así, la muestra

colectada de la única relación de DNAs transfectada, fue diluída directamente para los posteriores ensayos de placa.

VI.3 ENSAYO DE PLACAS PARA LA DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS RECOMBINANTES TÓXICOS.

La detección fenotípica y purificación de los recombinantes rAgMNPV/ *tox-34*⁺, fue realizada mediante ensayos de placas con los sobrenadantes de cotransfección, utilizando X-Gal para favorecer la identificación del fenotipo buscado (*lacZ*⁻/*polh*⁻ y *lacZ*⁺/*polh*⁺, según correspondiera) a través de la selección de placas blancas.

Como era de esperar, en el caso de los sobrenadantes de las cotransfecciones realizadas con el virus parental de primera generación, se detectaron placas blancas mezcladas con un gran exceso de placas azules. De acuerdo con la literatura, en este tipo de ensayos, el virus recombinante representa 0.2% - 1% de la población viral resultante de la cotransfección (O'Reilly *et al.*, 1992).

Con respecto al ensayo de placas realizado con el sobrenadante de la cotransfección correspondiente al virus parental de segunda generación, la recuperación de placas azules fue mínima (sólo dos en la menor dilución, probablemente debido a DNA parental sin digerir al momento de la cotransfección), confirmando el éxito de la estrategia de la implementación del genoma parental linealizado para maximizar la recuperación de recombinantes (Kitts y Posse, 1993).

Con el fin de purificar los recombinantes generados, fueron elegidas de las mayores diluciones plaqueadas para los respectivos sobrenadantes, por lo menos diez placas blancas. Los tacos de agarosa correspondientes a las placas escogidas se aspiraron con pipeta Pasteur descartable y se resuspendieron en medio de cultivo libre de suero fetal bovino (ver Cap. II).

Cada suspensión se sometió a dos rondas sucesivas del mismo tipo de ensayo de placas. En la foto de la **Figura VI.3.** se muestra una placa de Petri correspondiente al segundo plaqueo de una suspensión derivada de la cotransfección del pAg-DUALB y el DNA viral parental linealizado.

Por el contrario, los plaqueos de las suspensiones de las placas *lacZ*⁻/*polh*⁻, derivadas de la cotransfección del pVT-Tox34 y el DNA viral parental de primera generación, como se indicó en **VI.1**, aún presentaban un exceso de placas *lacZ*⁺/*polh*⁻, indicativas de la presencia de virus parental contaminante. En consecuencia, fue necesario continuar realizando sucesivos ensayos de placa con dichas suspensiones.

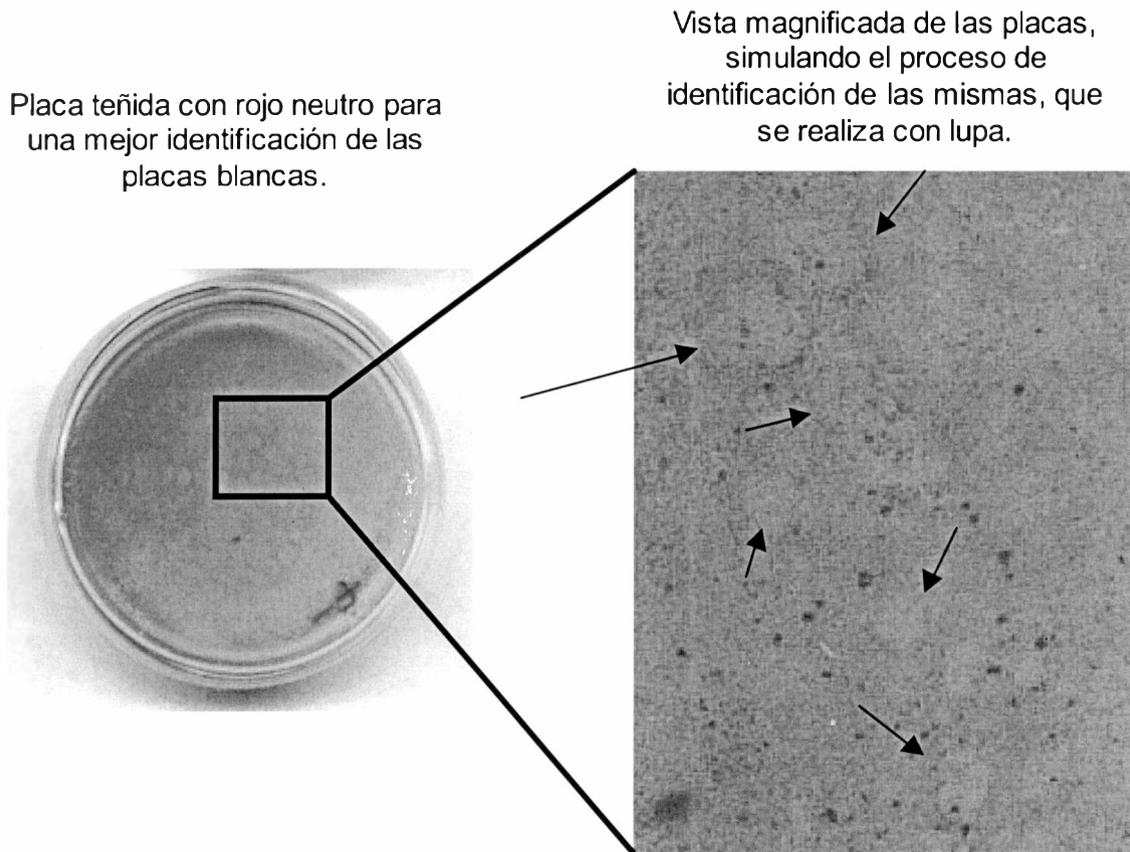


FIG. V.5. Etapa final de los ensayos de placa para la Purificación del rAgMNPV/tox⁺/polh⁻. Apariencia de las placas en las etapas finales de la purificación del recombinante. En el laboratorio, la identificación de las placas se realiza bajo lupa. Así, a la derecha se ha magnificado una de las zonas de la monocapa, con el fin de evidenciar la metodología utilizada para la selección de las placas. Se señalan con flechas potenciales placas de infección.

VI.4 ANÁLISIS POR PCR DE LOS RECOMBINANTES rAgMNPV/ *tox 34*⁺/*polh*⁺

PURIFICADOS.

Los aislamientos *lacZ*/*polh*⁺ obtenidos como se describió en el apartado anterior, fueron posteriormente analizados por PCR. Como DNAs moldes de la reacción, se utilizaron alícuotas de las suspensiones de los tacos de agarosa, luego del tratamiento que se describe en el Capítulo II para este tipo de muestras.

Con el propósito de confirmar simultáneamente la presencia y la estructura correcta de los potenciales recombinantes en las muestras escogidas, utilizamos para las reacciones de PCR, cuatro combinaciones de *primers* diferentes. Una de ellas, la de *primers* TOX, amplifica el marco de lectura del gen Tox-34, presente sólo en el recombinante tóxico. Así, en presencia de rAgMNPV/ *tox34*⁺/*polh*⁺ y los *primers* TOX, se obtiene un fragmento de 900 bp. A su vez, en presencia de rAgMNPV/ *LacZ*⁺/*polh*⁻ (virus parental) y la misma combinación de oligonucleótidos, no se obtiene producto de amplificación. Por otra parte, se usó como control positivo de la preparación de DNA molde, la combinación de *primers* UPS (apartados IV.4 y VI.2).

Un evento de recombinación inesperado, con la inserción de Tox-34 en otra porción del genoma (Tox-34 está flanqueado por secuencias regulatorias de *polh* y de *p10* en el pAgDUALB), daría por resultado la amplificación esperada para la combinación de oligonucleótidos Tox. Por consiguiente, incluimos para cada molde dos PCRs adicionales, con el fin de identificar aquellos aislamientos recombinantes de estructura potencialmente correcta, para proceder a su amplificación. La combinación de *primers* Ppolh_I-Tox_R amplifica el marco abierto de lectura de Tox-34 y el promotor de *polh*, ubicado *upstream* dicho gen en el recombinante esperado. Asimismo, agregamos otra combinación de *primers*, Pp10_I-Phn_R, que amplifica el promotor del gen que codifica para p10 y parte del marco abierto de lectura del gen *polh*, ubicado *downstream* dicho promotor en el recombinante esperado. Así, en el caso de un aislamiento elegido de estructura correcta, deberían obtenerse productos de amplificación de las dos últimas reacciones de PCR descritas, de 1050 pb y 534 pb respectivamente. En la **Figura V.3a y V.3b**, se muestran los resultados obtenidos con el aislamiento escogido y un esquema de los sitios de hibridación de todos los oligonucleótidos mencionados anteriormente.

El programa de ciclado empleado se muestra en la página que sigue.

Desnaturalización	94 °C	2 min
-------------------	-------	-------

Desnaturalización	92 °C	10 segundos
-------------------	-------	-------------

Hibridación	50 °C	10 segundos	35 ciclos
Extension	72 °C	1 minuto	
Extension final	72 °C	3 minutos	

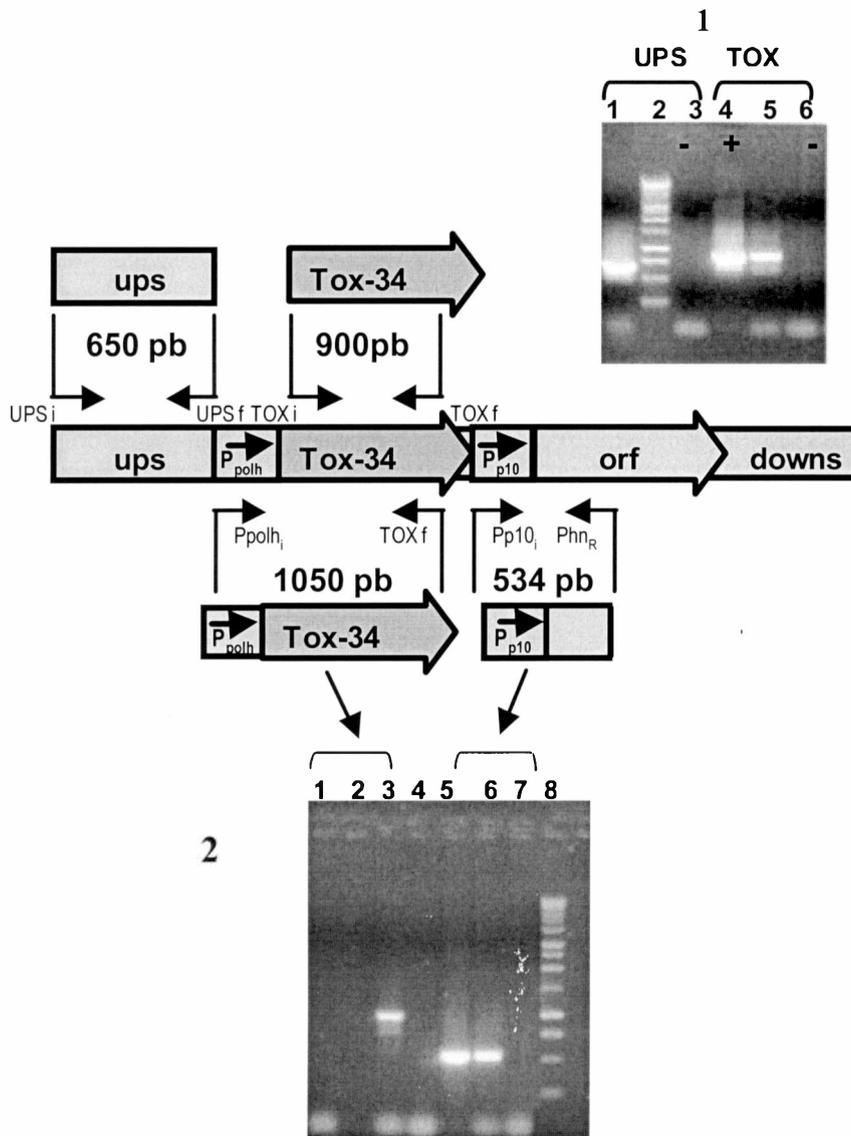


Figura VI.13. Análisis por PCR de los sobrenadantes de cotransfección.

Esquema de la región genómica viral recombinante. Se señalan los sitios de hibridación de las combinaciones de primers y los tamaños de los fragmentos de amplificación esperados. **Panel 1: Electroforesis en gel de agarosa, 1%, TAE 1X.** (-) corresponde a los controles negativos de las correspondientes PCRs. (+) corresponde a los controles positivos (pAg-DUALB sirvió de molde). Las calles 1 y 5 corresponden a las reacciones sobre el molde a ensayar. Marcador de peso molecular 1 kb (0,25kb, 0,5kb; 0,75kb; 1kb; 1,5 kb; 2kb; 2,5 kb; 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 8kb, 10kb).

Panel 2: Electroforesis en gel de agarosa, 1%, TAE 1X. Calle 1: control (-) de la PCR realizada con los primers Ppolh_i-Tox_R; Calle 3: producto de amplificación de 1050 pb obtenido con Ppolh_i-Tox_R sobre el molde a ensayar. Calle 4: control (-) de la PCR realizada con los primers Pp10_i-Phn_R. Calle 5: control (+) de la PCR realizada con los primers Pp10_i-Phn_R (pAg-DUALB sirvió de molde). Calle 6: producto de 534 pb, de la PCR realizada con los primers Pp10_i-Phn_R sobre el molde a ensayar. Calle 7: marcador de peso molecular 1 kb (0,25kb, 0,5kb; 0,75kb; 1kb; 1,5 kb; 2kb; 2,5 kb; 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 8kb, 10kb).

VI.5 GENERACIÓN DEL INÓCULO DE TRABAJO Y CONFIRMACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÓMICA DE LOS RECOMBINANTES.

Con el fin de progresar en la caracterización molecular de los recombinantes generados e iniciar los ensayos biológicos, se generaron inóculos de trabajo, a partir de tres aislamientos rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺*, de estructura potencialmente correcta conforme con los resultados de la PCR. Con los tres aislamientos se realizó el procedimiento que se describe a continuación.

Se infectó una monocapa de células UFL-AG-286 al 50 % de confluencia en una caja de 35 mm, con 500 μ l de la suspensión del taco de agarosa proveniente de la última ronda del ensayo de placas. Transcurrida la hora de agitación con el inóculo, se completó a 2 ml finales con TC-100 completo (ver Capítulo II para los detalles de la infección). Los 2 ml colectados a los 5 días, se denominaron pasaje 1, para cada aislamiento. Posteriormente, se tomó 1 ml del pasaje 1, se llevó a 4 ml con medio de cultivo completo, y se infectaron cuatro placas de 100mm. Transcurrida la hora de agitación con el inóculo, se completó a 10 ml finales con TC-100 completo en cada caja. Los 40 ml colectados a los 5 días se denominaron pasaje 2. A partir de este pasaje preparamos *stocks* de trabajo, mediante la infección de placas de 100 mm con una MOI de 0,1.

Los *stocks* de trabajo de los recombinantes fueron titulados por dilución terminal. Simultáneamente, se retituló el virus silvestre. Los resultados se muestran en la Tabla que sigue, luego de la conversión de TCID₅₀ a pfu, de acuerdo a O'Reilly *et al.*, 1992. Con rAgMNPV se designan los recombinantes rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺*, seguidos de un número que se deriva de la purificación y que identifica los diferentes clones virales.

	Stock viral	Título
Tabla I	AgMNPV salvaje	6x10 ⁸ pfu/ml
	rAgMNPV 433134	9x10 ⁹ pfu/ml
	rAgMNPV 433141	1,5x10 ⁹ pfu/ml
	rAgMNPV 413134	9x10 ⁸ pfu/ml

El *stock* de trabajo del clon rAgMNPV 433134 (la elección fue arbitraria, sólo basada en el mayor título exhibido por dicho clon) se utilizó para infectar células UFL-AG-286 con una multiplicidad de infección de 1 pfu por célula. El sobrenadante de infección fue recolectado con el propósito de aislar DNA del recombinante viral. El material obtenido fue digerido con EcoRI. El patrón de restricción predicho para esa digestión (ver la

Tabla de **Figura VI.4**) fue comparado con el resultado obtenido (Figura **VI.4**). De esta manera, se confirmó la estructura correcta del genoma del virus recombinante.

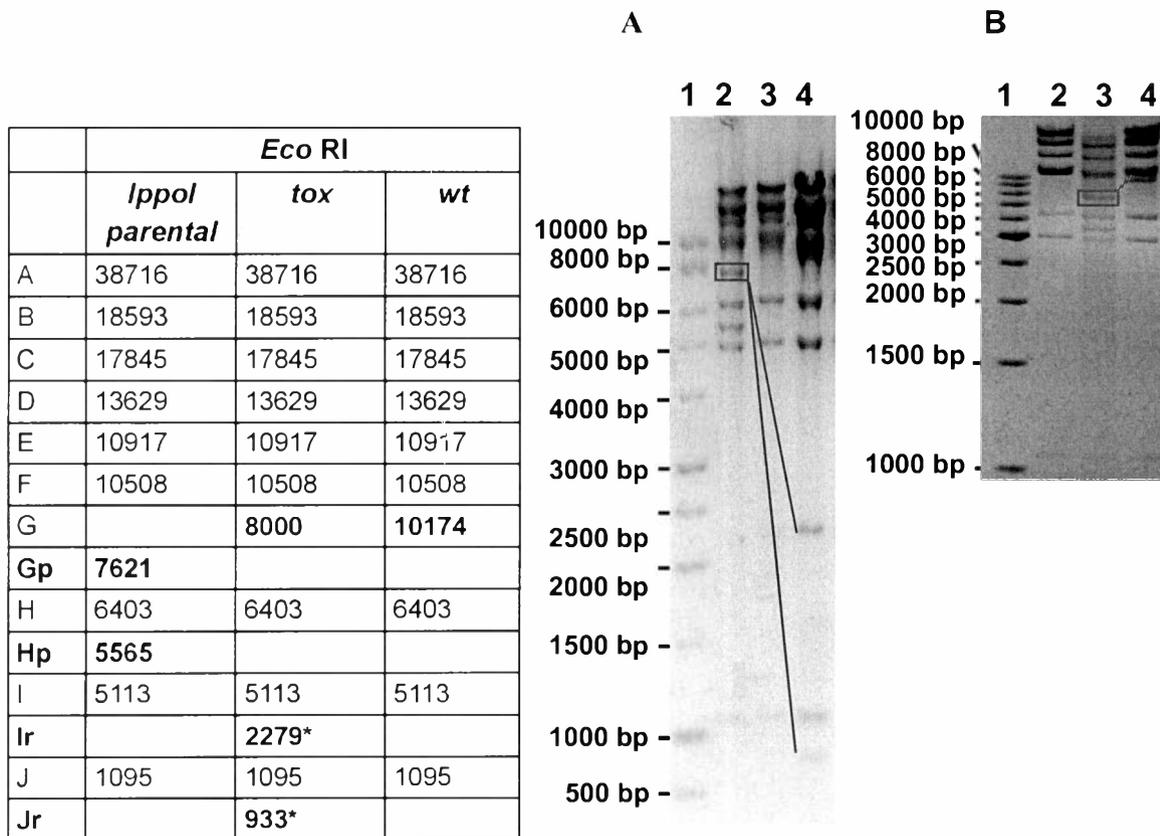


FIG. VI.4. Análisis por patrón de Restricción de *Eco*R I. En la Tabla, los fragmentos de restricción previstos para el virus *wild type* (*wt*), parental de segunda generación (*lppol* parental) y recombinante rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺*, deducidos en base a las modificaciones realizadas al genoma *wild type*. Los fragmentos indicados en negrita, que contienen el locus *lacZ* en el caso del virus parental o *polh* en el caso del virus *wild type*, son alterados luego de la recombinación homóloga con la construcción pAgDUALB. Así, en el producto de dicha recombinación se generan los fragmentos de DNA señalados con asteriscos (*).

Electroforesis en gel de agarosa, 0,6%, TAE 1X. El patrón de restricción está separado en dos paneles, dado que las calles fueron sobrecargadas en el gel del panel A con el fin de alcanzar la visualización de los fragmentos de restricción más pequeños. Como en tales condiciones se dificulta la resolución de los fragmentos de mayor tamaño, éstos se muestran en el gel del panel B.

Panel A: Calle 1, marcador de peso molecular 1 kb (0,5kb; 1kb; 1,5 kb; 2kb; 2,5 kb; 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 8kb, 10kb); calle 2, fragmentos de la digestión del virus parental de segunda generación con *Eco*R I, recuadrada, la banda de 5565 pb (Hp) que se descompone en el virus resultante de la recombinación, en dos bandas más pequeñas. Calle 3, fragmentos de la digestión del virus salvaje con *Eco*R I; calle 4, fragmentos de la digestión del virus rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺* con *Eco*R I. Señalados, los fragmentos producto del fragmento Hp del virus parental.

Panel B: Calle 1, marcador de peso molecular 1 kb (1kb; 1,5 kb; 2kb; 2,5 kb; 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 8kb, 10kb); calle 2, fragmentos de la digestión del virus salvaje con *Eco*R I; calle 3, fragmentos de la digestión del virus parental de segunda generación con *Eco*R I, recuadrado, el fragmento de 7621 pb (Gp) que se descompone en el virus resultante de la recombinación, en una banda de mayor tamaño; calle 4, fragmentos de la digestión del virus rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺* con *Eco*R I. Señalado, el fragmento producto del fragmento Gp del virus parental.

VI.7 CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN BIOLÓGICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES EN LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis*.

Una vez finalizada la caracterización fenotípica y genética del rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺* generado, por su aspecto en ensayos de placa, por PCR y patrón de restricción, se procedió a la evaluación de su actividad sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*.

Este ensayo preliminar con insectos obedeció a una serie de aspectos que era necesario analizar en forma previa a un estudio más detallado de las propiedades del rAgMNPV y a la evaluación de su velocidad de acción. En primer lugar, aparecía como la forma más directa de evaluar la expresión y actividad biológica de Txp I. Además, si bien según la bibliografía existente, Txp I exhibiría una acción efectiva en insectos sin demasiada especificidad con respecto al huésped (Tomalski *et al.*; 1989), nunca había sido probado en larvas de *Anticarsia gemmatalis*. No era una cuestión menor, dado que así como este tipo de toxinas discriminan entre vertebrados e invertebrados, también son capaces de hacerlo entre diferentes grupos de artrópodos. Por último, y en relación a la última observación, debía analizarse asimismo, si la infección viral simultánea a la expresión de la proteína insecticida, afectaba de alguna forma la susceptibilidad del insecto a la toxina.

Así, se inyectaron larvas de *Anticarsia gemmatalis* de segundo y cuarto estadio con 4×10^6 pfus de los stocks virales de AgMNPV silvestre, AgMNPV/ *lac Z⁺/ polh⁻* y AgMNPV/ *tox-34⁺/ polh⁺*. Las larvas inyectadas con medio de cultivo sirvieron como control negativo del experimento.

Se realizaron observaciones esporádicas a partir de las 24 hs p.i.

A las 24 hs p.i. no se detectaron diferencias de comportamiento entre las larvas de los distintos tratamientos. Sin embargo, a las 27 hs p.i., la presencia de larvas completamente paralizadas entre aquellas a las cuales se les había inyectado el AgMNPV/ *tox-34⁺/ polh⁺*, confirmó no sólo la expresión y actividad biológica de Txp I, sino también la susceptibilidad de la especie a la proteína. Asimismo, constituyó una indicación preliminar de la efectividad de la modificación introducida al genoma viral en cuanto al aumento de la velocidad de acción del patógeno, dado que a esa altura no se detectaron signos de infección ni otro tipo de manifestaciones en cuanto a comportamiento, que diferenciaron las larvas inyectadas con las demás poblaciones virales de los controles negativos.

En cuanto a los síntomas presentados por los insectos sometidos a la acción del AgMNPV/ *tox-34⁺/ polh⁺*, en las dos horas previas al establecimiento de la parálisis completa, se observó una menor movilidad con respecto a los controles (negativos y de infección silvestre) y la aparición de contracciones espasmódicas locales, que

posteriormente progresaron hacia contracción de toda la pared del cuerpo de las larvas, con la consecuente inmovilidad total en el término de un par de horas.

Entre el segundo y el tercer día post infección, la totalidad de las larvas infectadas con el recombinante tóxico estaba paralizada, mientras que los insectos correspondientes a los demás tratamientos parecían evolucionar en forma similar a los controles negativos de infección. El cuarto día post infección se registraron las primeras muertes de larvas tratadas con el AgMNPV/ *lac Z*⁺/ *polh*⁻ y con el virus silvestre. El porcentaje de larvas muertas con el AgMNPV/ *lac Z*⁺/ *polh*⁻, al cuarto día post infección, fue sensiblemente mayor al observado en larvas infectadas con el virus silvestre. Aunque no resulten claras las razones, esta observación está de acuerdo con informes previos relativos a la detección de una mayor toxicidad de recombinantes rAcMNPV/ *Lac*⁺ con respecto al AcMNPV salvaje (Hughes *et al*, 1997).

En las fotos de la **Figura VI.5**, se evidencian las patologías bien diferenciadas, asociadas a las infecciones producidas por las distintas poblaciones. Como se ha señalado en la Introducción general, el efecto final de la infección del virus silvestre es un daño tisular masivo. Por consiguiente, los cadáveres resultantes de dicha infección presentaron una coloración blanquecina, producto de la acumulación de poliedros, y una apariencia flácida, como consecuencia del inicio de la licuefacción de las larvas. En contraste, los cadáveres producto de la infección con el AgMNPV/ *tox-34*⁺/ *polh*⁺, conservaron su integridad estructural, permanecieron rígidos, ligeramente arqueados debido a la contracción muscular y adquirieron una coloración negra característica, probablemente debido a la melanización de la cutícula. Por su parte, los cadáveres de las larvas infectadas con el AgMNPV/ *lac Z*⁺/ *polh*⁻, resultaron similares a los de la infección silvestre, pero sin la coloración blanquecina, característica de la presencia de poliedros.

Con respecto a la pigmentación que adquieren los cadáveres de las larvas infectadas con el AgMNPV/ *tox-34*⁺/ *polh*⁺, su progresión se observa en la **Figura VI.6**. Una vez completamente paralizadas, las larvas mueren en el curso de unas horas, cuando se agotan sus reservas metabólicas. La aparición de la cutícula melanizada ocurrió luego de la muerte de los insectos. Se inició en forma de aro, aparentemente alrededor del sitio de inyección, en la región media de las larvas. Luego se extendió paulatinamente hacia la cabeza y por último, a todo el cadáver.

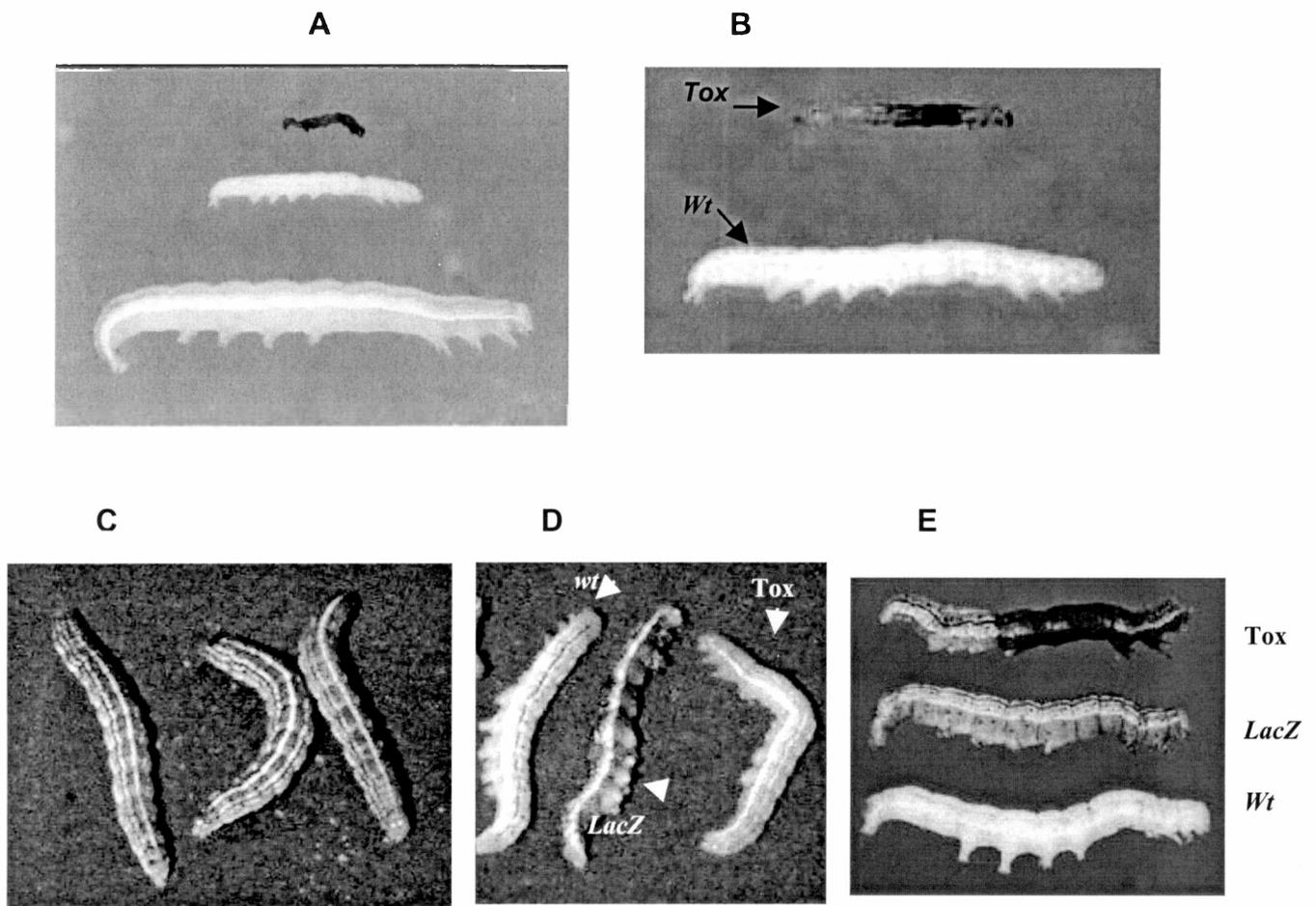


FIG. VI.5. Histopatología producida por los distintos fenotipos AgMNPV en larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Panel A: Patología y Evaluación comparativa de la velocidad de acción. Se muestran tres larvas del segundo estadio, infectadas por ingestión con los inóculos que se indican con flechas. *Tox* para el rAgMNPV que expresa TxP I; *wt* para el AgMNPV salvaje y SI, el control sin infectar. Se evidencian los distintos estadios de desarrollo que alcanzaron las larvas sometidas a los distintos tratamientos. La fotografía se tomó al día 5 de la administración del inóculo. El cadáver de la larva tratada con rAgMNPV tenía 3 días, de ahí su completa melanización, el control se encontraba saludable y el deceso de la larva tratada con AgMNPV *wt* había ocurrido en la hora previa. **Panel B: Aspecto del cadáver de Ag tratada con AgMNPV *wt* y rAgMNPV (*tox*).** Se manifiestan en la fotografía las diferencias en cuanto a la patología producida por un fenotipo viral y el otro. En el caso del cadáver rígido de la larva tratada con rAgMNPV se observa el inicio de la extensión de la melanización, con la conservación de la coloración propia de la larva en las zonas del cuerpo que no han sido aún alcanzadas por el fenómeno, en tanto que el cadáver de la larva tratada con el virus salvaje, exhibe una coloración blanquizca y un aspecto flácido como consecuencia de la acumulación de poliedros. La fotografía corresponde a un ensayo en larvas del cuarto estadio infectadas por inyección. **Panel C y D: Observaciones complementarias.** La fotografía corresponde a un ensayo por inyección en larvas del cuarto estadio. En el panel C se muestran larvas control al quinto día de la inoculación, saludables. En el panel D, aspecto de larvas infectadas con los distintos fenotipos virales, que se indican con flechas en la figura. En la larva infectada con el rAgMNPV se evidencia claramente el arqueamiento producido por la contracción muscular masiva y el inicio de la melanización en la región media. Al momento de la fotografía, se encontraba muerta. Sus características están en contraste con las de los otros dos insectos. Se evidencia la diferencia de color entre la larva afectada por AgMNPV salvaje (*polh⁺*) y el AgMNPV parental del sistema (*polh⁻/ LacZ⁺*). Al momento de la fotografía, estas larvas aún estaban vivas, aunque denotaban signos de infección claros, como el entecimiento de sus movimientos. **Panel E: Características macroscópicas de los cadáveres.** Los cadáveres resultantes de la infección con AgMNPV *wild type* y AgMNPV parental del sistema (*polh⁻/ LacZ⁺*) se presentan flácidos. La coloración difiere entre ellos (mencionado más arriba). Asimismo, difiere con la del cadáver producto de la infección con rAgMNPV, que presenta una melanización avanzada, denotando la diferencia entre el tiempo de muerte provocado por este virus y los virus *wt* y *LacZ*.

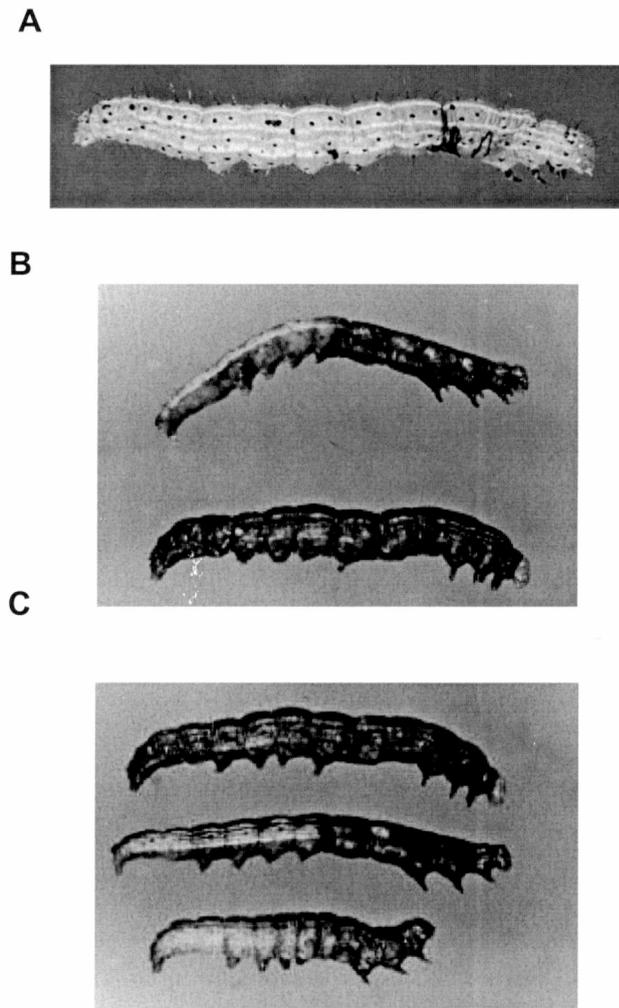


Figura VI.6. Evolución de la melanización en cadáveres de larvas infectadas por rAgMNPV/ tox 34⁺/ polh⁻. **Panel A: Inicio del proceso.** Visión magnificada del cadáver de una larva inyectada con rAgMNPV/ tox 34⁺/ polh⁻. Se indica con una flecha el aro de iniciación de la melanización, aparentemente en los alrededores del sitio de inyección, que no se manifiesta en las inyecciones de los fenotipos alternativos. **Paneles B y C:** las fotos corresponden a cadáveres de larvas inyectadas en el cuarto estadio, a distintos tiempos *post-mortem*. Como se indicó en el texto, el proceso avanza desde la parte media de la larva hacia la parte superior, para luego expandirse por todo el cuerpo. Asimismo, a medida que transcurre el tiempo, la contracción generalizada se va debilitando. En el panel C, el cadáver que presenta melanización sólo en la mitad superior, aún presenta el arco característico de la contracción total, que ya no es tan evidente en aquellos que ya se han melanizado completamente.

MICROSCOPIA ÓPTICA. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE POLIEDRINA EN CULTIVOS CELULARES.

Una vez comprobada la actividad biológica del recombinante generado, encaramos un estudio más detallado de su comportamiento.

Con el propósito de evaluar comparativamente la producción de poliedros recombinantes con respecto a los del virus silvestre, en el cual la poliedrina se expresa bajo el control de su propio promotor, con todas sus potenciales regiones regulatorias *upstream*, infectamos cultivos de células UFL-AG 286 con ambos virus a igual multiplicidad de infección (0,1 pfu/célula).

La **Figura VI.7** muestra una microscopía óptica de tales infecciones. Si bien observamos presencia de poliedros en las dos infecciones, advertimos una menor cantidad de cuerpos de oclusión en los cultivos infectados por el rAgMNPV/ *Tox-34⁺/polh⁺* (menos de diez poliedros por núcleo) con respecto a la cantidad observada en aquellos infectados por el virus silvestre. Asimismo, los cuerpos de inclusión recombinantes resultaron mucho más heterogéneos, en morfología y tamaño, en comparación con los silvestres.

Con el fin de comprobar la observación más arriba señalada, en cuanto a la menor cantidad de poliedros producida por el recombinante, purificamos los poliedros producto de ambas infecciones. La producción del cultivo infectado por AgMNPV silvestre fue de $2,5 \times 10^6$ poliedros/ml, en tanto que la del cultivo inoculado con rAgMNPV/ *Tox-34⁺/polh⁺* resultó de $6,0 \times 10^5$ poliedros/ml.

De cualquier manera, el recuento de los poliedros recombinantes no pudo realizarse en forma precisa, como consecuencia de la diversidad de tamaños exhibida por los cuerpos de inclusión y su tendencia a agregarse. Se observaron cristales enteros de un tamaño equivalente a tres veces el de un cuerpo de oclusión normal (se señala un ejemplo en la **Figura VI.7**). Asimismo, se observaron cristales muy pequeños, con tendencia a amontonarse con cristales de tamaño similar, formando masas informes con apariencia de grandes grumos, cuya morfología se estudió luego mediante microscopio electrónico. Estas características son similares a las descritas para los 'mutantes en la formación de poliedros' (PFM, *polyhedra formation mutants*) (Lua *et al.*, 2002; Katsuma *et al.*, 1999a; Katsuma *et al.*, 1999b; Slavicek *et al.*, 1998; Bischoff y Slavicek, 1997; Harrison y Summers, 1995). Es posible que este fenotipo se deba, en parte, a que la expresión de poliedrina en el rAgMNPV/ *Tox-34⁺/polh⁺* generado, está bajo el control del promotor de *p10*. Se indicó oportunamente en el Capítulo V, que detectamos diferencias en la secuencia de dicho promotor en las nucleótidos anteriores a la posición -54, con respecto a la secuencia publicada por Razuck *et al.*; 2002.

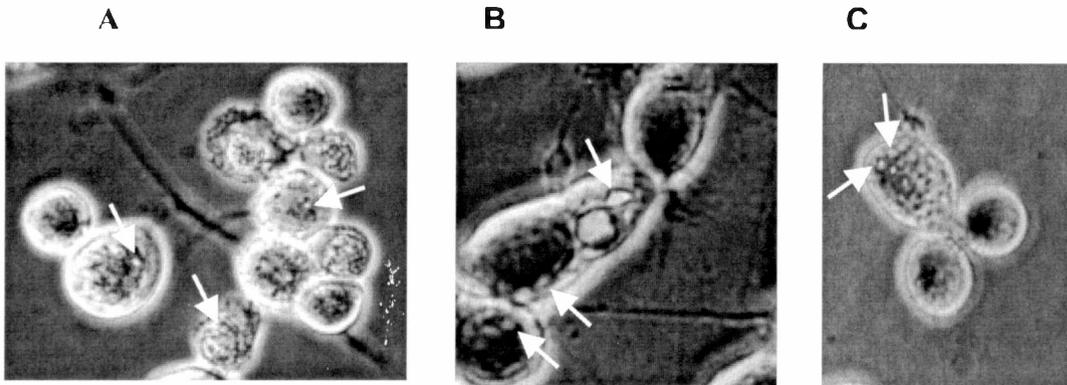


FIG. VI.7. Microscopía óptica de células UFL-AG-286 infectadas con AgMNPV salvaje y recombinante. Panel A: Infección con AgMNPV salvaje. Se observan poliedros de tamaño regular localizados en el núcleo aún íntegro (indicados con flechas, sólo algunos). **Panel B y C: Infección con AgMNPV recombinante.** Poliedros de tamaño irregular, en el panel B se indica un cuerpo de inclusión anormalmente desarrollado, en tanto se observan otros más pequeños anormalmente dispuestos en el borde de la membrana nuclear. En el panel C, otro campo de la misma infección, con poliedros de morfología aparentemente normal, la membrana nuclear ya se ha desintegrado y la célula se lizará próximamente.

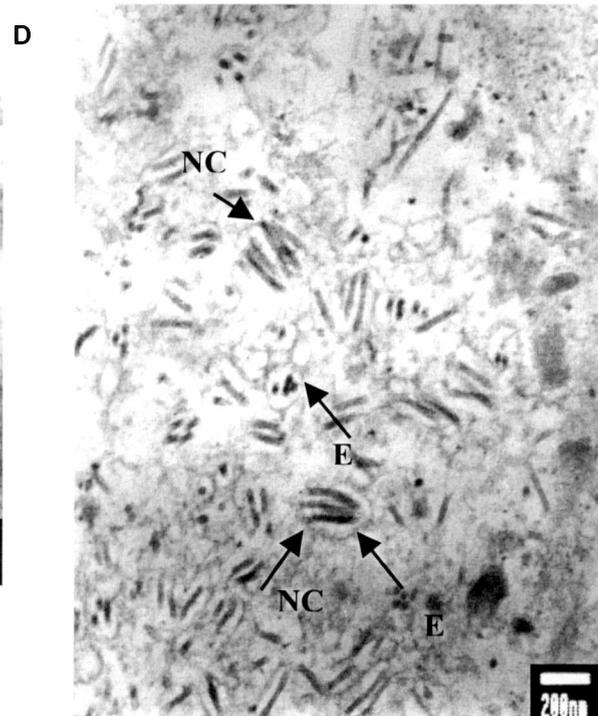
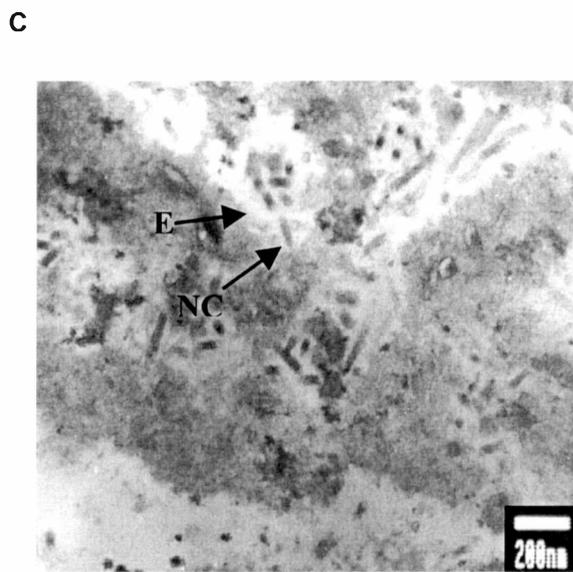
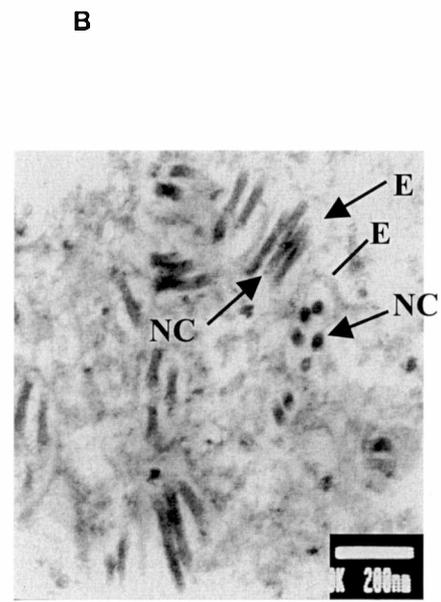
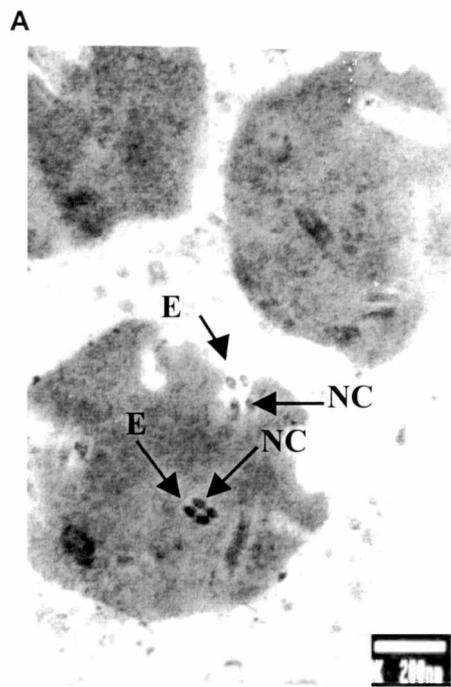
VI.8 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LOS POLIEDROS RECOMBINANTES Y SILVESTRES.

Con el fin de examinar tanto las diferencias evidenciadas por microscopía óptica entre los poliedros recombinantes y los silvestres con mayor detalle, como la presencia o ausencia de nucleocápsides virales en los cuerpos de oclusión recombinantes, se estudiaron las preparaciones al microscopio electrónico de barrido y de transmisión.

Mediante microscopía de transmisión verificamos la presencia de nucleocápsides envueltas, en los poliedros producidos por el AgMNPV/ *tox-34⁺/ polh⁺* (ver **Figura VI.8**). Asimismo, resultó clara la alteración morfológica y de tamaño de los cuerpos de oclusión mutantes en comparación con los poliedros silvestres (ver **Figura VI.8**). Mientras estos últimos presentaban un borde regular, no pudo detectarse un límite neto en los poliedros mutantes. Para revisar esta última apreciación, se iniciaron una serie de observaciones, disminuyendo sucesivamente el aumento utilizado, hasta la detección de la envoltura del poliedro mutante (paneles C, D, E y F de la **Figura VI.8**).

Así, el tamaño estimado para los poliedros silvestres, fue de 0,6-0,8 μm de diámetro transversal, en tanto que para los recombinantes advertimos cuerpos de oclusión de hasta 6 μm de sección transversal. Sin embargo, como se desprende del análisis de las fotos de la **Figura VI.8**, no es posible diferenciar claramente, en el caso de los poliedros mutantes, si las observaciones corresponden a un conjunto de cristales pequeños o a verdaderos poliedros de gran tamaño. Es clara la menor densidad electrónica en los poliedros recombinantes. No obstante, es evidente en el panel F de la **Figura VI.8**, la presencia de la envoltura del poliedro.

Con el microscopio de barrido, las preparaciones de los poliedros mutantes se observaron como grandes masas amorfas, aparentemente generadas por una agregación de varias unidades de cristalización más pequeñas, que exhibían diversidad de formas y tamaños (**Figura VI.9**), como si hubiesen crecido simultáneamente, de manera independiente unas de otras. Es posible advertir algunas cavidades en la superficie de algunos cuerpos de oclusión que corresponderían al desprendimiento de nucleocápsides y sería indicativo de una pobre asociación entre el cristal y los viriones.



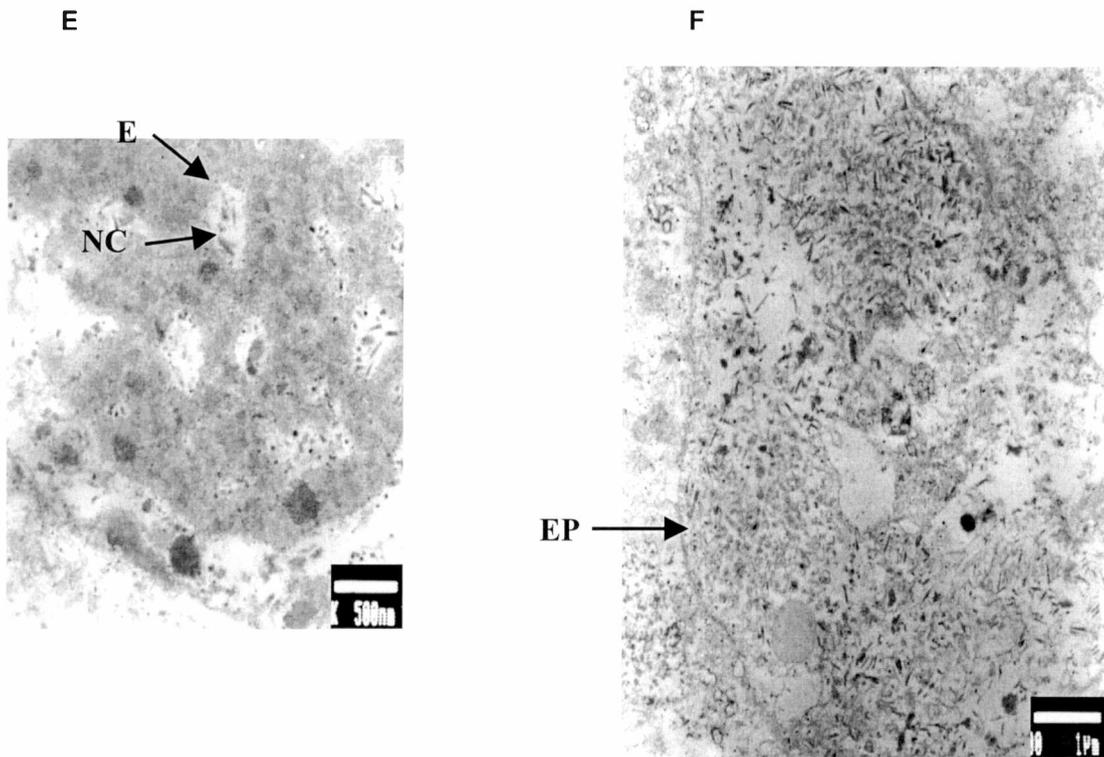


FIG. VI.8. Microscopía electrónica de transmisión de poliedros purificados de células UFL-AG-286 infectadas con AgMNPV salvaje y recombinante.. **Panel A:** Cuerpos de oclusión de AgMNPV salvaje 40x. Se indican algunas nucleocápsides (NC) con sus respectivas envolturas (E). **Panel B:** cuerpos de oclusión de AgMNPV recombinante 40x. **Paneles C y D:** cuerpos de oclusión de AgMNPV recombinante observados con aumento 25x. **Panel E:** cuerpos de oclusión de AgMNPV recombinante observados con aumento 15x. **Panel F:** cuerpos de oclusión de AgMNPV recombinante observados con aumento 0x. Indicada con flecha, la envoltura del poliedro (EP). La barra blanca sobre el fondo negro indica el tamaño de la escala.

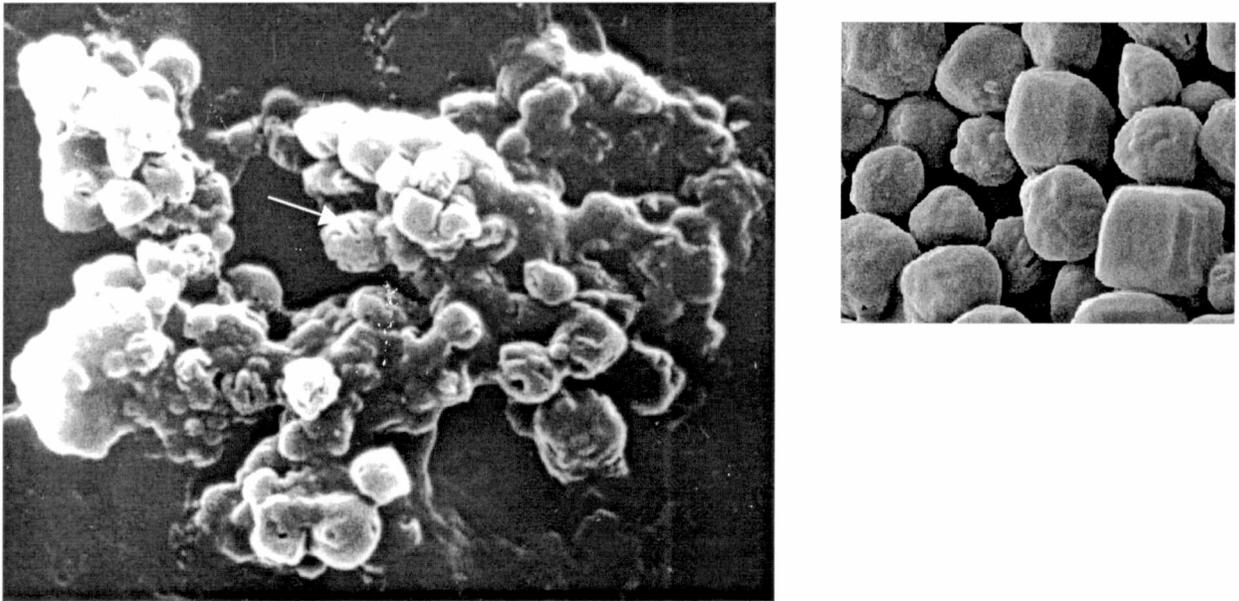


Fig. VI.9. Microscopía electrónica de barrido de poliedros purificados de células UFL-AG-286 infectadas con AgMNPV recombinante. Indicada con flechas, una cavidad que sería producto de la disociación de nucleocápsides. En la foto de la derecha, micrografía electrónica de poliedros silvestres, como referencia de una morfología normal.

V.10 VELOCIDAD DE ACCIÓN DEL rAgMNPV Y AgMNPV SILVESTRE.

Una vez comprobada la presencia de nucleocápsides ocluidas en los poliedros mutantes, encaramos el estudio de la magnitud de la variación en la velocidad de acción alcanzada por la modificación genética realizada al genoma viral. Para ello, realizamos bioensayos sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*.

Como se señaló en la introducción de este capítulo, el diseño del ensayo obedeció al propósito perseguido. Por consiguiente, en estos bioensayos se utilizó la inyección como vía de administración del inóculo viral. Así, fue posible tanto la determinación, con una precisión del orden de los minutos, del momento de adquisición de la infección, como de la dosis exacta suministrada. De esta manera, se minimizaron los efectos de las diferencias en comportamiento alimenticio de las larvas y se eliminaron los efectos de la interacción del inóculo con la dieta.

Se inyectaron 60 larvas del cuarto estadio por dosis y por tratamiento, en dos bloques de 30 individuos. Así, se inyectaron 60 larvas con 3×10^6 pfus de rAgMNPV/ *tox-34*⁺/ *polh*⁺; 60 larvas con la misma dosis de virus silvestre y controles negativos a los que

se les inyectó medio de cultivo. Posteriormente, se disminuyó la dosis y se inocularon 4×10^5 pfus cada stock viral en lotes de 60 larvas.

El rAgMNPV/ *tox-34⁺/ polh⁺* efectivamente actuó con mayor celeridad que el virus silvestre, con una significativa reducción con los tiempos medios de muerte, entre 58% y 63%, dependiendo de la dosis.

Con la dosis más alta, la media de tiempo que demoraron en dejar de alimentarse fue de 2 días para el recombinante y 5,65 días para el salvaje. Con la dosis siguiente, los valores resultaron 2,4 días y 5,7 días respectivamente. En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos, que se muestran en el gráfico de la **Figura VI.10**. No se registró mortalidad en los insectos control sin infectar. El experimento se continuó por 15 días, y el número de sobrevivientes se mantuvo constante. Es decir que los sobrevivientes, no fueron infectados a la menor dosis ensayada.

Tabla I
Resumen de los ensayos de respuesta en el tiempo con larvas de *Anticarsia gemmatalis* tratadas con de AgMNPV recombinante y silvestre.

CANTIDAD DE INSECTOS PARALIZADOS O MUERTOS. (*)				
AgMNPV	Virus silvestre		rAgMNPV/ <i>tox-34⁺/ polh⁺</i>	
	4x10 ⁵ pfu	3x10 ⁶ pfu	4x10 ⁵ pfu	3x10 ⁶ pfu
DOSIS (PFU)				
Días POST-INFECCIÓN				
1	0	0	0	0
2	33	56	0	0
3	54	60	0	0
4			0	0
5			14	37
6			38	44
7			39	60
Tiempo medio de muerte	2,39 ± 0,07 días con intervalo de confianza 99%= (2,21-2,57)	2,06 ± 0,03 días con intervalo de confianza 99%= (1,98-2.15)	5,67 ± 0,08 días con intervalo de confianza 99%= (5,49-5,90)	5,65 ± 0,11 días con intervalo de confianza 99%= (5.35-5.95)

(*) Los números en las columnas rAgMNPV/ *Tox 34⁺/ polh⁺* indican los insectos paralizados (aquellos que fueron incapaces de reacomodarse antes de 30 segundos luego de ser colocados sobre la parte dorsal) mientras que las columnas correspondientes a AgMNPV silvestre indican el número de insectos muertos por infección viral sin parálisis. Fue difícil distinguir el momento exacto de muerte con los insectos paralizados, pero a efectos prácticos,

tales insectos permanecieron completamente rígidos e incapaces de alimentarse, así que eventualmente perecieron (muerte evidenciada por un gradual cambio de color debido a la melanización).

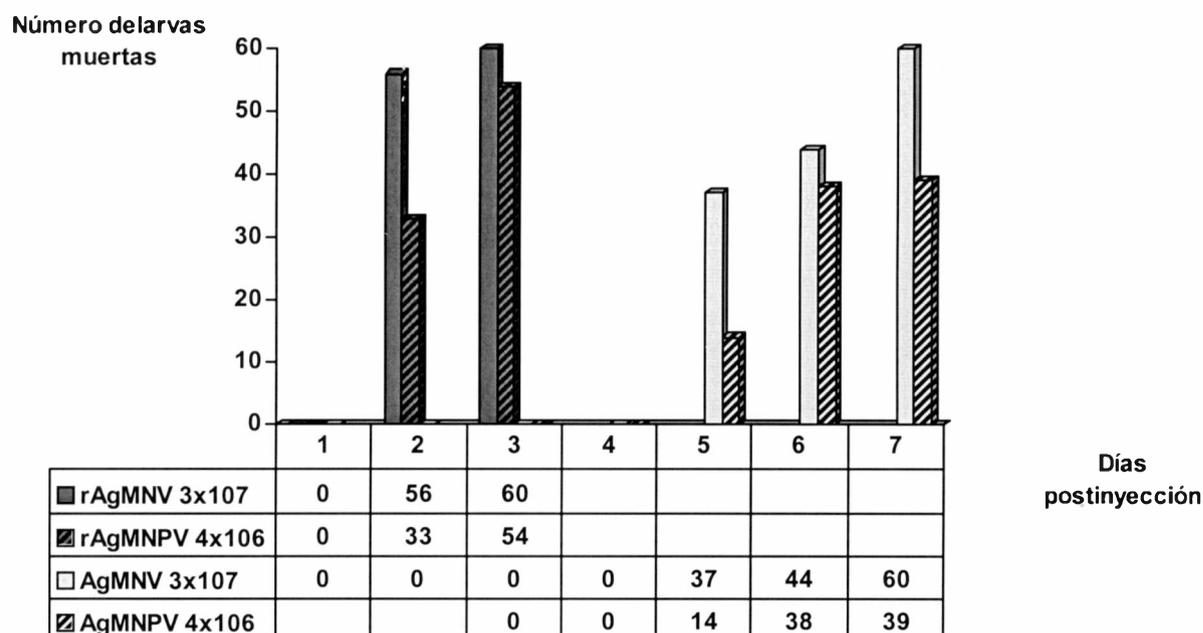


FIG. VI.10. Efectos de la expresión de *tox-34* luego de la inyección de viriones brotantes de AgMNPV y rAgMNPV. Se midió la respuesta de las larvas de *Anticarsia gemmatalis* a los tratamientos con dos dosis de AgMNPV silvestre (barras amarillas; y amarillas y azules) y con AgMNPV recombinante (barras rojas; y rojas y azules). No se registró mortalidad en los insectos control sin infectar. El experimento se continuó por 15 días, el número de sobrevivientes se mantuvo constante. Es decir que los sobrevivientes, no fueron infectados a la menor dosis ensayada.

Se ha señalado que el propósito del presente apartado fue evaluar la efectividad de la modificación genética introducida, en cuanto a la disminución en el tiempo requerido para matar al insecto, con respecto al virus silvestre.

Las técnicas estadísticas no tienen el poder de descubrir automáticamente hechos nuevos ni de suministrar conclusiones absolutas válidas, sin restricciones. Permiten someter las hipótesis a ensayos objetivos, independientes de la valoración individual del experimentador (Lison, 1968).

Al comparar dos series de mediciones como las de arriba, lo que interesa es si los resultados obtenidos indican una diferencia o una identidad entre las dos series, en este caso, si la diferencia entre los tiempos medios de muerte provocados por las dos poblaciones virales, resultó significativa. Traducido a la jerga estadística, la cuestión a

investigar fue si las dos series de mediciones se habían extraído de una sola población o de dos poblaciones distintas.

Los ensayos estadísticos consisten en poner a prueba la hipótesis de que ciertas características de las poblaciones, (en nuestro caso sus medias de tiempo de muerte) son iguales, hipótesis que generalmente se llama hipótesis nula. Si el ensayo demuestra que la probabilidad a favor de la hipótesis nula es muy pequeña, se infiere la probabilidad de una diferencia entre las dos poblaciones. Si la probabilidad a favor de la hipótesis nula no es mayor del 5% ($p=0,05$) se dice que hay una diferencia significativa entre las dos poblaciones. Si la probabilidad es menor que 1% ($p=0,01$), se dice que hay una diferencia altamente significativa.

La comparación de medias de dos series de mediciones puede realizarse por dos métodos, el ensayo t para la diferencia de medias y el análisis de la varianza (Lison, 1968).

El ensayo de t para la diferencia de medias consiste en el cálculo de la probabilidad de la hipótesis nula entre las medias. Explicado de forma sumamente elemental, plantear la hipótesis nula en nuestro caso, sería suponer que el tiempo medio de muerte de los insectos a raíz del tratamiento con el virus recombinante se confunde con el tiempo medio de muerte a raíz del tratamiento con el virus silvestre.

Sin bien el ensayo de t es el más difundido en los ensayos biológicos, actualmente se considera que el análisis de la varianza es una técnica más poderosa y versátil, con un campo de aplicación y de posibilidades de empleo mayores que el ensayo de t. Consiste en descomponer la varianza total de un conjunto de varianzas parciales correspondientes a fuentes de variación distintas y determinadas. Luego se comparan estas varianzas entre sí por medio de una prueba estadística llamada factor F. Así, el análisis de la varianza engloba toda la información en este número F, y nos suministra una probabilidad p para la hipótesis nula, en función de dicho factor.

Los datos obtenidos de los bioensayos previamente mostrados, fueron modelados de acuerdo a los métodos de comparación utilizados. De esta manera, los datos fueron organizados de manera enumerativa y no en forma de frecuencias acumuladas como aparecen en la Tabla 1. Es decir, a cada uno de los 60 individuos de cada tratamiento, se le asignó su correspondiente tiempo de parálisis/ muerte (por ej. insecto 1, tiempo de muerte = 5 días; insecto 2, tiempo de muerte = 5 días; y así para todos los individuos tratados). Por consiguiente, cada observación de tiempo es un dato independiente, único para cada individuo, en tanto que si los datos hubieran sido modelados en forma de frecuencias acumuladas como aparecen en la Tabla I, las observaciones realizadas sobre el mismo grupo de insectos a distintos tiempos estarían correlacionadas, la mortalidad en un punto determinado no podría ser menor

a la del punto de tiempo previo y en tal situación no sería correcto el empleo de las técnicas estadísticas de comparación de medias que utilizamos (ensayo de t y ANOVA).

Ambos *tests* confirmaron una diferencia altamente significativa en los tiempos medios de muerte provocados por los dos tratamientos, a modo de ejemplo en las Tablas II y III se exhiben los resultados obtenidos mediante el análisis de la varianza.

Inóculo 3x10 ⁶ PFUS	Tiempo medio de muerte (días)	Varianza	N
AgMNPV wt	5,65	0,77	60
rAgMNPV	2,07	0,06328	60

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Entre grupos	1	385.21	385.21	920,44	0
Dentro de los grupos	118	49.38	0.42		
Variación total	119	434.59			

Así, para la mayor dosis ensayada, el F calculado para los datos es $F = 920,44$, con un nivel de confianza de 0,01, la p de ocurrencia de la hipótesis nula resulta tan pequeña que es aproximada a $p=0$ por el programa estadístico (Statistix para Windows, Copyright 1985, Analytical Software). Por consiguiente, según el análisis de la varianza, la diferencia es altamente significativa (dado el nivel de confianza utilizado).

Inóculo 4x10 ⁵ PFUS	Tiempo medio de muerte (días)	Varianza	N
AgMNPV wt	5,67	0,28	39
rAgMNPV	2,39	0,24	54

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Entre grupos	1	243,29	243.296	942.12	0
Dentro de los grupos	91	23.50	0.26		
Variación total	92	266.80			

El mismo análisis, en este caso para la menor dosis ensayada, arrojó un $F = 942,12$; con un nivel de confianza de 0,01, nuevamente la p de ocurrencia de la hipótesis nula resulta tan pequeña que es aproximada a $p=0$ por el programa estadístico y por consiguiente, la diferencia entre los tiempos medios de muerte es altamente significativa.

En un experimento destinado al tratamiento por el análisis de la varianza, se distinguen tres tipos de efectos (Lison, 1968),

- **Efectos del tratamiento**, es decir, los introducidos a propósito, que fueron el objeto de los ensayos finales
- **Efectos ´ambientales´**, factores que no estaban destinados, en principio, a ser incluidos en el análisis, pero que ejercieron influencia y podrían controlarse (por ej, camada de insectos, día de la experiencia, estado de la dieta, etc).
- **Error experimental**, es decir, todos los elementos de variación no incluidos en los dos anteriores. Constituyen las variaciones no controladas.

En estas condiciones, el resultado X de cualquiera de los bioensayos presentados, puede representarse por: $X = \mu + \rho + \beta + \varepsilon$. En la expresión, μ es un valor constante y fijo para cada grupo, ρ es el efecto debido al tratamiento aplicado al individuo (objeto de la observación y constante para todos los individuos sometidos al mismo tratamiento), β es el efecto debido al bloque al que pertenece el individuo y ε el error experimental, propio del individuo en sí.

Las bases de la teoría del análisis de la varianza que utilizamos para el análisis de los datos están establecidas en una serie de suposiciones, a saber:

- los errores deben ser independientes
- los errores deben distribuirse normalmente
- los errores deben tener una varianza común
- los efectos del tratamiento y los efectos del medio deben ser aditivos

Con respecto a la primera suposición, implica que las variaciones no controladas del material no tengan una correlación mutua, es decir, que se produzcan estrictamente al azar. La manera de eliminar una correlación de errores es la aleatorización, o sea la incubación individuos testigos y tratados en el mismo lugar, sometidos a la mismas condiciones ambientales, etc. En los experimentos descritos se cumplió esta condición. En relación a la distribución normal de los errores, sólo en raras circunstancias es posible verificar si la tal distribución en una población es normal o no. De cualquier manera, investigaciones efectuadas por diversos estadísticos muestran que la influencia de este factor en cuanto a la validez de los ensayos F y del

ensayo de t para diferencias entre medias es mínima, es despreciable la variación que este error puede causar en el resultado, tampoco disminuye la información que se obtiene del análisis (Lison, 1968). De esta manera, la distribución de los errores no fue analizada en los bioensayos presentados.

Con respecto a la varianza común de los errores y la aditividad de los efectos del tratamiento y del medio (últimos dos aspectos a analizar, ligados entre sí), nuestros ensayos no cumplían ninguna de estas dos condiciones.

En primer lugar, como se indicó más arriba, los efectos de los tratamientos no resultaron aditivos. La inoculación del virus recombinante modificó en un cierto porcentaje el tiempo de muerte causado por el silvestre, y tal porcentaje se vio modificado asimismo con la variación de la dosis. Un hecho adicional que hace pensar en la no aditividad de los tratamientos es que la diferencia entre las medias supera el 25% y que la diferencia entre las medias aumenta cuanto más pronunciado es el efecto del tratamiento (Lison, 1968). Cuando las relaciones no son aditivas, la solución es realizar una transformación de los datos de manera de volverlas aditivas (transformación log).

La precisión en la determinación de una media depende de su varianza. Cuánto mayor es la varianza, menos precisa la media. Por consiguiente, una determinación hecha con un grupo de varianza elevada no tiene la misma significación que otra hecha con un grupo de varianza pequeña; debe pesar menos en el balance de la comparación porque es menos eficaz.

De esta manera, más importante en la práctica es la condición de la igualdad de la varianza. Para que el análisis sea válido, es necesario que todos los grupos experimentales posean la misma varianza, entendida como varianza verdadera, no observada (las mismas están sujetas a la fluctuación del muestreo). Si esta condición no se cumple, hay una pérdida importante de información sobre los efectos de los tratamientos. No sólo hay pérdida de información, sino que también se modifica el balance de la experiencia, los grupos experimentales no tienen el mismo peso cuando su varianza no es igual, como se indicó más arriba.

Así, para restablecer el equilibrio sería necesario asignarle un coeficiente teniendo en cuenta este efecto. El análisis de la varianza presupone que todas las determinaciones son iguales en peso. Resulta claro que en estas condiciones se sobreestimarán los efectos de los tratamientos afectados por una varianza elevada y se subestimarán los efectos de los tratamientos de varianza baja.

Ciertas técnicas estadísticas en las que se utilizan deliberadamente determinaciones de varianzas desiguales (por ejemplo la técnica de los *probits*), previenen la compensación por medio de coeficientes de peso; en el análisis de la varianza esto no

se hace, este método utiliza otro tipo de corrección. Así, implementamos la corrección adecuada para el análisis de la varianza. La operación apropiada es la transformación logarítmica de los datos.

En resumen, la transformación logarítmica tiene en general un efecto doblemente favorable, volver aditivos los efectos que no lo eran y homogeneizar las varianzas (Lison, 1968).

Luego de la transformación log de los datos correspondientes a la dosis más alta, el F calculado resultó $F = 1782.99$, con una p aún más pequeña que la presentada para los datos crudos (ver Tablas). Un resultado similar se obtuvo con la dosis más baja ensayada. Se hicieron comparaciones posteriores, con refinamientos de técnicas estadísticas. Todos arrojaron el mismo resultado, la diferencia es estadísticamente significativa, en todos los casos la probabilidad de que ocurra la hipótesis nula, tiende a 0.

Con respecto a la dosis más baja ensayada, hay otro aspecto que se desprende del ensayo y que merece algunas consideraciones.

Al diseñar el experimento, el propósito inicial fue ensayar dosis que produjeran aproximadamente el mismo porcentaje de mortalidad para cada virus, de acuerdo a la estandarización propuesta por van Beek y Hughes (1998). La recomendación de los autores es que sean escogidas dos dosis para el diseño general. Idealmente, una dosis que mate el 50% de las larvas y otra que sea de 10 veces superior. De esta manera, se ensayaron las dosis antes mencionadas. Se asumió que la inserción de *tox-34* en el genoma viral no tenía por qué alterar la infectividad del virus, dado que no participa del proceso de infección.

Sin embargo, resultó evidente de los datos indicados más arriba para la menor de las dosis ensayadas, que de alguna manera dicha presunción pareciera ser errónea, dado que se registró un mayor porcentaje de larvas muertas entre las tratadas con el rAgMNPV que entre las tratadas con el virus silvestre. De cualquier manera, se ampliará esta cuestión en la Discusión del presente Capítulo.

En cualquier caso, también se realizó el análisis estadístico de la diferencia de las proporciones, con el fin de verificar si tal diferencia era significativa. Para ello, se realizó el ensayo de χ^2 para la comparación de proporciones. El método utiliza las propiedades de esta distribución, importante en estadística teórica y aplicada, cuya definición exige consideraciones matemáticas que no detallaremos. Sólo indicaremos que el elemento común a los ensayos como el que nos interesaba analizar, es la comparación de los números observados en ciertas clase de objetos, con los números teóricos calculados para esas clases según cierta hipótesis. Así, en nuestro caso, la

hipótesis nula consistió en que no había diferencias entre las muestras tratadas con el virus recombinante y las tratadas con el silvestre, es decir que correspondían a dos muestras de la misma población. Para la realización del ensayo, resulta cómodo presentar los resultados bajo la forma de la Tabla que sigue, llamada frecuentemente 'cuadro de contingencia 2x2'.

	Virus silvestre	Virus recombinante	Totales
Muertas	39 (46,5)	54 (46,5)	93
Sobrevivientes	21 (13,5)	6 (13,5)	27
Totales	60	60	120

Como se indicó más arriba, el ensayo se efectúa probando la hipótesis nula, es decir, que no hay diferencias entre las tratadas con uno y otro virus. Por consiguiente, ambas muestras deben ser tratadas como de una misma población, ambas de 60 individuos. La mejor estimación de la tasa de mortalidad de esta población única, se logra por los totales de la columna de la derecha del cuadro de contingencia, que constituyen un *pool* de todos los datos. La proporción estimada de muertas es así 93/120 y la de sobrevivientes, 27/120. Si la hipótesis es exacta, éstas son las proporciones que deben esperarse, tanto en el grupo de las larvas tratadas con el virus recombinante como en el de las tratadas con el silvestre. Los valores esperados según la hipótesis fueron indicados entre paréntesis en la Tabla '2x2'. El valor de χ^2 se calcula dividiendo, en cada clase, el cuadrado de la diferencia entre el número hallado y el número teórico por el mismo número teórico, y haciendo la suma de los valores hallados de esta manera. En nuestro caso, el valor resultó, $\chi^2= 10.75$, con una $p=0.001$, es decir que la hipótesis nula puede ser rechazada con una probabilidad de equivocación inferior al 0,1% (para 1 grado de libertad del cuadro de contingencia). Como $\chi^2_{0,001}=10,8$; la hipótesis nula tendría una probabilidad de no ser rechazada del orden del 0,1%. No obstante, el ensayo de χ^2 en el caso de un cuadro de 2x2 necesita una corrección, llamada corrección de Yates para la continuidad. Nuevamente, quedan fuera nuestro propósito las consideraciones matemáticas que por las cuales se realiza dicha corrección y los fundamentos de la misma, nos limitaremos a indicar que $\chi^2_c=9,37$, superior al nivel crítico de probabilidad 0,5% ($\chi^2_{0,005}=7,88$), entonces la hipótesis nula puede rechazarse, en realidad, con una probabilidad de equivocación inferior al 0,5% y no al 0,1%. Es decir, la diferencia de proporción de larvas muertas

por el tratamiento con rAgMNPV y AgMNPV silvestre, resultó estadísticamente significativa, a la dosis ensayada.

Sin embargo, no se pueden inferir conclusiones sobre diferencias de infectividad de ambos virus, como se señalará en la Discusión.

Por último, realizamos una comparación de la relación de los tiempos letales medios (LRT, *lethal ratio for time*) de acuerdo al método recomendado por Bonning y Hammock (1993).

	3x10 ⁶ pfus	4x10 ⁵ pfus
AgMNPV	5,65	5,67
rAgMNPV	2,06	2,39
LRT	0,36	0,42

Tales relaciones de tiempos medios de muerte no han sido informados hasta el momento.

Con el propósito de evaluar el comportamiento del AgMNPV/ *tox-34⁺/ polh⁺* con el aumento de la dosis, ensayamos dos dosis complementarias. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VI.11.

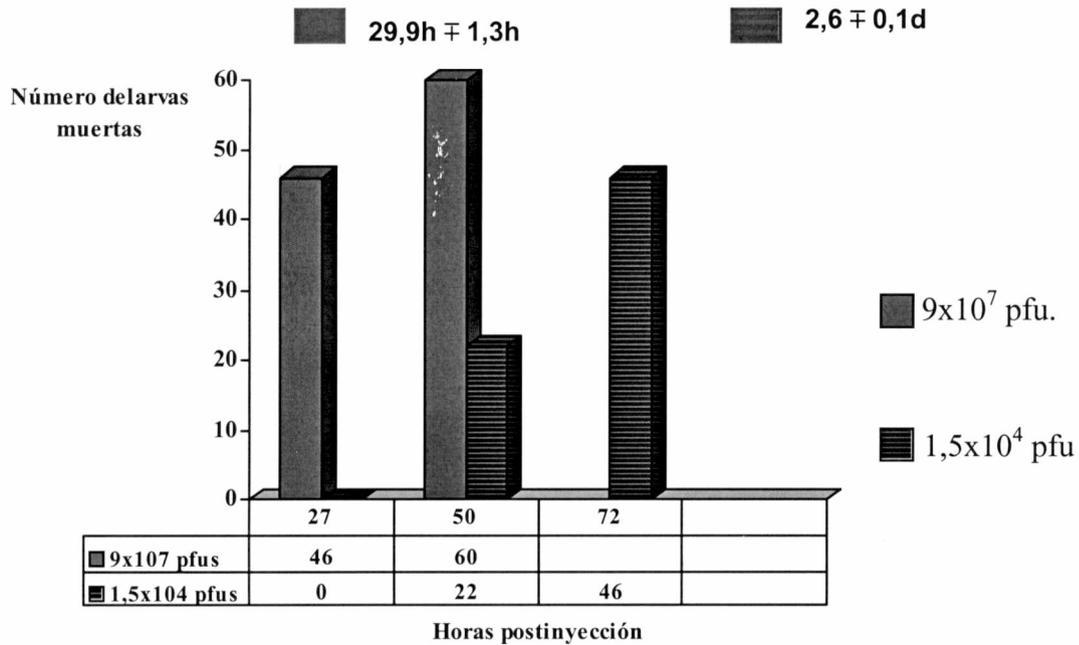


Figura V.11. Bioensayos con dosis complementarias.

VI.11 BIOENSAYOS POR INGESTIÓN.

Con el fin de evaluar si los poliedros anormales resultaban infectivos por vía oral, se realizaron ensayos sobre larvas neonatas. El inóculo viral fue administrado mediante el método de la gota (ver Cap.II). Es necesario subrayar que el propósito de este último ensayo fue meramente cualitativo, motivado por las observaciones de ultraestructura de los cuerpos de inclusión. Resultaba imprescindible una confirmación de la actividad biológica de los poliedros mutantes, en forma previa al inicio de un análisis más extenso, con un número de individuos estadísticamente significativo, para la caracterización completa de las propiedades bioinsecticidas de los recombinantes obtenidos. Se utilizaron 18 larvas neonatas por tratamiento. La elección del estadio para este análisis cualitativo, fue arbitraria, y se basó en la disponibilidad de cría (la cría es mantenida en forma discontinua). Se ensayaron dos dosis para OBs recombinantes y silvestres, 10 y 20 OBs por larva, respectivamente. La estimación de la dosis se realizó en base a ensayos previos (Sciocco de Cap, comunicación personal) referentes al volumen de líquido ingerido por larvas neonatas (aproximadamente 5 nanolitros). De esta manera, se estableció una aproximación de la dilución necesaria de la suspensión de poliedros, y se administró dicha dilución.

En la Figura VI.12. y la Tabla adjunta, se muestran los resultados obtenidos que evidencian la infectividad oral de los poliedros mutantes. No pueden extraerse mayores conclusiones de dicho conjunto de datos, debido a ciertas incongruencias entre las observaciones (ver más abajo). El experimento fue diseñado de forma tal de lograr 100% de mortalidad con la dosis más elevada (Sciocco de Cap, comunicación personal). Se verificó una mortalidad del 100% en los insectos tratados con el virus silvestre, no así en los tratados con el virus recombinante. Asimismo, la siguiente dosis ensayada, arrojó una aparente mayor infectividad para el virus silvestre. Esta observación no está de acuerdo con los resultados obtenidos por inyección.

Una explicación probable para esta incongruencia aparente, es el hecho anteriormente mencionado respecto de la tendencia a la agregación de los poliedros mutantes. De esta manera, es posible que aquellas larvas que no murieron, no hubieran ingerido poliedros en el volumen ingerido o bien que no todos los cuerpos de inclusión sean infectivos.

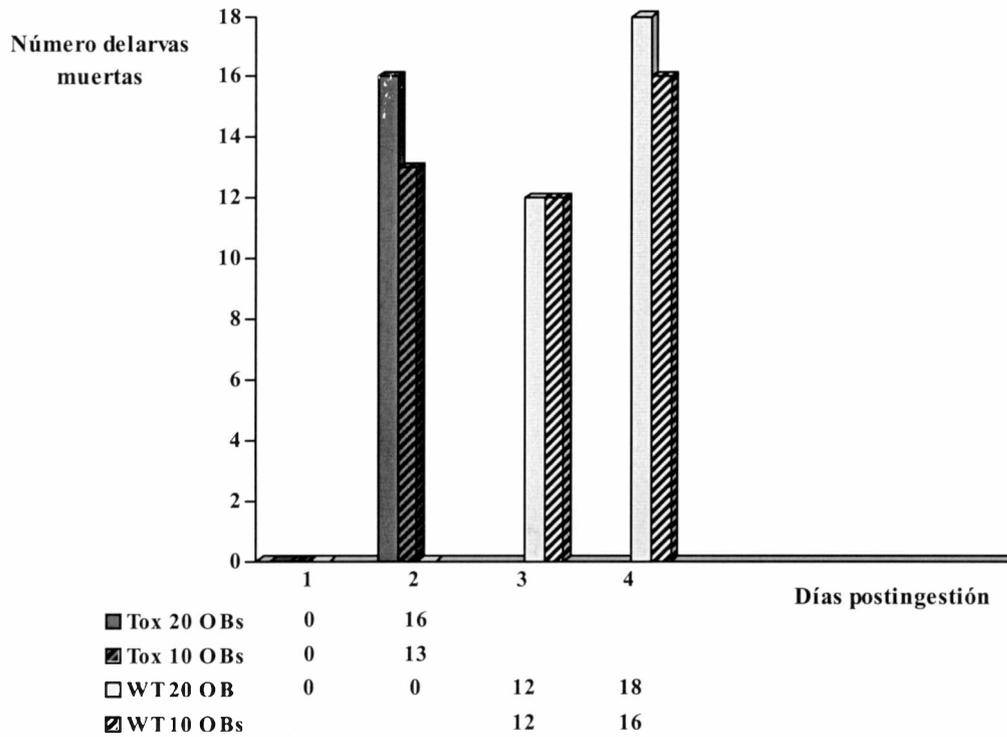


FIG. VI.12. Efectos de la expresión de *tox-34* luego de la infección oral con poliedros de AgMNPV y rAgMNPV. Se midió la respuesta de las larvas de *Anticarsia gemmatalis* a los tratamientos con dos dosis de AgMNPV silvestre (barras amarillas; y amarillas y azules) y con AgMNPV recombinante (barras rojas; y rojas y azules). No se registró mortalidad en los insectos control sin infectar. El experimento se continuó por 15 días, el número de sobrevivientes se mantuvo constante. Es decir que los sobrevivientes, no fueron infectados a la menor dosis ensayada.

No obstante, en las larvas que fueron efectivamente infectadas, se hizo evidente el acortamiento del tiempo de muerte producido por el virus recombinante, con respecto al virus silvestre. Sin embargo, es necesario hacer notar que los tiempos que se presentan en la tabla para el tratamiento con el rAgMNPV, no se corresponden con el tipo de medida de tiempo de muerte presentado en el apartado **VI.10**. Es decir que no fue posible realizar ninguna comparación entre la diferencia detectada en el presente ensayo y la correspondiente del apartado anterior. La variación en el tipo de medida de tiempo de muerte se debió a un imprevisto problema metodológico derivado del reducido tamaño de las larvas neonatas. Este aspecto complicó más de lo esperado el *screening* de larvas paralizadas. No fue posible observar los efectos descritos en el apartado **VI.7** para el inicio de la parálisis, ni el momento exacto de la parálisis completa. Si bien se intentó un seguimiento en intervalos de horas, desde las 24 horas p.i, sólo pudo establecerse con absoluta certeza el efecto de la toxina cuando habrían transcurrido varias horas luego del deceso, a partir del inicio de la melanización característica de los cadáveres infectados por el rAgMNPV. En larvas de *T. ni* infectadas con AcMNPV/ *tox 34*, se ha observado un lapso de 10 horas entre la parálisis completa y la muerte (Burden *et al.* 2000). Por otra parte, las dosis administradas en el apartado **VI.10**, en pfus (viriones brotantes), no pueden ser comparadas con las del presente apartado, en OBs (múltiples viriones ocluidos). Con respecto a los tiempos medios de muerte obtenidos para el virus silvestre, están de acuerdo a informe previos para las altas dosis administradas y el estadio desafiado (neonatas).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En este Capítulo se presentaron las evidencias experimentales relacionadas con la generación de un baculovirus genéticamente modificado, de eficacia bioinsecticida mejorada, específico para el control de la 'oruga de las leguminosas', *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) de acuerdo al objetivo final previsto en este proyecto de Tesis.

Los recombinantes rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺* generados, poseen la estructura genómica esperada, según los resultados presentados en los apartados VI.4-VI.5. Con respecto a sus características fenotípicas, tienen la capacidad de producir poliedros que contienen nucleocápsides envueltas y son infectivos por vía oral. Sin embargo, como se expuso en los apartados VI.7-VI.8, los cuerpos de inclusión presentan una morfología aberrante, que influiría en la estabilidad del recombinante en el ambiente.

El hecho de que el rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺* haya resultado un mutante en la formación de poliedros (PFM), puede ser explicado por diferentes factores o por una combinación de ellos. Sobre la base de los experimentos presentados en esta Tesis, ninguna de las posibilidades que se discuten a continuación puede ser descartada. De esta manera, en el análisis de las causas se incluyen los potenciales experimentos que resolverían las cuestiones planteadas, y generan perspectivas para estudios posteriores.

En general, la mayor parte de la bibliografía existente sobre PFMs, está relacionada con la descripción de mutaciones en la secuencia codificante del gen de poliedrina (Hu *et al.*, 1999) o del gen 25K (Fraser, 1987; Bischoff y Slavicek, 1997). Incluso, se ha informado que la alteración de un único aminoácido en la secuencia de poliedrina puede causar un gran cambio morfológico en los poliedros (Carstens *et al.*, 1986; Carstens *et al.*, 1987; Carstens *et al.*, 1992). Por consiguiente, realizamos diversos controles con el fin de asegurar que, en nuestro caso, el gen correcto de la poliedrina fue insertado en el recombinante. En principio, la secuencia de poliedrina insertada en el vector de transferencia, fue confirmada por secuenciación del pAgDUALB en uno y otro sentido, como se expuso en el Capítulo V. Más aún, como se indicó en el mismo Capítulo, el fragmento de PCR que contenía el gen de poliedrina con el promotor de p10 fusionado, fue secuenciado al menos en tres oportunidades (el producto de PCR, luego del clonado del mismo inserto en pGemT y, por último, cuando se obtuvo la versión final del vector de transferencia), resultando exactamente la misma secuencia de las seis lecturas mencionadas (todas las lecturas se realizaron sobre ambas hebras

de DNA). Una cuestión adicional que nos conduce a descartar una mutación en la poliedrina como responsable de la aberración morfológica, es el hecho de que las etapas de purificación por placa se repitieron por lo menos tres veces, y se aislaron varias placas que se purificaron por separado. En todos los casos los poliedros exhibieron la misma morfología. De cualquier manera, un experimento adicional que podría realizarse para descartar en forma categórica esta hipótesis, es la determinación de la secuencia nucleotídica del gen de poliedrina directamente sobre el DNA viral o previa amplificación por PCR.

Con respecto a las mutaciones en el gen 25K o *FP25K*, en realidad producen un fenotipo característico llamado FP (por *few polyhedra*) con características bien establecidas. Por definición, los mutantes FP son aquellos aislamientos que producen escasos (<10) poliedros, comparados con aislamientos silvestres que producen más de 50 poliedros por célula, y que aparecen en aislamientos con numerosos pasajes por cultivo celular (Braunagel *et al.*, 1997). Esta particularidad fenotípica también fue exhibida por el rAgMNPV/*tox 34⁺/polh⁺* aislado, como se señaló en el apartado VI.7. Sin embargo, el recombinante generado no presenta los demás rasgos característicos de los mutantes FP. A nivel ultraestructural, las oclusiones producidas por los FP no contienen viriones, o contienen viriones con morfología aberrante. Además, la envoltura intranuclear de los ODVs (*occluded derived viruses*) es, o bien amorfa o no es completa (Harrison y Summers, 1995). Asimismo, aquellos mutantes FP que contienen viriones ocluidos, tales oclusiones se presentan predominantemente como viriones envueltos unitariamente en lugar de estar envueltos en forma múltiple (MNPV).

La función de la proteína 25K aún no está completamente dilucidada. Los resultados más completos en relación al estudio de esta proteína en AcMNPV, fueron presentados por Braunagel *et al.*, 1997. Allí se indica que 25K es una proteína estructural de las nucleocápsides de los dos fenotipos del virión, que regularía la acumulación y el tráfico citoplasma-núcleo mediante regulación de la transcripción, estabilidad de mRNAs, traducción o alteración de la estabilidad de una o más proteínas virales. De esta manera, las características fenotípicas de los mutantes FP no serían consecuencia de las mutaciones en el gen 25K *per se*, más bien resultarían de una inadecuada estequiometría, localización o formación de complejos proteicos de otras proteínas virales.

Como se mostró en la **Figura V.8**, los poliedros mutantes producidos por el recombinante generado, a diferencia de los producidos por mutantes FP, presentan numerosos viriones ocluidos, y dichos viriones se hallan envueltos en manojos

múltiples. Es por ello que fueron clasificados como PFM, en vez de mutantes FP. No obstante, la posibilidad de que la aberración morfológica de los poliedros recombinantes se deba a una mutación en el gen 25K, es probable.

```

GCATGCCGCTGTGCATGGTTAAAATAATGACCGAATTGAGCAACGCGTCGGCGCCGCGCG 60
  M P L C M V K I M T E L S N A S A E R
GCGGAATGTACCGAAAACGCTTTGAGTTTACTTGCTATTTGGGCAACGTGGTGTCTGCA 120
G G M Y R K R F E F T C Y L G N V V S C
CAAAATGCAAGAGCGCGTGTAAATCGACGCGCTTTGCAATTTTACAAGATGGACCCCA 180
T K C K S A C L I D A L L H F Y K M D P
AGTGGCGTGGGTGAAGTGATGCATTGTGTGATCAAGGCGGAGGACGTGTACAAGCCGTCTA 240
K C V G E V M H L L I K A E D V Y K P S
ATTGGCTAAAAATGAAGGCGGTCAATAAACTGTGTCCGAAAAGCGGGCACGTGCAAGGGCA 300
N C V K M K A V N K L C P K A G T C K G
AAAACCCCATTTGTAATTTTAAATATTAAGCACACGACGCTTGCACAACATGGCCGATTC 360
K N P I C N F *
CATCAACAGGATTTTGCAGTTGTTTACCAGTGGAGTTCCAAAACGGGCGCGAGCTTGA 420
AAACCAAGCCGATTTGGAGTGTGTACGATTTGGAGCGATTTGGGGCGGCACATGAA 480
CAAGCAGATTTGAAGCGTCTGTAAAAAGAAAAACAGTCCGAAGAGCGCGCTGAAAAAGC 540
GGCATTGAAACGGGTTGAATTGGCAGCAGACCGTATGGCGATGCAAGCTAAAGCCGCGCC 600
TCATGCGACGATGACGGGCACTGGTCTACGCTTAGTCAGCAGCACCTTGAAGACATTGA 660
TCGCAATAAAGAAATGTAGACCGCATTTACAAGTTCAGCTCAAGCAGGATTGTTTGT 720
AAATAATAAAATGCTTTTAAATATAATTTGTATTTTATTACATTTTAAATAGATA 780
ATAAGTATTTTGTCTTATTGTAGCAACTTTGTAGTAAAATTTGCTATAACT
ATGCCAGATTATACGTATAGGCCGACCATTGGTCGCACGTATGTGTATGATAACAAGTAT 893
  M P D Y T Y R P T I G R T Y V Y D N K Y
TACAAAACTTGGTTCTGTGATTAAGAACGCCAAGCGCAAGAAGCACCTTCTTGAACAT 953
Y K N L G S V I K N A K R K K H L L E H
CAGGAGGAAGAAAAAGCCTAGATGGGCTAGATCATTACATCGTGGCCGAAGACCCATTT 1013
Q E E E K S L D G L D H Y I V A E D P F
TTAGGGCCCGCAAAAACCAAAATGACACTTTTAAAGAAATCCGCAATGTAAAACCC 1073
L G P K N Q L T L F K E I R N V K P
GACACGATGAAGCTCATTGTTAACTGGAGCGGTAAGAGTTTCTGCGCGAAACTTGGACT 1133
D T M K L I V N W S G K E F L R E T W T
CGTTTTGTGAAGACAGCTTTCCCATGTAAACGACCAAGAAGTGATGGATGTGTTTTTA 1193
R F V E D S F P I V N D Q E V M D V F L
GTCATTAACCTCCGCCAACTCGCCCTAACCGTTGCTACAAATCCTGGCGCAACACGCT 1253
V I N L R P T R P N R C Y K F L A Q H A
CTGCGTTGGGACATCGATTACGTGCCCCACGAGGTAATCCGCATTGTGGAGCCTTCTTAC 1313
L R W D I D Y V P H E V I R I V E P S Y
GTGGGCATGAACAACGAGTACAGAATTAGCCTAGCCAAGAAAGGCGGTGGTTGCCCAATC 1373
V G M N N E Y R I S L A K K G G G C P I
ATGAACATCCACAGCGAGTATACCAACTCGTTTGGAGTCTTTGTCAACCGCGTAATCTGG 1433
M N I H S E Y T N S F E S F V N R V I W
GAAAACTTTTACAAACCCATTGTGTACATTGGCACTGATTCCGGCGAAGAAGAAGAAATT 1493
E N F Y K P I V Y I G T D S G E E E E I
CTTATTGAAGTCTCGCTCGTGTCAAGGTGAAAGAGTTTTCGCGCCGACGCACCTCTGTTT 1553
L I E V S L V F K V K E F A P D A P L F
ACCGCCCCCGCTATTAA 1572
T G P A Y *
-GGCGCCGACAAATCGTTGGTAATAGCCAACAAATTTTTTAGTTTTACGTCGTCCGGCGC 1632
GTTGACCGCTTGTATGAAAAGCACGCGCGTCATCATACCGGCCCGCGAAAATTAATCCT 1692
CGATTTGTAAATAAACTTAGACGCGTCCGCCGCTACAGCTCCAGAGGAGGCTGTTTGT 1752
CTAATTCGTTTTTCGGGCAATACAACGTTTTTTCTAAACAAATGTAAACTATTTTTGCCT 1812
TTTCAACGTTTTTCGGCGCTTCTGGGTTTTTCTCTCAATAAATGGAAACATTTTGCAATA 1872
TTTTTTCTAATTCCTTTGTTATAATATTTTGATTTGTAACAATTTGCTATCTTTGGCAA 1932
AATTATAAAGGTGCACTGCAAAATGTAATCGCGTTTGTAGCCTTTTTGTATCAAGGT 1992
CATCGTCAAAACCGCTGCCAGATTCGCTAAAGTAGATCGGATCTTCCGACAACGCGCCA 2052
TGGCGCCTCGGGCCTCGCTAACGTGTGTATAACACACCCAAAATCCTGCAGGAGGCGC 2112
CTTTATGGGCTTGCCCAATTTTCGTTTTCAAGCCTGCCCGTTTTTTGAGGGTTGCGCCA 2172
GTTTTAATTTGATTAGCATGTCAACGCGTGGTCCAACGCGGCTTACGGTTCCACTT 2232
TTTTGAGTGTAGCTCCCATTTTAACTCTCGTCAAAACAACGCGCTCGATAATACGTCTTTGC 2292
GCGTTCTGACACTATTGCGTCTAACAAACAAATCGTCAAGCGCGC 2335

```

Figura V.13. Secuencia nucleotídica de las regiones virales flanqueantes *polh*. En negrita, en el extremo 5', se resalta el extremo C-terminal del *orf* cuyo producto de traducción presenta un 56% de identidad a lo largo de un tramo de 18 aminoácidos con la proteína 25K de AcMNPV. El otro marco abierto de lectura traducido e indicado corresponde al gen de poliedrina.

En la **Figura V.13** se muestra la secuencia nucleotídica de las regiones virales presentes en el pAgDUALB. Es esencialmente la misma secuencia del pAgPH que se presentó en la **Figura III.6** (Cap. III), sólo que en este caso se indican con más detalle otros marcos abiertos de lectura presentes en las regiones flanqueantes del ORF del gen de poliedrina. En el extremo 5' de la secuencia *upstream*, aparece el extremo 3' de un marco abierto de lectura, ORF 5, designado de esa manera por Zanotto *et al.* (1992) en base al homólogo de AcMNPV. La traducción del extremo 3' del ORF 5 de AgMNPV reveló un 56% de identidad a lo largo de un tramo de 18 aminoácidos con la proteína 25K de AcMNPV (Beames y Summers, 1989). La misma región de la proteína 25K de AcMNPV demostró identidades del 47%, 71% y 65% a lo largo de un tramo de 17 aminoácidos, con los productos de traducción de los respectivos ORFs 5 de OpMNPV, BmMNPV y AcMNPV. Es decir que, de confirmarse que la proteína 25K de AgMNPV está codificada por el ORF 5 dispuesto en el extremo 5' de la región *upstream* poliedrina, en el rAgMNPV/ *tox 34*⁺/ *polh*⁺ generado, dicha región podría haber sufrido algún tipo de mutación, por algún defecto en el evento de recombinación homóloga. Como ya se planteó más arriba, si éste fuera el caso, dado que la morfología de los poliedros era similar en todos los inóculos amplificados, suponemos que en realidad tal mutación ya se encontraba presente en los virus parentales del sistema, de primera y segunda generación, pero no fue detectada dado que los virus parentales mencionados eran *polh*⁻, de acuerdo al diseño del sistema de expresión.

Otro fundamento en favor de la última hipótesis, es la observación señalada en el apartado **VI.10**, respecto de la diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la proporción de larvas muertas observadas en los tratamientos con los virus recombinante y silvestre. Informes previos indican que los mutantes FP tienen una ventaja replicativa sobre los virus silvestres en cultivo celular (Harrison y Summers, 1995) o en su equivalente *in vivo*, la infección secundaria. Por consiguiente, el inesperado resultado obtenido en los bioensayos por inyección, en relación a un aparente aumento en la infectividad, no sería consecuencia de la introducción del gen *tox 34* al genoma viral, sino a la probable presencia de un mutante FP.

La mencionada ventaja replicativa en cultivo celular, estudiada para el caso de AcMNPV, se debe a que las células infectadas con mutantes FP liberan una mayor cantidad de virus brotantes (BVs) al medio extracelular (Fraser *et al.*, 1982; Harrison y

Summers, 1995; Potter *et al.*, 1978), y puede observarse progenie viral FP brotando de la membrana plasmática a las 72 horas p.i., en tanto que en células infectadas con el AcMNPV silvestre, la producción de BVs a las 72 horas p.i. es casi indetectable. De esta manera, el prolongado período de maduración de BVs en la superficie celular, se encuentra reflejado en los altos títulos de BVs. Una hipótesis que explicaría esta característica de los mutantes FP, es que el defecto mencionado más arriba con respecto a la envoltura de los ODV, conduce a la formación de viriones ODV que son ocluidos en forma ineficiente. Los ODVs no ocluidos se asociarían con las membranas intranucleares aberrantes que se forman en presencia de un mutante FP, sólo por un corto período de tiempo, luego del cual se disocian de tales estructuras, salen del núcleo y brotan de la membrana plasmática, adquiriendo una membrana que les permite la infección de nuevas células en cultivo o entre los tejidos del huésped (Harrison y Summers, 1995).

Es de destacar que si bien observamos una indicación de esta característica en los insectos, los títulos obtenidos en cultivo celular no fueron de una magnitud tal que parecieron inusuales, o significativamente diferentes a los obtenidos con el virus silvestre.

La secuencia nucleotídica de FP25K está altamente conservada en los baculovirus. AcMNPV y BmMNPV tienen una similitud de alrededor del 96,7%, y la comparación de todos los genes *FP25K* demuestra que la única región que carece de una conservación significativa son los 19-26 aminoácidos C-terminales (Braunagel *et al.*, 1997). Precisamente, si la recombinación homóloga fue defectuosa, la mutación en los rAgMNPVs generados se encontraría en la región C-terminal del gen. Una explicación probable para las diferencias de comportamiento observadas entre los mutantes FP y el PFM generado, al menos en cuanto a la envoltura y oclusión de las nucleocápsides, es que en el caso del rAgMNPV/ *tox 34⁺/ polh⁺*, la FP25K resultante de la mutación conserve parte de su actividad biológica, afectando en menor medida la oclusión de viriones, y en forma pronunciada la morfología de los poliedros.

De cualquier manera, está comprobado que en ausencia de un gen *FP25K* completamente funcional, la localización nuclear de la poliedrina también se haya comprometida durante la etapa de oclusión temprana, en el curso de la infección. El desconocimiento de la función exacta de *FP25K* complica la confirmación de las hipótesis planteadas más arriba.

Un problema adicional lo constituye el hecho de que los resultados obtenidos bien podrían ser consecuencia de otro aspecto que aún no se ha discutido, y cuyos efectos

se confundirían con los resultantes de un *FP25K*, hasta tanto no se defina con mayor precisión la función de la proteína 25K. Se ha señalado en el CapV., la diferencia detectada en la secuencia del promotor de *p10*, que conduce la expresión de poliedrina en el rAgMNPV, en las nucleótidos anteriores a la posición -54 respecto de la secuencia publicada por Razuck *et al.* (2002). De cualquier manera, según informes previos (Kuzio *et al.*, 1999; Fielding y Davidson, 2000; Posse *et al.*, 1990; Scheper *et al.*, 1997; Zuidema *et al.*, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Faktor *et al.*, 1997), las secuencias consenso presentes en el tramo de secuencia de 100% de identidad, son todas las necesarias para la correcta expresión de un promotor muy tardío. Sin embargo, aún no han sido identificados todos los factores que influyen en la expresión de *p10*. El recombinante fue capaz de producir poliedrina con niveles similares a los del silvestre, tal como fue confirmado por análisis por SDS-PAGE de las células infectadas (no se muestra). No obstante, no fueron realizados estudios cuantitativos más profundos ni en relación al nivel de proteína, ni de mRNA. En cualquier caso, fue señalado más arriba, tales experimentos no discernirían entre la última hipótesis o la expuesta anteriormente.

Otro factor que pudo alterar el correcto ensamblaje de los poliedros podría ser la sobreexpresión de Txp I, de la cual tampoco se sabe exactamente su función. Con respecto a esta última cuestión, Burden *et al.* (2000), realizaron un pormenorizado estudio de la acción de un rAcMNPV que expresaba Txp I (codificada por una ligera variante del gen *tox 34*) y poliedrina en larvas de *Trichoplusia ni*. Informaron que, de forma sistemática, a todos los tiempos de muerte registrados, el rAcMNPV rindió menor cantidad de poliedros en las larvas que el virus silvestre. El resultado era de esperar, evidentemente el incremento en la velocidad de acción del virus implica una concomitante reducción en la productividad viral *in vivo*. Sin embargo, independientemente de la relación LRT registrada (ver **VI.10**), la producción de poliedros del rAcMNPV resultó constante, y significativamente menor a la esperada por la disminución en el tiempo letal. Registraron una producción de poliedros del 5% de la del *wild type*. Señalan, en comparación, los registros de productividad medidos para un rAcMNPV que expresa otra neurotoxina específica de insectos, AaiT, que fueron del 20% con respecto a la productividad del virus silvestre, en larvas *T.ni*. Así, la explicación que sugieren para la inesperada disminución de la productividad viral de los cadáveres, es una interferencia de la expresión de Txp-I con la replicación viral, que reduciría la producción de virus más de lo que se esperaría en base sólo a la disminución del tiempo de muerte del insecto. La producción de Txp-I podría tener un efecto directo en la replicación viral. Nuestras observaciones no están de acuerdo con

esta hipótesis, dado que, como ya hemos indicado, la replicación viral *in vitro* es absolutamente normal. Más aún, los títulos obtenidos son del orden, o ligeramente superiores, a los obtenidos para el virus silvestre. Burden *et al.*(2000), no suministran información acerca de sus resultados *in vitro*. De esta manera, la hipótesis que postulamos para sus observaciones, es que la producción de Txp-I podría interferir de alguna manera con una correcta formación de los cuerpos de inclusión, en lugar de afectar la replicación viral. En ese caso, sus observaciones *in vivo*, estarían de acuerdo a las aquí presentadas para los experimentos *in vitro*. La cuestión se zanjaría mediante un estudio ultraestructural de los tejidos de las larvas *T.ni* muertas por la acción del rAcMNPV generado por los mencionados autores, que posee un FP25K silvestre y un gen de poliedrina expresado en su contexto natural. Asimismo, la disponibilidad de información acerca del modo de acción de Txp I, permitiría extraer conclusiones más precisas.

En base a los resultados mostrados en los apartados VI.10 y VI.11, concluimos que se logró un incremento estadísticamente significativo, en la velocidad de acción del virus AgMNPV sobre la plaga blanco. La disminución en los tiempos de muerte alcanzada, superior al 55%, es de las más rápidas hasta ahora informadas para baculovirus modificados genéticamente, incluso con respecto a aquellos a los que se les han introducido otras neurotoxinas específicas de insecto (Hughes *et al.*, 1997; Chejanovsky *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996; Popham *et al.*, 1997). La varianza en los tiempos medios de muerte resultó mucho más pequeña en las larvas infectadas con el recombinante, hecho que reflejó que la alta toxicidad de Txp I redujo la variabilidad de los tiempos, por consiguiente el efecto del tratamiento ejerció un efecto multiplicativo con respecto al silvestre (Lison, 1968).

El tiempo medio de muerte disminuyó con el incremento de la dosis viral, aspecto característico de los bioensayos con baculovirus. La velocidad de muerte resultó más variable a las dosis más bajas para ambos virus, y como ya fue indicado más arriba, aún más variables las del *wild type*, de acuerdo con el hecho de que dichas muertes se extendieron por un mayor período de tiempo.

Comprobamos la infectividad de los cuerpos de oclusión mediante ensayos cualitativos en larvas neonatas. Los resultados obtenidos no permiten concluir si la totalidad de los poliedros es infectiva o si cabe la posibilidad de que algunos cristales no contengan nucleocápsides. Es necesario profundizar los estudios de ultraestructura con el fin de inclinarse por tal hipótesis, ya se ha discutido la morfología aberrante de los cuerpos de oclusión mutantes, sin embargo en las observaciones aquí presentadas no se detectaron cuerpos de inclusión desprovistos de viriones. No obstante, debido a la

inusual morfología detectada, no resulta clara la magnitud de la protección de los viriones ocluidos alcanzada con tales cristales. Es imprescindible un estudio más detallado del fenómeno de oclusión del rAgMNPV/ *Tox 34⁺/ polh⁺* en forma previa al diseño de un bioensayo por ingestión, sin el mencionado estudio es imposible administrar dosis efectivas iguales del virus salvaje y control.

En relación al rAgMNPV/ *Tox 34⁺/ polh⁻*, su acción biológica resultó muy similar a la producida por el rAgMNPV/ *Tox 34⁺/ polh⁺*, en cuanto a su velocidad de acción, comprobada mediante ensayos cualitativos por inyección. No se realizó un estudio pormenorizado con un número significativo de larvas, como en el caso del recombinante *polh⁺*, porque se privilegió el estudio del recombinante con capacidad de producción de cuerpos de inclusión, de aplicación directa a campo. Sin embargo, hay alternativas de dispersión a campo de baculovirus *occ⁻*, que serán discutidas en el Capítulo VII.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El baculovirus de *A. gemmatalis* (AgMNPV) es una de las mayores causas de mortalidad de las poblaciones de dichas larvas en los cultivos de soja, y constituye una herramienta mucho más eficiente, limpia y segura para el control de *A. gemmatalis* comparada con los insecticidas químicos. Sin embargo, el inconveniente más significativo que limita la utilización más amplia de estos baculovirus es su baja velocidad de acción.

La demostración en los inicios de los '90, de que la velocidad de acción de los baculovirus podía mejorarse mediante ingeniería genética, renovó el interés en el estudio de los mismos como agentes de control biológico (Richards *et al.*, 1998).

En este marco, a mediados de 1998, se inició el presente trabajo de Tesis Doctoral, cuyo objetivo más general fue el desarrollo de un sistema para la construcción de AgMNPVs recombinantes.

A continuación se enumeran, a modo de conclusiones, los logros obtenidos.

- Se clonaron y secuenciaron el gen de la poliedrina (*polh*) de AgMNPV y sus regiones flanqueantes.
- Se construyeron vectores de transferencia para la recombinación homóloga con el locus *polh*, creándose el primer sistema de expresión basado en AgMNPV.
- Se aislaron y caracterizaron diferentes recombinantes de AgMNPV generados mediante mutagénesis dirigida por recombinación homóloga:

AgMNPV *polh*⁻ / *lacZ*⁺

AgMNPV *polh*⁻ / *lacZ*⁻ / *tox 34*⁺

AgMNPV *polh*⁺ / *lacZ*⁻ / *tox 34*⁺

- Los resultados de la infección de la línea celular derivada de *A. gemmatalis* UFL-AG 286 con AgMNPV *polh*⁻ / *lacZ*⁺ mostraron que el gen foráneo se expresa a muy altos niveles y que el producto posee la actividad enzimática correcta (Arana *et al.* 2001).
- Utilizando el AgMNPV *polh*⁻ / *lacZ*⁺ (y derivados del mismo) como parental del sistema, se obtuvieron las construcciones ulteriores, tendientes a la mejora del virus como agente de control biológico.

- Los resultados obtenidos a partir de insectos inyectados con los recombinantes *tox34⁺* demostraron la eficacia de la modificación genética realizada. Se comprobó una disminución significativa (55-60%) del tiempo de muerte en larvas infectadas por el virus recombinante, en comparación con el producido por el virus silvestre.
- Los virus modificados resultaron infectivos y biológicamente activos por vía oral.

El proyecto condujo a la generación de una serie de vectores de expresión nuevos basados en diferentes promotores del AgMNPV. Estas construcciones quedan disponibles para la producción de proteínas recombinantes en células de insectos con otras finalidades (estudios de estructura, producción de reactivos diagnósticos, etc.). En este sentido, los productos de este estudio se proyectan también hacia su aplicación en el campo de la Salud.

Por otra parte, en el contexto de la producción agroindustrial, se espera que los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, contribuyan al mejoramiento de la calidad y la sanidad vegetal en los cultivos de leguminosas (soja, poroto, maní), al proveer de una alternativa mejorada, de eficacia comprobada, para el control microbiológico de plagas.

El proceso requerido para la comercialización de un producto biotecnológico se muestra en la Tabla I (Guerra *et al.*, 2001).

Tabla I. Procedimiento general para la comercialización de bioinsecticidas		
Fase	Objetivo	Duración (años)
Investigación	Diseño de la metodología a seguir para llegar a los objetivos planteados.	4
Desarrollo	Elaboración de un compuesto o modificación genética deseada	4
Evaluación	Evaluación de la seguridad y los efectos secundarios del producto mediante bioensayos en humanos, animales o experimentos de campo.	4
Registro	Patente del producto y/o sistema de producción. Vigencia de la patente.	2 20 (6)*
Factibilidad económica	Cálculo de pasivos y activos a futuro, sobre la base de demanda y la estimación de ventas, en un período determinado de tiempo.	0.5
Fabricación	Producción sobre la base de los protocolos establecidos por las agencias gubernamentales correspondientes.	0.5
Comercialización	Promoción y venta del producto.	6

* La vigencia de la patente es de 20 años. Se ha calculado que un producto tarda de 12-14 años para salir al mercado, según el tiempo de investigación y desarrollo del mismo, pero la vigencia empieza a contar desde su aprobación, así que realmente son de 6 a 8 años durante los que el producto queda protegido por derechos de patente

De esta manera, con las evidencias presentadas en las secciones previas de esta Tesis, podemos concluir que se han completado la primera y la segunda etapa (Investigación y Desarrollo) del esquema de avance de este tipo de proyectos. Las perspectivas en el corto plazo en nuestro laboratorio, comprenden la evaluación y el registro de los AgMNPV generados.

La evaluación del impacto ambiental de su liberación, es un requerimiento universal para cualquier nuevo insecticida. Sin embargo, a diferencia de los insecticidas químicos, los baculovirus son agentes replicativos, y pueden permanecer viables en el medio por muchos años. En consecuencia, existe una probabilidad, al menos mínima, de que no pueda ser removido en caso de ser necesario.

Es por ello que ya en la fase de desarrollo del recombinante generado, tomamos ciertos recaudos para garantizar al máximo la seguridad biológica del microorganismo generado.

En primer lugar, si bien el producto del gen *tox 34*, Txp I, posee un mecanismo de acción desconocido, está comprobado que su neurotoxicidad es específica de lepidópteros (Tomalski *et al.*, 1989). Más aún, el AgMNPV se constituye, en el caso del baculovirus modificado, en un simple vector de distribución de la Txp I dentro del insecto, dado que es dicha proteína la causa real de la muerte acelerada de la plaga. Ahora bien, como ya se ha indicado en diversas oportunidades, el vector es de por sí sumamente específico. En conjunto, estas características ayudan a disipar temores sobre las potenciales consecuencias de 'movimiento de genes' o expresión inadvertida en insectos no blanco.

Finalmente, la expresión del gen *tox 34* en las construcciones virales finales, está conducida por promotores baculovirales tardíos (promotores de *p10* y *polh*, según sea el recombinante *polh*⁺ o *polh*⁻). La expresión de los promotores tempranos ocurre antes de la replicación del DNA viral, y para algunos genes puede proceder sin la necesidad de otras proteínas virales. En cambio, la expresión de los promotores tardíos es dependiente de la replicación del virus. De esta manera, la elección de promotores virales tardíos no fue arbitraria.

De cualquier manera, es de esperar que los dos recombinantes virales generados para control biológico, se encuentren en inferioridad de condiciones en su competencia con el virus silvestre por los nichos ecológicos. Esto ocurre porque, como se señaló oportunamente en el Capítulo I, una infección baculoviral se establece una vez que los cuerpos de oclusión que contienen viriones infectivos son ingeridos por el insecto huésped. En lepidópteros, las infecciones baculovirales son sistémicas, es por ello que

la liberación de progenie viral ocurre luego de la muerte del huésped. La disponibilidad de la siguiente generación de virus para comenzar un nuevo ciclo de infección, está asociada con la velocidad de muerte del insecto afectado. Si el individuo infectado muere demasiado rápido, el tiempo resulta insuficiente para lograr una máxima replicación del baculovirus. Asimismo, si la muerte se retrasa demasiado, se pierden oportunidades de transmisión a otros insectos. En resumen, los modelos teóricos predicen que los extremos de virulencia baculovirales no son favorecidos por la selección natural en comparación con los genotipos que matan al huésped el lapsos de tiempo intermedios (Richards *et al.*, 1998).

La reducción en progenie viral predicha para los recombinantes baculovirales que producen una reducción significativa en el tiempo de muerte de las larvas, como el que se presenta en este trabajo de Tesis, está fundamentado por datos reales (Burden *et al.*, 2000; Ignoffo y García, 1996). La reducida productividad viral informada por larva infectada con virus que expresan toxinas letales para insectos, han sido utilizadas para predecir una menor capacidad de los recombinantes para reciclarse en el ambiente, en comparación con las poblaciones virales silvestres.

Tales predicciones tienen una significativa influencia en la percepción de la seguridad de la liberación de los recombinantes al ambiente, si se asume que una menor productividad conduce a una reducida transmisión. En ese caso, el impacto ambiental para un recombinante de este tipo, sería mucho menor en comparación con la liberación de un virus salvaje (Richards *et al.*, 1998).

Estas predicciones sólo pueden ser verificadas por comparación directa de las velocidades de transmisión de los virus recombinante y silvestre, en un rango de condiciones ecológicas. En este tipo de estudios, el recombinante AgMNPV/ *lacZ*⁺ generado podría ser de utilidad, dado que el gen marcador facilita su localización en el ambiente.

De cualquier manera, el recombinante AgMNPV/ *tox 34*⁺/ *polh*⁺ presentado en el Capítulo VI, produce poliedros morfológicamente alterados, cuya estabilidad en el ambiente deberá estudiarse con mayor detalle en estudios posteriores. Si se comprobara una menor estabilidad de estos cuerpos de inclusión en comparación con los del AgMNPV silvestre, esta característica aportaría a la seguridad biológica del recombinante generado, dado que las predicciones antes indicadas estarían reforzadas por una menor persistencia del recombinante en el ambiente.

Una cuestión a analizar en esta Discusión, es la diseminación en el ambiente de los recombinantes *polh*⁻ generados (AgMNPV/ *lacZ*⁺/ *polh*⁻ y AgMNPV/ *tox 34*⁺/ *polh*⁻).

La co-oclusión es la incorporación de genomas baculovirales silvestre y mutante en el mismo cuerpo de oclusión. Este fenómeno ha sido propuesto como una estrategia válida para la distribución de baculovirus modificados genéticamente, *polh*⁻ (Bull *et al.*, 2001).

El fundamento del fenómeno de co-oclusión es una característica inusual de la biología de los MNPVs: múltiples copias del genoma pueden heredarse juntas dentro del mismo cuerpo de oclusión.

De esta manera, el crecimiento del recombinante *occ*⁻ junto con el virus silvestre *occ*⁺ en cultivo celular, conduce a la co-oclusión de los dos genotipos en un mismo cuerpo de oclusión cuando las células son infectadas por al menos un único genoma de cada genotipo (Bull *et al.*, 2001).

Sin duda, el estudio de los aspectos anteriores debe realizarse para completar la evaluación del bioinsecticida generado.

En este contexto, destacamos que en el marco de la estrategia de control biológico de plagas en una agricultura sustentable, no es aconsejable disminuir la diversidad genética de los cultivos ni confiar en un solo agente de control. Es por ello que en la actualidad, las empresas abocadas a la generación de plantas *Bt* transgénicas (en breve gran parte de los cultivos de soja serán sustituidos por la variedad transgénica que expresa el gen de la toxina de *Bacillus turingiensis*), están interesadas en la producción de paquetes tecnológicos que incluyan además otros agentes de biocontrol.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Arana EI, Albariño CG, O'Reilly D, Ghiringhelli PD, Romanowski V.** (2001). Generation of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus expressing a foreign gene under the control of a very late promoter. *Virus Genes*; 22(3), 363-372.
2. **Arana EI.; McCarthy CB.; Goldberg A.; Sciocco de Cap A., O'Reilly D. and Romanowski V.** 2001. Generation of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* MNPV bearing the itch mite toxin gene. 34th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Noordwijkerhout, Holanda.
3. **Blissard GW' and Rohrmann GF** 1989 Location, sequence, transcriptional mapping and temporal expression of the gp64 gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 170: 537-555.
4. **Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann.** 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35:127-155
5. **Blissard, G.W. and Rohrmann, G.F.** 1991. Baculovirus gp64 gene expression: Analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE-1. *J. Virol.* 65: 5820-5827
6. **Braunagel SC and Summers MD** 1994 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202: 315-328
7. **Braunagel SC, Burks JK, Rosas-Acosta G, Harrison RL, Ma H, Summers MD.** 1999. Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J. Virol.* 8559-8570
8. **Braunagel SC, Burks JK, Rosas-Acosta G, Harrison RL, Ma H, Summers MD.** 1999. Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J. Virol.* 8559-8570
9. **Braunagel, S.C., Elton, D.M., Ma, H. and Summers, M.D.** 1996a. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology* 217: 97-110
10. **Braunagel, S.C., He, H., Ramamurthy, P. and Summers, M.D.** 1996b. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology* 222: 100-114
11. **Burand JP, Summers MD and Smith G** 1980 Transfection with baculovirus DNA. *Virology* 101: 286-290.
12. **Burma, S., Mukherjee, B., Jain, A., Habib, S. and Hasnain, S.E.** 1994. An unusual 30-kDa protein binding to the polyhedrin gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Biol. Chem.* 269: 2750-2757
13. **Carstens, E.B., Tjia, S.T. and Doerfler, W.** 1979. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 99: 386-398
14. **Charlton CA and Volkman LE** 1993a Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf-21 cells induces actin cable formation. *Virology* 197: 245-254
15. **Cherbas, L. and Cherbas, P.** 1993. The arthropod initiator: the cap-site consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23: 81-90
16. **Clem RJ, Fechheimer M and Miller LK** 1991 Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254:1388-1390
17. **Clem, R.J.** 1997. Regulation of programmed cell death and apoptosis. En: *The Baculoviruses* (L.K. Miller, Ed.), pp237-266. Plenum Press, New York
18. **Cochran, M.A. and Faulkner, P.** 1983. Localization of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome. *Journal of Virology* 45, 961-970
19. **Engelhard, E.K., Kam-Morgan, L.N., Washburn, J.O. and Volkman, L.E.** 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3224-3227

20. **Faulkner, P., Kuzio, J., Williamst, G.V. and Wilson, J.A.** 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *J. Gen. Virol.* 78: 3091-3100
21. **Faulkner, P., Kuzio, J., Williamst, G.V. and Wilson, J.A.** 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *J. Gen. Virol.* 78: 3091-3100
22. **Faulkner, P., Kuzio, J., Williamst, G.V. and Wilson, J.A.** 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *J. Gen. Virol.* 78: 3091-3100
23. **Federici, B.A.** 1986. Ultrastructure of Baculoviruses, en; *The biology of baculoviruses*, Vol. I, pp 61-88, R.R. Granados and BA Federici, eds, CRC Press Boca Raton, FL
24. **Flipsen, J. T. M*, J. W. M. Martens, M. M. Van Oers, J. M. Vlak, and J. W. M. van Lent.** 1995. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology* 208:328-335
25. **Fraser MJ** 1986 Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 95: 189-195
26. **Friesen PD and Miller LK** 1986 The Regulation of Baculovirus Gene Expression. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Doerfler W and Böhm, P eds. 131: 31-49. Springer-Verlag, Berlin
27. **Ghosh, S., Jain, A., Mukherjee, B., Habib, S. and Hasnain, S.E.** 1998. The host factor polyhedrin promoter binding protein PPBP is involved in ranscription from the baculovirus polyhedrin gene promoter. *J. Virol.* 72: 7484-1493
28. **Ghosh, S., Jain, A., Mukherjee, B., Habib, S. and Hasnain, S.E.** 1998. The host factor polyhedrin promoter binding protein PPBP is involved in ranscription from the baculovirus polyhedrin gene promoter. *J. Virol.* 72: 7484-1493
29. **Glocker, B., Hoopes, R. R., Jr., Hodges, L., and Rohrmann, G. F** 1993. In vitro transcription from baculovirus late gene promoters: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 67, 3771-3776
30. **Gombart AF, Pearson MN, Rohrmann GF and Beaudreau GS** 1989 A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: Genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology* 169: 182-193
31. **Gomi, S., Ecale Zhou, C., Yih, W., Majima, K. and Maeda, S.** 1997 Deletion analysis of eighteen late gene expression gene homologues of the baculovirus BmNPV. *Virology* 230, 35-47.
32. **Granados RR** 1978 Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* 90: 170-174
33. **Granados RR and Lawler KA** 1981 In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108: 297-308
34. **Gula, M. A., P. L. Buller, and R. F. Weaver.** 1981. a-Amanitin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 38:916-921
35. **Guarino, L. A., and M. Smith.** 1992. Regulation of delayed-early gene transcription of dual TATA boxes. *J. Virol.* 66:3722-3739
36. **Guarino, L. A., and M. Smith.** 1992. Regulation of delayed-early gene transcription of dual TATA boxes. *J. Virol.* 66:3722-3739
37. **Guarino, L. A., and W. Dong.** 1991. Transient expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J. Virol.* 65: 3676-3680
38. **Guarino, L.A. and Summers, M. D.** 1986. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *Journal of Virology* 60, 215-223
39. **Hang, X. and Guarino, L.A.** 1999. Purification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase from infected insect cells. *J. Gen. Virol.* 80: 2519-2526
40. **Heldens, J. G. M., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W. and Vlak, J. M.** 1997. Identification and functional analysis of a non-hr origin of DNA replication in the genome of *Spodoptera exigua* multicapsi nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 78, 1497-1506

41. **Hong, T., Braunagel, S.C. and Summers, M. D.** 1994. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 204, 210-222
42. **Hong, T., Braunagel, S.C. and Summers, M. D.** 1994. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 204, 210-222
43. **Hoopes RR and Rohrmann GF** 1991 In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 4513-4517
44. **Horton, H.M. and Burand, J.P.** 1993 Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 67: 1860-1868
45. **Horton, H.M. and Burand, J.P.** 1993 Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 67: 1860-1868
46. **Jain, A. and Hasnain, S.E.** 1996. A 30-kDa host protein binds to two very late baculovirus promoters. *Eur. J. Biochem.* 239: 384-390
47. **Jarvis, D.L. and Garcia, A.** 1994. Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus gp64 protein. *Virology* 205: 300-313
48. **Kogan, P.H., Chen, X. and Blissard, G.W.** 1995. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. *J. Virol.* 69: 1452-1461
49. **Kool M, Ahrens CH, Goldbach RW, Rohrmann GF and Vlak JM** 1994b Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 91: 11212-11216
50. **Kool, M, C. H. Ahrens, J. M. Vlak, and G. F. Rohrmann.** 1995. Replication of baculovirus DNA. *J. Gen. Virol.* 76:2103-2118
51. **Kool, M., Goldbach, R. W. and Vlak, J. M.** 1994a. A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* 75, 3345-3352
52. **Kovacs, G.R., Guarino, L.A., Graham, B.L. and Summers, M.D.** 1991a Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology* 185, 633-643
53. **Kuzio, J., Pearson, M.N., Harwood, S.H., Funk, C.J., Evans, J.T., Slavicek, J.M. and Rohrmann, G.F.** 1999. Sequence analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* 253, 17-34
54. **Kuzio, J., Rohel, D.Z., Curry, C.J., Krebs, A. Carstens, E.B. and Faulkner, P.** 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 139: 414-418
55. **Li, L., Harwood, S.H. and Rohrmann, G.F.** 1999. Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology* 255, 9-19
56. **Liu, J.C. and Maruniak, J.E.** 1995. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the gp41 gene of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76: 1443-1450
57. **Lu, A. and Miller, L.K.** 1997 Generation of recombinant baculoviruses by direct cloning. *BioTechniques* 21, 63-67
58. **Lu, A. and L.K. Miller.** 1995. Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *J. Virol.* 69: 6265-6272
59. **Luckow VA, Summers MD.** 1989. High level expression of nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 170: 31-39
60. **McDougall, V.V. and Guarino, L.A.** 1999. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase: measurements of processivity and strand displacement. *J. Virol.* 73: 4908-4918
61. **McLachlin, J. R., and Miller, L. K.** 1994. Identification and characterization of vlf-1, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *J. Virol.* 68:7746-7756
62. **Morris, T. D. and Miller, L. K.** 1994. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter, *Gene* 140, 147-153
63. **Ooi BG and Miller LK** 1988 Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* 166: 515-523
64. **Ooi, B. G., Rankin, C., and Miller, L. K.** 1989. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mot. Biol.* 210, 721-736

65. **Ooi, B.G. and Miller, L.K.** 1990. Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of an antisense transcripts initiated downstream. *J. Virol.* 64: 3126-3129
66. **Oomens, A.G.P., Monsma, S.A. and Blissard, G.W.** 1995. The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization and processing. *Virology* 209: 592-603
67. **Pearson, M., Bjornson, R. M., Ahrens, C. H. and Rohrmann, G. F.** 1993. Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* 197, 715-725
68. **Possee, R. D., and S. C. Howard.** 1987. Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* 15:10233-10248
69. **Pullen, S. S. and P. D. Friesen.** 1995b. Early transcription of the *ie1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *J. Virol.* 69:156-165
70. **Pullen, S.S. and P. D. Friesen.** 1995a. The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator *ie-1*. *J. Virol.* 69: 3575-3583
71. **Purnell, B.A., Emanuel, P.A. and Gilmour, D.S.** 1994. TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes Dev.* 8: 830-842
72. **Rankin, C., Ooi, B. G. and Miller, L. K.** 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene* 70, 39-50
73. **Rapp, J. C., J. A. Wilson, and L. K. Miller.** 1998. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J. Virol.* 72:10197-10206
74. **Rohrmann GF** 1986 Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* 67: 1499-1513
75. **Rohrmann GF** 1992 Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* 73: 749-761
76. **Russell RLQ and Rohrmann GF** 1990 A baculovirus polyhedron envelope protein: Immunogold localization in infected cells and mature polyhedra. *Virology* 174: 177-184
77. **Theilmann, D. A., Chantler, J. K., Stewart, S., Flipsen, H. T., Vlak, J. M. and Crook, N. E.** 1996. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions. *Virology* 218, 148-158
78. **Theilmann, D. A., Chantler, J. K., Stewart, S., Flipsen, H. T., Vlak, J. M. and Crook, N. E.** 1996. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions. *Virology* 218, 148-158
79. **Thiem SM and Miller LK** 1989 Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 63: 2008-2018.
80. **Tjia ST, Carstens EB and Doerfler W** 1979 Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. 11. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology* 99: 391-409
81. **Todd, J. W., Passarelli, A. L., and Miller, L. K.** 1995. Eighteen baculovirus genes including *lef-77*, *p35*, *39k* and *p47* support late gene expression. *J. Virol.* 69, 968-974
82. **Tweeten, K. A., Bulla, L. A. and Consigli, R. A.** 1980. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsid. *Journal of Virology* 33, 866-876
83. **Van Oers MM, Flipsen JT, Reusken CB, Vlak JM.** 1994. Specificity of baculovirus *p10* functions. *Virology* 200: 513-523
84. **Vaux, D.L. and Strasser, A.** 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acadf. Sci USA* 93: 2239-2244
85. **Vialard, J. E. and Richardson, C. D.** 1993. The 1629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes nucleocapsid-associated phosphoprotein. *Journal of Virology* 67, 5859-5866
86. **Volkman LE and Goldsmith PA** 1985 Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* 143: 185-195
87. **Volkman, L. E. and Summers, M. D.** 1977. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkaliliberated, and nonoccluded forms. *Journal of Invertebrate Pathology* 30, 102-103
88. **Volkman, L.E.** 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. En: *Advances in Virus Research*, vol. 48. Academic Press, pp 313-348
89. **Wang X and Kelly DC** 1983 Baculovirus replication: Purification and identification of the *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase. *Journal of General Virology* 64: 2229-2336

90. **Washburn, J. O., B. A. Kirkpatrick and L. E. Volkman.** 1995. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology* 209: 561-568
91. **Washburn, J. O., Lyons, E.H., Hass-Stapleton, E.J. and Volkman, L.E.** 1999. Multiple nucleocapsid packaging of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in *Trichoplusia ni*. *J. Virol.* 73: 411-416
92. **Weyer, U., and R. D. Possee.** 1989. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene. *J. Gen. Virol.* 70:203208
93. **Whitford M, Stewart S, Kuzio I and Faulkner P** 1989 Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 63: 1393-1399
94. **Whitford, M. and Faulkner, P.** 1992 a, A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Virology* 66, 3324-3329
95. **Whitford, M. and Faulkner, P.** 1992b. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 66, 4763-4768. Erratum 67, ~427; 1993
96. **Whitt MA and Manning JE** 1988 A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* 163:33-42
97. **Wickham TJ, Shuler ML, Hammer DA, Granados RR and Wood HA** 1992 Equilibrium and kinetic analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus attachment to different insect cell lines. *Journal of General Virology* 73: 3185-3194
98. **Wickham, T.J., Granados, R.R., Wood, H.A., Hammer, D.A. and Shuler, M.L.** 1990. General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophys. J.* 58: 1501-1516
99. **Wilson ME, Mainprize TH, Freisen PD and Miller LK** 1987 Location, transcription and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine rich polypeptide. *Journal of Virology* 61: 661-666
100. **Wood HA** 1980 Isolation and replication of an occlusion body deficient mutant of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 105: 338-344
101. **Xu, B., Yoo, S. and Guarino, L, A.** 1995. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: Fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. *J Virol.* 69, 2912-2917
102. **Yang, C.L., Stetler, D.A. and Weaver, R.F.** 1991. Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. *Virus Res.* 20: 251-264
103. **Yang, S., and L. K. Miller.** 1998. Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 vlf-1 gene. *Virology* 245:99-109
104. **Yang, S., and L. K. Miller.** 1999. Activation baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J. Virol.* 73:3404-3409
105. **Zuidema D., Van Oers, M. M., Van Strien, E. A., Caballero, P. C., Klok, E. J., Goldbach, R. W. and Vlak, J. M.** 1993. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p10 gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* 74, 1017-1024