



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
(IBBM, UNLP–CONICET, La Plata)

“Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus de importancia agronómica”

Ricardo Salvador

Tesis Doctoral

2010

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata y en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); bajo la dirección del Profesor Dr. Victor Romanowski y de la Ing. Agr. Alicia Sciocco de Cap

MI RECONOCIMIENTO A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (ANPCYT), A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA y AL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Agradecimientos

A mis directores el Dr. Víctor Romanowski y Alicia Sciocco de Cap. Primero las damas; a Alicia Sciocco de Cap por transmitirme sin mezquindades y mucha paciencia su saber. Por perdonar mis desaciertos y elogiar los avances. Gracias por la confianza demostrada en estos años y haber guiado con sus ideas y todo lo que estuvo a su alcance este trabajo. También por contar conmigo en los nuevos proyectos y haberme abierto las puertas del INTA para formar parte de su grupo de trabajo .Gracias por todo!!!

Al Dr. Victor Romanowski por poner su experiencia e ideas en este trabajo. Gracias por brindarme la confianza y paciencia que fue necesaria en todo este tiempo. Por guiar, pero a la vez darme libertad de acción en el desarrollo de esta tesis. Por permitirme ser parte de su grupo de investigación y poner a mi disposición todo lo necesario para lograr los objetivos. Muchas Gracias!!!

Al Dr. Ricardo Gomez y la Ing. Graciela Quintana por sus aportes de las más diversas formas a la realización de este trabajo. Gracias!!!

A la Dra. Fernanda Zanca y el Dr. Marcelo Berreta, por compartir su experiencia y estar disponibles cada vez que fue necesario.

A mis compañeros de laboratorio del IBBM, los primeros y que ya emigraron, Diego, la Sole, Javi, el Colo, la Mini, Eduardo, Alejandra (ch), Alejandra (carni). Por guiarme en mis primeros tiempos dentro del laboratorio, por la ayuda y por haberme hecho disfrutar los días de trabajo compartidos. Gracias!!!! A los que están, a Leti, Gaby y Caro, por su amistad, compañerismo y fundamental ayuda en el día a día! A los más nuevos, Mandi, Maia, Santi, Leo, Matias, Magdalena, Jesi y Lucre por dar una mano siempre que se necesitó. Gracias a todos porque tuve la suerte de formar parte de un grupo de buenas personas, que hicieron y hacen del lugar de trabajo un espacio para disfrutar.

A mis compañeros del IMYZA, a Marcelo B., Marcelo F., Joel y Lorena por hacerme un espacio en el laboratorio, por cooperar de forma desinteresada en mi trabajo, dejarme participar en el de ellos y hacer siempre muy agradable mi estadía en Castelar. Gracias por todo!!! A María y Debora por haber mantenido la cría de los insectos con los cuales se realizaron los experimentos en esta tesis.

A mis compañeros del IBBM: a Nacho (Gallo para los Belgranenses) quien no sólo es un compañero de trabajo sino también un integrante del grupo de buenos amigos que me dejó la Facultad, gracias por tu ayuda en el labo y tantos años de buena amistad!. A Pity, Pistorio, Florencia, Federico, Julieta, JPG, Florcita, Julia, Emilia, Daniela, Finger, Augusto, Angie, Gonzalo, Mauricio, Carina y Verónica. A todos gracias porque siempre de alguna manera dieron una mano!

A Caty, por su valioso trabajo en el día a día y por contar con su ayuda cada vez que fue necesario. A Rubencito por colaborar en lo que estuviera a su alcance y mi reconocimiento a Carlitos por las divertidas charlas compartidas y su ayuda en el mantenimiento del laboratorio.

A los Dres. Laura García, Antonio Lagares, Anibal Lodeiro, Daniela Hozbor y Mario Aguilar, por permitirme hacer uso de sus equipamientos, necesarios para muchas de las experiencias realizadas en este trabajo.

A Silvia Moya, por su siempre amable y desinteresado interés en resolver los problemas de carácter administrativo que fueron surgiendo a lo largo de estos años. Gracias!

A la gente de Biotecnología del INTA, Castelar, Andrea P, Gabriela y Oscar, por su siempre gentil colaboración de una manera u otra en este trabajo. Gracias! A Esteban por su confianza depositada para los nuevos proyectos y darme el tiempo necesario para poder concluir esta tesis!

A Hernán, Luciano, Marcos, Soledad, Fito, Nadia, Marcelo Pecoraro., Cecilia Galosi, Gabriela Echeverria y Teresa Gonzales del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por su cooperación desinteresada cada vez que fue necesario.

A mis compañeros de la Cátedra de Biología, por disculpar mis faltazos en esta ultima etapa de escritura de la tesis. Gracias!

A mis amigos y afectos, Hugo, Horacio, Pancho, Pablo, Debo, La Flaca, la Coca, Mariana, el Colo, Sole, el Sapo, Diego, Chifi, Antonio, Minino, el Flaco y el Taco por no cuestionar mis ausencias en estos últimos tiempos!

Finalmente a toda mi familia, mi bien máspreciado, por estar siempre a mi lado.

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

aa	aminoácido
BLAST	"Basic local alignment search tool". Algoritmo para la búsqueda de similitudes entre secuencias
BV	Budded virus, virus brotante
<i>v-cath</i>	Cathepsin = gen catepsina viral
<i>CATH</i>	Cathepsin= catepsina (proteína)
<i>chiA</i>	chitinase A = quitinasa A (gen)
CHI-A	chitinase A = quitinasa A (proteína)
cm	cloranfenicol (antibiótico)
DO	Densidad óptica
<i>egfp</i>	enhanced green fluorescent protein (gen)
EGFP	enhanced green fluorescent protein (polipéptido)
Fig.	Figura
<i>gp37</i>	Gen de gp37
GP37	Proteína de gp37
GV	Granulovirus o virus de la granulosis
h	hora (s)
H2O bd	agua bidestilada
hr	homologous regions = secuencias de repetición homólogas
<i>iap</i>	inhibitor of apoptosis = inhibidor de apoptosis (gen)
<i>ie-1</i>	immediate early 1= inmediato temprano 1 (gen)
IE-1	polipéptido expresado a partir del gen ie-1
kb	kilo pares de bases(1 kb = 1000 bp)
kDa	kilo Daltons
LB	Luria Bertani, medio de cultivo para E. coli
<i>lef</i>	late expression factor = factor de expresión tardía
M	molar
min	minuto (s)
MIP	Manejo Integrado de Plagas
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
MNPV	Multiple Nucleocapsid PolyhedroVirus o virus de la poliedrosis nuclear múltiple
MP	membrana peritrófica
NC	Nucleocápside
NPV	NucleoPolyhedroVirus o nucleopoliedrovirus
nt	nucleótido (s)
OB	Occlusion Body, cuerpo de oclusión
ODV	Occlusion Derived Virus, virus derivado de oclusión
ON	overnight (toda la noche)
ORF	Open Reading Frame (Marco de Lectura Abierto)
ori	origin of viral DNA replication = origen de replicación de DNA viral
p.i.	post infección
OV	Occlusion Virion, virión ocluido
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction = Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
<i>polh</i>	ORF de poliedrina

rpm	revoluciones por minuto
SNPV	Single Nucleocapsid PolyhedroVirus o virus de la poliedrosis nuclear simple
TA	Temperatura Ambiente
UV	ultravioleta
V	Volts (voltios)
<i>vef</i>	viral enhancing factor = factor aumentador viral (gen)
VEF	viral enhancing factor = factor aumentador viral (proteína)
μl	microlitro
μm	micrómetro

INDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Evaluación de los efectos de EpapGV como incrementador de virulencia de nucleopoliedrovirus	36
Capítulo 3. Estudio y caracterización de un homólogo a <i>gp37</i> encontrado en el genoma de EpapGV	60
Capítulo 4. Caracterización de la quitinasa de EpapGV	88
Capítulo 5. Evaluación de genes de EpapGV en baculovirus recombinantes	116
Conclusiones generales y perspectivas	145

Introducción

Indice temático

Baculovirus	3
Estructura y composición de los baculovirus	5
Ciclo de infección	11
Uso de baculovirus en el control biológico de plagas	16
Epinotia (=Crociosema) aporema (Wals)	18
Virus de la granulosis de Epinotia aporema	19
Anticarsia gemmatalis (Hübner)	21
Nucleopoliedrovirus de Anticarsia gemmatalis (AgMNPV)	22
Spodoptera frugiperda (Smith)	23
Contexto de trabajo	25
Hipótesis	25
Objetivo general de la Tesis	26
Objetivos Particulares	27
Referencias	28

Baculovirus

La historia del descubrimiento de los baculovirus está íntimamente relacionada con el desarrollo de la industria de la seda que se originó en China hace 5.000 años. La cría del “gusano de seda” (*Bombyx mori*, Lepidoptera: Bombycidae) se extendió por todo Asia, llegando a Japón a través de Corea aproximadamente en el año 300 D.C. Posteriormente comenzó a practicarse en Europa alrededor del año 550 D.C. y llegó a México por los años 1.500 (Benz, 1986; Rohrmann, 2008). Las mermas en la producción asociadas a patologías observadas en los gusanos de seda, motivó el estudio de sus agentes causales. Hacia mediados del siglo XIX, con el advenimiento del uso y mejora en la calidad del microscopio óptico, se determinó que una de las enfermedades que afectaba a las larvas se caracterizaba por la presencia de cuerpos de oclusión poliédricos, en las células infectadas. Ello condujo a la posterior denominación de la enfermedad como “poliedrosis”. Aunque la presencia de partículas infecciosas dentro de los cuerpos de oclusión se había sugerido anteriormente, recién hacia finales de la década de 1940 se demostró de manera convincente la presencia de viriones en forma de bastón, mediante microscopía electrónica (Bergold, 1952; Rohrmann, 2008). Posteriormente se comenzó a designar como virus de la poliedrosis nuclear (*Nuclear Polyhedrosis Virus*, NPV) a aquellos virus cuyos cuerpos de oclusión se localizaban en el núcleo de la célula, distinguiéndolos de las poliedrosis citoplasmáticas (CPV, Fam. *Reoviridae*).

Por otra parte, en la década de 1920 se describió otra enfermedad que afectaba a insectos del Orden Lepidoptera y que se caracterizaba por la presencia de cuerpos de oclusión pequeños y de forma granular, la cual fue denominada “virus de la granulosis” (*Granulosis Virus*, GV) (Paillot, 1926; Rohrmann, 2008).

El término baculovirus fue sugerido por el Dr. Mauro Martignoni y deriva del latín *baculum* (bastón) aludiendo a la forma de los viriones. En 1973, se creó la Familia *Baculoviridae* (Vago, 1974).

Esta familia agrupa a virus que se caracterizan por presentar un genoma de DNA doble cadena, circular, súper-enrollado, que varía entre 80 y 180 kpb y codifica entre 90 y 180 genes. En la mayoría de los baculovirus existen dos tipos de viriones

con idéntico genotipo y diferente fenotipo: viriones ocluidos (*occluded virions*, OV_s u *occluded derived virions*, ODV_s) y viriones brotantes (*budded virions*, BV_s), los cuales cumplen roles diferentes durante el ciclo biológico del virus. En todos los casos, presentan cuerpos de oclusión (*occlusion bodies*, OB_s) donde se ocluyen los OV_s.

El tamaño y la forma de los OB_s se ha aprovechado para clasificar a la familia *Baculoviridae* en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV) (Theilmann *et al.*, 2005). Recientemente, sobre la base del conocimiento de secuencias genómicas baculovirales y sus relaciones filogenéticas, se ha sugerido la división de esta familia en cuatro géneros (Fig. 1.1) (Jehle *et al.*, 2006):

El género *Alphabaculovirus* incluye a todos los *Nucleopolyhedrovirus* específicos de lepidópteros. Los miembros de este género producen tanto viriones brotantes como viriones ocluidos, los cuales pueden presentar una o varias nucleocápsides por virión (SNPV o MNPV, respectivamente). Morfológicamente el cuerpo de oclusión mide aproximadamente 0,4 - 3 µm de diámetro. El tamaño del genoma oscila entre 100 y 180 kbp. La especie tipo propuesta es *Autographa californica Nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Por otra parte, entre los NPVs de lepidópteros se distinguen los grupos I y II. Ambos difieren en su contenido génico y en la proteína de fusión funcional en los viriones brotantes: GP64 y F, respectivamente.

El género *Betabaculovirus* incluye a representantes específicos que infectan sólo lepidópteros, nombrados anteriormente como *Granulovirus*. En su ciclo replicativo producen tanto viriones brotantes como ocluidos. El tamaño del OB es de aproximadamente 300-500 nm × 130-250 nm. El genoma puede poseer entre 100 y 180 kbp. Como especie tipo se propuso al granulovirus *Cydia pomonella* (CpGV).

El género *Gammabaculovirus* incluye a los *Nucleopolyhedrovirus* aislados de himenópteros. Presentan cuerpos de oclusión poliédricos de unos 0,4 -1,1 µm diámetro, con una sola nucleocápside por virión (SNPV). El tamaño de los genomas de NeleNPV (*Neodiprion lecontei Nucleopolyhedrovirus*) y de NeseNPV (*Neodiprion sertifer Nucleopolyhedrovirus*) es de 82 y 86 kbp, respectivamente. El fenotipo brotante puede estar ausente. La especie tipo propuesta es *Neodiprion lecontei Nucleopolyhedrovirus* (NeleNPV).

Por último, el género *Deltabaculovirus* incluye a *Culex nigripalpus Nucleopolyhedrovirus* (CuniNPV) y otros baculovirus específicos de dípteros. Tanto los BV como los ODV están descritos en el ciclo viral. CuniNPV presenta OBs de forma globular de unos 400 nm de diámetro. La proteína constituyente del cuerpo de oclusión no es homóloga ni a la poliedrina ni a la granulina. La especie tipo propuesta en este caso es *Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus* (CuniNPV).

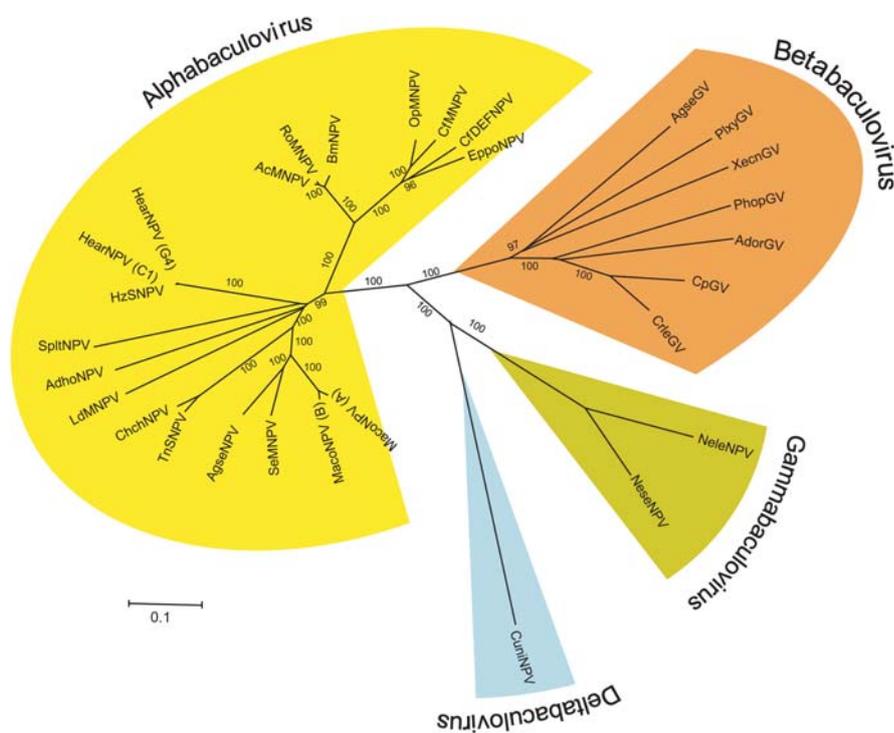


Fig.1.1. Árbol filogenético con géneros y especies incluídas en la Familia Baculoviridae (Jehle *et al.*, 2006).

Estructura y composición de los baculovirus

El genoma viral se encuentra empaquetado en nucleocápsides contenidas en viriones con forma de bastón, que miden aproximadamente 200 nm de largo por 30 nm de diámetro. Durante el ciclo de replicación viral, pueden presentar dos fenotipos virales con roles diferentes. Un fenotipo viral ocluido (OV, ODV) en una matriz proteica (constituída principalmente por granulina o poliedrina), el cual se

produce en grandes cantidades en las etapas finales de la infección y está especializado en la transmisión horizontal del virus de insecto a insecto susceptible (Theilmann *et al.*, 2005). Los cuerpos de oclusión que los contienen son liberados en el medio ambiente cuando el hospedador infectado muere y son capaces de persistir en la naturaleza, principalmente en el suelo y hojarasca, durante largos períodos de tiempo. Esta permanencia en el ambiente constituye una fuente de inóculo para generaciones subsiguientes de la plaga y un medio de control de la densidad poblacional del insecto (Kalmakoff, 1982).

Como se ha mencionado, los OV's se encuentran contenidos dentro de cuerpos de oclusión de formas y tamaños diversos, según la especie y género baculoviral.

Estructura de los cuerpos de oclusión

Los cuerpos de oclusión (OBs) están constituidos mayoritariamente por poliedrina o granulina (según el género baculoviral) (Fig. 1.2). Estas son los componentes estructurales más importantes del OB y ambas proteínas contienen aproximadamente 250 aa (30 kDa), siendo las más conservadas entre los baculovirus. Se encuentran homólogos en todos los genomas baculovirales (Funk, 1997). Como excepción se puede mencionar CuniNPV, en el que la secuencia aminoacídica de la proteína constituyente de los OBs parece no estar relacionada con la secuencia de la poliedrina de otros baculovirus (Afonso *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2006).

Otro componente del OB es su envoltura, cuya función parece estar asociada a sellar la superficie de los poliedros y aumentar su estabilidad (Rohrmann, 2008). En su composición se encuentran hidratos de carbono (Minion, 1979) y una proteína fosforilada que fue posteriormente identificada como PE (Ac131) (Whitt & Manning, 1988) y que presenta homólogos en los genomas de todos los baculovirus que infectan lepidópteros, secuenciados hasta el presente (van Oers & Vlak, 2007).

Entre las factores asociados a los OBs se puede citar además a Ac68, que parecería estar involucrada con la morfogénesis del poliedro (Xu *et al.*, 2008b). La proteína P10 (Ac137) es requerida para la correcta formación de los poliedros y cuando es fosforilada se la encuentra asociada a microtúbulos (Cheley *et al.*, 1992).

La delección de *p10* en el genoma viral ocasiona la malformación de poliedros y la formación de una envoltura incompleta (Gross *et al.*, 1994).

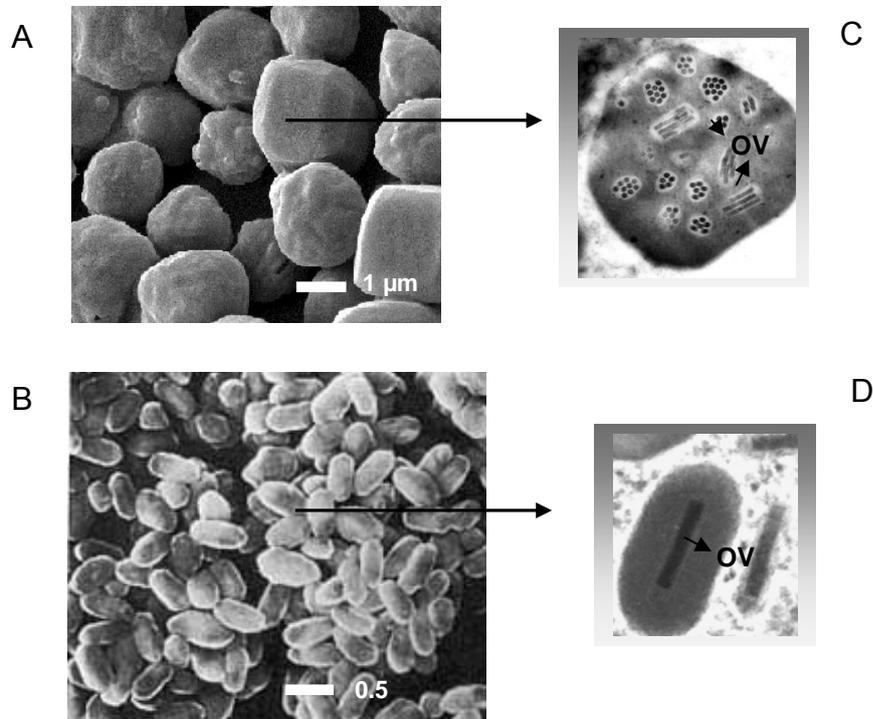


Fig. 1.2. A y B: Micrografías electrónicas de barrido de un NPV y un GV. C y D: Micrografías electrónicas de cortes ultrafinos de cuerpos de oclusión (OV: viriones ocluidos)

Las proteínas VEFs (*Viral enhancing factors* o *enhancers*) pueden aparecer asociadas a los OBs de ciertos baculovirus; son metaloproteasas que en el caso de TnGV llegan a representar el 5% de la masa del OB (Hashimoto *et al.*, 1991). Estas proteasas facilitan la infección viral por disrupción de la membrana peritrófica (MP) del hospedador (Derksen & Granados, 1988; Lepore *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1999; Tanada *et al.*, 1973; Wang & Granados, 1997)

Estructura de viriones ocluidos

Los viriones ocluidos dentro de la matriz proteica del OB poseen una envoltura constituida por diversas proteínas designadas como ODV-E (Fig. 1.3). Como

ejemplo la ODV-E66 en AcMNPV (Ac46) codifica una enzima que es capaz de digerir el ácido hialurónico, que es un polisacárido importante de la matriz extracelular (Vigdorovich *et al.*, 2007). Homólogos a esta proteína se encuentran casi todos los baculovirus, excepto los aislados de himenópteros y dípteros (van Oers & Vlak, 2007).

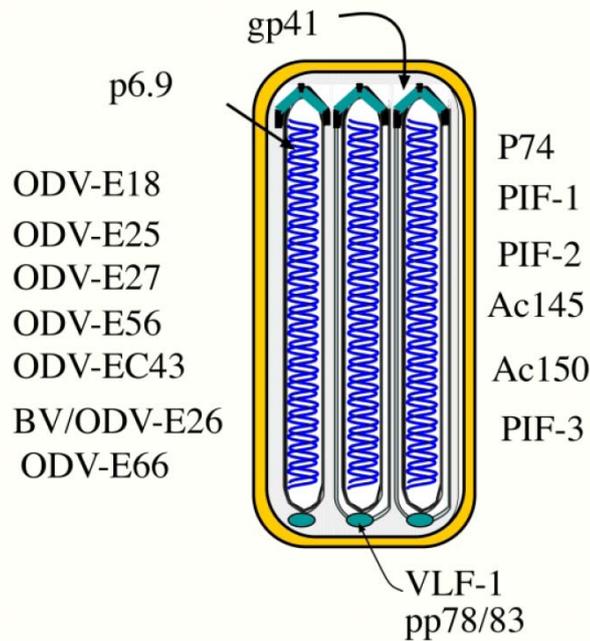


Fig.1.3. Componentes proteicos de un virión derivado del cuerpo de oclusión. ODV-E: proteínas de la envoltura del ODV. PIF/ P74/ Ac145/ Ac150: Factores de infección *per os*. (Fuente: Rohrmann, 2008)

Otro grupo de proteínas encontradas en la envoltura que rodea a los ODV se asocia a la infección de los insectos por vía oral, por lo cual fueron designadas con el nombre de *per os infectivity factors* (PIF). Se identificaron cuatro genes *pif* en AcMNPV denominados p74-pif (Ac138), Ac 22 (pif-2), Ac115 (pif-3), y Ac119 (pif-1). Homólogos de estos cuatro genes están presentes en los genomas de todos los baculovirus. Las proteínas PIF1, PIF2, y p74 actúan mediando de forma específica la unión de los ODV a las células del intestino medio, sugiriéndose que están directamente involucradas en la interacción virus-célula en las etapas iniciales de la infección (Ohkawa *et al.*, 2005). Otros dos genes hallados en AcMNPV (Ac 145 y Ac150), posiblemente presentan una función similar a los genes *pif*, ya que al ser

ambos deletados en AcMNPV, el virus modificado resultó ser menos infeccioso que el salvaje (Lapointe, 2004).

Estructura de la nucleocápside (NC)

Cada OV puede contener en su interior una (GVs y SNPV) o varias nucleocápsides (MNPV), cuya estructura es común con la de los viriones brotantes (BV). La nucleocápside (NC) está conformada por DNA superenrollado íntimamente asociado a la proteína P6.9. Esta proteína con capacidad de unión a DNA participa en alto grado de la compactación que presenta el material genético viral.

Por otra parte, la proteína VLF-1 (Ac77) (*very late factor*), está ubicada en la región terminal de la NC y tiene funciones estructurales tanto en los ODV como en los BV (Yang & Miller, 1998).

La cápside del virión está compuesta principalmente por la proteína VP39 (Ac89), que posee homólogos en todos los genomas baculovirales. Entre otras proteínas de importancia que están presentes en los viriones se pueden citar a GP41 (Ac80), que se encuentra localizada entre la envoltura del virión y la cápside, constituyendo una estructura denominada tegumento (Whitford & Faulkner, 1992) que es requerida para el egreso de la nucleocápside del núcleo (Olszewski & Miller, 1997).

Ac142 (p49), es otro componente de la nucleocápside del BV y del ODV. Está presente en todos los baculovirus secuenciados (Rohrmann, 2008). Mediante estudios bajo microscopio electrónico se reveló que es requerido en la nucleocápside para formar el ODV y su posterior oclusión en el OB (McCarthy & Theilmann, 2008). Por último, la proteína Ac144 asociada al virión, podría estar involucrada en el procesamiento del DNA, su empaquetado y en la morfogénesis de la NC (Vanarsdall *et al.*, 2007).

Estructura de los viriones brotantes (BVs)

Los BVs representan el segundo fenotipo viral hallado en el ciclo infeccioso de los baculovirus. Estos poseen una envoltura diferente a la encontrada en los ODVs, lo cual les permite realizar una infección a nivel sistémico (de célula en célula dentro

del hemocele del insecto). Los OV_s infectan células del epitelio intestinal unas 10.000 veces más eficientemente que los BV_s. Mientras que estos últimos son, en cambio, 1.000 más infectivos en cultivos celulares (Rohrmann, 2008).

Estructuralmente los BV_s poseen en su envoltura una proteína con actividad fusogénica bien caracterizada denominada GP64 (Ac128). Debido a su importancia en la infectividad del BV se pensó que estaría presente en todos los baculovirus (Monsma *et al.*, 1996; Oomens *et al.*, 1995). El análisis de diversos genomas demostró la ausencia de homólogos a este ORF, en los cuales la función de fusión era cumplida por una proteína denominada F (prot. F). Algunos baculovirus poseen ambos ORFs pero en esos casos, la proteína F es inactiva. Según estudios realizados en tal sentido, se postula que *gp64* podría haberse adquirido en diferentes linajes baculovirales en los cuales la actividad de la proteína F fue desplazada (Rohrmann, 2008). Como se ha mencionado, la presencia/ausencia de este ORF es utilizada para agrupar a los NPV dentro de los grupos I y II (Fig.1.4).

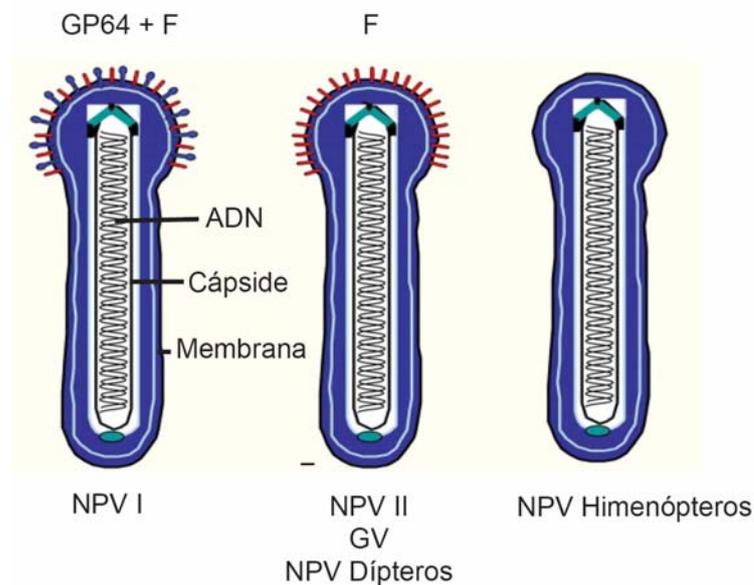


Fig. 1.4. Estructura de BV y distribución de GP64/F en los diferentes grupos

Si bien la proteína F (Ac23) no posee actividad fusogénica en AcMNPV, cuando es delecionada se observa un aumento del tiempo letal (Pearson *et al.*, 2001a). Los

representantes del grupo II de NPVs, GVs y baculovirus aislados de dípteros utilizan la proteína F como proteína de fusión y carecen de homólogos a *gp64*. La inserción del ORF correspondiente a la proteína F de *Agrotis segetum Granulovirus* en el genoma de AcMNPV en el cual *gp64* fue deletado demostró ser capaz de rescatar la infectividad (Yin *et al.*, 2008).

Ciclo de infección

Para entender el ciclo de infección de los baculovirus, es necesario referirse someramente al tracto gastrointestinal del insecto, ya que es en este sitio donde transcurren las primeras etapas del mismo. El intestino de este grupo de artrópodos se compone de tres secciones: intestino anterior, medio y posterior. En lepidópteros, el intestino anterior cumple la función de facilitar la absorción, el almacenamiento y la transformación física de los alimentos. Está recubierto por una cutícula que contiene quitina y que forma parte del exoesqueleto del insecto. Una válvula separa el intestino anterior del intestino medio. Este último está involucrado en la secreción de enzimas y en la absorción de los alimentos digeridos. En la entrada y salida del intestino medio, el pH es cercano a 7,0, pero en la región central puede variar entre 10 y 12, dependiendo de las especies de lepidópteros (Dow, 1992). Otra válvula separa el intestino medio del intestino posterior. Éste se encuentra recubierto por una cutícula similar a la del intestino anterior y está involucrado en la captación de material digerido, aunque en menor medida que el intestino medio.

El intestino medio si bien carece de una cutícula, está recubierto internamente por una estructura acelular denominada la membrana peritrófica (MP) (Fig. 1.5) (Peters, 1992). Esta membrana no está presente en todos los grupos de insectos, faltando en grupos como fitópteros (piojos) y tisanópteros (pescaditos de plata), entre otros (Peters, 1992). La presencia de la MP durante el ciclo vital de los insectos que la poseen, es variable y en algunos aparece solo en los estadios larvales mientras que en otros puede estar presente en todos los estados del ciclo (Waterhouse, 1953).

Tradicionalmente, las MPs de los insectos se clasifican en tipo I y tipo II de acuerdo con su formación (Wigglesworth, 1930). Las MPs de tipo I son producidas a lo largo de todo el intestino medio, lo que se cree que es la situación ancestral y se

encuentra en la mayoría de las especies en la actualidad. Las MPs Tipo II son producidas por células de una zona restringida del intestino medio anterior de dípteros, dermápteros, como así también de algunas familias de lepidópteros (Peters, 1992).

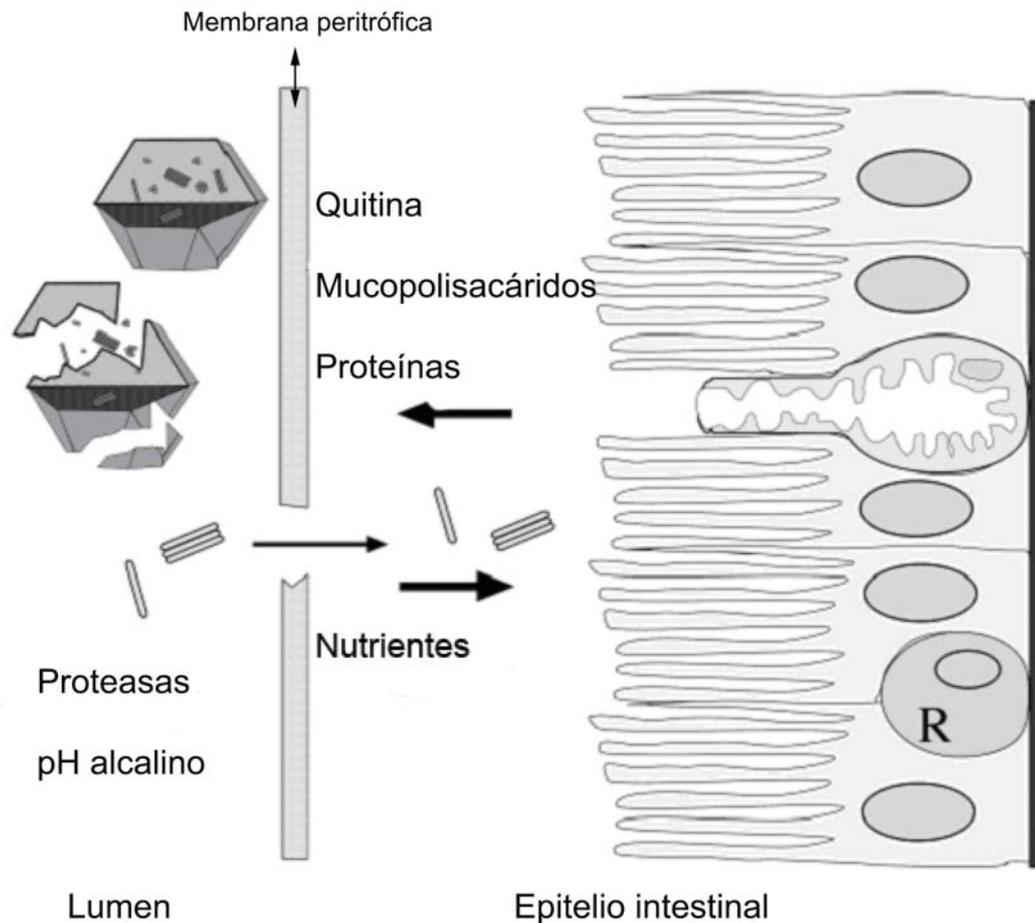


Fig.1.5. Esquema del intestino medio de un insecto con membrana peritrófica. Se muestra la presencia de cuerpos de inclusión baculovirales y su acción sobre la MP. R: células regenerativas del epitelio intestinal. (Fuente: Rohrmann 2008)

La MP está compuesta por quitina (poli β (1,4)-N-acetil-D-glucosamina), la que representa entre el 3 y el 13% de la misma (Lehane, 1997). El resto de la MP está formado por una mezcla de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos. Las proteínas constituyen entre el 20-55% del total de la masa en la PM (Zimmermann, 1975). Estas proteínas varían en tamaño desde 15 hasta 220 kDa.

La función que posee la MP en el intestino medio es proteger la superficie del mismo de los daños causados por el material abrasivo, los alimentos y para limitar el acceso de los microorganismos. También permite la transferencia de sustancias líquidas y digeridas a las células epiteliales del intestino medio, pero impide el paso de las partículas de comida más grandes. Es desgastado por el paso de los alimentos y se regenera a partir de las células epiteliales.

El ciclo de los baculovirus se divide en dos etapas: la infección primaria y la infección secundaria. En los lepidópteros, el estado larval es el más susceptible. Las larvas ingieren los cuerpos de oclusión que se encuentran contaminando su alimento (Fig. 1.6).

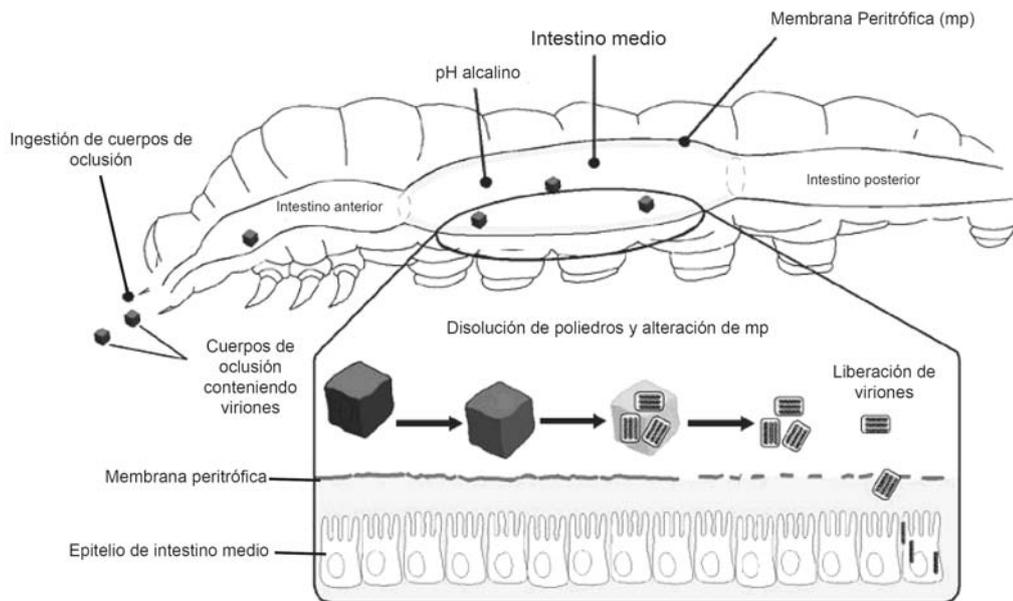


Fig. 1.6: Fase primaria de infección de un baculovirus (NPV)

Los OB ingeridos, al alcanzar el intestino medio, son rápidamente disueltos debido a la acción de proteasas alcalinas presentes en los jugos intestinales ($\text{pH} > 9.5$) y se liberan los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV). La primera barrera

que encuentran dichos viriones es la membrana peritrófica (Eisemann & Binnington, 1994; Lehane, 1997).

Los viriones se unen luego a las microvellosidades del epitelio intestinal mediante la fusión de sus membranas, permitiendo que las nucleocápsides (NC) contenidas en su interior sean liberadas en el citosol (Flipsen *et al.*, 1995). Es en esta etapa, cuando las proteínas presentes en la envoltura del ODV, como las anteriormente mencionadas P74 y PIFs, juegan un rol importante en la fusión a las células del intestino medio (Ohkawa *et al.*, 2005).

Las NC liberadas en el citosol son transportadas al núcleo y el DNA desnudo entra por el poro nuclear iniciando la expresión y replicación del DNA (Granados & Lawler, 1981) (Fig.1.7). La mayor parte de las proteínas necesarias para la replicación del DNA viral están incluidas en el ODV: DNA polimerasa, helicasas, IE1, LEF1 y LEF3 (Braunagel *et al.*, 2003). La incorporación al azar dentro del ODV no está descartada, aunque es probable que este proceso sea altamente específico (Rohrmann, 2008). Una vez replicado el material genético e iniciada la cascada transcripcional de los genes virales que permite la formación de nuevas NC, estas salen del núcleo posiblemente por brotación llevando una envoltura procedente de la membrana nuclear que contiene al menos una proteína viral (GP16) (Gross *et al.*, 1993). Esta membrana es posteriormente perdida en el citoplasma.

En la fase secundaria de la infección, las NC formadas son transportadas a la membrana celular, desde donde abandonan la célula por brotación o a través de la membrana basal. Previamente, grandes cantidades de proteínas virales (GP64 o proteína F) son acumuladas sobre la membrana celular que constituirá la envoltura del BV (Braunagel *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 2001b).

Los BV una vez que abandonan la célula migran a células vecinas, adonde entran por endocitosis, probablemente mediada por la interacción de GP64/F con un receptor de la superficie celular. Una vez que la vesícula endosomal es liberada en el citosol, el endosoma se acidifica, su membrana y la del BV se fusionan, liberando la nucleocápside en el citoplasma.

Durante la infección secundaria, en las infecciones producidas por NPV, los viriones que permanecen en el núcleo parecen obtener una membrana de microvesículas

que tendría su origen en la membrana nuclear interna y que habría sido modificada por el agregado de proteínas virales específicas (Braunagel & Summers, 2007). En esta etapa ocurre la hiperexpresión de genes tardíos resultando en altos niveles de producción de proteínas como P10 y poliedrina. Esta última se acumula en el núcleo rodeando a los viriones y se sabe que al menos una proteína (Ac68) interviene en este proceso de oclusión de los viriones dentro de la matriz proteica del cuerpo de oclusión (Xu *et al.*, 2008a). La proteína P10 parece estar íntimamente involucrada en el ensamblado de la envoltura del poliedro sobre el cuerpo de oclusión (Rohrmann, 2008) (Fig. 1.7).

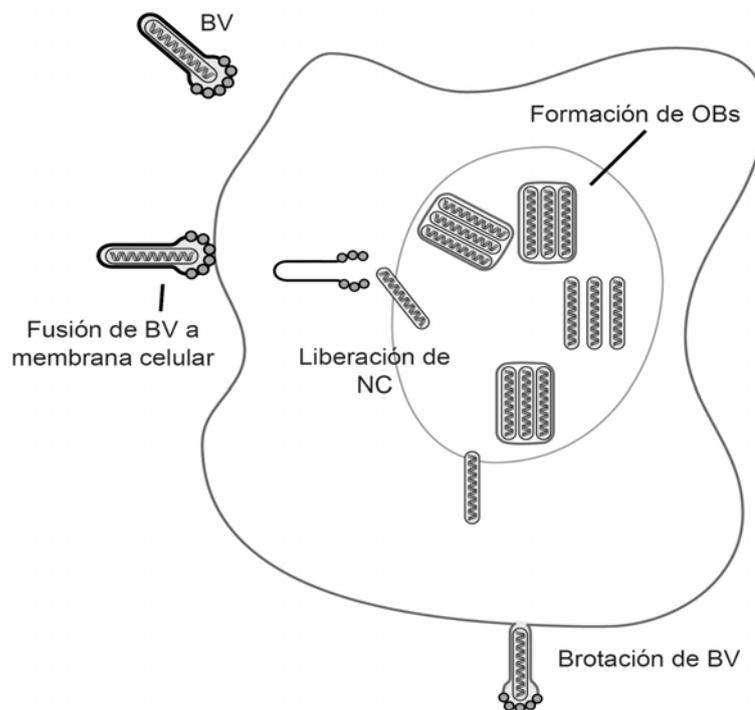


Fig. 1.7. Fase secundaria de infección. Viriones brotantes (BV) ingresan, mediante fusión de su membrana con la membrana celular, a células susceptibles dentro del hospedador en las cuales continuarán con la generación de BV y con la formación de cuerpos de oclusión (OB). Estos últimos serán liberados al medio posteriormente a la muerte y ruptura del tegumento del hospedador.

Avanzada la infección se produce la lisis celular, adquiriendo la hemolinfa una característica coloración blanquecina debido a la acumulación de cuerpos de oclusión. En tal sentido, estudios realizados con AcMNPV, BmNPV y SeMNPV en células de insecto mostraron que este último proceso es dependiente de la presencia de P10, de la acción de una proteína quinasa y de catepsina codificadas por el virus (Williams *et al.*, 1989; Van Oers *et al.*, 1993; Lanier *et al.*, 1996; Williams & Faulkner, 1997). En infecciones *in vivo*, cuando la mayor parte de los tejidos susceptibles se ven afectados, el insecto muere. El tegumento de la larva se rompe y se liberan los OBs en el ambiente, ayudado este proceso por la acción de una quitinasa codificada por el mismo virus (Hawtin *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005).

Los cuerpos de oclusión liberados estabilizan a los viriones en el exterior del huésped, permitiendo la transmisión horizontal de la infección cuando las larvas de insectos susceptibles ingieren alimento por ellos contaminados (Miller, 1996).

Uso de baculovirus en el control biológico de plagas

El control biológico de plagas se relaciona con el uso de los enemigos naturales: predadores, parásitos, parasitoides y patógenos. El manejo de patógenos de insectos (entomopatógenos) tiene como objetivo reducir las poblaciones y los efectos de las plagas.

Para que un patógeno sea efectivo como agente de control microbiano de plagas, debe reunir algunas características deseables, entre las que se encuentran alta virulencia, inocuidad hacia otras formas de vida (incluidos insectos benéficos, vertebrados y plantas), acción rápida, larga permanencia a campo y producción fácil y económica.

Los baculovirus junto con la bacteria esporulada *Bacillus thuringiensis* y algunas especies de hongos, representan los tres grupos de entomopatógenos que mayor atención han recibido para su desarrollo como bioinsecticidas (Tabla 1.1). A nivel mundial el uso de virus bioinsecticidas muestra diferencias regionales. Su uso en las regiones templadas de Europa, Estados Unidos y Canadá con sistemas de producción extensiva está limitado actualmente al control de plagas forestales y de frutales (Caballero *et al.*, 2001). En cambio, la situación en los países en vías de

desarrollo es más favorable y se destaca sobre todos, el programa de control de *Anticarsia gemmatalis* llevado a cabo en Brasil exitosamente por más de veinte años (Moscardi & Sosa Gomez, 2007)

Tabla 1.1. Listado de plagas agronómicas y forestales controladas mediante el uso baculovirus incluidos en formulaciones comerciales. (Fuente: Control de Plagas Agrícolas. Autores: J.A. Jacas y A. Urbaneja Ed. Phytoma, 2008).

Insecto	Virus	Nombre del bioinsecticida	Empresa	Cultivo
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Capex	Andermatt Biocontrol AG	Manzano
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	NPV	Baculo-Soja Baculovirus Nitral Coopervirus PM Protege	Nova Era Biotecnología Agrícola Nitral Urbana Laboratorios Coop. Central Agropecuaria DTE Milenio Agro Ciencias	Soja
<i>Autographa californica</i>	NPV	VPN-80	Agrícola El Sol	Hortalizas, algodón, etc.
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Carpovirusine Madex CYD-X	Natural Plant Protection Andermatt Biocontrol AG Certis	Manzano y Peral
<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	GV	Cryptex	Andermatt Biocontrol AG	Citricos, algodón
<i>Erinnyis ello</i>	GV	-	Biocaribe SA	Yuca
<i>Helicoverpa armigera</i>	NPV	Helicovex Heliokill	Andermatt Biocontrol AG Ajay Bio-Tech	Hortalizas, algodón
<i>H. zea</i> y <i>Heliiothis virescens</i>	NPV	Elcar GemStar LC	Sandoz Certis	Algodón, hortalizas, etc.
<i>Hyphantria cunea</i>	NPV	Virin-ABB		Forestales
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	Gypchek Disparvirus Virin-ENSh	USDA ForestService Corporation CCIP Inc.	Forestales
<i>Mamestra brassicae</i>	NPV	Mamestrin Virin-EKS	Natural Plant Protection	Hortalizas
<i>Mamestra configurata</i>	NPV	Virosoft CP4	Biotepp Inc.	Manzano
<i>Neodiprion sertifer</i> y <i>N. lecontei</i>	NPV	Virox Neochek S Leconteivirus	Microbial Resources USDA Forest Service Canadian Forest Service	Forestales
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	NPV	TM Biocontrol-1 Virtuss	USDA Forest Service Corporation CCIP Inc.	Forestales, ornamentales
<i>Phthorimaea operculella</i>	GV	PTM baculovirus	Varias	Patatas
<i>Pieris rapae</i>	GV	-	Wuhan University	Hortalizas
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	Spod-X Spexit Ness-E	Certis Andermatt Biocontrol AG Applied Chem. Thail.	Hortalizas, ornamentales
<i>Spodoptera frugiperda</i>	NPV	-	Embrapa	Maíz, sorgo
<i>Spodoptera littoralis</i>	NPV	Spodopterin	Natural Plant Protection	Hortalizas, algodón, etc.
<i>Spodoptera litura</i>	NPV	-	Zhongshan University	Hortalizas, algodón, arroz
<i>Spodoptera sunia</i>	NPV	VPN-82	Agrícola El Sol	Hortalizas

En nuestro país, durante la campaña 2003 se realizó en el Valle Inferior del Río Negro (Prov. de Río Negro), la primera experiencia de control de la plaga de manzanos y perales “carpocapsa” (*Cydia pomonella*) mediante el uso del granulovirus homónimo (CpGV). El producto utilizado fue Carpovirus Plus, registrado en la Argentina por el INTA. Durante más de 7 años, se desarrolló un trabajo intensivo y sostenido de evaluación de la eficacia de control en las distintas regiones productoras de nuestro país. Dados los resultados positivos de su aplicación, su uso sigue en aumento. Más recientemente fue aprobado el registro para el uso experimental de una formulación a base de *Epinotia aporema* Granulovirus (EpapGV) (exp. SENASA E241).

Lepidópteros plaga de importancia agronómica regional y agentes de biocontrol utilizados.

Epinotia (=Crociosema) aporema (Wals)

Conocido vulgarmente como “barrenador de los brotes del soja”, es un insecto incluido en el Orden Lepidoptera, Familia Tortricidae. Esta plaga se encuentra distribuida en Centro y Sudamérica. Ataca diversas leguminosas de importancia económica tales como el poroto, arvejas, garbanzo, soja, maní y alfalfa (Villata & Ayessa, 1994).

Es considerada como una de las plagas claves o principales en las leguminosas cultivadas. Los daños en los cultivos los realizan los estadios larvales que inicialmente raspan la superficie de la epidermis de los folíolos y luego barrenan el brote terminal y principal de las leguminosas. En poroto y soja, en caso de una fuerte infestación, daña también los brotes laterales, los que se secan y mueren; posteriormente perforan el tallo en el ápice, penetrando en él y formando canales hacia abajo. Como consecuencia de sus ataques las plantas infestadas paralizan su desarrollo y quedan raquíticas, produciendo vainas muy pequeñas y de mala calidad.

Exteriormente la infestación se manifiesta por los excrementos que son expulsados hacia fuera del canal y por la deformación de los folíolos de los brotes, que se

encuentran unidos por hilos de seda (Fig. 1.8). También pueden alimentarse de hojas, vainas e inclusive flores. Un daño secundario es la entrada de microorganismos a la vaina a través de los orificios que las larvas realizan al penetrar en ellas (Liljesthröm & Rojas-Fajardo, 2005)



Fig. 1.8. *Epinotia aporema* (Walls). (Fuente: www.inta.gov.ar/imyza/index).
A. Estadios larvales sobre hojas del cultivo de soja. **B.** Larva barrenando tallo de leguminosas. **C.** Adultos. **D.** Daño producido en brotes y hojas de soja.

En nuestro país, el daño producido por esta plaga en cultivos de soja representa el segundo en importancia económica, determinándose pérdidas de un rendimiento de hasta 40%. En la actualidad, se utilizan para su control insecticidas químicos de amplio espectro y alta toxicidad, que además de ser contaminantes, limitan la implementación de un correcto manejo integrado de plagas debido a su escasa selectividad.

Virus de la granulosis de *Epinotia aporema*

En el año 1982 se colectaron por primera vez en Chile, larvas de *Epinotia aporema* muertas con signos característicos de infección viral (Ripa, 1982). Posteriormente, investigadores de la EEA INTA Oliveros (Santa Fe), llevaron a cabo estudios sobre la dinámica poblacional de la plaga en cultivos de soja e identificaron sus principales agentes de control biológico natural. Producto de dichas investigaciones, se detectó un baculovirus con alta incidencia en la mortalidad natural de larvas de dicha especie (Diaz y Diez, 1989)

Mediante trabajos conjuntos entre el IBBM (CONICET, UNLP) y el IMYZA (INTA, Castelar) se realizó la caracterización morfológica y bioquímica de un aislamiento a partir de larvas muertas de *E. aporema* colectadas en Oliveros, al cual se lo denominó *Epinotia aporema Granulovirus* (EpapGV) (Sciocco-Cap *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2002) (Fig 1.9)

El virus fue evaluado bajo condiciones controladas y se establecieron metodologías para el control de la calidad de un formulado insecticida a base de EpapGV (Parola *et al.*, 2003; Manzán *et al.*, 2008). Sobre la base de esos antecedentes, se obtuvo ante SENASA el registro de uso experimental de una formulación para el control de este insecto plaga (SENASA E-256). Además, se obtuvo un mapa físico y una secuencia parcial del genoma, caracterizándose funcionalmente algunos genes de interés (Manzán *et al.*, 2002; Parola *et al.*, 2003).

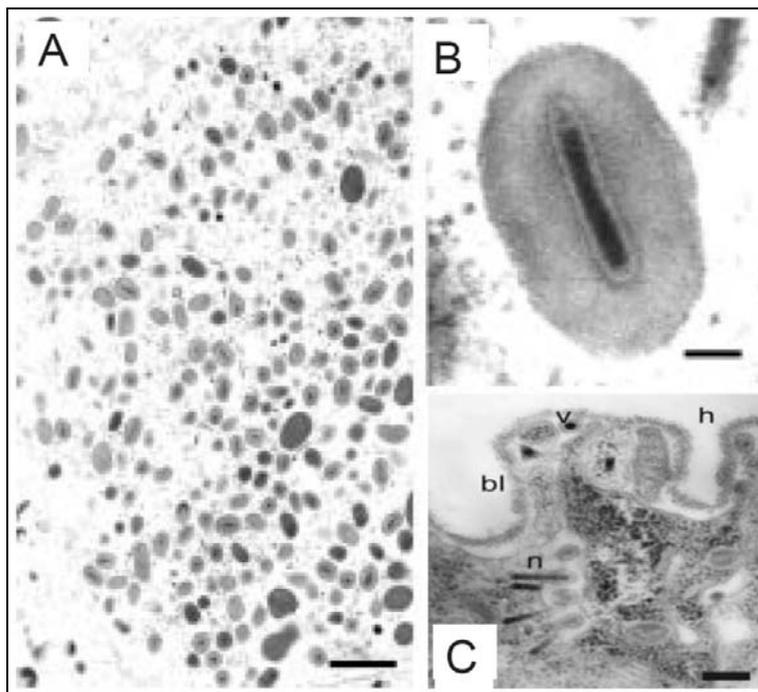


Fig. 1.9. Estudios de microscopía para la caracterización de EpapGV (Fuente: Sciocco *et al.*, 2001 y Goldberg *et al.*, 2002). A: Corte de células epidérmicas mostrando viriones y gránulos (barra, 1 μ m). B: Sección longitudinal de un OB (barra, 100 nm). C. Nucleocápsides (n) brotando de estructuras vesiculares. Lámina basal (bl), virión (v), Hemolinfa (h).

Orugas defoliadoras

Anticarsia gemmatalis (Hübner)

Fue descrita por primera vez en 1903 en Florida (Hinds, 1931). Se la encuentra en todo el continente americano y es una plaga principal en los cultivos de soja en Brasil. En nuestro país, se encuentra en la región Pampeana, Mesopotamia y Norte (Fig.1.10). Las mayores infestaciones se han producido en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Iannone, 2007) coincidente con la mayor área sembrada de soja, su planta predilecta. Además, puede encontrarse en maní, alfalfa, poroto y otras plantas diferentes a leguminosas que incluyen el algodón, trigo, lino y algunas hortalizas. Las hembras depositan entre 900 y 1000 huevos, en forma aislada, en el envés de las hojas. La oruga llega a medir 35 a 40 mm de largo y se presenta en dos formas: una de color verde intenso y otra de color verde oscuro a negro, con

una serie de líneas longitudinales blancas. Presentan 6 estadios y requieren 15 a 20 días para alcanzar su máximo desarrollo (Aragón *et al.*, 1998).



Fig. 1.10. *Anticarsia gemmatalis*. A: Adulto; B: larvas de quinto estadio. C y D: daño foliar producido por las larvas

Las larvas de primer estadio se alimentan del parénquima foliar, dejando la epidermis superior de las hojas casi intacta. En el segundo estadio, se alimentan de la porción intermedia del tejido y de las nervaduras más pequeñas. A medida que aumenta su desarrollo su voracidad también se incrementa (Gutierrez, 1978).

Las larvas son esencialmente filófagas, pero en ocasiones atacan también las vainas que aún no formaron granos. Una larva llega a consumir entre 100 y 110 cm² de hojas de soja, también pueden dañar, total o parcialmente, vainas tiernas (Flores, 2006).

Sumados a los controles culturales y químicos existen herramientas de control biológico. La utilización a campo en gran escala de aislamientos de un baculovirus, denominado *Anticarsia gemmatalis Nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), ha hecho de este virus el más utilizado a nivel mundial (Oliveira *et al.*, 2006).

Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV)

Este virus fue aislado en Brasil en el año 1977 y desde 1980 es utilizado como bionsecticida y aplicado en forma extensiva (Fig.1.11).

AgMNPV es principalmente infectivo hacia *A. gemmatalis*, aunque otras especies como *Pseudoplusia includens*, *Rachiplusia nu* y *Spodoptera sp.*, resultan ser susceptibles pero a dosis que resultan antieconómicas en aplicaciones en campo.

El proceso de infección desde su inicio hasta la muerte en la larva dura entre seis y siete días, pero al tercer día prácticamente deja de alimentarse y sus movimientos se reducen al mínimo, dirigiéndose generalmente a la parte superior de la planta, donde queda colgada de las falsas patas abdominales o espuripedios, en posición muy característica.

En los primeros dos días después de la muerte, la larva presenta un color amarillo-cremoso, el cual se va oscureciendo hasta quedar completamente negro; es en esta fase se produce la ruptura del tegumento, liberando gran cantidad de poliedros sobre la superficie foliar, que van a servir como fuente de inóculo para infectar a otras larvas presentes en el cultivo.

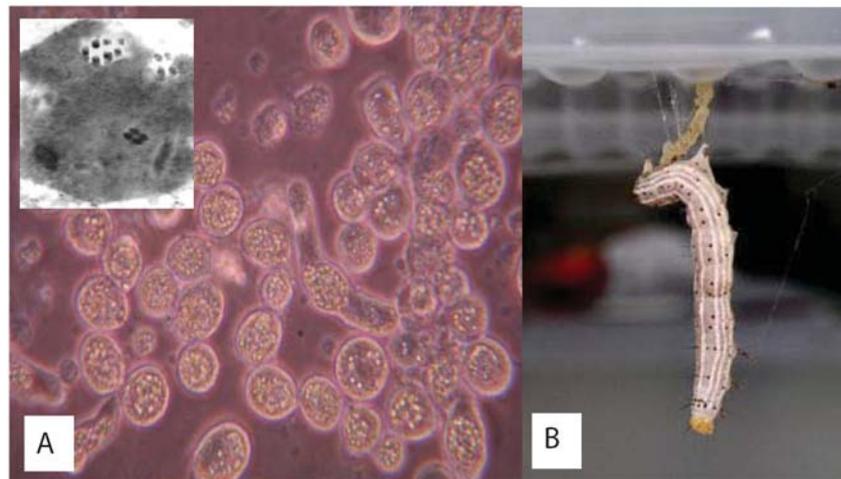


Fig.1.11. A: Microscopia electrónica de transmisión de un corte ultrafino de un poliedro de AgMNPV y células (UFI Ag-286) infectadas con AgMNPV, observadas bajo microscopio óptico. B: larva de *Anticarsia gemmatalis* muerta por acción de AgMNPV.

Recientemente se publicó la secuencia completa del genoma de AgMNV (Oliveira *et al.*, 2006) lo que facilitará el diseño de modificaciones que optimicen su acción insecticida.

***Spodoptera frugiperda* (Smith)**

La “oruga cogollera”, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), es una especie polifitófaga nativa del trópico, con amplia distribución geográfica, desde Argentina y Chile, hasta el sur de Estados Unidos. En maíz, prefiere hojas y brotes tiernos, especialmente los cogollos (Fig.1.12). Entre los cultivos frecuentemente atacados se destacan entre otros, algodón, sorgo, soja, girasol y maíz. (Alonso Alvarez, 1991; Murillo, 1991). Es la plaga principal del noroeste y noreste argentino (Willink y col., 1990). Los maíces de siembra tardía son los más afectados y se requieren hasta 3 aplicaciones de insecticidas para controlar la plaga (Sosa, 2002). Las larvas son activas de noche y de día, atacan a la planta de maíz actuando como cortadoras, defoliadoras y cogolleras según el momento de su desarrollo, produciendo daños directos cuando se alimentan de los granos de la espiga (Willink y col., 1993).

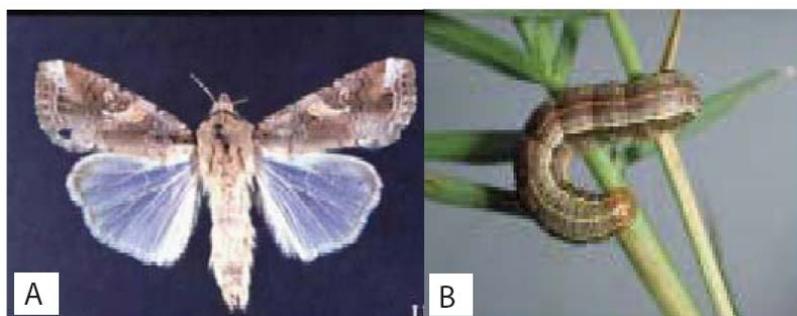


Fig. 1.12. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).
A: Adulto; B: Larva de cuarto estadio (Fotos: J. L. Capinera, USDA).

Esta plaga presenta 6 a 8 estadios en su estado larval. Durante los dos primeros, las larvas roen la epidermis de las hojas, dejando manchas translúcidas; a partir del tercero, consumen toda la lámina foliar dejando huecos irregulares en el follaje, luego migran hacia el cogollo, donde encuentran protección. Por otra parte a esa edad, tienen hábitos caníbales, razón por la cual se encuentra una sola por cogollo.

El mayor consumo, 80 % de la ingesta, lo realizan en los dos últimos estadios (Alonso Alvarez, 1991). El control de la plaga en nuestro país se realiza mediante agentes químicos y prácticas culturales.

Contexto de trabajo

Los baculovirus son utilizados como agentes de control de plagas agrícolas y forestales. Actualmente existe la posibilidad de modificarlos genéticamente con el objeto de aumentar su eficacia como agentes insecticidas. Desde el punto de vista teórico se consideran dos tipos de modificaciones: por un lado, disminuir su especificidad, es decir ampliar su rango de hospedantes y por otro, modificar los factores de eficacia insecticida del virus, es decir la velocidad de acción y la dosis efectiva. Centrándonos en este último punto de vista, existen antecedentes que demuestran la existencia de factores proteicos codificados en algunos baculovirus, los cuales son capaces de incrementar su acción insecticida. Estos factores fueron descubiertos mediante el uso de mezclas virales, que evidenciaron el incremento de la patogenicidad de uno de los virus (Derksen & Granados, 1988; Lepore *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1999; Slavicek & Popham, 2005; Tanada *et al.*, 1973; Wang & Granados, 1997; Wang *et al.*, 2004)

La utilización de mezclas virales permite determinar el tipo de interacción que se establece entre los agentes virales utilizados y, a su vez, buscar los agentes proteicos responsables del efecto observado.

Hipótesis

Mediante trabajos conjuntos entre el IBBM y el IMYZA (INTA) se realizó la caracterización biológica y molecular del granulovirus *Epinotia aporema* (EpapGV), el cual se encuentra bajo registro de uso experimental como bioinsecticida (Goldberg, 2003; Goldberg *et al.*, 2002; Parola, 2004; Parola *et al.*, 2002; Sciocco-Cap *et al.*, 2001). Según resultados preliminares de ensayos realizados por nuestro equipo de investigación, la administración conjunta de EpapGV y AgMNPV potencia

la actividad insecticida de AgMNPV en larvas de la especie homónima acortando el tiempo letal. Debido a que EpapGV no sería infectivo hacia *A. gemmatalis*, se postula que tal incremento en la virulencia podría estar asociado a la presencia de ciertas proteínas presentes en las preparaciones de cuerpos de oclusión de EpapGV.

En este contexto, los objetivos incluyen la búsqueda y caracterización de genes asociados a la virulencia en EpapGV, el estudio de su función en el ciclo de infección viral mediante la generación de recombinantes de AcMNPV y el desarrollo de estrategias que permitan optimizar la utilización a campo de EpapGV, aislado o en combinación con AgMNPV.

El análisis del genoma de AgMNPV recientemente publicado muestra que posee 132239 pb y codifica 152 marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames*: ORF) (Oliveira *et al.*, 2006). En este genoma se encuentran ausentes los genes *gp37*, *chiA* y *v-cath* que se han hallado dispuestos en bloque en el genoma de EpapGV.

En base a los antecedentes resumidos en la Introducción, a las diferencias en contenidos génicos y a los resultados preliminares mencionados, se espera poder utilizar al sistema AgMNPV-*A. gemmatalis* como sistema modelo para el estudio de estos genes de EpapGV y sus productos, a fin de evaluar su potencial de utilización en el mejoramiento de la eficacia insecticida del mismo y otros *Nucleopolyhedrovirus* de importancia agrícola. A diferencia de otros sistemas modelo, tanto AgMNPV como EpapGV son patógenos de plagas de interés agronómico.

Es dentro de este contexto que surge el plan de trabajo de Tesis y los objetivos generales y particulares planteados.

Objetivo general de la Tesis

Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus y utilización de los mismos para el mejoramiento genético de virus de importancia agronómica en nuestro país.

Objetivos Particulares

- Evaluación de la interacción de los virus de EpapGV y AgMNPV en mezclas virales aplicadas sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis* y *Epinotia aporema*.
- Identificación, clonado, secuenciación y estudio funcional de genes de EpapGV relacionados con la virulencia y con posible actividad potenciadora de la infección.
- Generación de virus recombinantes (rAcMNPV y AgMNPV) que expresen genes candidatos para el mejoramiento genético de su eficacia insecticida.

Referencias

- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L. & Kutish, G. F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *J Virol* 75, 11157-11165.
- Alonso Alvarez, R. 1991. Reseña histórica y aspectos bioecológicos del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). In Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.) Calí, Colombia 96p. Pag. 12-14.
- Bergold, G. H. (1952). Demonstration of the polyhedral virus in blood cells of silkworms. *Biochim Biophys Acta* 8, 397-400.
- Braunagel, S. C., Russell, W. K., Rosas-Acosta, G., Russell, D. H. & Summers, M. D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9797-9802.
- Braunagel, S. C. & Summers, M. D. (2007). Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Curr Drug Targets* 8, 1084-1095.
- Caballero, P., Lopez-Ferber, M. & Williams, T. (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra-Phytoma, España, 518 pp.
- Cheley, S., Kosik, K. S., Paskevich, P., Bakalis, S. & Bayley, H. (1992). Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells. *J Cell Sci* 102 (Pt 4), 739-752.
- Derksen, A. C. & Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* 167, 242-250.

- Diaz, B. D., S. (1989). Presencia de un virus de la granulosis en larvas de *Epinotia aporema* (Wals.), en cultivos de soja. In *IV Conferencia Mundial de Investigación en soja*, pp 1588-1592 Buenos Aires, Argentina
- Dow, J. A. (1992). pH gradients in lepidopteran midgut. *J Exp Biol* 172, 355-375.
- Eisemann, C. H. & Binnington, K. C. (1994). The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int J Parasitol* 24, 15-26.
- Flipsen, J. T., Martens, J. W., van Oers, M. M., Vlak, J. M. & van Lent, J. W. (1995). Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology* 208, 328-335.
- Flores, J. R. A. y. F. (2006). Control integrado de plagas en soja en el sudeste de Córdoba.
- Funk, J., Braunagel, S. C. & Rohrmann, G.F. 1997. Baculovirus structure. pp. 7-32. En: *The Baculoviruses*. L. Miller (ed.). Plenum Press, New York
- Goldberg, A. V. (2003). Estudio biológico y molecular del proceso de infección de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema* y evaluación de su potencial como agente de control biológico. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires
- Goldberg, A. V., Romanowski, V., Federici, B. A. & Sciocco de Cap, A. (2002). Effects of the Epap granulovirus on its host, *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). *J Invertebr Pathol* 80, 148-159.
- Granados, R. R. & Lawler, K. A. (1981). *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108, 297-308.
- Gross, C. H., Russell, R. L. & Rohrmann, G. F. (1994). *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J Gen Virol* 75 (Pt 5), 1115-1123.

- Gross, C. H., Wolgamot, G. M., Russell, R. L., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1993). A baculovirus encoded 16-kDa glycoprotein localizes near the nuclear membrane of infected cells. *Virology* 192, 386-390.
- Gutierrez, B. P., J. (1978). Ciclo de vida y hábitos de *Anticarsia gemmatalis* plaga de la Boya en el Valle del Cauca. *Rev Colomb Entomol* 4, 3-9.
- Hashimoto, Y., Corsaro, B. G. & Granados, R. R. (1991). Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 11), 2645-2651.
- Hinds, W. O. (1931). The soybean caterpillar in Louisiana. *Journal of Economic Entomology* 24, 1168-1173.
- Iannone, N. (2007). Alerta! Plaga de la soja. <http://www.elsitioagricola.com/plagas/intaperga20070117soja.asp>
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol* 151, 1257-1266.
- Kalmakoff, J. K., J. M. (1982). Enzootic virus control of *Wiseana* spp. in the pasture environment. . In *Microbial and Viral Pestides*, pp 435-448 Edited by G Kurstak New York: Marcel Dekker
- Lapointe R. Characterization of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus proteins, Ac145 and Ac150, which affect oral infectivity in a host-dependent manner. *J Virol* 2004;78(12):6439-48.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42, 525-550.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol* 68, 131-140.

- Liljeström, G. & Rojas-Fajardo, G. (2005). Parasitismo larval de *Crociosema (=Epinotia) aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) en el noreste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 64, 37-44.
- McCarthy, C. B. & Theilmann, D. A. (2008). AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology* 375, 277-291.
- Minion (1979). Characterization of the polyhedral envelope of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis virescens*. *J Invertebr Pathol* 34:303-307.
- Monsma, S. A., Oomens, A. G. & Blissard, G. W. (1996). The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70, 4607-4616.
- Moscardi, F. and S. Gomez. D. (2007). Microbial control of insect pest of soybean. *Chapter VII-5, pp 411-426*. En: *Field Manual of Techniques in Insect Pathology*, H Kaya and L Lacey (eds). Springer. The Netherlands.
- Murillo, A. 1991. Distribución, importancia y manejo del complejo Spodoptera en Colombia. In *Memorias Seminario Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.). Calí. Colombia 96p. Pag. 15-23.
- Ohkawa, T., Washburn, J. O., Sitapara, R., Sid, E. & Volkman, L. E. (2005). Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. *J Virol* 79, 15258-15264.
- Oliveira, J. V., Wolff, J. L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E., de Souza, M. L., Moscardi, F., Maruniak, J. E. & Zanotto, P. M. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 87, 3233-3250.

- Olszewski, J. & Miller, L. K. (1997). A role for baculovirus GP41 in budded virus production. *Virology* 233, 292-301.
- Oomens, A. G., Monsma, S. A. & Blissard, G. W. (1995). The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization, and processing. *Virology* 209, 592-603.
- Paillot, A. (1926). Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chenilles de *P. brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasites. *Compt Rend* 1926;182:180-2.
- Parola, A. D. (2004). Caracterización molecular de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema*. Tesis Doctoral; Universidad Nacional de La Plata.
- Parola, A. D., Manzan, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002). Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* 25, 329-341.
- Pearson, M. N., Russell, R. L. & Rohrmann, G. F. (2001a). Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virology* 291, 22-31.
- Pearson, M. N., Russell, R. L. & Rohrmann, G. F. (2001b). Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virology* 291, 22-31.
- Peng, J., Zhong, J. & R, R. G. (1999). A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J Insect Physiol* 45, 159-166.
- Perera, O. P., Valles, S. M., Green, T. B., White, S., Strong, C. A. & Becnel, J. J. (2006). Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV). *J Invertebr Pathol* 91, 35-42.
- Peters, W. (1992). *Peritrophic Membranes*. Berlin. Springer. 1st ed.
- Ripa, R. (1982). Presencia de dos nuevos patógenos en *Epinotia aporema* Wals. . *Agricultura Técnica* 41,55-56
-

- Rohrmann, G. (2008). Introduction to the baculoviruses and their taxonomy. www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=bacvir...pdf
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldberg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001). Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Appl Environ Microbiol* 67, 3702-3706.
- Slavicek, J. M. & Popham, H. J. (2005). The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancins are components of occlusion-derived virus. *J Virol* 79, 10578-10588.
- Sosa, M. A. (2002). Estimación de daño de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz con infestación natural en tres fechas de siembra en el noreste santafesino. *INTA. EEA Reconquista - Setiembre 2002*
- Tanada, Y., Himeno, M. & Omi, E. M. (1973). Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *J Invertebr Pathol* 21, 31-40.
- van Oers, M. M. & Vlak, J. M. (2007). Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets* 8, 1051-1068.
- Vanarsdall, A. L., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (2007). Characterization of baculovirus constructs lacking either the Ac 101, Ac 142, or the Ac 144 open reading frame. *Virology* 367, 187-195.
- Vigdorovich, V., Miller, A. D. & Strong, R. K. (2007). Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus. *J Virol* 81, 3124-3129.
- Villata, C. A. A., A. M Ayessa. (1994). Manejo integrado de plagas en soja. *Agro de Cuyo* 7, 71.
- Wang, P. & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6977-6982.

- Wang, P., Li, G. & Granados, R. R. (2004). Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 215-227.
- Waterhouse (1953). The occurrence and significance of the peritrophic membrane, with special reference to adult Lepidoptera and Diptera. *Aust. J. Zool.* .
- Whitford, M. & Faulkner, P. (1992). A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *J Virol* 66, 3324-3329.
- Whitt, M. A. & Manning, J. S. (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.
- Wigglesworth (1930). The formation of peritrophic membranes in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q. J. Microsc. Sci.* 73:593–616
- Willink, E., M. A. Costilla. y. V. M. Osores (1990). Principales plagas del maíz: Daños, pérdidas y recomendaciones para la siembra. *Avance Agroindustrial Alo II (42):17-19*
- Willink, E. V. M. Osores y. M. A. Costilla (1993). Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. *Rev Ind y Agric de Tucumán 70(1-2): 49-52*
- Xu, H. J., Yang, Z. N., Zhao, J. F., Tian, C. H., Ge, J. Q., Tang, X. D., Bao, Y. Y. & Zhang, C. X. (2008a). *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production. *J Gen Virol* 89, 1212-1219.
- Yang, S. & Miller, L. K. (1998). Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 (vlf-1) gene. *Virology* 245, 99-109.

Yin, F., Wang, M., Tan, Y., Deng, F., Vlak, J. M., Hu, Z. & Wang, H. (2008). A functional F analogue of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus GP64 from the *Agrotis segetum* granulovirus. *J Virol* 82, 8922-8926.

Zimmermann (1975). Investigations on the transport function and structure of peritrophic membranes of the blowfly *Calliphora erythrocephala* Mg. *Comp. Biochem. Physiol.* 51B:181-86

Capítulo 2

Evaluación de los efectos de EpapGV como incrementador de virulencia de nucleopoliedrovirus

Índice temático

Introducción	37
Materiales y métodos	41
Resultados y discusión	46
Ensayos de interacción	46
Detección de agentes virales	48
Efecto sobre membrana peritrófica	50
Referencias	55

Introducción

Existen seis categorías de relaciones biológicas interespecíficas: antagonismo, mutualismo, comensalismo, amensalismo, competencia y neutralismo. Estas pueden ser aplicadas a la interacción entre virus, y entre los mismos y las células susceptibles de los insectos (Begon *et al.*, 1996). Aquí nos referiremos sólo a tres de ellas: antagonismo, neutralismo y mutualismo. El antagonismo implica que una especie se beneficie a expensas de otra, esto caracteriza por ejemplo, a la depredación y el parasitismo en los organismos celulares, mientras que en los virus, el antagonismo se refiere a la replicación de un virus que va en detrimento de la replicación de otro virus. En el neutralismo, dos especies interactúan sin causarse daño o beneficio. El neutralismo en las interacciones virales queda representado cuando dos especies de virus infectan a las células, sin interferir la infección de uno con la del otro. También se le llama neutralismo de proliferación independiente (Lowe & Paschke, 1968). En las interacciones mutualistas, un virus se beneficia de la presencia de otro.

En el caso particular de los baculovirus, se sugiere que el neutralismo es probablemente el menos frecuente en la naturaleza, ya que todas las especies interactúan unas con otras en cierta forma. Es posible que la sensibilidad de los métodos de detección utilizados en el estudio de los procesos de interacción pueda afectar la interpretación del fenómeno (Cheng & Lynn, 2009)

Como ejemplo de interacción entre dos virus se puede citar a los virus ThorSNPV y ThorMNPV que fueron originalmente aislados en las poblaciones naturales de las larvas de *Thysanoplusia orichalcea* en el Oeste de Java, Indonesia (Cheng & Carner, 2000; Cheng *et al.*, 2005a). Las muestras originales consistieron de una mayoría de virus de ThorSNPV y una mínima cantidad de ThorMNPV. La forma de los OBs de ThorSNPV es tetraédrica y la forma de los OBs de ThorMNPV es poliédrica (Cheng & Carner, 2000; Cheng *et al.*, 2005) por lo cual eran fácilmente diferenciables. La propagación inicial de ambos virus fue llevada a cabo en larvas de la oruga desfoliadora de la soja, *Pseudoplusia includens*. Pasajes sucesivos realizados a partir del inóculo original dieron como resultado una reducción progresiva de ThorSNPV y un aumento de la ThorMNPV (Cheng & Carner, 2000; Cheng *et al.*, 2005c). ThorSNPV y ThorMNPV fueron separados y purificados para

realizar bioensayos sobre *P. includens*. Los dos virus replican en el tejido graso y en matriz traqueal de *P. includens* pero los dos tipos de OBs no se encontraron en las mismas células (Cheng *et al.*, 2005). Por lo tanto, es muy probable, que la interacción entre ThorSNPV y ThorMNPV en larvas de *P. includens* sea del tipo neutralista (Cheng & Lynn, 2009).

El mutualismo puede ser favorecido evolutivamente ya que ambas especies se benefician en la interacción. Como ejemplo, se puede mencionar baculovirus aislados de *Choristoneura fumiferana* que constituyen una mezcla de al menos dos tipos de *Nucleopolyhedrovirus*, el CfMNPV y CfDEFNPV (Arif & Doerfler, 1984; Lauzon *et al.*, 2005a). El CfDEFNPV es considerado defectuoso, ya que no puede infectar larvas de *C. fumiferana* vía *per os* debido a que no puede pasar al epitelio intestinal para luego entrar en el hemocele y replicar en otros tejidos, mientras que CfMNPV es infectivo vía *per os* en larvas de *C. fumiferana* (Lauzon *et al.*, 2005a). En una infección con ambos virus, el CfDEFNPV es en estas condiciones capaz de replicar en hemocele y otros tejidos de *C. fumiferana*. Por lo tanto, la acción de CfDEFNPV se ve favorecida por la presencia del virus de CfMNPV, mediante un mecanismo poco conocido. Una vez que ambos virus están en el hemocele, CfDEFNPV de alguna manera facilita la infección de CfMNPV ya que este último en la progenie viral siempre predomina (Lauzon *et al.*, 2005b).

Otro ejemplo de interacciones mutualistas existe en ciertas poblaciones naturales de *Spodoptera frugiperda* *Nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) caracterizadas por presentar diferentes genotipos, algunos con deleciones de hasta 15 kb en comparación con el genoma completo de SfMNPV (Lopez-Ferber *et al.*, 2003). Estos mutantes se encuentran con una frecuencia de alrededor del 35% en poblaciones naturales de SfMNPV y no son capaces de infectar a las larvas de *S. frugiperda* por vía oral debido a la ausencia de genes *pifs* (*per os infectivity factors*) que están localizados en la región eliminada en la deleción descrita (Kikhno *et al.*, 2002; Lopez-Ferber *et al.*, 2003). Se ha demostrado que existe una mayor patogenicidad en poblaciones naturales que contienen ambos genotipos que las poblaciones constituidas por virus que solo contienen el genoma completo, lo que sugiere una interacción de tipo mutualista entre estos genotipos virales (Lopez-Ferber *et al.*, 2003). En esta interacción, los genotipos sin los genes *pif* no producen infección *per os*, pero se benefician al ser co-ocuidos en los OBs de los virus con

genotipo completo. Una vez que el virus delecionado se encuentra en el hemocele, probablemente replican más rápido que el genotipo completo debido a la corta longitud de su genoma (Barrett & Dimmock, 1986; Lopez-Ferber *et al.*, 2003).

En el caso de inoculaciones conjuntas entre baculovirus de distintos géneros, se demostró una asociación sinérgica entre un NPV (PuNPV) y un GV (PsunGV) cuando se co-inocularon larvas de *Pseudaletia unipuncta* (Tanada & Hara, 1975; Tanada *et al.*, 1973). Efectos similares fueron registrados para las combinaciones NPV-GV en larvas de *Pseudaletia separata* (PuNPV y PsunGV) (Hukuhara *et al.*, 1987), *Trichoplusia ni* (TnGV y AcMNPV) (Derksen & Granados, 1988), *Xestia c-nigrum* (XcNPV y XcGV) (Goto, 1989) y *Mamestra brassicae* (MbNPV y XcGV) (Mukawa & Goto, 2007). Al factor responsable de este aumento de la virulencia, se lo denominó factor acrecentador de virulencia (*viral enhancing factor, enhancin* o VEF) y se lo encontró en varios GVs y en algunos NPVs (Bischoff & Slavicek, 1997; Peng *et al.*, 1999; Slavicek & Popham, 2005; Wang & Granados, 1997b). Los VEF son una clase de metaloproteasas que facilitan la infección viral por degradación de proteínas de alto peso molecular presentes en la matriz de la membrana peritrófica (MP) del intestino medio del insecto (Derksen & Granados, 1988; Slavicek & Popham, 2005). Las proteínas de la MP, son el blanco de acción de los VEF (Wang & Granados, 1997b). Sin embargo, la interacción puede resultar antagónica como se puede ejemplificar en una infección mixta con un NPV y un GV, descrita en larvas de *Pseudaletia unipuncta* (Tanada & Watanabe, 1971). En la este caso, el GV ayuda a la infección del NPV pero la patogenicidad de la mezcla es menor que la del GV solo. Esto se debe a que en la coinfección, las proteínas VEF presentes en los gránulos del GV alteran la MP facilitando el pasaje de los ODVs del NPV hacia las células intestinales susceptibles pero cuando ambos virus están presentes en el hemocele, la replicación del NPV interfiere con la replicación del GV (Roelvink *et al.*, 1995; Wang & Granados, 1997a; Tanada & Watanabe, 1971).

Debido al efecto que produce sobre la MP, el gen *vef* es de interés no solamente para el mejoramiento genético de los baculovirus sino también para la obtención de plantas transgénicas que mediante su expresión intentan desequilibrar la homeostasis intestinal de los insectos plaga de cultivos de interés económico (Cao *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006).

Considerando que *E. aporema* y *A. gemmatalis* son especies que se presentan en

ciertas áreas como plagas simultáneas (para las cuales se dispone de formulaciones baculovirales para ser evaluadas en el campo) y sobre la base de los antecedentes mencionados, se procedió al estudio de la posible interacción entre ambos virus, en larvas de *A. gemmatalis* y de *E. aporema*. En colaboración con otros miembros del grupo de trabajo, se evaluó el efecto de mezclas virales con los virus de EpapGV y AgMNPV en larvas de *E. aporema* y *A. gemmatalis* (Biedma, 2009). En este capítulo se detallan dichos estudios y se analizan las potenciales causas de la interacción, con el fin de avanzar en la identificación de genes de EpapGV con posible incidencia en el aumento de la virulencia natural de nucleopoliedrovirus.

Materiales y métodos

Insectos. Las larvas de *Epinotia aporema* y *Anticarsia gemmatalis*, empleadas para la multiplicación de virus y los bioensayos, fueron provistas por el insectario del IMYZA-INTA, Castelar. La cría de los insectos se realizó bajo condiciones controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (50-70%), fotoperíodo (14:10 L/O) y fue mantenida en dieta artificial (Greene *et al.*, 1976).

Virus. Los virus EpapGV (aislamiento argentino) y AgMNPV (aislamiento brasileño 2D) fueron multiplicados en larvas de cuarto estadio de sus respectivos hospedantes. La propagación se realizó por contaminación superficial de la dieta (sin formaldehído) con cuerpos de oclusión (1×10^3 OBs/mm²). Las larvas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (50%) hasta el momento de recolección del material infectado.

Bioensayos. Los ensayos *in vivo* fueron realizados según la metodología descrita por Hughes y Wood (1986). Para ello, larvas de *A. gemmatalis* fueron mantenidas en recipientes individuales, sin alimento, durante 12 hs. A continuación se les suministró una gota de la suspensión viral a evaluar dispuesta sobre Parafilm, utilizándose en la misma suspensión sacarosa al 1% como fagoestimulante y Coomassie Brilliant Blue al 0,1% como colorante para la verificación final de la ingesta. Para la realización del ensayo se tuvieron en cuenta los datos de volúmenes ingeridos por larvas de tercer estadio de *A. gemmatalis* ($155 \pm 13,9$ nl) (Kunimi & Fuxa, 1996), la DL₅₀ de AgMNPV (168 OB/larva) y los antecedentes acerca de la ausencia de virulencia de EpapGV hacia *A. gemmatalis* (Sciocco-Cap *et al.*, 2001)



Fig. 2.1: Método utilizado para aplicación de virus: A las larvas de *Anticarsia gemmatalis* de tercer se les ofreció la suspensión coloreada como alimento y se seleccionaron aquellas que mostraron coloración hasta la mitad del tracto intestinal.

Los ensayos se realizaron en una cámara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50% de humedad relativa. Se ensayaron dos dosis de AgMNPV (50 y 300 OB/larva) y una de EpapGV (6000 OB/larva) sobre 30 individuos por tratamiento, realizándose tres repeticiones. Se utilizaron como inóculo tanto los virus individuales (AgMNPV-2D y EpapGV) como la mezcla (AgMNPV/EpapGV en relación 50/6000 OB/larva y 300/6000 OB/larva, respectivamente) (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Tratamientos y dosis utilizadas sobre larvas del 3^{er} estadio de *Anticarsia gemmatalis*.

Tratamiento	Dosis
1a	50 OB de AgMNPV
1b	300 OB de AgMNPV
2a	50 OB de AgMNPV + 6000 OB de EpapGV
2b	300 OB de AgMNPV + 6000 OB de EpapGV
3	6000 OB de EpapGV

Las larvas control fueron tratadas en forma idéntica con soluciones que no contenían virus. Una vez ingerida la dosis, las larvas fueron transferidas a recipientes individuales conteniendo dieta artificial. La mortalidad fue registrada a intervalos de 12 h. El cálculo de los respectivos tiempos de supervivencia medios se realizó utilizando el programa Vistat® (Cornell University). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) usando el software InfoStat (versión 2008). Para la comparación de los valores obtenidos (TL_{50}) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (α) de 0,05.

Extracción de DNA total a partir de larvas utilizadas en bioensayos. Las larvas recolectadas fueron homogeneizadas en baño hielo-agua y la suspensión resultante se filtró a través de una gasa colocada en un tubo *ependorf* de 0,5 ml perforado en su base. El filtrado fue tratado con Na_2CO_3 a concentración final de 0,1 M durante 30 min, se neutralizó la solución mediante agregado de Tris-HCl (pH 6,2). Las muestras fueron hervidas por 5 min y se utilizó 1 μl de esta solución para la reacción

de PCR (Manzan *et al.*, 2008).

PCR. La presencia de DNA viral de AgMNPV y EpapGV fue determinada mediante PCR utilizando *primers* específicos que amplifican el ORF de poliedrina (orf-I y orf-f) y el ORF de granulina (*Gr-up* y *Gr-down*), respectivamente (Arana *et al.*, 2001; Parola *et al.*, 2002). Como controles positivos se utilizaron DNAs de AgMNPV y de EpapGV. Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV mediante tinción con bromuro de etidio.

Preparación de cuerpos de oclusión y extracción de DNA. Las larvas infectadas obtenidas del bioensayo fueron maceradas en mortero agregando agua para favorecer la homogeneización, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante una semana. Posteriormente, la suspensión se filtró a través de gasa y se agregó SDS a concentración final de 0,1%. Se centrifugó 2 min a 2000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) para eliminar todos los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 7000 rpm durante 20 minutos, a 4°C. El *pellet* se resuspendió en agua y se centrifugó por 20 min a 5000 rpm; este paso se realizó tres veces a modo de lavado. Finalmente, se resuspendieron en agua y se verificó su limpieza por medio de observación al microscopio de contraste de fase (400X). A una suspensión de 1×10^9 OBs en 500 μ l de agua, se le agregó 55 μ l de Na₂CO₃ 1 M y se incubó 30 min a temperatura ambiente para permitir la disolución de los OBs y la liberación de los viriones. Cuando la solución se tornó transparente se agregaron 55 μ l de Tris-HCl 1 M pH 7,6 para neutralizar la suspensión. Se centrifugó a 7000 rpm durante 2 min para sedimentar los cuerpos de oclusión no disueltos. El sobrenadante se llevó a una concentración final de 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,25% SDS y 500 μ g/ml proteinasa K, se incubó durante 14 hs a 37°C con agitación suave. Se realizaron tres extracciones sucesivas (fenol/fenol-cloroformo-isoamílico/cloroformo-isoamílico) agregando 500 μ l de solvente orgánico en cada caso. Se llevó la fase acuosa a una concentración final de 0,2 M NaCl, se agregó 500 μ l de isopropanol para precipitar y posteriormente se lavó el *pellet* con 500 μ l de etanol 70% y se centrifugó a 14000 rpm 10 min. El *pellet* se resuspendió en 50 μ l de TE.

Extracción de membranas peritróficas y SDS-PAGE. Larvas del 3° estadio de *A. gemmatalis* fueron alimentadas con inóculos conteniendo las dosis ensayadas previamente (50 poliedros de AgMNPV, mezclas de 300 poliedros y 6000 gránulos, con 6000 gránulos de EpapGV) y únicamente con la solución fagoestimulante. Confirmada la ingesta, las larvas fueron depositadas en recipientes de forma individual y 12 horas post-infección diseccionadas para la extracción de sus membranas peritróficas. Las mismas fueron lavadas en agua destilada, eliminando el contenido intestinal y rápidamente homogeneizadas en buffer de corrida y sus proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) usando el equipo Mini-protean II (Bio-Rad). Posteriormente el gel fue teñido con *Coomasie Blue*.

Búsqueda por PCR de *vef* (*viral enhancing factor*) en el genoma de EpapGV. El alineamiento de secuencias de *vef* encontradas en la base de datos de GenBank permitió la identificación de secuencias conservadas que fueron utilizadas para el diseño de los *primers* enh-fw 5' TTGTTTCGTTTCAGAGG 3' y enh-rev 5' TGTTCCGGGTGTCATCG 3' (Ta 48.9°C). El producto de amplificación (212 pb) fue analizado en geles de agarosa al 1% y visualizados bajo luz UV mediante tinción con bromuro de etidio. Como control positivo se utilizó DNA de *Xestia c-nigrum* GV (XcGV) el cual codifica en su genoma cuatro *vefs*. El DNA fue enviado gentilmente por la Dra. Chie Goto (National Agricultural Research Center, Tsukuba, Japón) .

Microscopia electrónica de barrido de membranas peritróficas (MP). Para la realización de este estudio se siguió la metodología descrita por Mitsuhashi *et al.*, (2007). Larvas de 3° estadio de *A. gemmatalis* se alimentaron con inóculos conteniendo las dosis ensayadas previamente (50 poliedros de AgMNPV, mezclas de 300 poliedros y 6000 gránulos, con 6000 gránulos de EpapGV) y únicamente con la solución fagoestimulante. Confirmada la ingesta, las larvas fueron depositadas en recipientes de forma individual y a las 18 hs postratamiento, las larvas fueron utilizadas para la extracción de sus MP. Cada larva fue inmovilizada en hielo y posteriormente diseccionada para la extracción de la MP. Las mismas se lavaron en PBS 0,1% y se fijaron a temperatura ambiente en glutaraldehído al 1%. Cada

muestra se deshidrató en una serie de etanol (50, 70, 90, y 100%). Las muestras resultantes se deshidrataron mediante la realización de punto crítico (BAL-TEC, modelo CP-30) y metalizadas con oro (JEOL mod. Fine Coat Ion Sputter). Posteriormente se examinaron de forma individual en microscopio de barrido (JEOL, modelo JSM-6360 LV).

Resultados y discusión

Ensayos de interacción

Inicialmente, se realizó una primera evaluación sobre el efecto que produce el agregado de preparaciones de cuerpos de oclusión de EpapGV cuando es aplicado de forma conjunta con cuerpos de oclusión de AgMNPV, en larvas de *Anticarsia gemmatalis*.

En el siguiente gráfico se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de cada muestra ensayada (Fig. 2.2). Se comenzó registrar mortalidad a partir del cuarto día postratamiento.

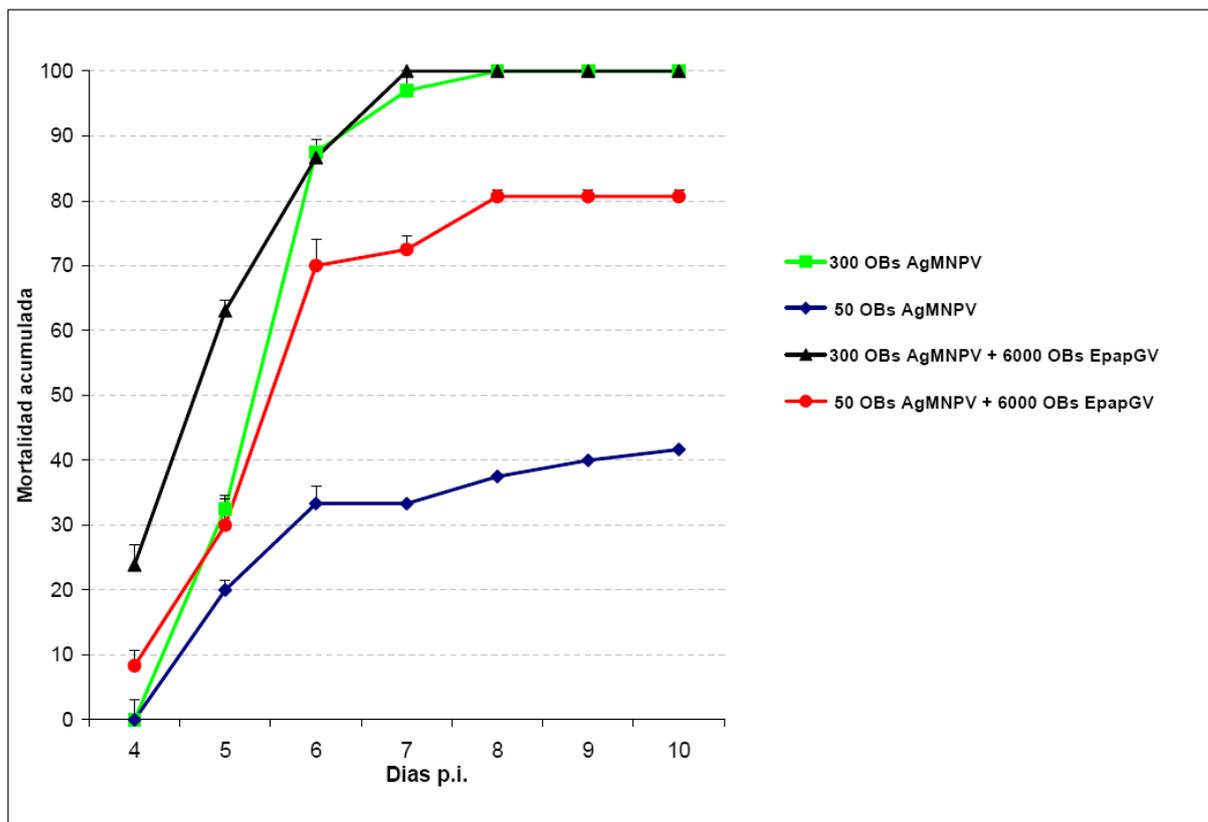


Fig. 2.2: Porcentaje de mortalidad acumulada vs. días post-infección (p.i.). Bioensayos realizados sobre larvas de *A. gemmatalis* de tercer estadio, tratadas con AgMNPV sólo (300 y 50 poliedros, OB por larva) o con la mezcla viral AgMNPV/EpapGV (300/6000 o 50/6000, poliedros/gránulos, OBs por larva). No se observó mortalidad en los controles, ni en el tratamiento con EpapGV solo. Las desviaciones estándar oscilaron entre $\pm 2,33$ hs (50 OBs AgMNPV) y $\pm 10,61$ hs (300/6000 mezcla viral).

Con los datos de mortalidad obtenidos, para cada uno de los tratamientos y dosis ensayadas, se calculó el Tiempo Letal Medio (TL₅₀). Posteriormente se realizó un análisis de varianza, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 2.2. Como puede observarse en la misma, el menor TL₅₀ se registró con la mayor dosis de AgMNPV en combinación con EpapGV (Tratamiento 2b). Entre los tratamientos 1b y 2a no se observaron diferencias significativas, a pesar de que se utilizó en el tratamiento 1b una dosis de AgMNPV seis veces menor que en 2a.

Tabla 2.2: Valores estimados de Tiempo Letal Medio (TL₅₀) y análisis de la varianza de los distintos tratamientos y dosis utilizados en los bioensayos

Tratamiento	AgMNPV (OBs)	EpapGV (OBs)	TL ₅₀ en días (**)
1a	50		7.7 ^c
1b	50	6000	5.7 ^b
2a	300		5.6 ^b
2b	300	6000	5.1 ^a

(**) Las letras diferentes indican diferencias significativas en los valores de TL₅₀ (p<0.05).

De estos datos se desprenden dos resultados a destacar: el primero muestra que el agregado de gránulos de EpapGV permitiría utilizar una menor dosis de AgMNPV para obtener un mismo TL₅₀; el segundo comprueba la existencia de una interacción positiva entre las preparaciones de AgMNPV y EpapGV, que favorece el uso de la mezcla viral en comparación con el uso del virus de AgMNPV solo.

Los lepidópteros plaga *E. aporema* y *A. gemmatalis* pueden detectarse sobre el mismo cultivo en la misma época del año. De cada uno de estos organismos se aislaron baculovirus capaces de controlar de manera eficiente a su hospedador, evitando los daños que ocasionan sobre los cultivos. En este trabajo se realizaron estudios tendientes a evaluar la interacción entre estos diferentes virus y el efecto de ambos aplicados conjuntamente. El efecto del uso de las mezclas virales es más notorio en larvas de *A. gemmatalis* inoculadas con 50 OB de AgMNPV mezclados con 6000 OB de EpapGV, tratamiento con el que se obtuvo tanto una disminución

significativa del TL_{50} como un efecto sinérgico (mayor mortalidad larval) a igual dosis de AgMNPV.

Si bien tanto en los tratamientos de 300 OB y 300/6000 OB se alcanzó el 100% de mortalidad de las larvas tratadas, las sometidas a la segunda dosis presentaron un TL_{50} significativamente menor. Por los resultados obtenidos se puede aseverar que el agregado de gránulos de EpaGV en combinación con AgMNPV incrementa la eficacia insecticida de este último sobre su propio hospedador.

Detección de agentes virales

Para verificar si esta disminución observada fue consecuencia de una coinfección viral, se realizó una PCR sobre el DNA total obtenido del conjunto larvas muertas de *A. gemmatalis* con síntomas de infección. Para identificar a los virus se realizaron reacciones de PCR individuales sobre el DNA extraído. En la detección de EpaGV se utilizó un juego de *primers* que amplifican el gen de *granulina* del mismo, dando un producto de 830 pb; mientras que para identificar la presencia de AgMNPV se utilizó un juego de *primers* dirigidos al gen de *poliedrina*, dando un producto de 750 pb.

Como se observa en la Fig. 2.3, en larvas muertas de *A. gemmatalis* y con la utilización de los *primers* para amplificar el gen de *poliedrina* (gel B) solo se detectó la presencia del AgMNPV cuando este agente fue utilizado sólo (Gel B, calle 3) o en combinación con EpaGV (Gel B, calle 4). Utilizando el DNA extraído de las mismas larvas y utilizando *primers* para amplificar el ORF de *granulina*, la PCR resultó negativa. Estos datos indicarían que el agente causal de la mortalidad de las larvas de *A. gemmatalis*, fue en todos los casos, el virus homónimo.

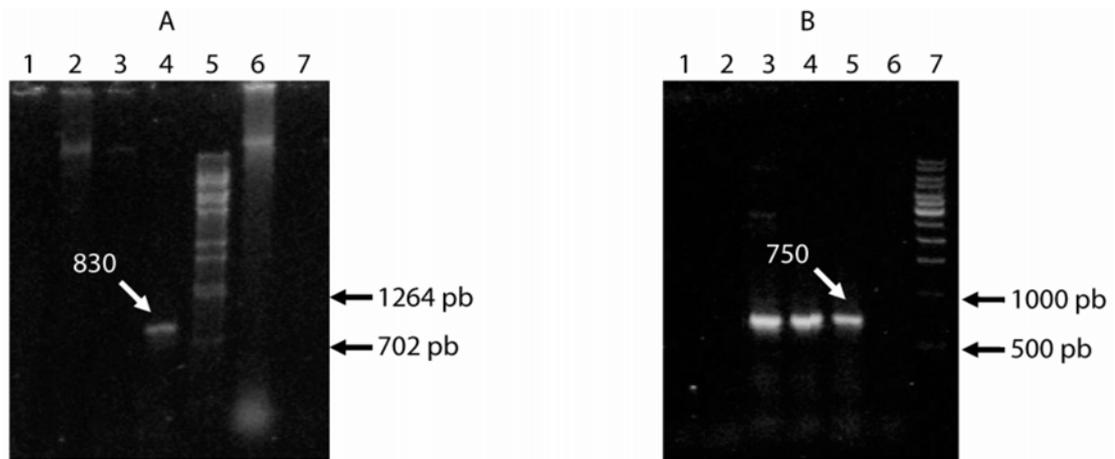


Fig. 2.3: Productos de PCR obtenidos utilizando *primers* específicos que amplifican *granulina* (gel A) y *poliedrina* (gel B). En A: Calles 1-3, DNA de larvas tratadas con: 1: AgMNPV, 2: AgMNPV/EpapGV, 3: EpapGV; 4: DNA EpapGV (control positivo), 5: DNA/*Bst*EII, 6: DNA de larvas sin tratar (control negativo), 7: DNA de AgMNPV (control negativo). En B: Calle 1: DNA EpapGV (control negativo); calles 2-4, DNA de larvas tratadas con: 2: EpapGV, 3: AgMNPV, 4: AgMNPV/EpapGV; 5: DNA de AgMNPV (control positivo), 6: Control larvas (control negativo), 7: 500 pb. Las flechas blancas señalan la banda de interés; a la izquierda del gel se indican los tamaños de algunas de las bandas del marcador de PM.

En coinfecciones con baculovirus con alta a moderada homología, se describieron eventos de recombinación tanto en cultivo de células (Croizier & Ribeiro, 1992; Hajos *et al.*, 2000), (Kondo & Maeda, 1991) como en larvas de insecto (Kamita *et al.*, 2003; Merryweather-Clarke *et al.*, 1994). Por tal motivo, para confirmar los datos obtenidos por PCR se procedió a verificar la identidad del virus obtenido a partir de las larvas muertas sometidas a las mezclas virales (tratamientos 1b y 2b). Para tal fin, se realizó una extracción de DNA a partir de los OBs obtenidos de las larvas y se lo digirió con enzimas de restricción. Como se observa en la Figura 2.4 el perfil restricción obtenido para el DNA extraído de los cuerpos de oclusión de las larvas muertas, corresponde al de AgMNPV.

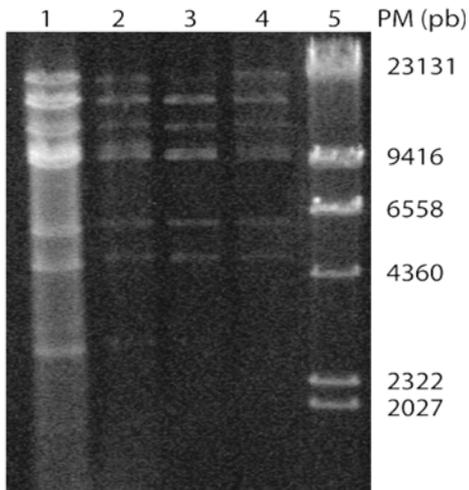


Fig. 2.4: Patrón de restricción de DNA obtenido a partir de OBs extraídos de larvas de *A. gemmatalis* sometidas a distintos tratamientos. DNA extraído de OBs presentes en: Calle 1: control AgMNPV extraído de cultivo celular. Calle 2: larvas infectadas con la mezcla 50 OBs AgMNPV/6000 OBs EpapGV. Calle 3: larvas infectadas con la mezcla 300 OBs AgMNPV/6000 OBs EpapGV. Calle 4: larvas infectadas con AgMNPV sólo. Calle 5: marcador de peso molecular (λ HindIII).

Entre la búsqueda de las causas del efecto observado se evaluó la hipótesis de una infección cruzada. Los resultados negativos de detección mediante PCR del genoma viral de EpapGV en larvas de *A. gemmatalis* y de AgMNPV en larvas de *E. aporema* mostraron la falta de infectividad en el huésped evaluado. Esto confirmó los resultados obtenidos previamente respecto al rango de hospedantes de EpapGV (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). Por consiguiente, se puede inferir que el aumento de la virulencia a partir de la mezcla viral sobre larvas de *A. gemmatalis*, estaría asociada a la adición de preparaciones de cuerpos de oclusión de EpapGV y no a una coinfección.

Efecto sobre la membrana peritrófica y SDS-PAGE

Como se mencionó anteriormente, existen factores codificados en el genoma de ciertos GV que poseen la capacidad de incrementar la infectividad de NPVs (Derksen & Granados, 1988; Lara-Reyna *et al.*, 2003; Lepore *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2004). Los más estudiados actúan sobre la membrana peritrófica (MP) del hospedador, la cual posee entre sus funciones impedir el pasaje de agentes potencialmente dañinos. Esta membrana, compuesta principalmente por quitina y proteínas, es alterada en su estructura por componentes presentes o asociados al cuerpo de oclusión viral (Derksen & Granados, 1988). La consecuencia de este daño, deriva en un mayor pasaje de los viriones a través de la MP facilitando el contacto entre el virión y el epitelio intestinal. Con el fin de verificar si algún factor proteico presente en el cuerpo de

oclusión de EpapGV fue el agente causal de la disminución del TL_{50} observado en los ensayos previos, se realizó un patrón proteico de membranas peritróficas extraídas de las larvas sometidas a los distintos tratamientos evaluados (Fig. 2.5).

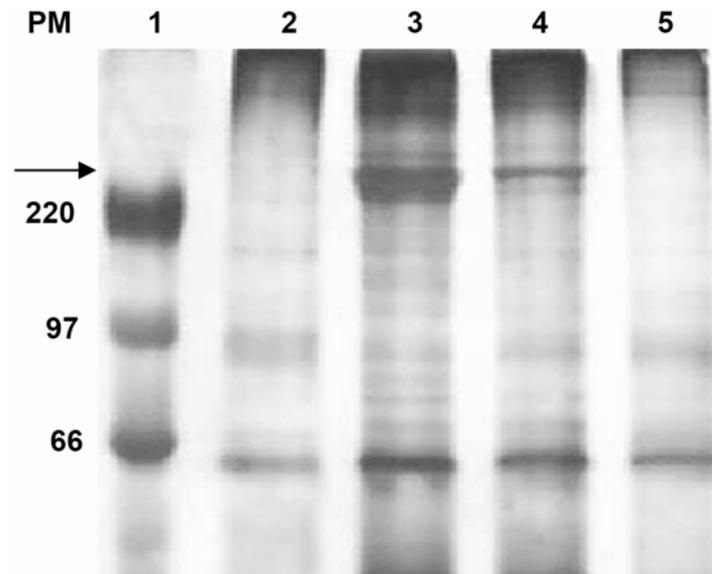


Fig. 2.5: SDS-PAGE de proteínas de membranas peritróficas extraídas de *A. gemmatalis* a los 90 minutos post-infección. Calle 1: Marcador de PM (kDa). Calle 2: Control (larvas sin infectar), calle 3: tratadas con AgMNPV + EpapGV (50/6000 OB/larva), calle 4: con EpapGV (6000 OB/larva), calle 5: con AgMNPV (50 OB/larva). Tinción con plata. La flecha productos de degradación de las proteínas de muy alto peso molécula.

Según los resultados obtenidos, se produciría una degradación de las proteínas de alto peso molecular en las membranas peritróficas de las larvas de *A. gemmatalis* sometidas al tratamiento con ambos virus (calle 3) y en las tratadas con EpapGV solo (calle 4); mientras que en las muestras correspondientes al tratamiento con AgMNPV (calle 5) como en el control (calle 2) las proteínas de alto peso molecular (cercanas al punto de siembra de la muestra) no fueron degradadas a productos de menor tamaño. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos complementarios.

Búsqueda por PCR de *vef* (*viral enhancing factor*) en el genoma de EpapGV.

En primer término, se procedió determinar la posible presencia del gen *vef* en el genoma de EpapGV. Con este fin, se realizaron alineamientos de las secuencias disponibles en las bases de datos y se diseñaron *primers* específicos para la búsqueda del ORF mediante amplificación genómica. Como control positivo se usó el DNA de *Xestia c-nigrum* Granulovirus (XcGV), que posee cuatro *vefs* en su genoma.

Se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado (214 pb) para XcGV (control positivo), resultando negativa la amplificación sobre el DNA de EpapGV (Fig.3.4).

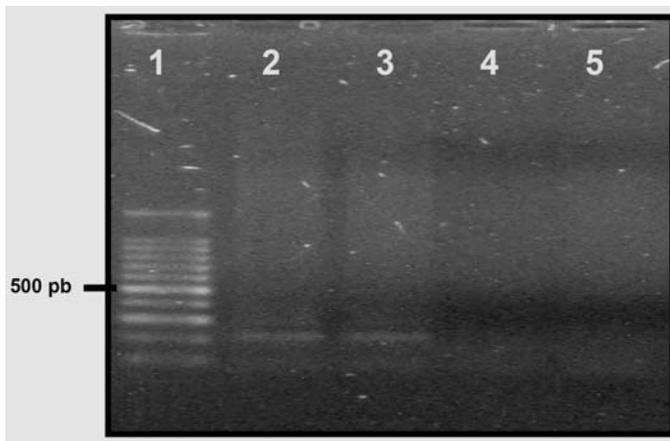


Fig. 3.4. PCR para la detección de un *enhancer* en el genoma de EpapGV. De izquierda a derecha. Calle 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Calle 2: Control positivo, DNA de XcGV (dilución 1:10). Calle 3: Control positivo, DNA de XcGV (dilución 1:50). Calle 4: DNA de EpapGV. Calle 5: Control negativo

Estos resultados fueron luego confirmados al obtener la secuencia completa del genoma de EpapGV (Ferrelli, 2010).

Microscopía electrónica de barrido de membranas peritróficas.

Con el fin de complementar el análisis sobre el efecto de preparaciones de OBs de EpapGV en las membranas peritróficas de larvas de *A. gemmatalis*, se procedió a la observación de las mismas, bajo microscopio electrónico de barrido (Fig.2.6).

Los resultados muestran un deterioro en la estructura de la membrana peritrófica de larvas de *A. gemmatalis* tratadas con preparaciones de cuerpos de oclusión de EpapGV y, además, perforaciones asociadas a cuerpos esferoidales de tamaño variable y con un diámetro promedio aproximado de aproximadamente 1 μm . Su presencia indica que los mismos no fueron degradados tempranamente en

el medio alcalino del intestino medio del hospedador, tal como ocurrió con los cuerpos de oclusión que encierran viriones en una matriz de poliedrina o de granulina. Este resultado fue luego confirmado mediante la observación de preparaciones de OBs tratadas con solución de CO_3Na_2 (ver Capítulo 3)

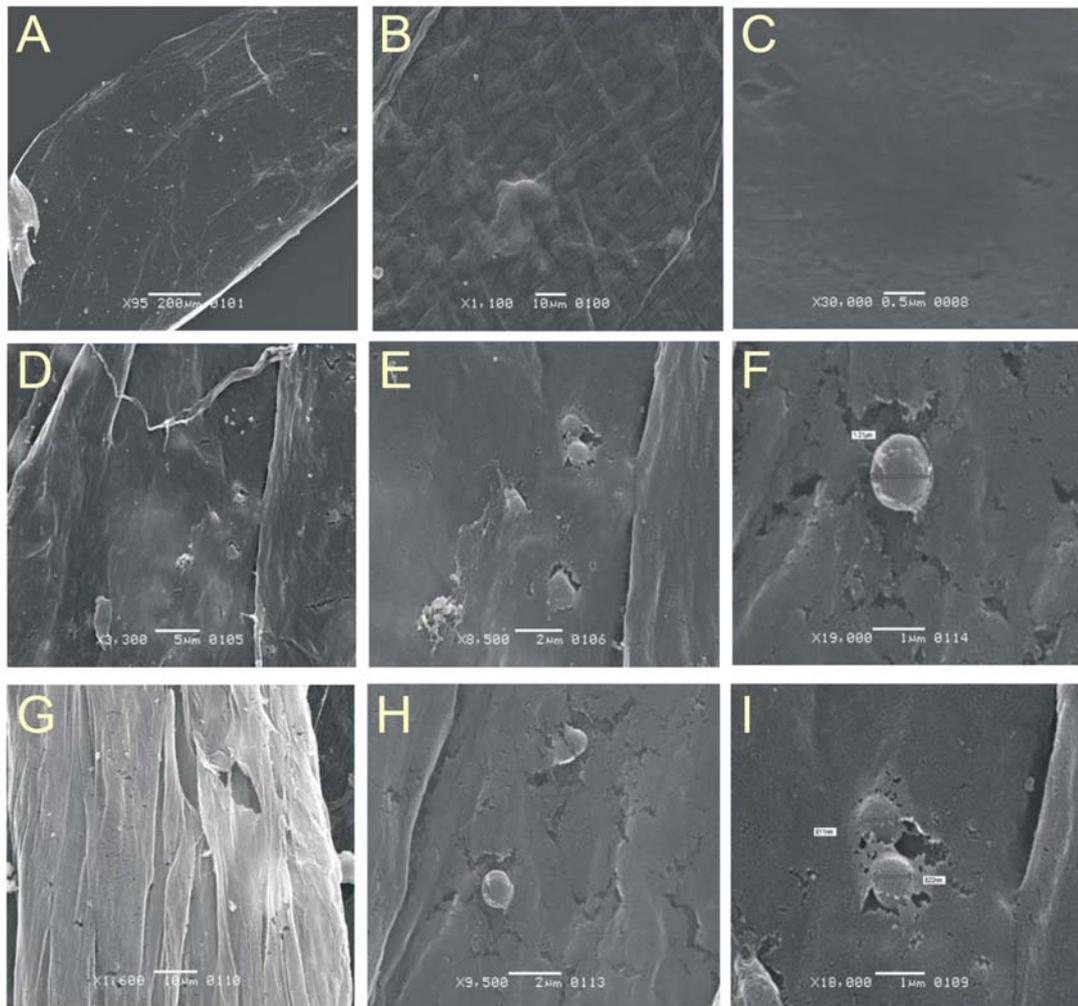


Fig. 2.6. Microscopía electrónica de barrido de membranas peritróficas de larvas del tercer estadio de *Anticarsia gemmatalis* infectadas solo con poliedros (A-C); mezcla de poliedros y gránulos (D- F) y solo con gránulos (G-I)

En estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo, se observó la presencia de cuerpos electrodensos de mayor tamaño que los gránulos de EpapGV, tanto en cortes ultrafinos de tejidos infectados, como en preparaciones purificadas de OBs. Los mismos no contenían viriones y se asumió entonces que se trataba de cristales de granulina, tal como fuera sugerido por Hess y Falcon

(1987) en estudios realizados sobre la patología producida por CpGV en larvas de *Cydia pomonella* (Goldberg, 2003) (Fig.2.7)

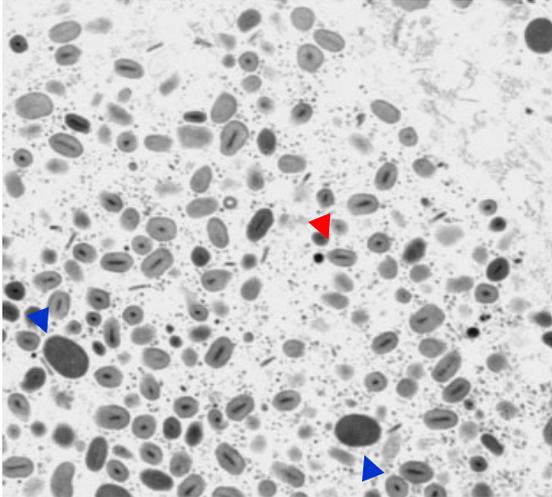


Fig. 2.7. Micrografía electrónica: con flechas rojas se indican los cuerpos de inclusión, que poseen una longitud promedio de 600 μm ; con flechas azules se muestran cuerpos proteicos de aproximadamente 1 – 1,5 μm de largo (Foto: A. V. Goldberg).

El tamaño y la forma de estas estructuras son coincidentes con las observadas mediante microscopía de barrido, sobre las membranas peritróficas (MP) de las larvas tratadas con EpapGV.

Los resultados de todos los ensayos realizados estarían indicando la presencia de factores en los OBs o asociados a los mismos, capaces de actuar sobre la MP o sus componentes. Habiéndose confirmado la ausencia de genes *vef*, se realizó un análisis de las secuencias parciales disponibles del genoma de EpapGV (Parola, 2004), con el fin de ubicar otros genes descritos en la literatura como posibles factores de incremento de virulencia. Se ubicó así un gen de interés a ser caracterizado y evaluado: *gp37*.

En relación a proteínas homólogas a GP37, cabe mencionar que en CfDEFMNPV (Gross *et al.*, 1993; Liu & Carstens, 1996) y en entomopoxvirus (otro grupo de virus entomopatógenos) (Dall *et al.*, 1993; Gauthier *et al.*, 1995; Mitsunashi *et al.*, 1998; Mitsunashi & Sato, 2000) se observó que pueden formar cristales, aunque hasta el presente no se ha descrito este tipo de inclusiones en el género *Betabaculovirus*.

Referencias

- Arif, B. M. & Doerfler, W. (1984). Identification and localization of reiterated sequences in the *Choristoneura fumiferana* MNPV genome. *EMBO J* 3, 525-529.
- Barrett, A. D. & Dimmock, N. J. (1986). Defective interfering viruses and infections of animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 128, 55-84.
- Begon, M., Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1996). Ecology: individuals, populations, and communities. Oxford Press; Cambridge, Mass.: Blackwell Science.
- Biedma, M. E. (2009). Desarrollo de un sistema de recombinación para su aplicación al estudio de determinantes genéticos que afectan la infectividad de baculovirus de interés agronómico. *Tesis Doctoral; Universidad Nacional de La Plata*.
- Bischoff, D. S. & Slavicek, J. M. (1997). Molecular analysis of an *enhancin* gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 71, 8133-8140.
- Cao, J., Ibrahim, H., Garcia, J. J., Mason, H., Granados, R. R., and Earle, E. D. (2002). Transgenic tobacco plants carrying a baculovirus *enhancin* gene slows the development and increase the mortality of *Trichoplusia ni* larvae. . *Plant Cell Rep* 21:244-250
- Croizier, G. R. & Ribeiro, H. C. T. (1992). Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus wild populations. *Virus Research* 26, 183-196
- Cheng, X. W., Carner, G. R., Lange, M., Jehle, J. A. & Arif, B. M. (2005a). Biological and molecular characterization of a multicapsid nucleopolyhedrovirus from *Thysanoplusia orichalcea* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol* 88, 126-135.
- Cheng, X. W., Carner, G. R., Lange, M., Jehle, J. A. & Arif, B. M. (2005b). Biological and molecular characterization of a multicapsid nucleopolyhedrovirus from *Thysanoplusia orichalcea* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol* 88, 126-135.
-

- Dall, D., Sriskantha, A., Vera, A., Lai-Fook, J. & Symonds, T. (1993). A gene encoding a highly expressed spindle body protein of *Heliothis armigera* entomopoxvirus. *J Gen Virol* 74 (Pt 9), 1811-1818.
- Derksen, A. C. & Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* 167, 242-250.
- Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J. C. & Bergoin, M. (1995). The *Melolontha melolontha* entomopoxvirus (MmEPV) fusolin is related to the fusolins of lepidopteran EPVs and to the 37K baculovirus glycoprotein. *Virology* 208, 427-436.
- Goto, C. (1989). Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera:Noctuidae). *Appl Entomol Zool* 25, 135-137
- Greene, G. L., Leppla, N. C. & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol* 69, 487-488.
- Gross, C. H., Wolgamot, G. M., Russell, R. L., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1993). A 37-kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies. *J Virol* 67, 469-475.
- Hajos, J. P., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Zavodszky, P. & Vlak, J. M. (2000). High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. *Arch Virol* 145, 159-164.
- Hukuhara, T., K. Tamura, Y. Zhu, H. Abe and Y. Tanada (1987). Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infections. *Appl Entomol Zool* 22, 235-236.
- Kamita, S. G., Maeda, S. & Hammock, B. D. (2003). High-frequency homologous recombination between baculoviruses involves DNA replication. *J Virol* 77, 13053-13061.

- Kondo, A. & Maeda, S. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 65, 3625-3632.
- Kunimi, Y. & Fuxa, J. R. (1996). Volumes ingested by four species of noctuids with reference to peroral droplet bioassay of baculoviruses. *J Invertebr Pathol* 68, 310-311.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lara-Reyna, J., Del Rincon-Castro, M. C. & Ibarra, J. E. (2003). Synergism between the nucleopolyhedroviruses of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni*. *Acta Virol* 47, 189-194.
- Lauzon, H. A., Jamieson, P. B., Krell, P. J. & Arif, B. M. (2005). Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 86, 945-961.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol* 68, 131-140.
- Liu, J. J. & Carstens, E. B. (1996). Identification, molecular cloning, and transcription analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus *spindle-like protein* gene. *Virology* 223, 396-400.
- Liu, S., Li, H., Sivakumar, S. & Bonning, B. C. (2006). Virus-derived genes for insect-resistant transgenic plants. *Adv Virus Res* 68, 427-457.
- Lopez-Ferber, M., Simon, O., Williams, T. & Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc Biol Sci* 270, 2249-2255.
- Lowe, R. E. & Paschke, J. D. (1968). Pathology of a double viral infection of *Trichoplusia ni*. *J Invertebr Pathol* 12, 438-443.

- Manzán, M. A. (2002). Clonado molecular del genoma del virus de la granulosis de *Epinotia aporema*, EpapGV y caracterización del gen de la ecdisona glicosiltransferasa. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas*, p. 156
- Manzan, M. A., Aljinovic, E. M., Biedma, M. E., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2008). Multiplex PCR and quality control of *Epinotia aporema* granulovirus production. *Virus Genes* 37, 203-211.
- Merryweather-Clarke, A. T., Hirst, M. & Possee, R. D. (1994). Recombination between genetically modified and unmodified *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in *Trichoplusia ni* larvae. *Acta Virol* 38, 311-315.
- Mitsubishi, W., Furuta, Y. & Sato, M. (1998). The spindles of an entomopoxvirus of coleoptera (*Anomala cuprea*) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 71, 186-188.
- Mitsubishi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K. & Wada, S. (2007). Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *J Virol* 81, 4235-4243.
- Mitsubishi, W. & Sato, M. (2000). Enhanced Infection of a Nucleopolyhedrovirus in a Lepidopteran Pest (*Spilosoma imparilis*) by Spindles of a Coleopteran Entomopoxvirus (EPV) (*Anomala cuprea* EPV). *Japanese Forestry Society*
- Mukawa, S. & Goto, C. (2007). Enhancement of nucleopolyhedrovirus infectivity against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by proteins derived from granulovirus and a fluorescent brightener. *J Econ Entomol* 100, 1075-1083.
- Parola, A. D. (2004). Caracterización molecular de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema*. *Tesis Doctoral; Universidad Nacional de La Plata*.
- Peng, J., Zhong, J. & R, R. G. (1999). A baculovirus enhancer alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J Insect Physiol* 45, 159-166.
- Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., Arciello, S., Corrado, G. & Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the
-

- peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 1205-1213.
- Roelvink, P. W., Corsaro, B. G. & Granados, R. R. (1995). Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *J Gen Virol* 76, 2693-2705.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldberg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001). Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Appl Environ Microbiol* 67, 3702-3706.
- Slavicek, J. M. & Popham, H. J. (2005). The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancins are components of occlusion-derived virus. *J Virol* 79, 10578-10588.
- Tanada, Y. & Hara, S. (1975). Enzyme synergistic for insect viruses. *Nature* 254, 328-329.
- Tanada, Y., Himeno, M. & Omi, E. M. (1973). Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm. *J Invertebr Pathol* 21, 31-40.
- Tanada, Y. & Watanabe, H. (1971). Disc electrophoretic and serological studies of the capsule proteins obtained from two strains of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J Invertebr Pathol* 18, 307-312.
- Wang, P. & Granados, R. R. (1997a). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6977-6982.

Capítulo 3

**Estudio y caracterización de un homólogo a *gp37*
encontrado en el genoma de EpapGV**

Indice temático

Introducción	61
Materiales y métodos	65
Resultados y discusión	72
Sequenciación y caracterización de gp37 de EpapGV	72
Análisis filogenético de GP37 y homólogos	76
Expresión de GP37 en un sistema eucariota	78
Determinación de la presencia de GP37 en OB de EpapGV	80
Referencias	83

Este capítulo forma parte de la siguiente publicación

Analysis of EpapGV gp37 gene reveals a close relationship between granulovirus and entomopoxvirus. **Salvador R**, Ferrelli ML, Berretta MF, Mitsuhashi W, Biedma ME, Romanowski V, Sciocco-Cap A.

Virus Genes. 2012 Dec;45(3):610-3. doi: 10.1007/s11262-012-0800-3. Epub 2012 Aug 17.

Introducción

Los estudios realizados sobre diferentes géneros integrantes de la familia *Baculoviridae* (*Nucleopolyhedrovirus* y *Granulovirus*) están orientados no sólo a ampliar la comprensión de los mecanismos de patogénesis viral, sino también, a optimizar su uso como agentes de biocontrol.

En tal sentido, en las últimas décadas se han registrado grandes avances en relación con el mejoramiento de la eficiencia de los nucleopoliedrovirus mediante ingeniería genética, encarándose investigaciones tendientes principalmente hacia el aumento de la velocidad de acción y ampliación el rango de hospedadores susceptibles, manteniendo las cualidades propias de los baculovirus en relación a su inocuidad hacia organismos no blanco (Chen *et al.*, 1998; Maeda, 1989a; b; Zuidema *et al.*, 1989). En la actualidad, este mejoramiento está orientado hacia la expresión de genes propios de los insectos o genes virales que alteren la fisiología del insecto blanco (Inceoglu *et al.*, 2006).

Entre ellos, un gen con capacidad para aumentar la infectividad se describió en otra familia de virus entomopatógenos, los Entomopoxvirus (EPV). En estos, el cuerpo de oclusión viral está constituido por una proteína denominada esferoidina. Esta proteína presentó una alta homología respecto a secuencias obtenidas de baculovirus, a las que se designó como gp37 (Vialard *et al.*, 1990). Estudios posteriores demostraron que la homología con la esferoidina era incorrecta, debido a que en los procesos de purificación de estos cuerpos de oclusión, la misma se encontraba contaminada con otros cuerpos cristalinos fusiformes constituidos por proteínas a las que se denominó *fusolins* (fusolinas) (Fig 3.1) (Gauthier *et al.*, 1995). Por lo tanto, entre las *fusolinas* de los entomopoxvirus y *gp37* de los baculovirus se estableció una relación determinada por la similitud a nivel de secuencia, no siendo muy claros hasta el momento los orígenes de este vínculo.

Tanto las secuencias aminoacídicas procedentes de los entomopoxvirus, como la descritas inicialmente por Vialard y col. (1990) para AcMNPV, poseen 5 regiones de alta homología, así como potenciales sitios de glicosilación (Gauthier *et al.*, 1995; Vialard *et al.*, 1990). Según este estudio, el ORF está bajo un promotor de

expresión. Si bien ambas familias virales no se encuentran vinculadas filogenéticamente, se postula un origen común de las fusolinas y las gp37 baculovirales (Vialard *et al.*, 1990).

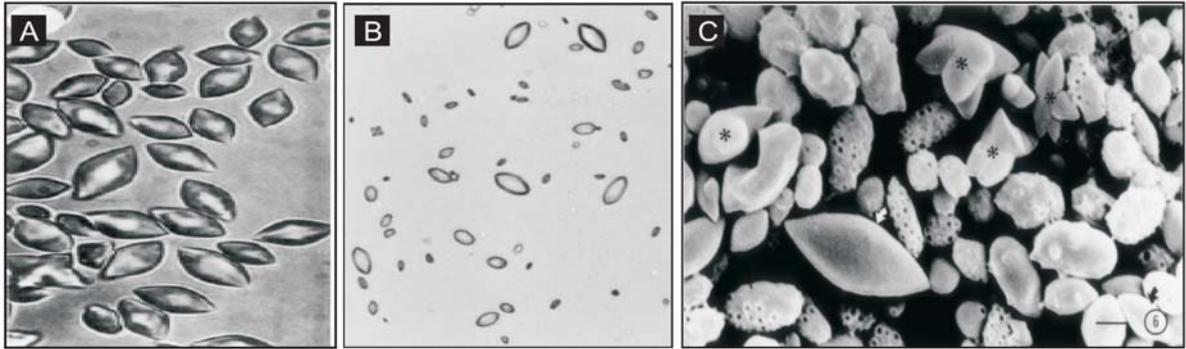


Fig 3.1. Morfología de los cristales de fusolinas obtenidas a partir de diferentes insectos infectados con entomopoxvirus (Fuente: A. Gauthier *et al.*, 2005; B. Wijonarko *et al.*, 1998; C. Lai-Fook *et al.*, 2000).

Posteriormente, los estudios sobre GP37 estuvieron orientados a dilucidar su ubicación subcelular y su función en el ciclo de infección baculoviral. De esta manera su presencia comenzó a ser descrita en otros baculovirus, principalmente en los NPVs. Se demostró que GP37 del nucleopoliedrovirus *Orgyia pseudosugata* (OpMNPV) posee las regiones conservadas descritas por Vialard y col. (1990) y que la región más conservada está presente en el extremo amino terminal, mientras que el extremo carboxilo muestra una mayor variabilidad (Gross *et al.*, 1993). Estas observaciones fueron válidas para todas las secuencias descritas posteriormente. A diferencia de lo encontrado en la descripción de AcMNPV, en OpMNPV la proteína GP37 no se encuentra asociada a la poliedrina, aunque se la encuentra altamente concentrada en el citoplasma formando cuerpos de inclusión (Gross *et al.*, 1993). Esta última característica solo fue descrita nuevamente en el nucleopoliedrovirus *Choristoneura fumiferana* DEF (CfDEFNPV) (Li *et al.*, 2000). Las causas que determinan la formación de inclusiones en algunos NPVs no están muy claras, asociándose la ausencia de cristalización de GP37 en otros virus, a un bajo nivel de expresión proteico (Li *et al.*, 2003). Los estudios con tunicamicina indican que se trata de una glicoproteína (Phanis *et al.*, 1999). Datos posteriores surgidos del estudio de *gp37*, le atribuyeron un papel importante en el proceso de

duplicación del DNA viral debido al alto grado de conservación de la secuencia, su glicosilación y los dominios encontrados (Liu & Carstens, 1996). Sin embargo, trabajos realizados con mutantes en los cuales *gp37* fue deletado, demostraron que no es esencial en el ciclo de replicación viral (Cheng *et al.*, 2001).

Por otra parte, ensayos llevados a cabo con fusolinas evidenciaron que era capaz de potenciar la infección cuando estos cuerpos proteicos eran administrados junto a otros virus (Mitsubishi *et al.*, 1998; Wijonarko & Hukuhara, 1998). Los siguientes trabajos centraron su atención sobre su acción sobre la MP del hospedador.

Más recientemente, se demostró que la GP37 de baculovirus presenta diferentes grados de glicosilación, que puede estar o no asociada a los cuerpos de oclusión, que el promotor es predominantemente tardío pero puede tener motivos tempranos en algunos casos, que están muy conservadas las 6 cisteínas aparentemente responsables de formaciones cristalinas en algunos hospedadores. Además, las 5 regiones conservadas (inicialmente descritas en *Autographa californica* MNPV por Vialard y col., 1990) presentan un dominio de unión a quitina tipo 3, diferente al tipo 2 de las mucinas. La capacidad de unirse a la quitina de la membrana peritrófica quedó demostrada en ensayos realizados con GP37 de *Spodoptera litura* MNPV (Li *et al.*, 2003).

En el caso de las fusolinas de EPV se ha demostrado alteran la estructura de la membrana peritrófica permitiendo de esta manera un mayor pasaje de viriones al sitio de replicación viral (Mitsubishi *et al.*, 2007). Sin embargo, en baculovirus no existen estudios que verifiquen la misma actividad de GP37.

Por otra parte, los antecedentes indican que genes hallados en el genoma de los baculovirus podrían tener su origen en otros organismos incluido el propio huésped (Wang *et al.*, 2004b). La homología entre fusolinas y GP37 hace suponer un origen común (Vialard *et al.*, 1990), no muy difícil de imaginar conociendo que representantes de ambas familias virales, esto es Entomoviridae y Baculoviridae, pueden ser aislados de un mismo hospedador (*Heliothis armigera* o *Choristoneura fumiferana*, por ejemplo) (Dall *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2002);(de Jong *et al.*, 2005; Lauzon *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1997). Los análisis de filogenia que incluyen ambas familias los muestran como dos grupos bien separados (Phanis *et al.*, 1999), pero los mismos no fueron realizados incluyendo la gran cantidad de secuencias

disponibles en la actualidad en las bases de datos, ni tampoco incluyen organismos como las bacterias. Estas, por ejemplo, poseen proteínas con secuencias homólogas a las *fusolinas* y *gp37*, denominadas *chitin binding proteins (cbps)* cuya función parece estar involucrada en la optimización del proceso de degradación de la quitina (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005).

Los resultados expuestos en el capítulo anterior indican la existencia de sinergismo entre el virus de AgMNPV y EpapGV cuando son aplicados de forma conjunta sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Además, se verificó la ausencia de genes *vef*. Por tal motivo, se consideró de interés realizar la caracterización del homólogo a *gp37* encontrado en el genoma de EpapGV y establecer su posible participación en los efectos observados en los ensayos *in vivo*.

Materiales y métodos

Insectos. Las larvas de *E. aporema*, empleadas para la multiplicación de virus, fueron provistas por el insectario del IMYZA-INTA, Castelar. La cría de los insectos se realizó bajo condiciones controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (50-70%), fotoperíodo (14:10 L/O) y fue mantenida en dieta artificial (Greene *et al.*, 1976).

Células de insectos. Células de *Trichoplusia ni* (*HighFive*) (Wickham *et al.*, 1992) y *Spodoptera frugiperda* SF9 (Vaughn *et al.*, 1977) fueron mantenidas a 27°C en medio TC100 suplementado con 10% de suero fetal bovino (BIOSER).

Virus. EpapGV fue multiplicado en larvas de cuarto estadio de su respectivo hospedante. La propagación se realizó por contaminación superficial de la dieta (sin formaldehído) con cuerpos de inclusión (1×10^3 OBs/mm²). Las larvas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (50%) hasta el momento de recolección del material infectado.

Extracción de DNA de EpapGV. Las larvas recolectadas fueron maceradas en baño hielo agua, esta mezcla se filtró a través de una gasa colocada en un tubo *ependorf* de 0,5 ml perforado en su base. El filtrado fue tratado con Na₂CO₃ a concentración final de 0,1 M durante 30 min, se neutralizó la solución mediante agregado de Tris-HCl (Ph 6,2). Las muestras fueron hervidas por 5 min y se utilizó 1 μl de esta solución para la reacción de PCR (Manzán *et al.*, 2008).

Extracción de cuerpos de oclusión a partir de larvas infectadas con EpapGV. Las larvas infectadas fueron recolectadas y maceradas con la ayuda de un mortero, se agregó agua para ayudar a la homogeneización, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente una semana. Posteriormente, se filtró la mezcla a través de gasa, se midió el volumen y se agregó SDS a concentración final de 0,1%. Se centrifugó 2 min a 2000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) para eliminar todos los restos celulares. El sobrenadante se ubico sobre un gradiente de sacarosa de 35% a 65%

y se centrifugó por una hora a 32.500 xg. La banda blanca correspondiente a los OBs se recuperó y se diluyó en tres volúmenes de agua destilada y se centrifugó por 1 hora a 20.000 xg, este último paso se repitió tres veces para eliminar restos de sacarosa. El *pellet* fue finalmente resuspendido en agua destilada.

Secuenciación de gp37 de EpapGV. En base a la secuencia parcial del ORF de gp37 (Parola *et al.*, 2002) se diseñó un *primer* de secuencia 5'-CTGACAATCTTGGCACACC-3' (T 53,7 °C) para continuar con la secuenciación. El análisis de la secuencia obtenida permitió identificar un codón de terminación y por lo tanto obtener la secuencia completa del ORF.

Amplificación por PCR del ORF de gp37 de EpapGV. Una vez obtenida la secuencia completa del ORF se diseñaron *primers* específicos para la amplificación de gp37 de EpapGV gp37-up-EcoRI (5'-GGAATTCCAGATATGATAGTACGATAATATTG'-3) gp37-down-PstI (5'-AACTGCAGTTAAAACCTCGTCATTTTGT'-3). Ambos *primers* fueron diseñados conteniendo los citados sitios de restricción (subrayados) El producto de amplificación fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizado bajo luz UV mediante tinción con bromuro de etidio.

Análisis filogenético. La secuencia teórica aminoacídica de GP37 de EpapGV fue comparada con un total de 37 secuencias obtenidas por BLAST en el EMBL/GenBank (Tabla 3.2). Las mismas se alinearon mediante el uso del programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) con los siguientes parámetros: pairwise alignments; slow, gap opening 10, gap extension 0±1, matrix BLOSUM, 30; multiple alignments; gap opening 10, gap extension 0±05. Las 38 secuencias de proteínas completas se utilizaron en el alineamiento final. El análisis filogenético se realizó con el método del vecino más cercano (*Neighbor-joining*, NJ) usando el conjunto de programas de MEGA 3.1 (D. L. Swofford). Los valores de *bootstrap* en NJ se obtuvieron después de 500 replicaciones.

Tabla 3.2. Abreviaturas y números de acceso en GenBank de los organismos utilizados en este trabajo.

	Abreviatura	N° de acceso en GenBank
Nucleopolyhedrovirus (NPV)		
<i>Agrotis ipsilon</i> MNPV	AgipMNPV	NC_011345
<i>Agrotis segetum</i> NPV	AgseNPV	NC_007921
<i>Autographa californica</i> MNPV	AcMNPV	L22858
<i>Bombyx mori</i> NPV	BmNPV	L33180
<i>Choristoneura fumiferana</i> DEF MNPV	CfDEFMNPV	NC_005137
<i>Chrysodeixis chalcites</i> NPV	ChchNPV	YP_249671
<i>Ecotropis obliqua</i> NPV	EcoNPV	NC_008586
<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	EppoMNPV	AY043265
<i>Helicoverpa zea</i> MNPV	HzMNPV	AF334030
<i>Hyphantria cunea</i> NPV	HycuNPV	NC_007767
<i>Lymantria dispar</i> MNPV	LdMNPV	AF081810
<i>Mamestra brassicae</i> MNPV	MbMNPV	AF108960
<i>Mamestra configurata</i> NPV	MacoNPV	U59461
<i>Maruca vitrata</i> MNPV	MaviMNPV	NC_008725
<i>Plutella xylostella</i> MNPV	PlxyMNPV	DQ457003
<i>Rachiplusia ou</i> MNPV	RouMNPV	NC_004323
<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	SeMNPV	AF169823
<i>Trichoplusia ni</i> NPV	TniNPV	NC_007383
Granulovirus (GV)		
<i>Cydia pomonella</i> GV	CpGV	U53466
<i>Heliothis armigera</i> GV	HaGV	D28558
<i>Pieris rapae</i> GV	PieraGV	GQ884143
<i>Pseudaletia unipuncta</i> GV	PsunGV	EU678671
<i>Xestia c-nigrum</i> GV	XcGV	AF162221
Entomopoxvirus (EPV)		
<i>Anomala cuprea</i> EPV	AncuEPV	AB000780
<i>Choristoneura biennis</i> EPV	CbEPV	M34140
<i>Choristoneura fumiferana</i> EPV	CfEPV	U76536
<i>Heliothis armigera</i> EPV	HaEPV	L08077
<i>Melolontha melolontha</i> EPV	MmEPV	X77616
<i>Pseudaletia separata</i> EPV	PsEPV	D50590
Bacteria		
<i>Serratia marcescens</i>	Serratia	BAA31569
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonas	YP_855149
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Vibrio	ZP_05885129
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	Pseudoalteromonas	ZP_01132952
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Burkholderia	YP_443713

Expresión de EpapGV gp37 en células de insectos. El producto obtenido por amplificación correspondiente al ORF completo de *gp37* fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *PstI* (Promega) y clonado en el vector pBacPack 8 (Invitrogen) cortado con el mismo par de enzimas. Una vez ligados inserto y vector, se transformaron células *DH5α* electrocompetentes. Las colonias, seleccionadas mediante la utilización de ampicilina, fueron chequeadas mediante *colony* PCR usando los *primers* que amplificaron el ORF y mediante los *primers* bac1 (5-‘AACCATCTCGCAAATAAATA-3’) y bac2 (5’-AAGCGCTAGATTCTGTGCGT3’) complementarios a regiones externas y flanqueantes a la región de inserción del ORF. El plásmido obtenido se denominó pbgp37 y fue utilizado para la generación de virus recombinantes que permiten la expresión del ORF clonado. El sistema de recombinación empleado se basa en el uso de un bácmido del virus AcMNPV (bacGOZA) el cual ha sido modificado genéticamente. Entre las modificaciones se incluye la inserción de un replicón mini-F, que permite la posibilidad de que este genoma sea mantenido en bacterias y la delección parcial del ORF 1629 lo cual ocasiona la inviabilidad de este genoma. La porción faltante de este ORF esta incorporada en el plásmido de transferencia, por lo cual solo la ocurrencia del evento de recombinación homóloga entre plásmido y bácmido en células transfectadas con ambos, posibilita la obtención de un recombinante viable. La presencia del recombinante es evidenciada por la aparición de poliedros (OBs) en las células co-transfectadas, ya que el bácmido posee el ORF de poliedrina bajo promotor de p10. El vector de transferencia transfiere al bácmido el ORF de interés bajo el promotor de poliedrina por lo cual se espera un alto nivel de expresión proteica. La viabilidad del recombinante solo es posible ante un evento de recombinación que indica la transferencia del ORF clonado en el vector de transferencia por lo cual este sistema es altamente eficiente en la generación de virus como vectores de expresión.

Las células SF-9 (sembradas en placas de 35 mm de diámetro; 0.5×10^6 células) fueron transfectadas con el plásmido pbacgp37, el DNA del bacGOZA y el reactivo de transfección *Cellfectin* (Invitrogen) siguiendo las especificaciones y recomendaciones del fabricante (Fig.3.3). Las células fueron mantenidas a 27 °C por 4 h con la mezcla lípidos-DNA y luego la mezcla fue reemplazada por medio TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino. La incubación a 27 °C se

extendió hasta observar la presencia de células con poliedros. El sobrenadante de la transfección fue utilizado para reinfectar células Sf9 y el segundo pasaje se realizó sobre células de *Trichoplusia ni* (HighFive).

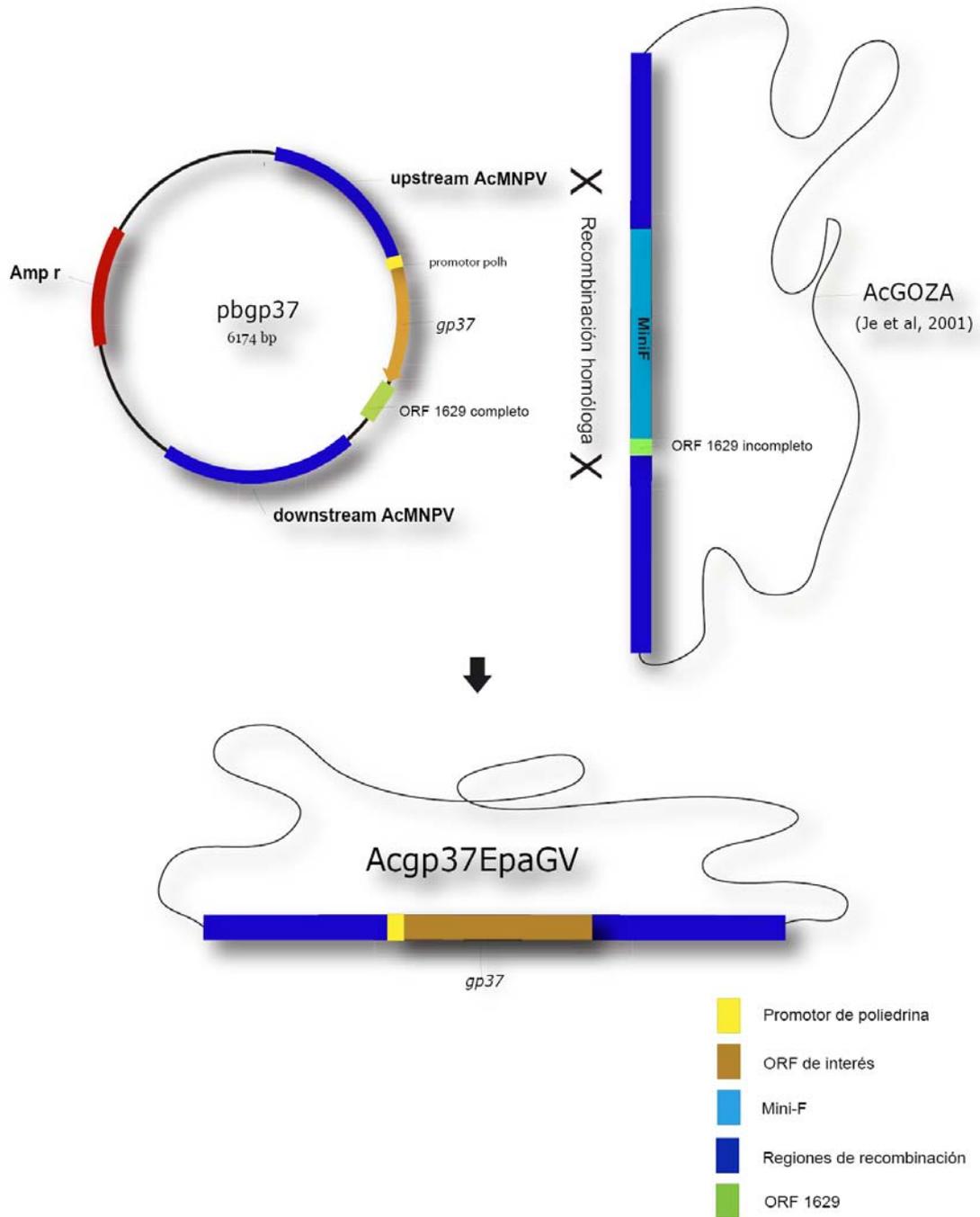


Fig. 3.3. Generación del recombinante *Acgp37EpaGV* mediante cotransfección de un plásmido de transferencia portador del ORF de interés y *DNA* de un bácido de AcMNPV.

Purificación de cuerpos de oclusión del rAcgp37EpapGV a partir de cultivos celulares. Monocapas de células infectadas con el virus rAcgp37EpapGV fueron resuspendidas 96 horas posinfección y centrifugadas a 6000 rpm durante 5 min. Posteriormente los *pellets* celulares se resuspendieron en un buffer de lisis y se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosas. La fracción correspondiente a los poliedros fue extraída y lavada tres veces con agua destilada para eliminar los restos de sacarosa. La concentración de los OBs purificados se determinó mediante el uso de un hemocitómetro (cámara de Neubauer)

Producción de anticuerpos. Se separaron las proteínas a partir de extractos celulares infectados con Acgp37EpapGV, mediante SDS-PAGE. La banda correspondiente a GP37 fue retirada del gel y deshidratada a temperatura ambiente. Con ayuda de un mortero se pulverizó el fragmento de gel conteniendo GP37 para posteriormente ser resuspendido en adyuvante de Freund completo. Se inocularon ratones C57BL/6J por vía subcutánea, respetando el siguiente protocolo: día 0, inoculación con adyuvante de Freund completo; día 15, inoculación con adyuvante de Freund incompleto y día 30, con adyuvante de Freund incompleto. Al día 45 se procedió al sangrado de los animales y a la extracción del suero.

Análisis mediante SDS-PAGE y Western Blot. Las células infectadas con el recombinante Acgp37EpapGV fueron levantadas 72 hs postinfección, lavadas dos veces con buffer PBS, centrifugadas y resuspendidas en SDS-PAGE *sample buffer*. Posteriormente, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), usando el equipo *Mini-protean II* (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-Psq; Millipore, Bedford, MA) usando un aparato *Trans-Blot® SD Semi-dry Transblot* (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 15 V por 30 min. Posteriormente, las membranas se incubaron en una solución de bloqueo (PBS conteniendo 5% de leche descremada) por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:5.000 del anticuerpo anti-fusolin AcEPV (Mitsubishi *et al.*, 2007) y se lavó tres veces con PBS que contenía 0,05% de *Tween* 20. A continuación, la membrana fue incubada 1 h con una dilución 1:5.000 de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a HRP (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se lavaron en PBS (0,05% de *Tween* 20) y

revelada con DAB (Sigma) y H₂O₂. Como controles se utilizaron células HighFive sin infectar y células infectadas con un recombinante de AcGOZA generado para expresar proteínas de virus (proteínas Z y GPC del virus Junín) no relacionadas con los baculovirus.

Secuenciación del extremo amino-terminal. Las proteínas procedentes de células infectadas con el virus Acgp37EpapGV fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (*Trans-Blot® SD, Semi-Dry Electrophoretic Transfer*, BioRad). Posteriormente, la banda del peso molecular acorde al esperado se separó de la membrana y se envió al Instituto LANAIS-PRO (UBA) para su secuenciación N-terminal mediante el método de Edman.

Disolución de cuerpos de oclusión en Na₂CO₃ y análisis mediante *Western Blot* y microscopía electrónica de barrido. Los gránulos provenientes de larvas infectadas con EpapGV se resuspendieron en agua destilada. Alícuotas de 1 ml de 1,5 x 10¹⁰ OB/ml fueron tratadas con una solución de Na₂CO₃ (concentración final de 0,1 M) a diferentes tiempos (10 min, 6 h y 18 h); la reacción de disolución fue detenida con el agregado de ácido clorhídrico diluido. Posteriormente cada muestra se centrifugó 5 min a 14000 rpm y el *pellet* resuspendido en 30 ul agua destilada. De cada tratamiento se tomaron 5 ul y se depositaron sobre placas de cobre para su metalización con oro y su posterior análisis mediante microscopía electrónica de barrido. El resto del volumen se utilizó para análisis mediante *Western blot*.

Resultados y discusión

Secuenciación y caracterización de *gp37* de EpapGV

El estudio de la secuencia parcial disponible del genoma de EpapGV (Parola *et al.*, 2002), indicó la presencia de *gp37* flanqueado por el ORF *odv-e18* por un lado y catepsina (*v-cath*) y quitinasa (*chiA*) en el otro extremo (Fig.3.5).

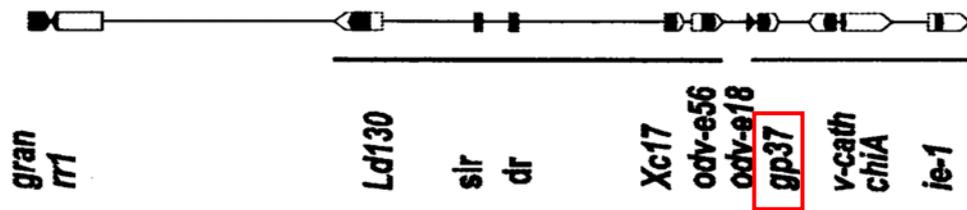


Fig. 3.5. Regiones flanqueantes de *gp37* (en recuadro) en el genoma de EpapGV. Extraído de Parola *et al.*, 2003.

Con la secuencia disponible (de aproximadamente 200 nucleótidos) se diseñó un *primer* específico que permitió encontrar un codón de stop y de esta forma obtener la secuencia completa del ORF de *gp37*. Del análisis de la secuencia obtenida se dedujo que el ORF posee 669 nt y que el codón de inicio está bajo regulación de un promotor tardío (Figura 3.6).

La traducción teórica completa de *gp37* de EpapGV determinó que codifica para una proteína de 221 aminoácidos de aproximadamente 25,4 kDa, en cuyo extremo amino terminal posee una región hidrofóbica que se correspondería con un péptido señal (Dall *et al.*, 1993), seguido por un motivo His-Gly-Tyr. Este motivo es característico de las proteínas maduras tipo fusolinas y constituiría la secuencia consenso de clivaje del péptido señal.

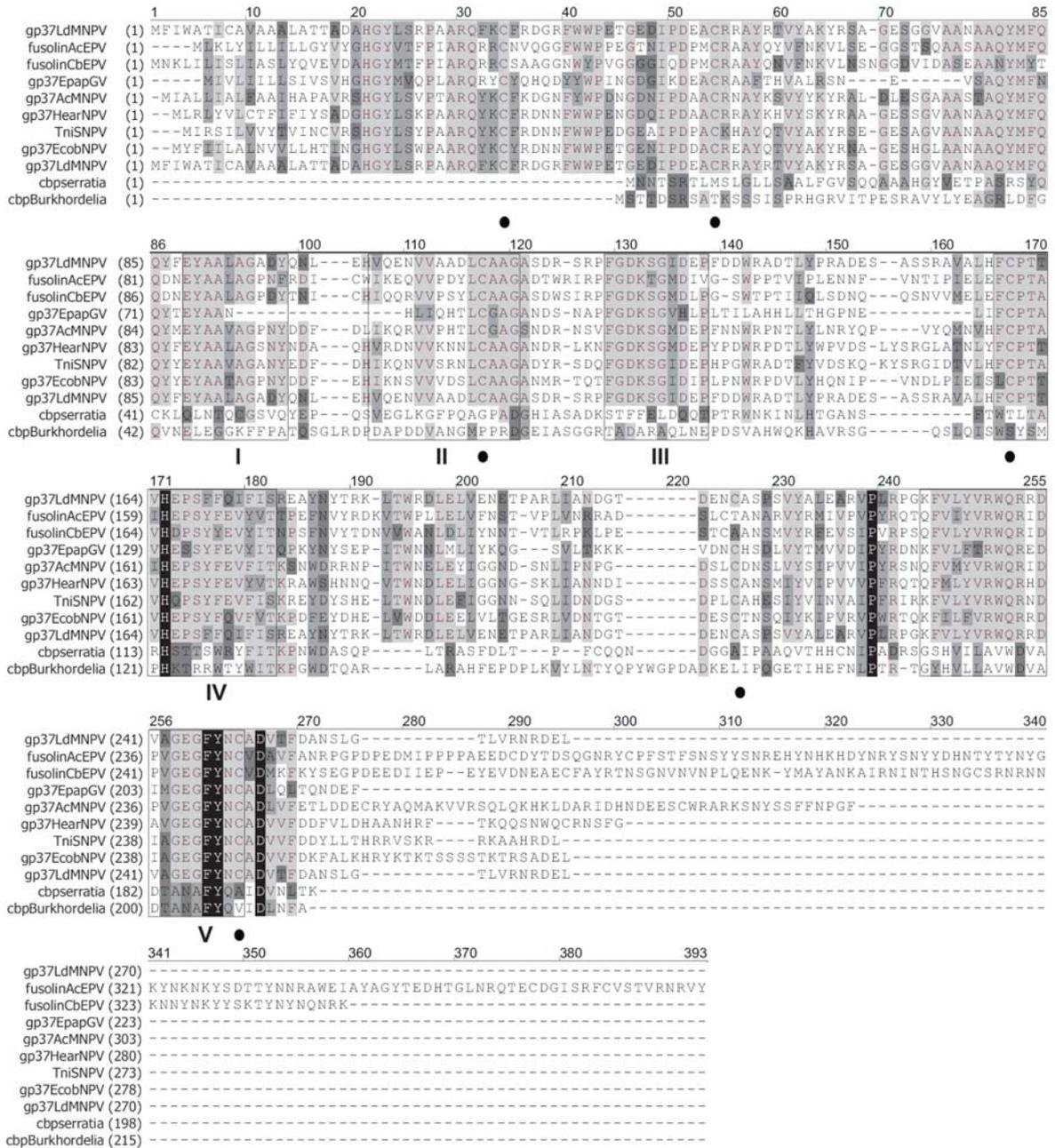


Fig. 3.7: Comparación esquemática de las secuencias aminoacídicas indicando con recuadros y números romanos (I-V) las cinco regiones descritas por Vialard y col. (1990). Los puntos en negro debajo del alineamiento indican la presencia de cisteínas (C). Referencias: en fondo negro y letras blancas indican total identidad con secuencia consenso (no mostrada); fondo gris claro y letras negras indican alta identidad con secuencia consenso; fondo gris oscuro y letras negras muestran baja identidad con secuencia consenso y fondo blanco con letras negras residuos no similares a secuencia consenso.

El análisis global de estas secuencias (GP37, fusolinas y CBP) en su conjunto muestra que poseen una longitud que va desde 200 aa a aproximadamente de 380 aa en baculovirus, hasta alcanzar una longitud cercana a los 400 aa en entomopoxvirus y algunas bacterias. El extremo amino-terminal es el más conservado y es donde ubica el dominio de unión a quitina. Recientemente en fusolinas de EPV, se demostró que en este extremo de la proteína se ubica la región responsable de la actividad tipo *enhancin* sobre la membrana (Takemoto *et al.*, 2008). La región del extremo carboxilo se presenta sumamente variable en cuanto a secuencia y longitud (Li *et al.*, 2003) (Fig. 3.8). En EPV este extremo es eliminado por la acción de enzimas presentes en el intestino medio y no posee ningún rol aparente en el aumento de la infectividad (Takemoto *et al.*, 2008).

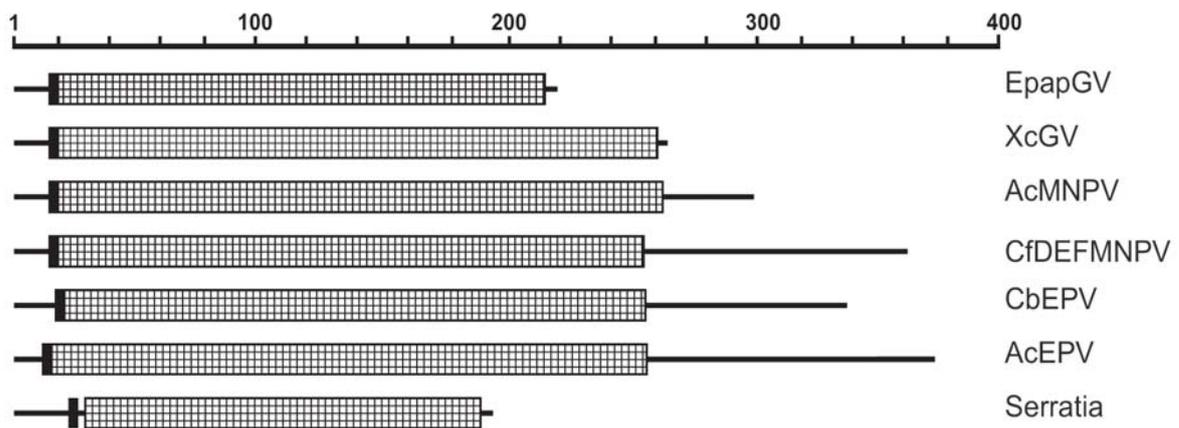


Fig. 3.8: Comparación esquemática de las secuencias aminoacídicas indicando longitud de las mismas y con rectángulo cuadriculado, la porción correspondiente al dominio de unión a quitina (Chitin-binding domain 3, *INTERPRO database* accesión number: IPR004302). El bloque en negro representa el sitio de clivaje del péptido señal y la línea negra indica la longitud en aa.

La secuencia aminoacídica completa deducida del ORF de *gp37* de EpapGV muestra que es la más pequeña entre las de proteínas virales de este grupo, descritas hasta el presente. Si bien posee una delección entre las regiones 1 y 2 descritas por Vialard y col. (1990), los dominios y señales característicos están presentes. El ORF está ubicado adyacente a los genes *catepsina* y *quitinasa* que juegan un rol importante en la degradación de la quitina en las etapas finales del ciclo infectivo y en la liberación de los cuerpos de oclusión en el medio ambiente. La

disposición de estos tres genes está conservada en muchos de los baculovirus secuenciados hasta el momento. En las bacterias está demostrada una asociación funcional entre el homólogo a *gp37* (las *cbps*) y las quitinasas, no demostrada hasta el momento en baculovirus (Techkarnjanaruk & Goodman, 1999; Tsujibo *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1997).

Análisis filogenético de GP37 y homólogos

Es muy escaso el análisis filogenético que se describe en la bibliografía sobre esta familia de proteínas. El único realizado indica que los baculovirus y los entomopoxvirus (EPV) forman dos grupos claramente separados (Phanis *et al.*, 1999). El mismo se realizó con un escaso número de secuencias (7 secuencias de NPV y 5 de EPV), sin secuencias de GVs ni de bacterias. En la actualidad se dispone de mayor cantidad de datos que nos permiten hacer un análisis más exhaustivo de las relaciones de estos organismos, basándonos en este gen y sus homólogos. Las secuencias (CBPs) de bacterias provienen en su mayoría de organismos del grupo taxonómico de las Gammaproteobacterias.

El análisis filogenético llevado a cabo en este trabajo incluye un total de 32 secuencias provenientes de baculovirus (NPVs y GVs), EPV y bacterias (Fig. 3.10). Los NPVs se agruparon acorde a lo descrito en otros análisis filogenéticos en los cuales se diferencian dos linajes (NPV I y NPV II) (Herniou & Jehle, 2007). Los EPVs provenientes de lepidópteros (CbEPV, CfEPV, HaEPV y PsEPV) se separaron de los aislados de los coleópteros (AncuEPV y MmEPV). Contrario a lo esperado, los GVs no aparecen cercanos a los NPVs sino que se agrupan junto a los EPVs. Los GVs analizados se distribuyeron en dos grupos, por un lado XcGV, HearGV y PsunGV, cuyos hospedadores pertenecen a la Familia *Noctuidae* y por otro EpapGV, CpGV (hospedadores de la Familia *Tortricidae*) y PiraGV (de la Familia *Pieridae*).

Mediante el análisis filogenético se demuestra que el origen de este gen en los baculovirus sigue siendo incierto. La presencia de homólogos en entomopoxvirus y bacterias sugiere la posibilidad de eventos de transferencia horizontal de este gen entre estos grupos. Para el caso de los entomopoxvirus la suposición no es muy difícil de sostener ya que los EPV como los baculovirus poseen hospedadores

comunes. como *Choristoneura fumiferana* y *Heliothis armigera* (Dall *et al.*, 2001). En relación a la presencia de homólogos a *gp37* en bacterias, está bien documentada la evidencia de que numerosos grupos de estos microorganismos viven como endosimbiontes en diferentes tejidos de lepidópteros u otros grupos de insectos (Fukatsu *et al.*, 2000; Broderik *et al.*, 2004). No sería el primer caso de transferencia horizontal entre baculovirus y bacterias ya que otros trabajos sostienen que genes como la quitinasa fueron adquiridos partir de estas últimas (Wang *et al.*, 2004a).

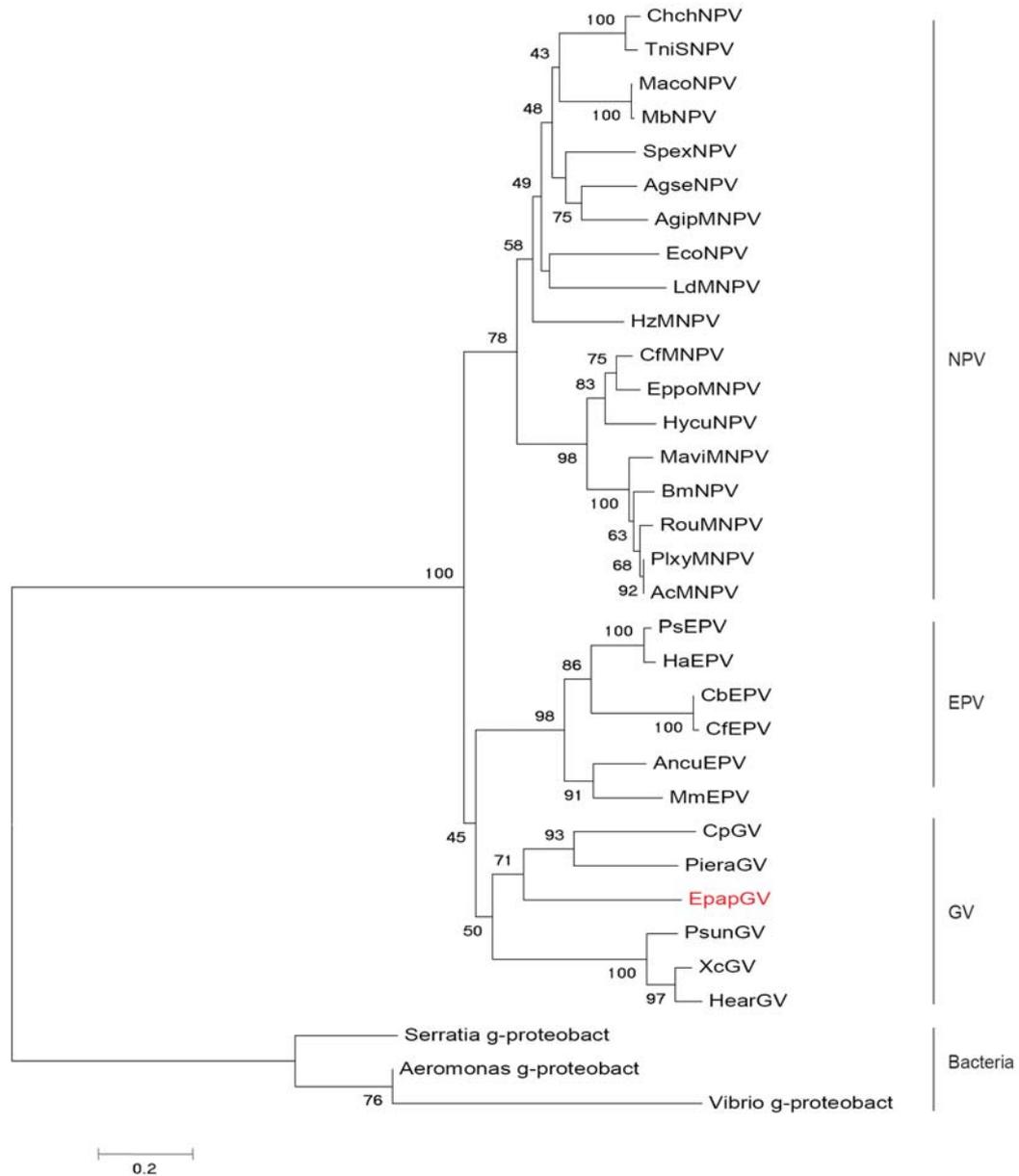


Fig.3.9. Análisis filogenético con 33 secuencias de organismos que poseen homólogos a *gp37*. A la derecha, el grupo en el cual se encuentra incluida cada secuencia

Expresión de GP37 en un sistema eucariota

Habiendo obtenido la secuencia completa del *gp37* de EpapGV, se diseñaron *primers* con sitios de restricción y se amplificó el ORF mediante PCR (Fig. 3.10). El producto fue purificado, clonado en un vector de transferencia y cotransfectado en células de insecto Sf9 con un báculo de AcMNPV (Je *et al.*, 2001). Verificada la presencia de poliedros en la monocapa transfectada (Fig.3.11.A) se traspasó el sobrenadante de las mismas a células HighFive para proceder a la amplificación del virus.

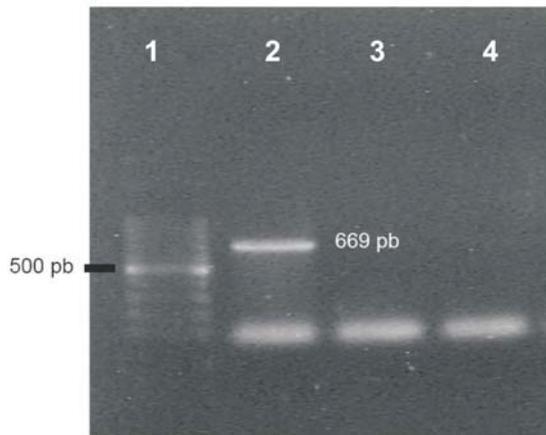


Fig. 3.10: PCR de amplificación de *gp37* de EpapGV. El producto posee un tamaño de aproximadamente de 700 nt. De izquierda a derecha: calle 1: peso molecular (100 pb); calle 2: DNA EpapGV; calle 3: DNA AgMNPV; calle4: control negativo.

Los extractos de células (HighFive) infectadas con el virus Acgp37EpapGV se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 3.11). La proteína expresada posee un peso acorde al calculado de manera teórica (aproximadamente 25 kDa). Como controles de la expresión se utilizaron otros recombinantes (AcGOZA) con ORFs no relacionados a *gp37* (baculovirus que expresan genes Z y GPC de virus Junín).

Con el objetivo de confirmar la identidad proteica de las bandas observadas por SDS-PAGE se procedió a la secuenciación de banda inferior. Los aminoácidos secuenciados desde el extremo aminoterminal confirmaron que la banda extraída se corresponde con la secuencia teórica de GP37 de EpapGV (datos no mostrados).

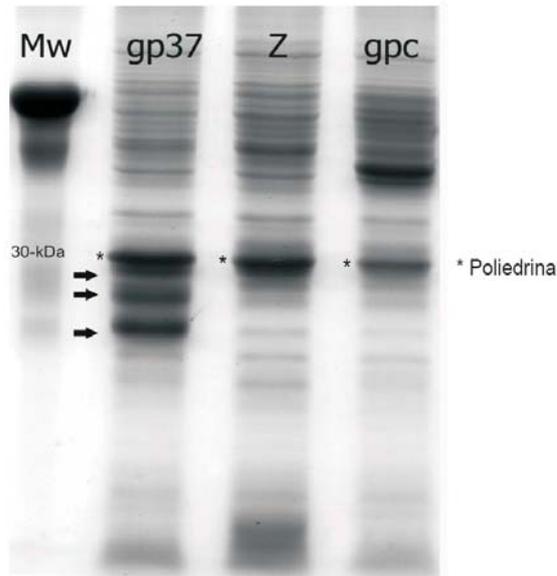


Fig. 3.11. SDS-PAGE con lisados de células infectadas con diferentes recombinantes de AcMNPV (AcGOZA). Flechas: bandas correspondientes a GP37. Asteriscos indican banda correspondiente a la poliedrina en cada una de las muestras.

Teniendo una alta expresión de GP37 se procedió a la obtención de anticuerpos en ratones. Una vez extraído el plasma, se evaluó los mismos mediante *Western Blot* sobre extractos proteicos de células infectadas con Acgp37EpapGV. Los resultados demostraron que los anticuerpos eran poco específicos, por lo cual se procedió a realizar un segundo intento de obtención. El segundo intento resultó poco satisfactorio y teniendo en cuenta el alto grado de similitud con las fusolinas descritas en EPV, se solicitaron anticuerpos anti-fusolina de AncuEPV que fueron gentilmente enviados por el Dr. Wataru Mitsuhashi (National Institute of Agrobiological Sciences, Japón). El uso de estos anticuerpos permitió comprobar no solamente la identidad de GP37 de EpapGV (Fig. 3.12.A) sino también la similitud que existe a nivel de secuencia entre las fusolinas de los EPV y GP37 de granulovirus.

Mediante el uso de tunicamicina en cultivos celulares infectados con Acgp37EpapGV y *Western blot*, se pudo determinar que las bandas adicionales observadas en el análisis mediante SDS-PAGE (Fig. 3.11.) correspondían a diferentes grados de glicosilación del polipéptido. El agregado del inhibidor determinó la desaparición de las bandas de tamaños aparentes mayores y la observación de una única banda que se correspondería a GP37 de EpapGV sin glicosilar (Fig. 3.12.B).

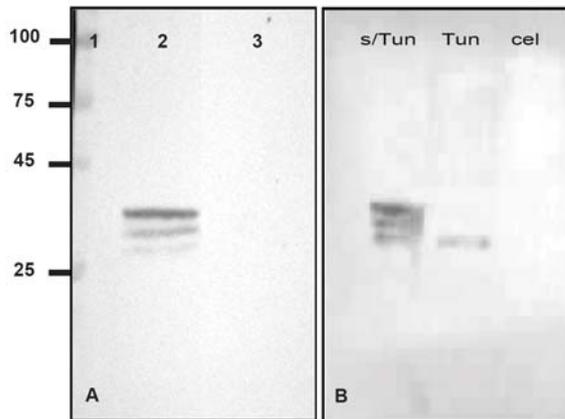


Fig. 3.12. A. Western Blot. Los tamaños del peso molecular figuran a la izquierda (en kDa). Calle 1: marcadores de peso molecular. Calle 2: células infectadas con Acgp37EpapGV. Calle 3: células infectadas con AcZ. **B.** Western Blot. S/Tun: células infectadas con Acgp37EpapGV sin tunicamicina. Tun: células infectadas con Acgp37EpapGV sin tunicamicina. Cel. control no infectadas células.

La expresión en células de insecto infectadas con el recombinante Acgp37EpapGV y su reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos contra fusolina confirmaron la identidad de GP37. La secuenciación del extremo amino de esta proteína y el tamaño del polipéptido expresado en presencia de tunicamicina coincidió con los datos predichos a partir de la secuencia nucleotídica y que, al menos, algunos de los sitios de glicosilación predichos son utilizados.

Determinación de la presencia de GP37 en OB de EpapGV

Se ha informado previamente que en algunos casos GP37 puede estar presente en el núcleo y ser incorporada en los cuerpos de oclusión (Vialard *et al.*, 1990) o formar cristales debido el establecimiento de puentes disulfuro (Gauthier *et al.*, 1995).

Los datos obtenidos en los ensayos sobre interacción entre AgMNPV y EpapGV presentados en el capítulo 2 sugieren la presencia de factores proteicos asociados a gránulos de EpapGV. En este contexto se podría especular que GP37 sería uno de estos factores. La aparición de inclusiones cristalinas constituidas por GP37 no es muy frecuente en infecciones producidas por NPVs (Gross *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2000; Liu & Carstens, 1996). En EPV, la fusolina cristaliza predominantemente en hospedadores del Orden Coleoptera (Gauthier *et al.*, 1995) y hasta el momento no existen estudios de ningún tipo de GP37 en GVs.

Los cristales de fusolina, cuando son administrados oralmente para evaluar su efecto sobre MP, parecen resistir a los jugos intestinales manteniendo su estructura (Mitsubishi *et al.*, 2007). Lo observado en nuestro trabajo con microscopía electrónica de barrido, mostró la presencia de cuerpos esferoidales 18 hs después a

la administración de mezclas conteniendo gránulos de EpapGV (Capítulo 2). Estos cuerpos no son OBs de EpapGV, ya que resultaron resistentes a la disolución en el medio alcalino del intestino medio de los lepidópteros.

La observación de gránulos de EpapGV expuestos durante diferentes períodos de tiempo a una solución alcalina de Na_2CO_3 mostró que en la mezcla de OBs existen partículas de 2 a 4 μm resistentes a la disolución (Fig. 3.14).

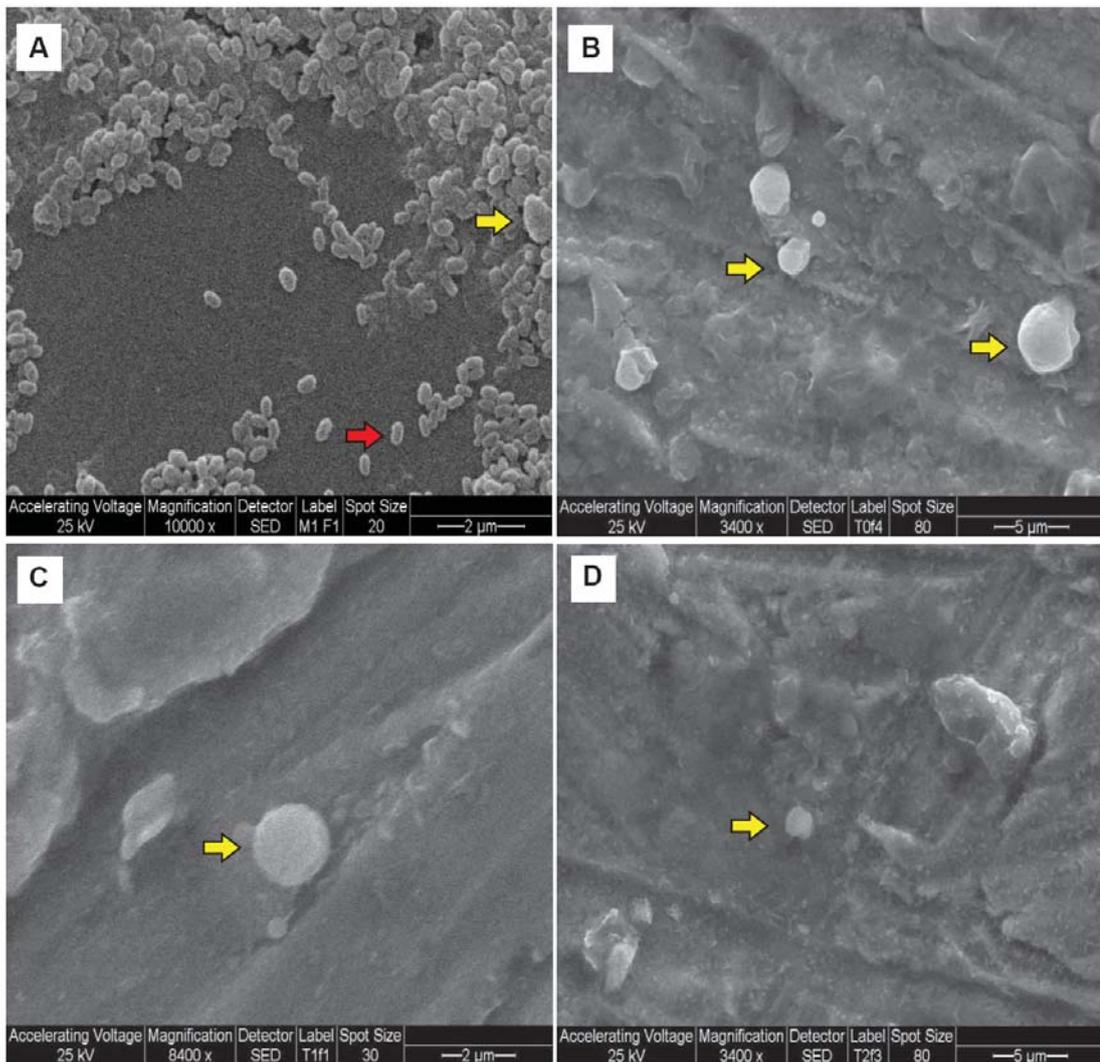


Fig. 3.14. Microscopía electrónica de barrido sobre suspensiones de gránulos de EpapGV disueltos por exposición durante distintos tiempos a una solución de Na_2CO_3 . Con flecha roja se indica el OB y con flecha amarilla cuerpos proteicos. A: OBs de EpapGV sin disolver. B: gránulos expuestos a solución de carbonato la cual fue neutralizada con ácido clorhídrico a los 10 min. C: gránulos en solución de carbonato durante 6 horas. D: gránulos en solución de carbonato durante 18 hs. (barra de referencia en micrómetros en el ángulo inferior izquierdo).

Como puede observarse, los OBs son inmediatamente disueltos ante el agregado de Na_2CO_3 (Fig. 3.14 B) y los cuerpos esferoidales de 2-4 μm siguen siendo visibles aún 18 hs posteriores al agregado de carbonato.

Con el fin de determinar si estos cuerpos podrían estar constituidos por GP37 se utilizaron los anticuerpos disponibles. La detección de GP37 en estos cuerpos mediante *Western blot* resultó negativa (datos no mostrados), quizás por una baja concentración de los mismos. El mismo ensayo se realizó sobre gránulos sin disolver y el resultado fue el mismo. Por tal motivo, no fue posible aún asociar los cristales observados por microscopía, con la proteína GP37. Se realizarán estos análisis con muestras de mayor tamaño.

Referencias

- Chen, C. J., Quentin, M. E., Brennan, L. A., Kukel, C. & Thiem, S. M. (1998). Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus hrf-1 expands the larval host range of Autographa californica nucleopolyhedrovirus. *J Virol* 72, 2526-2531.
- Cheng, X., Krell, P. & Arif, B. (2001). P34.8 (GP37) is not essential for baculovirus replication. *J Gen Virol* 82, 299-305.
- Dall D, Luque T, O'Reilly D. Insect-virus relationships: sifting by informatics. *Bioessays*. 2001 Feb;23(2):184-93.
- Dall, D., Sriskantha, A., Vera, A., Lai-Fook, J. & Symonds, T. (1993). A gene encoding a highly expressed spindle body protein of Heliothis armigera entomopoxvirus. *J Gen Virol* 74 (Pt 9), 1811-1818.
- De Jong, J. G., Lauzon, H. A., Dominy, C., Poloumienko, A., Carstens, E. B., Arif, B. M. & Krell, P. J. (2005). Analysis of the Choristoneura fumiferana nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 86, 929-943.
- Fukatsu, T., Nikoh, N., Kawai, R. & Koga, R. (2000). The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid Acyrthosiphon pisum (Insecta: homoptera). *Appl Environ Microbiol* 66, 2748-2758.
- Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J. C. & Bergoin, M. (1995). The Melolontha melolontha entomopoxvirus (MmEPV) fusolin is related to the fusolins of lepidopteran EPVs and to the 37K baculovirus glycoprotein. *Virology* 208, 427-436.
- Greene, G. L., Leppla, N. C. & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium *J Econ Entomol* 69, 487-488.
- Gross, C. H., Wolgamot, G. M., Russell, R. L., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1993). A 37-kilodalton glycoprotein from a baculovirus of Orgyia pseudotsugata is localized to
-

- cytoplasmic inclusion bodies. *J Virol* 67, 469-475.
- Herniou, E. A. & Jehle, J. A. (2007). Baculovirus phylogeny and evolution. *Curr Drug Targets* 8, 1043-1050.
- Inceoglu, A. Bora, S. George Kamita, and Bruce D. Hammock (2006). Genetically modified baculoviruses: A historical overview and future outlook. *Advances in Virus Research* Vol 68, 323-360
- Je, Y. H., Chang, J. H., Choi, J. Y., Roh, J. Y., Jin, B. R., O' Reilly, D. R. & Kang, S. K. (2001). A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for the generation of baculovirus expression vectors. *Biotechnol Lett* 23, 575-582.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai-Fook, J. & Dall, D. J. (2000). Spindle bodies of *Heliothis armigera* entomopoxvirus develop in structures associated with host cell endoplasmic reticulum. *J Invertebr Pathol* 75, 183-192.
- Lauzon, H. A., Jamieson, P. B., Krell, P. J. & Arif, B. M. (2005). Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 86, 945-961.
- Li, X., Barrett, J., Pang, A., Klose, R. J., Krell, P. J. & Arif, B. M. (2000). Characterization of an overexpressed spindle protein during a baculovirus infection. *Virology* 268, 56-67.
- Li, X., Barrett, J. W., Yuen, L. & Arif, B. M. (1997). Cloning, sequencing and transcriptional analysis of the *Choristoneura fumiferana* entomopoxvirus spheroidin gene. *Virus Res* 47, 143-154.
- Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y. & Pang, Y. (2003). Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* 96, 113-122.
- Liu, J. J. & Carstens, E. B. (1996). Identification, molecular cloning, and transcription
-

- analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus spindle-like protein gene. *Virology* 223, 396-400.
- Lu, S. Y., Qi, Y. P. & Ge, G. Q. (2002). Interaction of *Heliothis armigera* nuclear polyhedrosis viral capsid protein with its host actin. *J Biochem Mol Biol* 35, 562-567.
- Maeda, S. (1989a). Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 34, 351-372.
- Maeda, S. (1989b). Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 1177-1183.
- Mitsubishi, W., Furuta, Y. & Sato, M. (1998). The spindles of an entomopoxvirus of coleoptera (*Anomala cuprea*) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 71, 186-188.
- Mitsubishi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K. & Wada, S. (2007). Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *J Virol* 81, 4235-4243.
- Parola, A. D., Manzan, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002). Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* 25, 329-341.
- Phanis, C. G., Miller, D. P., Cassar, S. C., Tristem, M., Thiem, S. M. & O'Reilly, D. R. (1999). Identification and expression of two baculovirus gp37 genes. *J Gen Virol* 80 (Pt 7), 1823-1831.
- Takemoto, Y., Mitsubishi, W., Murakami, R., Konishi, H. & Miyamoto, K. (2008). The N-terminal region of an entomopoxvirus fusolin is essential for the enhancement of peroral infection, whereas the C-terminal region is eliminated in digestive juice. *J Virol* 82, 12406-12415.
- Techkarnjanaruk, S. & Goodman, A. E. (1999). Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas sp.* strain S91. *Microbiology* 145 (Pt
-

4), 925-934.

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Tsujibo, H., Orikoshi, H., Baba, N., Miyahara, M., Miyamoto, K., Yasuda, M. & Inamori, Y. (2002). Identification and characterization of the gene cluster involved in chitin degradation in a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* 68, 263-270.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. & Eijsink, V. G. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* 280, 28492-28497.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Vialard, J. E., Yuen, L. & Richardson, C. D. (1990). Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, an entomopoxvirus protein. *J Virol* 64, 5804-5811.
- Wang, H., Wu, D., Deng, F., Peng, H., Chen, X., Lauzon, H., Arif, B. M., Jehle, J. A. & Hu, Z. (2004a). Characterization and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* 100, 179-189.
- Wang, P., Li, G. & Granados, R. R. (2004b). Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 215-227.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. & Regue, M. (1997). Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia*
-

marcescens 2170. *J Bacteriol* 179, 7111-7117.

Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L. & Wood, H. A. (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8, 391-396.

Wijonarko, A. & Hukuhara, T. (1998). Detection of a virus enhancing factor in the spheroid, spindle, and virion of an entomopoxvirus. *J Invertebr Pathol* 72, 82-86.

Zuidema, D., Klinge-Roode, E. C., van Lent, J. W. & Vlak, J. M. (1989). Construction and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutant lacking the polyhedral envelope. *Virology* 173, 98-108.

Capítulo 4

Caracterización de la quitinasa de EpapGV

Índice temático

Introducción	91
Materiales y métodos	93
Resultados y discusión	98
Análisis de la secuencia	98
Expresión y análisis de CHIA de EpapGV	100
Evaluación de la actividad de CHIA	102
Organización genómica de las regiones flanqueantes de chiA de EpapGV y análisis filogenético	105
Referencias	109

Introducción

La quitina es un polímero lineal constituido por monómeros de (1,4)-N acetilglucosamina (GlcNAc). Es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, animales como anélidos y cnidarios y también está presente en el resistente exoesqueleto de los artrópodos (incluidos arácnidos, crustáceos e insectos). En estos últimos cumple funciones estructurales y se la encuentra constituyendo la cutícula adyacente a la epidermis y la tráquea. También, como se mencionó en el capítulo anterior, es un componente principal de la membrana peritrófica (MP) intestinal. Evolutivamente, una gran diversidad de organismos desarrolló la capacidad de metabolizar la quitina mediante catalizadores biológicos con diferentes propósitos. El conjunto de enzimas que participan en las rutas degradativas de la quitina son denominadas quitinasas. Las mismas se aislaron de los artrópodos, virus, bacterias, hongos, plantas, nematodos y varios vertebrados (Fukamizo, 2000).

En los insectos, las quitinasas desempeñan un papel importante en el metabolismo de la quitina, que es fundamental para el crecimiento de los insectos y la morfogénesis (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Las cutículas de los insectos forman un exoesqueleto que exhibe sólo una capacidad limitada para mantener el ritmo de crecimiento del cuerpo, porque es una estructura rígida debido a la presencia de quitina y de proteínas esclerotizadas. Para permitir el crecimiento y el desarrollo, los insectos se ven periódicamente obligados a reemplazar su vieja cutícula con una nueva y más flexible durante una muda (ecdisis). El fluido sintetizado durante este proceso contiene proteasas y quitinasas, que digieren y reciclan los principales componentes de la cutícula al mudar (Merzendorfer & Zimoch, 2003; Reynolds, 1996).

Las quitinasas se clasifican en dos diferentes familias, 18 y 19 de las glicósido-hidrolasas, sobre la base de su similitud aminoacídica y sus dominios catalíticos (Davies & Henrissat, 1995; Henrissat & Romeu, 1995). La Familia 18 incluye a las quitinasas de bacterias, hongos, virus, animales y las de algunas plantas (Clases III y V); en la familia 19 se incluyen a las de las plantas (clases I, II y IV). Las

quitinasas de ambas familias no comparten similitud a nivel aminoacídico y las estructuras tridimensionales son diferentes por lo que se supone que evolutivamente tienen orígenes distintos (Henrissat, 1991)

Funcionalmente, las quitinasas se pueden clasificar como endo y exoquitinasas. Las endoquitinasas clivan la quitina al azar en sitios internos, liberando oligómeros solubles de GlcNAc (Sahai, 1993). Las exoquitinasas catalizan la liberación de dímeros de GlcNAc (N, N-diacetilquitobiosas) desde los extremos de las microfibrillas de la quitina para posteriormente generar monómeros de GlcNAc (Harman, 1993; Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Las quitinasas maduras se caracterizan a nivel proteico por poseer un dominio de unión a quitina, un dominio catalítico y una región bisagra que une ambos (Shinshi *et al.*, 1990).

La familia 18 incluye a quitinasas presentes en bacterias, diversos eucariotas y virus, incluyendo a las codificadas por los baculovirus (Hawtin *et al.*, 1995; Henrissat, 1999).

Hasta el presente, se han encontrado genes de quitinasa en la mayoría de los genomas baculovirales (Tabla 4.1). En AcMNPV, el gen que codifica para la síntesis de CHIA es expresado en la etapa tardía de la replicación del virus y posee actividad tanto endo como exoquitinasa (Hawtin *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2004). Sin embargo, dentro de los baculovirus existen variaciones y así, por ejemplo, la CHIA de *Epiphyas postvittana nucleopoliedrovirus* (EppoNPV) es una exoquitinasa con una baja actividad endoquitinasa (Young *et al.*, 2005).

La función principal de las quitinasas encontradas en los baculovirus es intervenir en la licuefacción de los cadáveres de larvas infectadas (Fig. 4.1). La degradación de la cutícula de los insectos facilita la dispersión de los cuerpos de oclusión (OB) virales en el medio ambiente. Un gen denominado *catepsina* (*V-Cath*), hallado en el genoma de los baculovirus contribuye también al proceso de licuefacción de las larvas infectadas (Ohkawa *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 1992; Slack *et al.*, 1995).

El producto del gen *V-cath* cumple la función de degradar las proteínas cuticulares y facilitar el acceso de CHIA a la quitina (Hawtin *et al.*, 1997). En la infección de células con virus en los cuales *chiA* fue deletado, se inhibe la síntesis de los precursores de la catepsina viral por lo que se postula que CHIA también puede servir de chaperona molecular para el plegado de V-CATH en el retículo endoplasmático (Hom & Volkman, 2000).



Fig. 4.1. Larvas infectadas por NPV en un estado temprano de infección (coloración blanquecina por la acumulación de OBs) y muertas. La ruptura del tegumento se debe a la licuefacción por acción de genes como *quitinasa* y *catepsina*.

La quitinasa de AcMNPV expresada en *Escherichia coli* fue capaz de perforar la MP de larvas de *Bombyx mori*, provocando un 100% de mortalidad cuando las mismas fueron alimentadas con la enzima en una concentración de 1 mg/g de peso corporal de las larvas. También se observó una reducción del crecimiento de las larvas cuando se alimentaron con dosis subletales de quitinasa (0,56 mg/g de lípidos) (Rao *et al.*, 2004). Estas observaciones demuestran el potencial que posee la quitinasa como herramienta en el control biológico. Hasta el momento, no existen estudios que demuestren la actividad de CHIA baculoviral *in vivo* en las primeras etapas del ciclo infeccioso, por tal motivo se iniciaron estudios tendientes a caracterizar la quitinasa presente en el genoma de EpapGV y determinar si puede tener un rol relevante en las primeras etapas de la infección viral.

Materiales y métodos

Insectos. Las larvas de *Epinotia aporema* fueron empleadas para la multiplicación de virus y bioensayos, fueron provistas por el insectario del IMYZA-INTA, Castelar. La cría de los insectos se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± 1 °C), humedad relativa (50-70%) y fotoperíodo (14:10 L/O) y fueron mantenidos en dieta artificial (Greene *et al.*, 1976)

Células de insectos. Células de *Trichoplusia ni* (HighFive) (Wickham *et al.*, 1992) y *Spodoptera frugiperda* SF9 (Vaughn *et al.*, 1977) fueron mantenidas en medio TC100 y suplementadas con 10% de suero fetal Bovino (BIOSER).

Virus. EpapGV fue multiplicado en larvas de cuarto estadio de *E. aporema*. La propagación se realizó por contaminación superficial de la dieta (sin formaldehído) con cuerpos de inclusión (1×10^3 OBs/mm²). Las larvas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± 1 °C) y humedad (50%) hasta el momento de recolección del material infectado.

Extracción de DNA de EpapGV. Las larvas recolectadas fueron maceradas en baño hielo agua. Esta mezcla se filtró a través de una gasa colocada en un tubo *ependorf* de 0,5 ml perforado en su base. El filtrado fue tratado con Na₂CO₃ a concentración final de 0,1 M durante 30 min, se neutralizó la solución mediante agregado de Tris-HCl (pH 6,2). Las muestras fueron hervidas por 5 min y se utilizó 1 µl de esta solución para la reacción de PCR.

Extracción de cuerpos de oclusión a partir de larvas infectadas con EpapGV. Las larvas infectadas fueron recolectadas y maceradas con la ayuda de un mortero, se agregó agua para ayudar a la homogeneización, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente una semana. Posteriormente, se filtró la mezcla a través de gasa, se midió el volumen y se agregó SDS a concentración final de 0,1%. Se centrifugó 2 min a 2000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) para eliminar todos los restos celulares. Los OBs se purificaron por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa (35-60% p/p) a 20000 rpm en rotor Beckman SW 28 y posteriormente se extrajo la fracción correspondiente a los gránulos. La misma se diluyó 1:3 en

agua destilada, se centrifugó 30 min a 10000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) y se resuspendió en agua para eliminar los restos de sacarosa. El *pellet* final fue resuspendido en agua.

Secuenciación y amplificación de *chiA* de EpapGV. Al momento de iniciar este trabajo, solo se conocía la secuencia parcial de *chiA* de EpapGV (Parola *et al.*, 2002). Por este motivo, en base a la secuencia disponible se diseñó un *primer* (dato no mostrado) que permitió obtener la secuencia completa de este ORF. Posteriormente, se diseñaron *primers* con sitios de restricción (señalados entre paréntesis): *chiA*-EpapGV (KpnI) 5'-TGGTACCGTATGAAACTAGCAATTGTGTC-3' y *chiA*-EpapGV (XhoI) 5'-CGACGCGTCGTATGAAACTAGCAATTG-3', que permitieron la amplificación completa del ORF para su posterior clonado.

Análisis bioinformático y filogenético. La secuencia teórica aminoacídica de CHIA de EpapGV fue utilizada para la búsqueda de patrones y motivos característicos en InterProscan. También se comparó con secuencias obtenidas por BLASTP en el EMBL/GenBank. Las mismas se alinearon mediante el uso del programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) con los siguientes parámetros: *pairwise alignments; slow, gap opening 10, gap extension 0±1, matrix BLOSUM, 30; multiple alignments; gap opening 10, gap extension 0±05*. En el alineamiento final se utilizó la secuencia completa de cada una de las proteínas utilizadas. El análisis filogenético se realizó con el método del vecino más cercano (*Neighbor-joining*, NJ) usando el conjunto de programas de MEGA 3.1 (D. L. Swofford). Los valores de *bootstrap* en NJ se obtuvieron después de 500 repeticiones.

Orden y presencia de genes *chiA-gp37* en genomas baculovirales. En el EMBL/GenBank se realizó la búsqueda de genomas completos baculovirales para el análisis de la presencia/ausencia de *gp37* y *chiA*, así también como la posición relativa que ocupan en los mismos. Debido a la existencia de homólogos a estos dos genes (*cbps-chiA*) en bacterias, también se analizó la disposición de estos genes en los genomas bacterianos disponibles.

Expresión de *chiA* en un sistema eucariota. El producto correspondiente a *chiA* de EpapGV obtenido por amplificación, fue clonado inicialmente en el vector pGEM-T (Promega) y luego digerido con las enzimas KpnI y XhoI (Promega) para su

clonado en el vector pBacPack 8 (Invitrogen) digerido con el mismo par de enzimas (Fig. 4.2) .

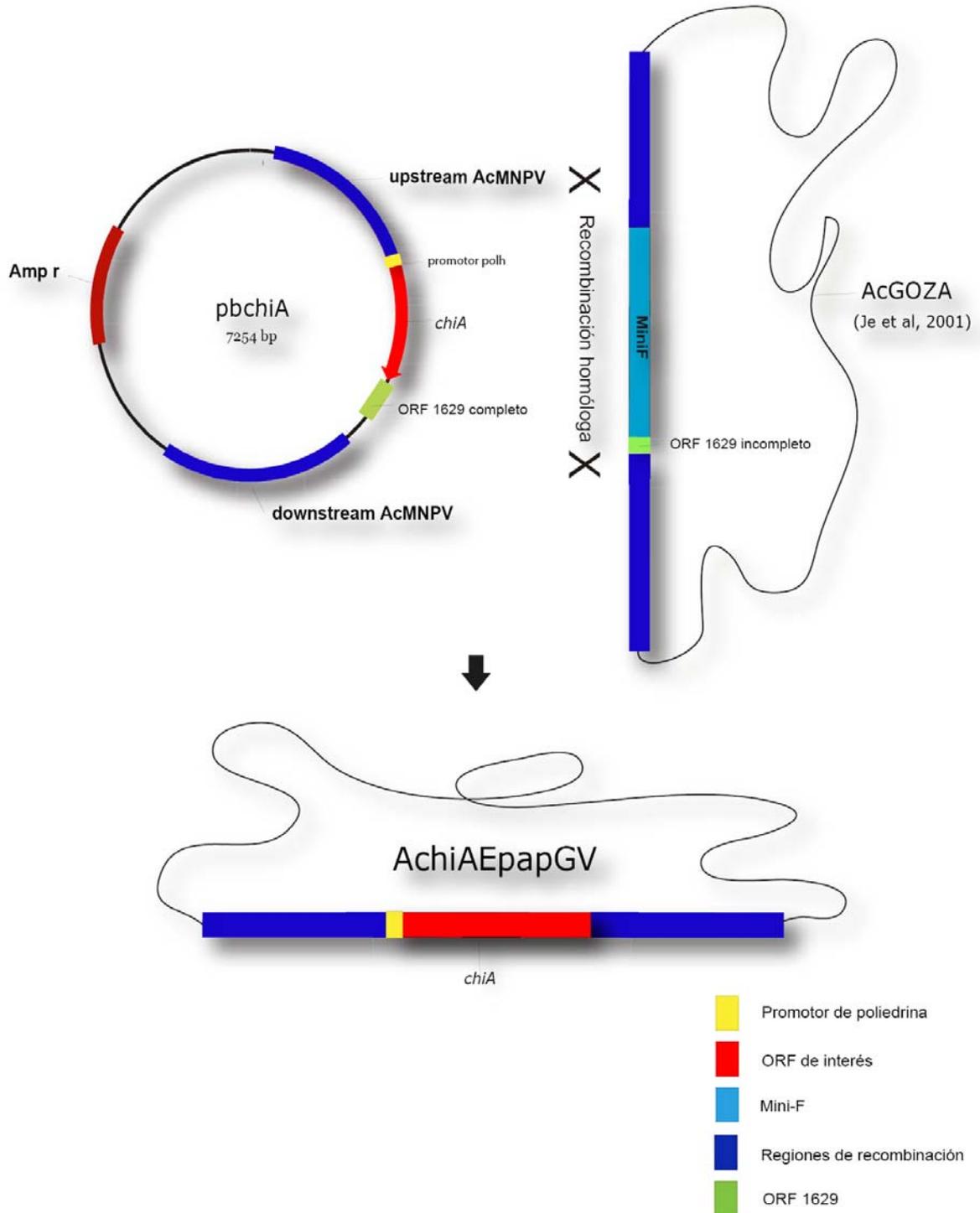


Fig. 4.2. Metodología utilizada para la obtención del recombinante AchiAEpapGV. Cotransfección en células de insectos del plásmido de transferencia (*pbchiA*) con DNA del bácmido de AcMNPV (AcGOZA)

Una vez ligados el inserto y el vector, se transformaron células *DH5a* electrocompetentes. Las colonias se seleccionaron mediante la utilización de ampicilina, luego fueron examinadas por *colony* PCR usando los *primers* que amplificaron inicialmente el ORF y mediante los *primers* bac1 (5'-AACCATCTCGCAAATAAATA-3') y bac2 (5'-TTGCGTGTCTTAGATCGGAA-3') cuyos sitios complementarios en el vector corresponden a regiones externas y flanqueantes a la de la inserción del ORF. El plásmido obtenido (denominado pbchiA) fue purificado y utilizado para cotransfectar junto a DNA del bácmido AcGOZA (sistema descrito en el capítulo anterior), células SF-9 sembradas en placas de 35 mm (0.5×10^6 células). El reactivo de transfección Cellfectin (Invitrogen) fue utilizado siguiendo las especificaciones y recomendaciones del fabricante. Las células fueron mantenidas a 27°C por 4 horas con la mezcla lípidos-DNA y luego la misma fue reemplazada con medio TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino. La incubación a 27 °C se extendió hasta el momento de observar la presencia de células con poliedros. El sobrenadante conteniendo BVs del recombinante AchiAEpapGV, se utilizó para reinfectar células Sf9. Posteriormente, se realizó el segundo pasaje sobre células de *Trichoplusia ni* (HighFive).

Análisis mediante SDS-PAGE y Western Blot. Las células infectadas con el recombinante AchiAEpapGV fueron levantadas 72 hs post-infección, lavadas dos veces con *buffer* PBS, centrifugadas y resuspendidas en SDS-PAGE *sample buffer*. Posteriormente, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), usando el equipo Mini-protean II (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-Psq; Millipore, Bedford, MA) usando un aparato Semidry Transblot (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 15 V por 30 min. Posteriormente, las membranas se incubaron en una solución de bloqueo (PBS conteniendo 5% de leche descremada) por 1 h a temperatura ambiente. Luego, las mismas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:1.000 del anticuerpo anti-CHIA y se lavó tres veces con PBS que contenía 0,05% de *Tween* 20 (Daimon *et al.*, 2005). A continuación, la membrana fue incubada 1 h con una dilución 1:5.000 de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a HRP (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se lavó en PBS + 0,05% de *Tween* 20 y se reveló con DAB (Sigma)

y H₂O₂. Como controles se utilizaron células HighFive sin infectar y células infectadas con un recombinante de AcGOZA generado para expresar proteínas del virus Junín (Z y GPC) no relacionadas con los baculovirus.

Detección de CHIA en cuerpos de oclusión. Soluciones de 20 µl conteniendo 2x10⁵ OB/ml de los virus AchiAEpapGV y wt AcMNPV fueron mezcladas de manera independiente con SDS-PAGE *sample buffer* y sus proteínas separadas mediante SDS-PAGE. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante *Western Blot* (siguiendo el protocolo descrito anteriormente). Como control positivo se utilizaron extractos de células HighFive infectadas con el virus AcchiAEpapGV.

Ensayos de actividad enzimática con quitina marcada. Se evaluó el uso del sustrato cromogénico *chitin-azure* (Sigma) y la quitinasa comercial de *Streptomyces griseus* (SIGMA) en el medio de cultivo celular (TC-100) suplementado con suero fetal bovino. La actividad de la enzima se evidencia por la liberación del cromógeno que es cuantificado en espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. Sobrenadantes de células de *Trichoplusia ni* (2 x10⁶) fueron recolectados (500 µl) y mezclados 0,5 mg de quitina-azul (SIGMA) y la quitinasa de *Streptomyces griseus*. Como control negativo solo se utilizo SN y quitina marcada. Las mezclas se incubaron a 27 °C durante 96 h y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm para precipitar la quitina marcada. Los sobrenadantes fueron utilizados para la medición de la absorbancia a 560 nm en espectrofotómetro. Una unidad de enzima es la cantidad de enzima que produce un aumento de 0,01 en la absorbancia.

Actividad enzimática de CHIA a diferentes temperaturas. Se infectaron células de *Trichoplusia ni* (2 x10⁶) con el virus recombinante AchiAEpapGV (10 m.o.i.), utilizándose el virus salvaje AcMNPV (10 m.o.i.) como control negativo. Al observarse un elevado porcentaje de células infectadas y lisadas (cerca del 80%) los sobrenadantes fueron recolectados. Luego de una centrifugación de 5 min a 10000 rpm para precipitar restos celulares, un mililitro del SN fue mezclado con 1 ml de sodio 0,2 M (pH 6.5) y 5 mg de quitina-azul (SIGMA) .La mezcla se incubó a diferentes temperaturas (17, 27, 37 y 47 °C) durante 5 días y luego se centrifugaron a 14000 rpm. Los sobrenadantes fueron utilizados para la medición de la absorbancia a 560 nm en espectrofotómetro, considerando que una unidad de enzima es la cantidad de enzima que produce un aumento de 0,01 en la

absorbancia. Como control positivo se usó quitinasa comercial de *Streptomyces griseus* (SIGMA).

Evaluación de la actividad enzimática de CHIA a diferentes pH. Células de *Trichoplusia ni* (2×10^6) fueron infectadas con el virus recombinante AchiAEpapGV (10 m.o.i.), utilizándose el virus salvaje AcMNPV (10 m.o.i.) como control negativo. Al observarse un elevado porcentaje de células infectadas y lisadas (cerca del 80%) los sobrenadantes fueron recolectados. Luego de una centrifugación de 5 min a 10000 rpm para precipitar restos celulares, 500 μ l de la muestra fueron mezclados con 500 μ l de medio TC100 a diferentes pH (desde pH 3 a pH 11) y 5 mg de quitina-azul (SIGMA). Las mezclas se incubaron a 27 °C durante 5 días y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm. Los sobrenadantes fueron utilizados para la medición de la absorbancia a 560 nm, en espectrofotómetro. Se considera que la actividad de una unidad de enzima produce un aumento de 0,01 en la absorbancia.

Resultados y discusión

Análisis de la secuencia

El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida a partir del genoma de EpapGV determinó que el ORF posee una longitud de 1.713 pares de bases y que se encuentra bajo regulación de un promotor tardío. En base a la secuencia obtenida se diseñaron *primers* específicos que permitieron amplificar el ORF utilizando como molde tanto el DNA de EpapGV como diferentes clones conteniendo fragmentos genómicos que incluyen a *chiA* (Fig. 4.3). La comparación con otras secuencias obtenidas del GenBank mediante el algoritmo Blastp, identificó a las quitinasas (*chiA*) de *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) y de *Agrotis segetum granulovirus* (AgseGV) como las secuencias con mayor porcentaje de identidad aminoacídica (61%). Entre otros genes con alta homología, podemos hallar secuencias de CHIA de numerosos *Granulovirus*, *Nucleopolyhedrovirus* y de bacterias, como *Serratia marcescens*.

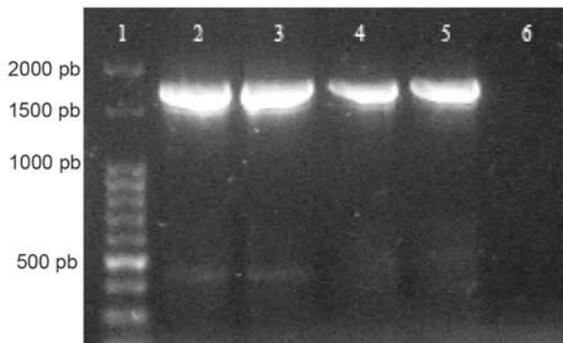


Fig. 4.3. La amplificación del ORF con los *primers* diseñados a partir de genoma viral y de diferentes clones conteniendo el fragmento con *chiA*. Calle 1: marcador de peso molecular, calle 2: DNA EpapGV, calle 3: Clon J (genoteca HindIII EpapGV), Calle 4: Clon B (genoteca BgIII EpapGV), calle 5: Clon E (genoteca BamHI EpapGV), calle 6: control negativo.

La traducción teórica de la secuencia nucleotídica obtenida indica que codifica para una proteína de 568 aminoácidos cuyo peso molecular fue estimado en 63 kDa. Del primer análisis de la secuencia aminoacídica se deduce que no posee el motivo KDEL de retención en retículo endoplásmico, tal como fue descrito anteriormente para la secuencia aminoacídica de CHIA de CpGV (Daimon *et al.*, 2007). Según la base de datos utilizada (InterProScan) la enzima se clasifica como una O-

glicosilhidrolasa. La misma se incluye en un amplio grupo de enzimas que son capaces de hidrolizar enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y otro tipo de compuestos. El sistema de clasificación de las glicosilhidrolasas está basado sobre la similitud de secuencia y ha dado lugar a la definición de 85 familias (Henrissat & Romeu, 1995).

El dominio catalítico hallado en CHIA (ubicado entre los aa 115 y 522) se clasifica como integrante de la familia 18. Dentro de este dominio, el sitio activo para CHIA de EpapGV está ubicado entre los aminoácidos 301-309 (FDGVDIDWE). Cercano al extremo aminoterminal (ubicado entre el aa 14 al 150) se halló un dominio denominado N-terminal, este se encuentra en una serie de quitinasas bacterianas y virales (Fig.4.4 y 4.5). Su función no es conocida, pero se supone que pueden intervenir en la interacción con el sustrato de la enzima, la quitina. El mismo está separado por una región bisagra del dominio catalítico; esta región es probablemente móvil, permitiendo al dominio N-terminal tener diferentes posiciones relativas en solución (Perrakis *et al.*, 1994). La existencia característica del péptido señal se encontró entre las posiciones aminoacídicas 1 y 15 (Fig.4.4)

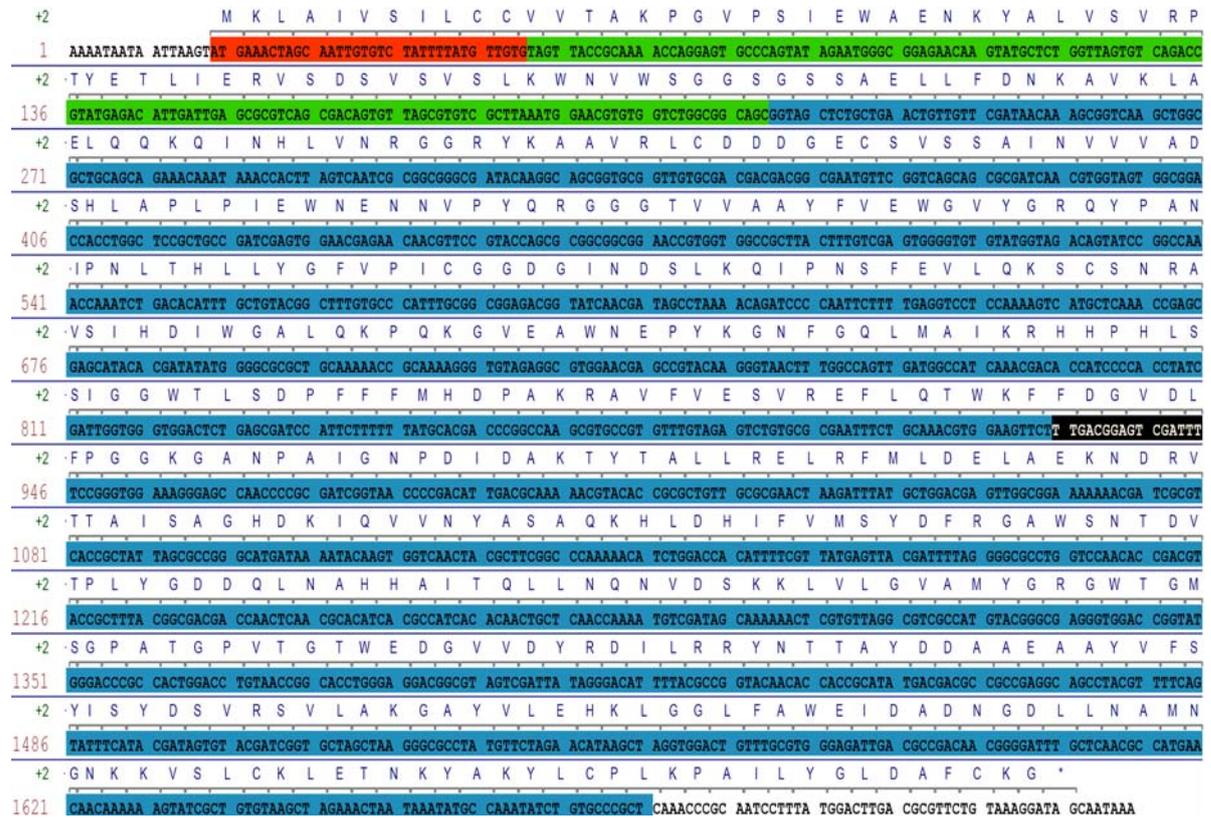


Fig: 4.4. Representación esquemática de la quitinasa de los baculovirus. A: péptido señal, B: dominio N-terminal, C: dominio catalítico que incluye el sitio activo (1). Entre el dominio B y el C se encuentra la denominada región bisagra.

La secuencia nucleotídica de *chiA* de EpapGV estudiada y analizada en este capítulo presenta un promotor tardío acorde a su participación en los estadios finales del proceso infeccioso (Hawtin *et al.*, 1995). Este gen codifica para la síntesis de una enzima (CHIA) cuyo análisis determinó que posee las regiones y dominios característicos de la familia 18 de las glicosido-hidrolasas. Entre estos se puede mencionar al péptido señal, el dominio de unión a quitina y el sitio catalítico (Henrissat, 1999).

La pérdida del motivo proteico KDEL de retención en retículo endoplásmico, es una particularidad que comparte con la CHIA de CpGV (Daimon *et al.*, 2007). La

utilización de anticuerpos anti-CHIA permitió por un lado, confirmar la identidad proteica de la CHIA de EpapGV clonada y expresada en un sistema eucariota, y por otro, confirmó su presencia en el sobrenadante celular acorde con la pérdida del motivo KDEL.



■ Péptido señal ■ Dominio N-Terminal ■ Dominio catalítico ■ Sitio activo

Fig. 4.5. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *chiA* de EpapGV. Los distintos sitios y dominios relevantes se encuentran subrayados.

Expresión y análisis de CHIA de EpapGV

El recombinante obtenido de AcMNPV conteniendo el ORF *chiA* de EpapGV (AchiA_{EpapGV}), se utilizó para infectar células HighFive y las proteínas obtenidas de las mismas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con *Coomassie brilliant blue*. En comparación con los controles utilizados se observó la presencia de una

banda de aproximadamente 63 kDa acorde con el peso molecular esperado para CHIA de EpapGV (Fig. 4.6 A)

Con el objetivo de revelar la identidad de la proteína expresada en células de insecto infectadas con el recombinante AchiAEpapGV, se utilizaron anticuerpos anti-CHIA (gentilmente enviados por la Dra. Hualin Wang, Wuhan Institute of Virology, China).

Mediante la técnica de *Western Blot* se pudo confirmar la presencia de CHIA de EpapGV en el extracto proteico celular (Fig. 4.6 B 1-2). Dada la característica en la secuencia aminoacídica de no poseer el motivo de retención en retículo (KDEL), se evaluó la presencia de CHIA en el sobrenadante (SN) de células infectadas con el recombinante AchiAEpapGV. Los resultados mostraron que CHIA es detectada en el SN en etapas previas a la lisis celular, estando esto en concordancia con los motivos descritos en la secuencia proteica (Fig.4.6 B 3-4).

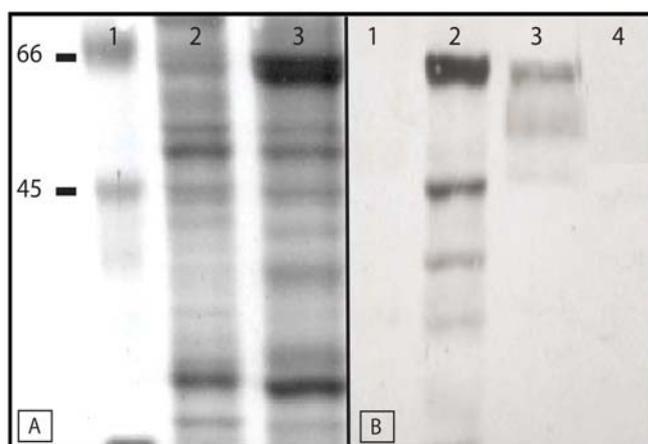


Fig. 4.6. A: SDS-PAGE de extractos celulares teñidos con *Coomassie blue*. 1: peso molecular (los números la izquierda corresponden a kDa). 2: Control, células infectadas con AcMNPV (virus salvaje). 3. Células infectadas con AchiAEpapGV. **B. Western Blot.** 1. Células infectadas con AcMNPV (virus salvaje). 2. Células infectadas con AchiAEpapGV. 3. Sobrenadante de células infectadas con AchiAEpapGV. 4. Sobrenadante de células infectadas con AcMNPV.

En los antecedentes mencionados previamente, se describió la presencia de CHIA en cuerpos de oclusión procedentes de cultivos infectados con baculovirus (Hawtin *et al.*, 1995). Mediante *Western Blot* se pudo verificar la presencia de CHIA en los OBs procedentes de células infectadas con AchiAEpapGV, posiblemente como contaminante o formando parte de los OBs (Fig. 4. 7).

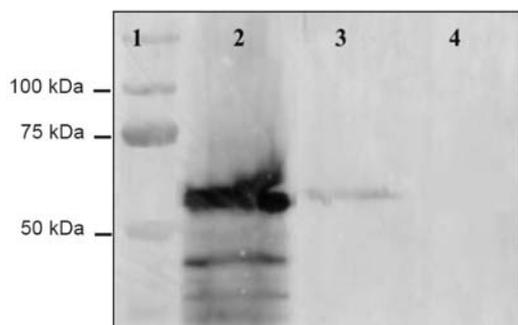


Fig. 4.7. Detección de CHIA en preparaciones de OBs extraídos de células infectadas con AchiAEpapGV. Calle 1: marcador de peso molecular. 2: Control positivo (extracto de células infectadas con AchiAEpapGV). Calle 3: OBs de AchiAEpapGV. Calle 4: OBs de *wtAcMNPV* (virus salvaje)

La ausencia de CHIA en OBs de *wtAcMNPV* observada en este trabajo posiblemente se deba a la baja concentración de cuerpos de oclusión utilizada (10^5 OB/ml) ya que en estudios realizados por otros autores, en los cuales se utilizaron concentraciones mayores (10^8 OBs/ml), CHIA pudo ser detectada en cuerpos de oclusión de este virus (Hawtin *et al.*, 1997). En relación a esto los mismos sostienen que es posible que CHIA no participe en las etapas iniciales de la infección cuando es administrado *per os* en larvas de insectos y que la falta de actividad de CHIA detectada en los poliedros, por ejemplo contra la membrana peritrófica, podría ser resultado de la baja concentración de la proteína en el OB (Hawtin *et al.*, 1997)

Hasta el momento solo existen estudios *in vitro* que demuestran que la MP es dañada cuando es expuesta a dosis iguales o superiores de 7 $\mu\text{g/ml}$ de CHIA (Rao *et al.*, 2004), pero no existen estudios *in vivo*. En el próximo capítulo se describirá el efecto de OBs de AchiAEpapGV sobre la MP de *A. gemmatalis*.

Evaluación de la actividad de CHIA

Se realizaron estudios complementarios con el fin de caracterizar la actividad de CHIA de EpapGV bajo diferentes condiciones. En primera instancia se evaluó el sistema a utilizar, mediante el uso de una quitinasa obtenida de la bacteria *Streptomyces griseus* (Sigma) y quitina marcada (*Chitin Azure*, SIGMA), ambas disueltas en medio TC100 completo. El resultado obtenido mostró que el medio en el cual sería disuelta la quitina marcada, era adecuado para evaluar la actividad catalítica de la quitinasa (Fig. 4.8).



Fig. 4. 8. Izquierda: quitina marcada incubada con quitinasa de *Streptomyces aureus* en medio TC100 completo. Derecha: quitina marcada y TC100 completo.

Posteriormente, se utilizaron sobrenadantes de cultivos celulares infectadas con AchiAepapGV para evaluar la actividad de la quitinasa a diferentes temperaturas y valores pH. Según los resultados obtenidos, existe una mayor actividad enzimática a temperaturas comprendidas entre los 27°C y 37°C (Fig. 4. 9). Los sobrenadantes de las células infectadas con el virus salvaje de AcMNPV muestran actividad quitinolítica debido posiblemente a la propia quitinasa del virus.

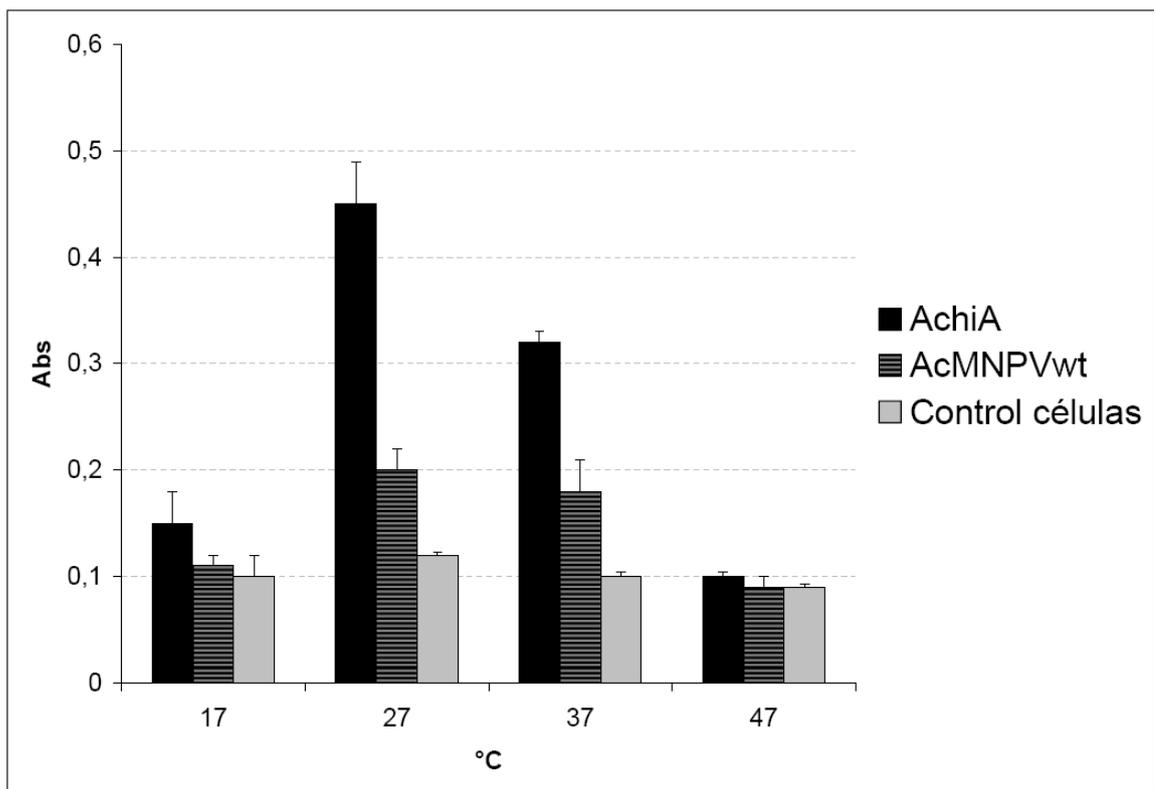


Fig. 4.9. Medición de la actividad quitinolítica de sobrenadantes procedentes de células infectadas con virus salvaje de AcMNPV, con virus AchiAepapGV y medio TC100 tomado de células sin infectar.

Los datos obtenidos muestran que la enzima es capaz de mantener su actividad quitinolítica a un amplio rango de pH, siendo máxima entre 6 y 7 (Fig. 4.10). Sobrenadantes procedentes de células infectadas con el virus AcMNPV salvaje demostraron tener una actividad enzimática menor a la detectada en SN de células infectadas con el virus recombinante.

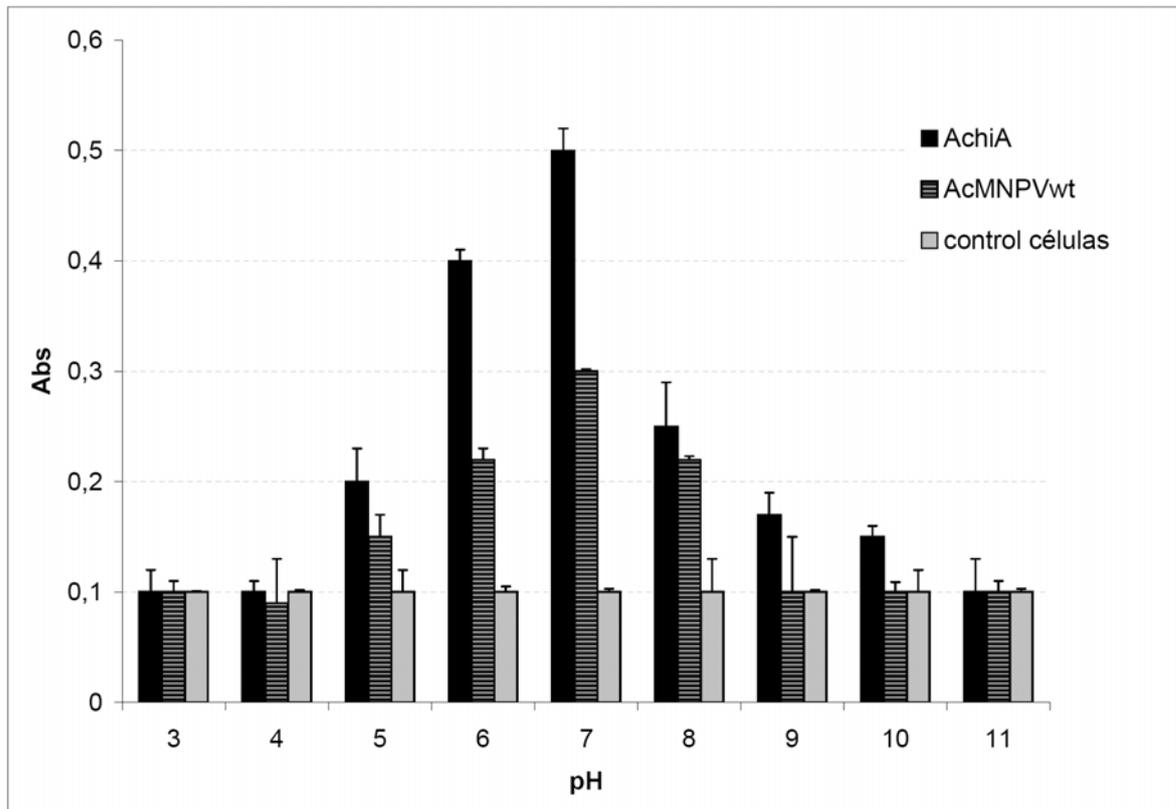


Fig. 4.10. Medición de la actividad quitinolítica de sobrenadantes de células infectadas con virus salvaje de AcMNPV, con virus AcchiAepapGV y medio TC100 tomado de células sin infectar.

La presencia de quitinasas en una amplia diversidad de organismos hace que este tipo de enzimas posean actividad catalítica en condiciones muy diversas (Sahai, 1993). Por este motivo, se realizaron experimentos con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de acción de la CHIA de EpapGV. Los resultados indican que la actividad se mantiene entre los 20°C y los 37°C aproximadamente. En este aspecto, en baculovirus no existen análisis de la actividad de esta enzima a diferentes temperaturas. Mientras tanto la actividad enzimática de CHIA a diferentes pHs está bien estudiada. En general, esta enzima puede hidrolizar la quitina en un rango de pH comprendido entre 4 y 11 (Daimon *et al.*, 2007; Hawtin *et al.*, 1997;

Young *et al.*, 2005); y los datos obtenidos en este estudio se ubican dentro de esos valores.

La detección de CHIA asociada al OB mostrada previamente, sumado a la actividad que posee la enzima a pH alcalino nos permite suponer la existencia de que CHIA ataque la matriz quitinosa de la MP durante las primeras etapas de la infección *per os*. En base a este supuesto se realizaran ensayos que nos permitan determinar si existe un efecto de CHIA sobre la MP del hospedador.

Organización genómica de las regiones flanqueantes de *chiA* de EpapGV y análisis filogenético

El orden de los genes en baculovirus ha sido utilizado para hacer inferencias de sus relaciones filogenéticas (Herniou *et al.*, 2001; Rashidan *et al.*, 2004a; b). En este estudio se comparó la presencia y posición relativa de los genes *gp37*, *cath* y *chiA* en distintos genomas de baculovirus. Tanto como *cath* y *chiA* están relacionados funcionalmente en baculovirus (Daimon *et al.*, 2007), mientras que homólogos bacterianos a *gp37* y *chiA* están asociados en bacterias en la degradación de la quitina (Tsujiro *et al.*, 2002). De los tres genes analizados es más constante la presencia de *chiA* y *cath* (Tabla 4.1) debido quizás, a que están asociadas funcionalmente como se explicó brevemente en la introducción de este capítulo.

En el caso de *gp37*, clasificado como un gen auxiliar, hay diferencias en relación a su presencia dentro de los baculovirus. Se lo encuentra presente en la mayoría de los *Nucleopolyhedrovirus*, está ausente en la mayoría de los *Granulovirus* (sólo 6 de los 13 analizados lo poseen) y ausente en todos los *Nucleopolyhedrovirus* aislados de himenópteros y dípteros. No se encontró ningún baculovirus con la presencia de *gp37* y ausencia de *chiA* y *cath* en el mismo genoma. También, hay que destacar la ausencia de los *gp37*, *cath* y *chiA* en el genoma del virus de AgMNPV (Oliveira *et al.*, 2006) utilizado en los ensayos de interacción descritos en el capítulo II de esta tesis (Tabla 4.1)

Tabla 4.1. Presencia (+) o ausencia (-) de los genes *gp37*, *cath* y *chiA* en los genomas de baculovirus

Virus/ Genes	<i>gp37</i>	<i>chiA</i>	<i>v-cath</i>
GVs			
EpapGV, CpGV, XcGV, PieraGV, PsunGV	+	+	+
HearGV	+	+	-
AgSeGV	-	+	+
CreleGV	-	+	+
SpliGV, PxGV, AdorGV, PhopGV, ChocGV	-	-	-
NPVs			
EcobNPV, ChchNPV, TniSNPV, CIBINPV, CbNPV, SFMNPV, AgseNPV, LdNPV, SpexNPV, MacoNPV-96B, MacoNPV-90/2, HzSNPV, HearNPV, SpINPV, LeseNPV, MaruMNPV, BmNPV, EppoNPV, OpMNPV, HyCuNPV, AnpeNPV, PxMNPV, RanuMNPV, CfDEFMNPV, AcMNPV	+	+	+
AgMNPV	-	-	-
AdhoNPV	-	-	+

Si bien la secuencia aminoacídica codificada por estos tres genes es relativamente conservada en todos los baculovirus, el agrupamiento de los mismos en los genomas resulta ser variable. Genomas como AcMNPV y OpMNPV ó EpapGV, CpGV y el recientemente secuenciado *Pieris rapae Granulovirus* presentan un orden similar en la organización de *gp37*, *cath* y *chiA*. En el caso de CrleGV los genes *cath* y *chiA* presentan el mismo agrupamiento que el encontrado en EpapGV y CpGV, sólo con la diferencia que *gp37* está ausente (Fig.4.11)

Un análisis completo del grupo de genes *gp37*, *cath* y *chiA* reveló que la presencia de estos genes resultó ser más variable en los Betabaculovirus donde aproximadamente solo el 30% de los secuenciados hasta el momento poseen los 3 ORFs, que en los Alphabaculovirus en los cuales casi un 80% los poseen. El ORF correspondiente a *gp37*, según este análisis, nunca aparece solo en los genomas baculovirales, su presencia siempre está acompañada de *chiA* y *cath*, a excepción de HearGV cuyo genoma posee *gp37* y *chiA* pero *cath* está ausente.

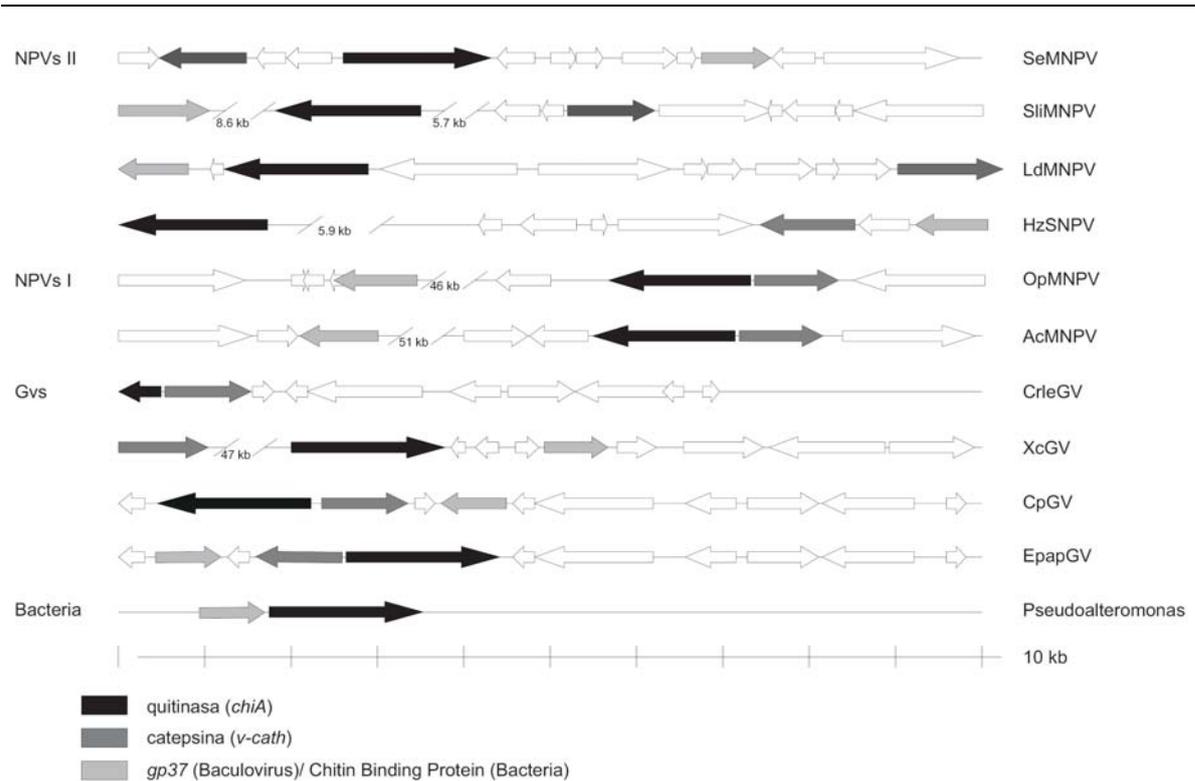


Fig. 4.11. Posición relativa de los genes *gp37* (*cbp* en bacterias), *cath* y *chiA* en diferentes genomas de baculovirus y comparación con la hallada también en algunas bacterias. Entre barras aparece el número de nucleótidos (expresados en kpb) encontrado en algunos genomas entre los genes estudiados.

La filogenia del ORF de la quitinasa baculoviral fue analizada en repetidas ocasiones (Daimon *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004). El último trabajo -publicado en el 2004-, se realizó incluyendo un número mayor de secuencias que en los anteriores y sostiene la relación monofilética entre las quitinasas de los baculovirus y bacterias del grupo de las gammaproteobacterias como *Serratia marcescens* y *Burkholderia cepacia*, entre otras. Está bien documentado que la filogenia del gen de la quitinasa solo concuerda parcialmente con la filogenia de genes del ARNr 16S, la cual es la base de la actual filogenia bacteriana. Se supone que eventos de transferencia horizontal del gen de quitinasas entre bacterias es la razón de esta desviación (Cottrell *et al.*, 2000). A pesar de la misma, los autores sostienen que no se ve afectada la conclusión de que la mayoría de las quitinasas de los baculovirus derivarían de proteobacterias (Wang *et al.*, 2004).

A diferencia del planteo anterior realizado con 9 secuencias baculovirales (7 NPVs y 2 GVs), en nuestro análisis se incluyó un total de 26 secuencias virales. De esta forma los *Granulovirus* aparecen como grupo hermano de las bacterias, separándose de los *Nucleopolyhedrovirus* (Fig.4.11).

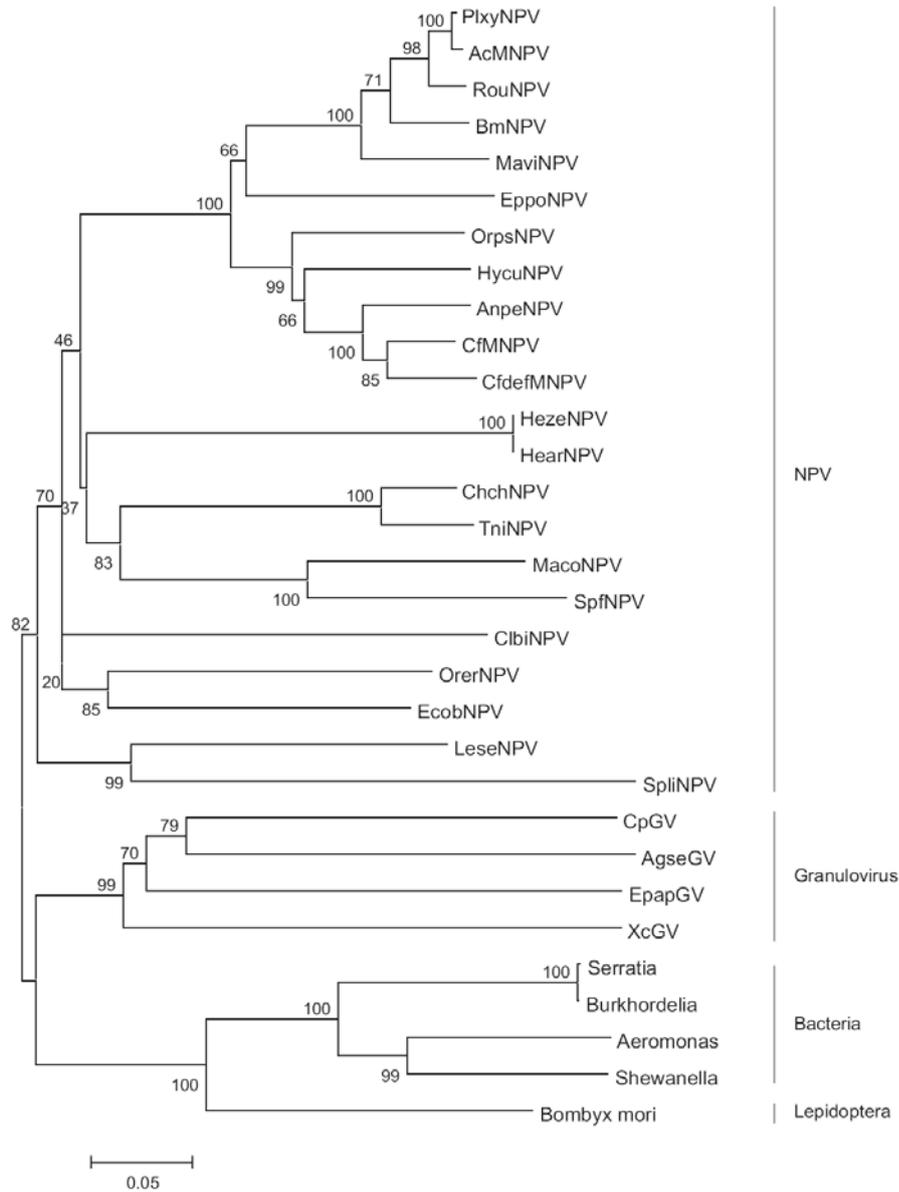


Fig. 4.11. Árbol filogenético de CHIA de EpapGV y quitinasas de diferentes grupos taxonómicos

Esta relación difiere de los agrupamientos observados en estudios filogenéticos anteriores en los cuales GVs y NPV estaban incluidos dentro del mismo (Hawtin *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2004). Para esclarecer estas diferencias será necesario un

mayor número de secuencias de *Granulovirus* disponibles que permitan corroborar las relaciones observadas en este estudio.

También se incluyó en este trabajo la *chiA* presente en el genoma del lepidóptero *Bombyx mori*. El elevado valor de *bootstrap* en el agrupamiento que vincula esta secuencia a las bacterianas, indican el estrecho vínculo existente entre ambas y es coincidente al obtenido en análisis previos (Daimon *et al.*, 2003).

En el Capítulo 3 de esta tesis, el análisis filogenético de GP37, reveló su vínculo con las *chitin binding proteins* (CBPs) bacterianas. El estudio de genes bacterianos implicados en la degradación de la quitina, demuestra la existencia de un bloque que incluye a una quitinasa (*chiA*), homóloga a la encontrada en los baculovirus y una *chitin binding protein* (*cbp*), relacionada entre otros con *gp37* de los baculovirus (Watanabe *et al.*, 1997; Techkarnjanaruk & Goodman, 1999; Tsujibo *et al.*, 2002). Según lo descrito, las CBPs actúan optimizando la acción catalítica de la quitinasa sobre la quitina. La unión de la CBP a la quitina, generaría cambios estructurales en la misma que facilitarían el acceso de la quitinasa e incrementaría su acción (Howard *et al.*, 2003; Tsujibo *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta que la disposición de estos genes (*chiA-cbps*) en algunas bacterias (Tsujibo *et al.*, 2002), es muy similar a la que se encuentra en los Baculovirus (Fig. 4.11), se podría postular no solo el origen bacteriano de las *gp37* virales sino también que la transferencia ocurrida entre bacterias y virus incluyó conjuntamente tanto a *chiA* como a *gp37*. Esta suposición queda fundamentada por la similitud en la topología de los árboles filogenéticos realizados tanto para quitinasa como para *gp37*.

La asociación funcional que existe entre *chiA* y *cbps* en bacterias no está demostrada hasta el momento con sus homólogos en los baculovirus.

Referencias

- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9, 270-277.
- Cottrell, M. T., Wood, D. N., Yu, L. & Kirchman, D. L. (2000). Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the alpha- and gamma-subclasses of the proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66, 1195-1201.
- Daimon, T., Hamada, K., Mita, K., Okano, K., Suzuki, M. G., Kobayashi, M. & Shimada, T. (2003). A *Bombyx mori* gene, BmChi-h, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 749-759.
- Daimon, T., Katsuma, S., Iwanaga, M., Kang, W. & Shimada, T. (2005). The BmChi-h gene, a bacterial-type chitinase gene of *Bombyx mori*, encodes a functional exochitinase that plays a role in the chitin degradation during the molting process. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 1112-1123.
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W. K. & Shimada, T. (2007). Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Arch Virol* 152, 1655-1664.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci* 1, 105-124.
- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Pietro, A. D., and Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83:313-318
- Hawtin, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., Zanotto, P. M., Howard, S. C., Gooday, G. W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A. & Possee, R. D. (1995). Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 212, 673-685.
-

- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R. D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238, 243-253.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2), 309-316.
- Henrissat, B. (1999). Classification of chitinases modules. *EXS* 87, 137-156.
- Henrissat, B. & Romeu, A. (1995). Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 311 (Pt 1), 350-351.
- Herniou, E. A., Luque, T., Chen, X., Vlaskovska, J. M., Winstanley, D., Cory, J. S. & O'Reilly, D. R. (2001). Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *J Virol* 75, 8117-8126.
- Hom, L. G. & Volkman, L. E. (2000). *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH. *Virology* 277, 178-183.
- Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M. & Hutcheson, S. W. (2003). Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 627-635.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. (1998). Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2283-2292.
- Keyhani, N. O. & Roseman, S. (1996). The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinase. *J Biol Chem* 271, 33414-33424.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Merzendorfer, H. & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206, 4393-4412.
-

- Ohkawa, T., Majima, K. & Maeda, S. (1994). A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 68, 6619-6625.
- Oliveira, J. V., Wolff, J. L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E., de Souza, M. L., Moscardi, F., Maruniak, J. E. & Zanotto, P. M. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 87, 3233-3250.
- Parola, A. D., Manzan, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002). Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* 25, 329-341.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. & Vorgias, C. E. (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169-1180.
- Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., Arciello, S., Corrado, G. & Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 1205-1213.
- Rashidan, K. K., Nassoury, N., Giannopoulos, P. N., Mauffette, Y. & Guertin, C. (2004). Identification, characterization and phylogenetic analysis of conserved genes within the odvp-6e/odv-e56 gene region of *Choristoneura fumiferana* granulovirus. *J Biochem Mol Biol* 37, 206-212.
- Rawlings, N. D., Pearl, L. H. & Buttle, D. J. (1992). The baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome includes a papain-like sequence. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373, 1211-1215.
- Reynolds, S. E. (1996). Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv Insect Physiol* 26, 157-232.
- Sahai, A. S., and Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* 11:317-338.
-

- Shinshi, H., Neuhas, J. M., Ryals, J. & Meins, F., Jr. (1990). Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol* 14, 357-368.
- Slack, J. M., Kuzio, J. & Faulkner, P. (1995). Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 5), 1091-1098.
- Techkarnjanaruk, S. & Goodman, A. E. (1999). Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91. *Microbiology* 145 (Pt 4), 925-934.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Tsujibo, H., Orikoshi, H., Baba, N., Miyahara, M., Miyamoto, K., Yasuda, M. & Inamori, Y. (2002). Identification and characterization of the gene cluster involved in chitin degradation in a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* 68, 263-270.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Wang, H., Wu, D., Deng, F., Peng, H., Chen, X., Lauzon, H., Arif, B. M., Jehle, J. A. & Hu, Z. (2004). Characterization and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* 100, 179-189.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. & Regue, M. (1997). Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *J Bacteriol* 179, 7111-7117.
-

Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L. & Wood, H. A. (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8, 391-396.

Young, V. L., Simpson, R. M. & Ward, V. K. (2005). Characterization of an exochitinase from *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (family Baculoviridae). *J Gen Virol* 86, 3253-3261.

Capítulo 5

Evaluación de genes de EpapGV en baculovirus recombinantes

Indice temático

Introducción	116
Materiales y métodos	122
Resultados	129
Generación de recombinantes de AgMNPV.	130
Evaluación de la expresión de genes de interés mediante Western Blot	133
Evaluación de virus recombinantes de AcMNPV	134
Referencias	140

Introducción

Dentro de los patógenos utilizados para controlar plagas en los cultivos, los baculovirus han sido usados ampliamente porque tienen la capacidad de controlar la especie plaga sin generar patogenicidad cruzada a otras especies no blanco, las cuales pueden actuar como enemigos naturales de las mismas plagas. El nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae) denominado AcMNPV fue uno de los primeros descritos y el interés en su estudio empezó cuando se observó que controlaba poblaciones de *A. californica*, las cuales destruían masivamente cultivos de alfalfa (Cory & Bishop, 1995). En 1970, se aplicó extensivamente en campos del suroeste de Ontario con el fin de estudiar la efectividad contra el gusano de la col, *Trichoplusia ni*. (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Richards *et al.*, 1998).

Desde 1970, con el desarrollo de la biología molecular, la investigación de los virus de insectos, especialmente baculovirus, se fue incrementado y las nuevas técnicas de ingeniería genética hicieron posible el inicio de la modificación de su genoma. A fines de los 80, se realizaron en Inglaterra los primeros ensayos en campo con baculovirus genéticamente modificados (AcMNPVpol-*lacZ*) (Black, 1997; Levidow, 1995) y en el año 1989, en Estados Unidos (Wood, 1994). Estos ensayos realizados con virus *polh*⁻, tenían como objetivo evaluar la persistencia de los mismos en el ambiente. En el año 1993, se evaluó el primer AcMNPV recombinante *polh*⁺ que expresaba una neurotoxina específica de insectos (AaIT) causando un efecto paralizante en las larvas infectadas y resultando en una disminución del daño en los cultivos de más del 50% (Cory *et al.*, 1994).

Si bien numerosos estudios han concluido que las toxinas selectivas expresadas en los baculovirus recombinantes no son dañinas para organismos no blanco, el uso de otros tipos de genes (tales como hormonas juveniles, proteasas, quitinasas u otras enzimas) es visto como una alternativa más segura (Bora Inceoglu *et al.*, 2008).

Actualmente las investigaciones se dirigen especialmente hacia la obtención de baculovirus recombinantes, modificados para aumentar el rango de huéspedes o disminuir el tiempo letal (Inceoglu *et al.*, 2006; Cory & Bishop, 1995; Richards *et al.*, 1998). Si bien se han realizado varios estudios con el fin de definir cuáles son los determinantes genéticos que permiten ampliar el rango de hospedantes (Birnbaum *et al.*, 1994; Katou *et al.*, 2006; McCarthy & Theilmann, 2008), no se ha podido establecer un esquema válido para todas las especies.

En teoría, cualquier gen que codifique una proteína capaz de interrumpir el desarrollo normal, de modificar el comportamiento de una larva o reducir el daño causado por la alimentación de los insectos sobre el cultivo se convierte en candidato para su inclusión en un virus recombinante con probabilidades de ser un agente de control biológico mejorado.

Desde el punto de vista teórico, se pueden considerar dos tipos de modificaciones: por un lado, disminuir su especificidad, ampliando de esta forma el rango de hospedadores y, por el otro, modificar los factores de eficacia insecticida del virus (Lopez-Ferber *et al.*, 2001) Este último tipo de modificaciones tiene como objetivo mejorar la actividad del virus en su propio hospedador. Esta mejora puede ser de dos tipos: 1) disminución en la cantidad de cuerpos de oclusión necesarios para matar al insecto, el cual generalmente se expresa en Dosis Letal Media (DL₅₀); 2) disminución del tiempo necesario para matar las larvas que se expresa en Tiempo Letal Medio (TL₅₀) (Lopez-Ferber *et al.*, 2001). Con tales objetivos se desarrollaron numerosos baculovirus algunos de los cuales fueron capaces de mejorar la acción insecticida de los mismos. El descubrimiento de los *vef* (descritos en el Capítulo 1) en *Trichoplusia ni* granulovirus (TnGV) (Tanada *et al.*, 1973) y el posterior conocimiento del modo de acción sobre la membrana peritrófica (MP) del hospedador (Bischoff & Slavicek, 1997; Derksen & Granados, 1988a; Lepore *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1999; Wang & Granados, 1997), llevaron a la construcción de baculovirus recombinantes con este gen. Los resultados demostraron que la incorporación del *vef* de TnGV en el genoma de AcMNPV produjo una disminución de 2,1 veces la DL₅₀ y 1,3 veces el TL₅₀ en comparación con el virus de AcMNPV salvaje (Rincón-Castro, 1997).

Finalmente, otra alternativa ensayada con éxito ha consistido en generar modificaciones que alteren la fisiología de hospedador, así el producto del gen viral *egt* (*ecdysteroid UDP-glycosyltransferase*) extiende el estado larval al inactivar los ecdisteroides que actúan como hormonas que regulan la muda del insecto (O'Reilly & Miller, 1991). La comparación entre larvas infectadas con aislamientos silvestres de AcMNPV y con AcMNPV Δegt (en el que se ha eliminado el gen *egt*), mostraron que las larvas infectadas con este último presentaban una reducción significativa del peso, reducción del 40% en la cantidad de alimento consumido y del 20% en el tiempo letal medio del virus (Cross *et al.*, 1991). Experiencias similares fueron conducidas con otros baculovirus, tales como HearNPV y AgMNPV (Sun *et al.*, 2002; Ribeiro & Pinedo, 2001).

Los resultados expuestos en el capítulo 2 de esta tesis, mostraron la existencia de factores codificados en el genoma de EpapGV capaces de aumentar la virulencia en mezclas virales administradas sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*. En base a los datos disponibles hasta el momento, se seleccionaron y estudiaron genes que podrían estar involucrados en los efectos observados *in vivo* en las mezclas virales ensayadas. Los genes *gp37* y *chiA*, están ausentes en el genoma de AgMNPV (Oliveira *et al.*, 2006) y por lo tanto se consideraron como buenos candidatos para ser empleados en la modificación genética de este virus con el fin de incrementar su actividad insecticida y potenciar su uso como agente de biocontrol.

En algunos baculovirus, tanto GP37 como CHIA parecen encontrarse asociados al cuerpo de oclusión (Gross *et al.*, 1993; Hawtin *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003; Vialard *et al.*, 1990). Estudios previos muestran que factores presentes en los OBs son capaces de alterar la estructura de la MP (Derksen & Granados, 1988b). Si bien se demostró que los OBs poseen CHIA con actividad quitinolítica (Hawtin *et al.*, 1997), los efectos de esta enzima sobre la MP solo fueron demostrados *in vitro* (Rao *et al.*, 2004). Para el caso de GP37, en algunos NPVs es detectada en los OBs, pero el bajo nivel de expresión observado durante la infección sea quizás el motivo por el cual no puede evidenciarse su actividad sobre la MP del hospedador con baculovirus que contienen ese gen funcional (Li *et al.*, 2003).

Sobre la base de estos antecedentes, se encaró la generación de baculovirus capaces de sobreexpresar GP37, CATH y CHIA, como herramientas que aporten

datos sobre el papel de estas proteínas en las etapas iniciales del ciclo infeccioso de los baculovirus y puedan ser utilizables en el mejoramiento de su eficiencia como bioinsecticidas. Además, cabe considerar que la ausencia de los genes que codifican para estas proteínas en AgMNPV (Oliveira *et al.* 2006), convierten a este virus en un modelo óptimo para la realización de estudios de caracterización funcional.

Materiales y métodos

Células y virus. Para la obtención de virus AgMNPV recombinantes se utilizaron células derivadas de *Anticarsia gemmatalis* (UFLAG-286) (Sieburth *et al.*, 1988) que fueron mantenidas a 27 °C en medio TC-100 (JRH Bioscience) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser) y 50 µg/ml de gentamicina (Parafarm). El virus AgMNPV-IPpol (McCarthy, 2005) fue propagado en monocapa de células UFLAG-286 y cuantificado mediante ensayo de placas siguiendo el protocolo de O'Reilly (1992). La obtención de los virus recombinantes AchiAEpapGV, Acgp37EpapGV fue descrita anteriormente.

Clonado de genes de EpapGV. Utilizando el vector de transferencia pI2 (Biedma, 2009) se construyeron plásmidos recombinantes del tipo pI2-X conteniendo distintos ORFs X de EpapGV. Los ORFs de EpapGV seleccionados fueron amplificados mediante PCR utilizando como molde DNA viral de EpapGV y *primers* específicos. Para la amplificación del fragmento genómico que contiene el bloque de los ORFs *gp37-cath-chiA* se utilizaron los *primers* gp37Ep-Up-EcoRI y chiA-Down-XhoI. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa, aislados y digeridos con enzimas de restricción para su clonado en el vector pI2, previamente digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos obtenidos se denominaron pI2-*gp37*, pI2-*chiA*, y pI2-4kb (bloque *gp37-cath-chiA*). Los mismos se analizaron mediante PCR, perfiles de restricción y secuenciación. Los *primers* utilizados para amplificar los respectivos ORF se detallan a continuación, indicando el nombre, secuencia, T_m, %CG y longitud del amplicón, respectivamente:

gp37Ep-Up-EcoRI	5' GGAATTCAGATATGATAGTACTGATAATATTG 3'	55.4	30.3	689 pb
gp37Ep-Down-PstI	5' AACTGCAGTTAAACTCGTCATTTTGT 3'	56	33.3	
chiA-Up-KpnI	5' TGGTACCGTATGAACTAGCAATTGTGTC 3'	59.6	41.4	1731 pb
chiA-Down-XhoI	5' GGCTCGAGGCTATCCTTTACAGAACGCGTCAAGTCC 3'	63.9	55.6	

Linealización del DNA viral de AgMNPV-IPpol. Para la reacción de digestión del ADN viral AgMNPV-IPpol con la enzima de restricción IPpol, se siguió el protocolo propuesto por McCarthy (2005) en el cual se utiliza *buffer* E (Promega) en lugar del

buffer recomendado por el fabricante de la enzima. Las condiciones de incubación y cantidad de enzima que se usaron fueron las recomendadas por el proveedor.

Obtención de recombinantes de AgMNPV. Se sembraron 1×10^6 células UFLAg-286 sobre placas de 35 mm y se incubaron ON a 27 °C para favorecer su adhesión a la superficie. Las células fueron cotransfectadas con una mezcla de 500 ng de ADN genómico de AgMNPV-IP ρ ol linealizado y 1 μ g del plásmido de transferencia correspondiente (pI2-x) (Biedma, 2009). Se utilizaron los lípidos *Insect-GeneJuice* (Novagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, los DNA viral y plasmídico fueron diluidos en 100 μ l de TC-100 libre de suero (solución A), 2 μ l de reactivo de transfección fue diluido en 100 μ l de TC-100 libre de suero (solución B), la solución B fue agregada gota a gota a la solución A y esta mezcla incubada a temperatura ambiente por 45 min. Pasado este lapso se agregaron 800 μ l de medio TC-100 libre de suero. La mezcla final fue agregada a la monocapa celular, previamente lavada dos veces con PBS 1X, e incubada por 4 h a 27°C. Luego, se agregaron 2 ml de TC-100 suplementado con 10% de suero. Al cabo de seis días, se recolectó el medio sobrenadante, conteniendo la progenie viral. Los virus recombinantes fueron purificados mediante ensayos de placa sucesivos (O'Reilly, 1992). La detección de los virus recombinantes fue monitoreada por la aparición de poliedros y mediante PCR (McCarthy, 2005).

Generación de un recombinante AcMNPV-eGFP. El ORF completo correspondiente a la proteína fluorescente (*green fluorescent protein*, eGFP) fue obtenido a partir del plásmido pGemT-eGFP (Ure, 2009) mediante digestión con la enzima EcoRI y clonado posteriormente en el vector pBacPack 9 (Invitrogen) digerido con la misma enzima. Una vez ligados inserto y vector, se transformaron células *DH5 α* electrocompetentes. Las colonias seleccionadas mediante la utilización de ampicilina fueron analizadas mediante *colony PCR* usando los *primers* bac 1 (5'-AACCATCTCGCAAATAAATA-3') y bac2 (5'-AAGCGCTAGATTCTGTGC GT-3') cuyos sitios de pegado corresponden a regiones externas y flanqueantes al sitio de inserción del ORF. Mediante la combinación de *primers* bac y eGFP se determinó la correcta orientación del inserto. El plásmido obtenido, denominado pbGFP, fue purificado y utilizado para cotransfectar junto a DNA del bácido de

AcGOZA (sistema descrito anteriormente) (Fig. 5.1), en células SF-9 sembradas en placas de 35 mm (0.5×10^6 células). El reactivo de transfección *Insect-GeneJuice* (Novagen) fue utilizado siguiendo las especificaciones y recomendaciones del fabricante. Las células fueron mantenidas a 27 °C por 4 h con la mezcla lípidos-DNA y luego la misma fue reemplazada por medio TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino. La incubación a 27 °C se extendió hasta el momento de observar la presencia de células con poliedros. El sobrenadante de la transfección conteniendo el recombinante AcGFP fue utilizado para reinfectar células Sf9 y el segundo pasaje se realizó sobre células de *Trichoplusia ni* (HighFive). La presencia del virus recombinante se confirmó mediante la presencia de poliedros y fluorescencia de las monocapas infectadas sometidas a luz UV.

Purificación de DNA viral a pequeña escala. Los BV se aislaron a partir del sobrenadante del cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a $1000 \times g$ a 4 °C durante 5 min. La precipitación de los viriones se realizó centrifugando 1,5 ml de este sobrenadante a 14-18.000 rpm y 4 °C durante 30 min en un tubo *ependorf*. Luego se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces en el mismo tubo. El *pellet* de viriones se resuspendió delicadamente en *buffer* de lisis [Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM; EDTA 10 mM; SDS 0,25%], se agregó proteinasa K (500 µg/ml) y se incubó a 60 °C durante un mínimo de 2 h. Se realizaron tres extracciones sucesivas (fenol/ fenol-cloroformo-isoamílico/ cloroformo-isoamílico), agregando 500 µl de solvente orgánico en cada caso. Se llevó la fase acuosa a una concentración final de 0,2 M NaCl, se agregó 500 µl de isopropanol para precipitar y posteriormente se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C por 30 min. El *pellet* se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril y fue utilizado para detectar recombinantes mediante la técnica de PCR.

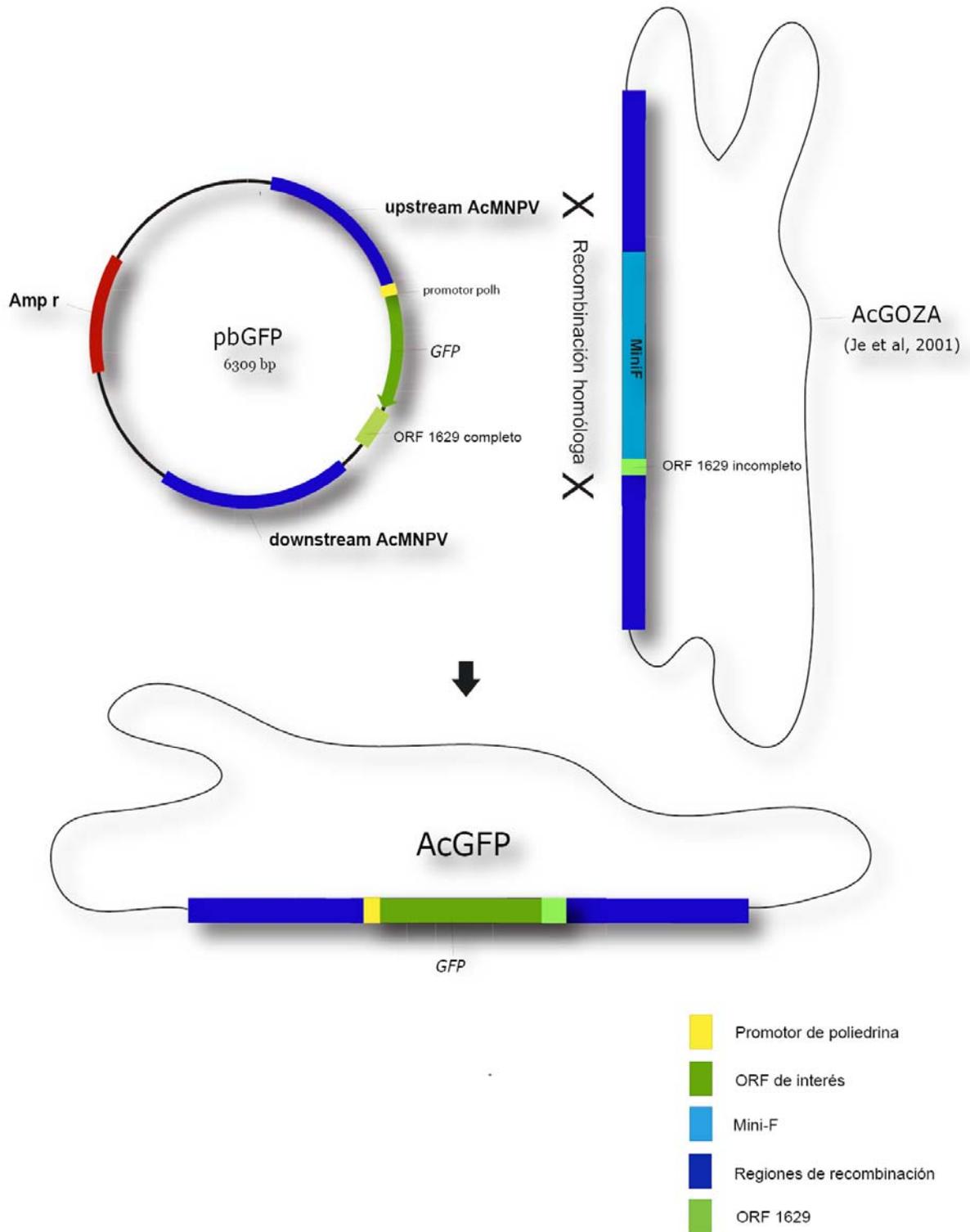


Fig. 5.1. Generación del recombinante Ac-eGFP mediante recombinación homóloga en células de insecto entre el plásmido pbGFP y DNA del bácido de AcMNPV Ac-GOZA.

SDS-PAGE y Western Blot. Células UFLAG-286 infectadas con el virus rAgMNPV/*gp37-polh+* obtenido fueron colectadas a las 72 hs postinfección, lavadas dos veces con buffer PBS, centrifugadas y resuspendidas en *sample buffer*. Como control positivo se utilizaron células infectadas con el recombinante Acgp37EpapGV tratadas de igual manera. Posteriormente, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), usando el equipo Mini-protean II (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-Psq; Millipore, Bedford, MA) usando una aparato Semidry Transblot (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 15 V por 30 min. Posteriormente, las membranas se incubaron en una solución de bloqueo (PBS conteniendo 5% de leche descremada) por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:5.000 del anticuerpo anti-fusolin AcEPV y posteriormente se lavó tres veces con PBS (0,05% de *Tween 20*). A continuación, la membrana fue incubada 1 h con una dilución 1:5.000 de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a HRP (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se lavaron en PBS (0,05% de *Tween 20*) y revelada con DAB (Sigma) y H₂O₂. Como controles negativos se utilizaron células UFLAG-286 sin infectar, y células infectadas con el virus salvaje de AgMNPV.

Insectos. Las larvas de *A. gemmatalis*, *Epinotia aporema* y *Spodoptera frugiperda* empleadas para los bioensayos fueron provistas por el insectario del IMYZA-INTA, Castelar. La cría de insectos se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± 1°C), humedad relativa (50-70%) fotoperíodo (14:10 L/O) y fueron mantenidas en dieta artificial (Greene *et al.*, 1976).

Bioensayos con virus AchiAEpapGV y Acgp37EpapGV sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*, *Epinotia aporema* y *Spodoptera frugiperda*. Los ensayos *in vivo* fueron realizados según la metodología descrita por Hughes y Wood (1986) descrita anteriormente (Cap. 2), en larvas de 3^{er} estadio de las especies mencionadas. Las dosis utilizadas se muestran en la Tabla 5.1. Se ensayaron las diferentes dosis de rAcMNPV sobre 15 individuos por grupo, los ensayos se repitieron al menos 3 veces. Como control negativo se utilizó la mezcla fagoestimulante coloreada. La mortalidad fue registrada a intervalos de 24 h.

Tabla 5.1. Dosis, virus y larvas utilizadas para la evaluación de los recombinantes AchiAEpapGV y Acgp37EpapGV

Dosis (OBs/larva)	Virus	Especie
1500-1500	AcGFP-Acgp37	<i>A. gemmatalis</i>
1500-1500	AcMNPVwt-AcGFP	<i>A. gemmatalis</i>
3000	AcGFP	<i>A. gemmatalis</i>
1500-1500	AcGFP-Acgp37	<i>S. frugiperda</i>
1500-1500	AcMNPVwt-AcGFP	<i>S. frugiperda</i>
3000	AcGFP	<i>S. frugiperda</i>
1500-1500	AcGFP-Acgp37	<i>E.aporema</i>
1500-1500	AcMNPVwt-AcGFP	<i>E.aporema</i>
3000	AcGFP	<i>E.aporema</i>

Evaluación de infección mediante inyección de BV del virus AcGFP. Larvas del 3^{er} estadio de *S. frugiperda*, *Epinotia aporema* y *A. gemmatalis* fueron inyectadas con 3 µl de BV del virus AcGFP (aprox. 100 p.f.u./larva). A los 6 días p.i. fueron sometidas a disección para la extracción de tejido intestinal, tejido graso, hemolinfa y tráqueas. La presencia de células infectadas se determinó mediante la elaboración de extendidos y la observación utilizando microscopía de fluorescencia.

Microscopía electrónica de barrido de membranas peritróficas. Larvas del 3^o estadio de *Anticarsia gemmatalis* fueron alimentadas con fragmentos (cubos) de dieta contaminada superficialmente con diferentes dosis (ver tabla 5.2). Las larvas control se alimentaron sin la presencia de cuerpos de oclusión viral. A las 18 hs. postratamiento, solo las larvas que ingirieron completamente la dieta fueron utilizadas para la extracción de sus membranas peritróficas. Cada larva fue inmovilizada en hielo y posteriormente diseccionada para la extracción de la MP. Las mismas se lavaron en PBS 0.1% y se fijaron a temperatura ambiente en glutaraldehído al 1%. Cada muestra se deshidrató en una serie de etanol (50, 70, 90, y 100%). Cada membrana se secó a temperatura ambiente y posteriormente fueron metalizadas con oro (JEOL mod. Fine Coat Ion Sputter). Posteriormente se examinaron de forma individual en microscopio de barrido (JEOL, modelo JSM-6360 LV).

Tabla 5.2. Dosis (en OBs) y virus administrados *per os* a larvas de 3° estadio de *A. gemmatalis*

Dosis (OBs/larva)	Virus	Especie
3000	Acgp37EpapGV	<i>A. gemmatalis</i>
3000	AchiAEpapGV	<i>A. gemmatalis</i>
3000	AgMNPV	<i>A. gemmatalis</i>
3000	AcGFP	<i>A. gemmatalis</i>

Ensayos de interacción viral entre AgMNPV y los virus recombinantes AchiAEpapGV, Acgp37EpapGV y AcGPF. Los ensayos *in vivo* fueron realizados según la metodología descrita por Hughes y Wood (1986). Se ensayaron diferentes dosis de virus de AgMNPV solo y en combinación con virus recombinantes de AcMNPV (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Dosis (en OBs) y virus administrados *per os* a larvas de 3° estadio de *A. gemmatalis*

Dosis (OBs/larva)	Virus	Especie
100	AgMNPV	<i>A. gemmatalis</i>
100 + 3000	AgMNPV + AchiAEpapGV	<i>A. gemmatalis</i>
100 + 3000	AgMNPV + Agp37EpapGV	<i>A. gemmatalis</i>
100 + 3000	AgMNPV + AcGFP	<i>A. gemmatalis</i>

Resultados

Clonado de genes de EpapGV en el vector de transferencia pl2.

El vector de transferencia pl2, permite el clonado de genes seleccionados para su expresión bajo el control del promotor de *poliedrina*. El vector contiene también el ORF de la *poliedrina* bajo el control del promotor de *p10*. Estas características permiten generar virus recombinantes de AgMNPV *polh+* (Biedma, 2009). Los plásmidos recombinantes pl2-*gp37* y pl2-*chiA* se obtuvieron mediante la amplificación por PCR de los respectivos ORF a partir de DNA de EpapGV. Posteriormente se clonaron el vector pGEM-T (pGEM-T*gp37* y pGEM-T*chiA*) que fue utilizado para confirmar la identidad de los respectivos ORF mediante secuenciación. Estos mismos plásmidos se utilizaron para obtener, mediante el uso de la enzima de restricción EcoRI los ORF completos de *gp37* y *chiA*, cada uno con ambos extremos EcoRI. Estos fragmentos, previamente purificados, se clonaron en el vector pl2 cortado con la misma enzima (Fig. 5.2.)

Dada la disposición y orientación que poseen los genes *gp37-cath* y *chiA* en el genoma de EpapGV analizado en el capítulo anterior, fue posible utilizar los *primers* gp37Ep-up-EcoRI (sentido) y chiA-down-XhoI (antisentido) para la amplificación del fragmento conteniendo estos tres genes. Una vez obtenido el mismo mediante PCR (Fig. 5.3), fue purificado y digerido con las respectivas enzimas de restricción. Posteriormente fue clonado en el vector pl2 digerido con las mismas enzimas. El inserto fue confirmado mediante la técnica de PCR utilizando los pares de *primers* correspondientes a cada ORF individual (*gp37* y *chiA*).

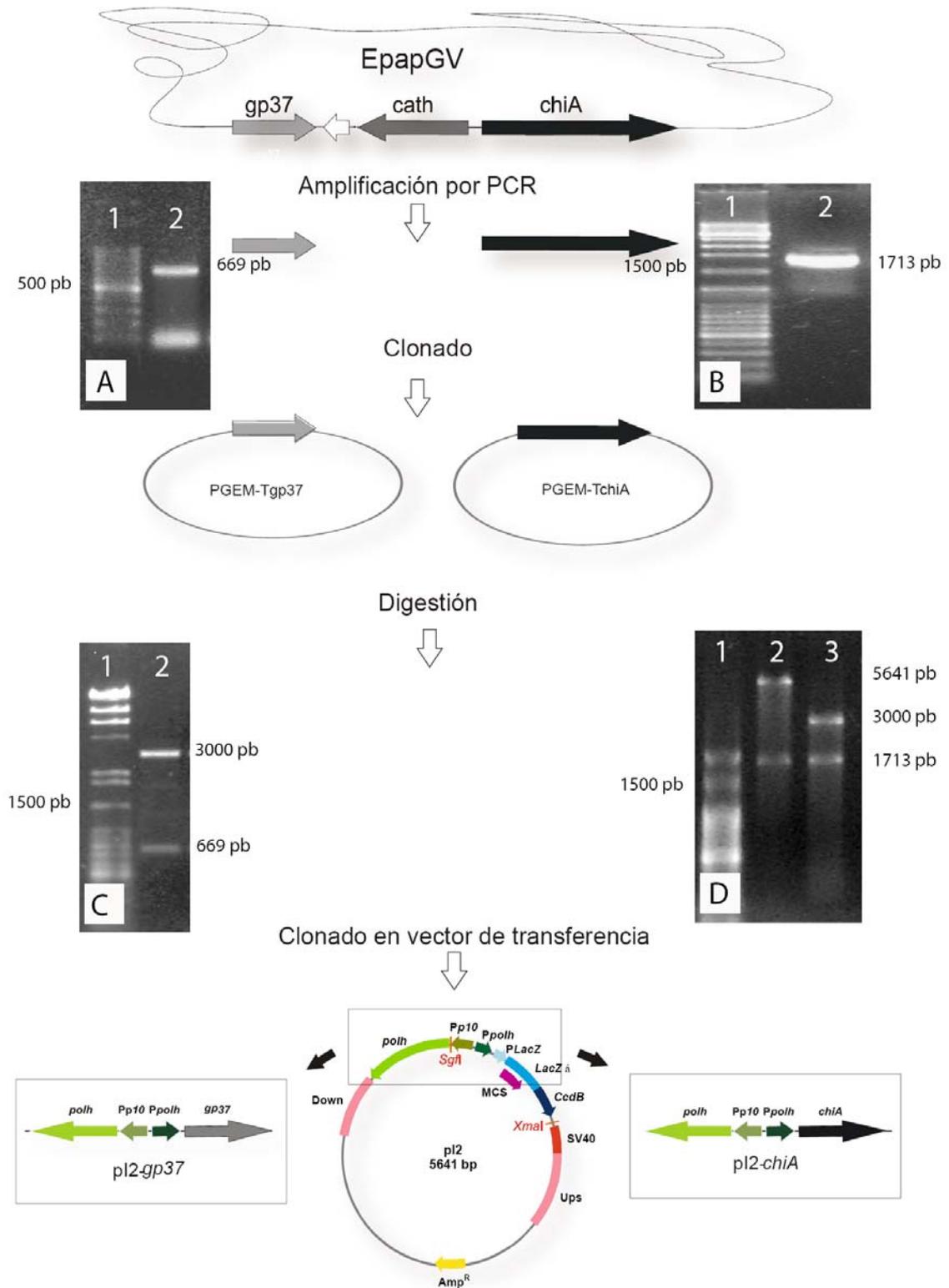


Fig. 5.2: Esquema de amplificación por PCR, clonado y confirmación mediante enzimas de restricción de los vectores de transferencia pI2-*gp37* y pI2-*chiA*. A-B: amplificación por PCR de *gp37* y *chiA* respectivamente. C: digestión de pGEM-Tgp37 con *EcoRI*. D.1-2: digestión pI2*chiA* y pGEM-T*chiA* con *EcoRI* respectivamente.

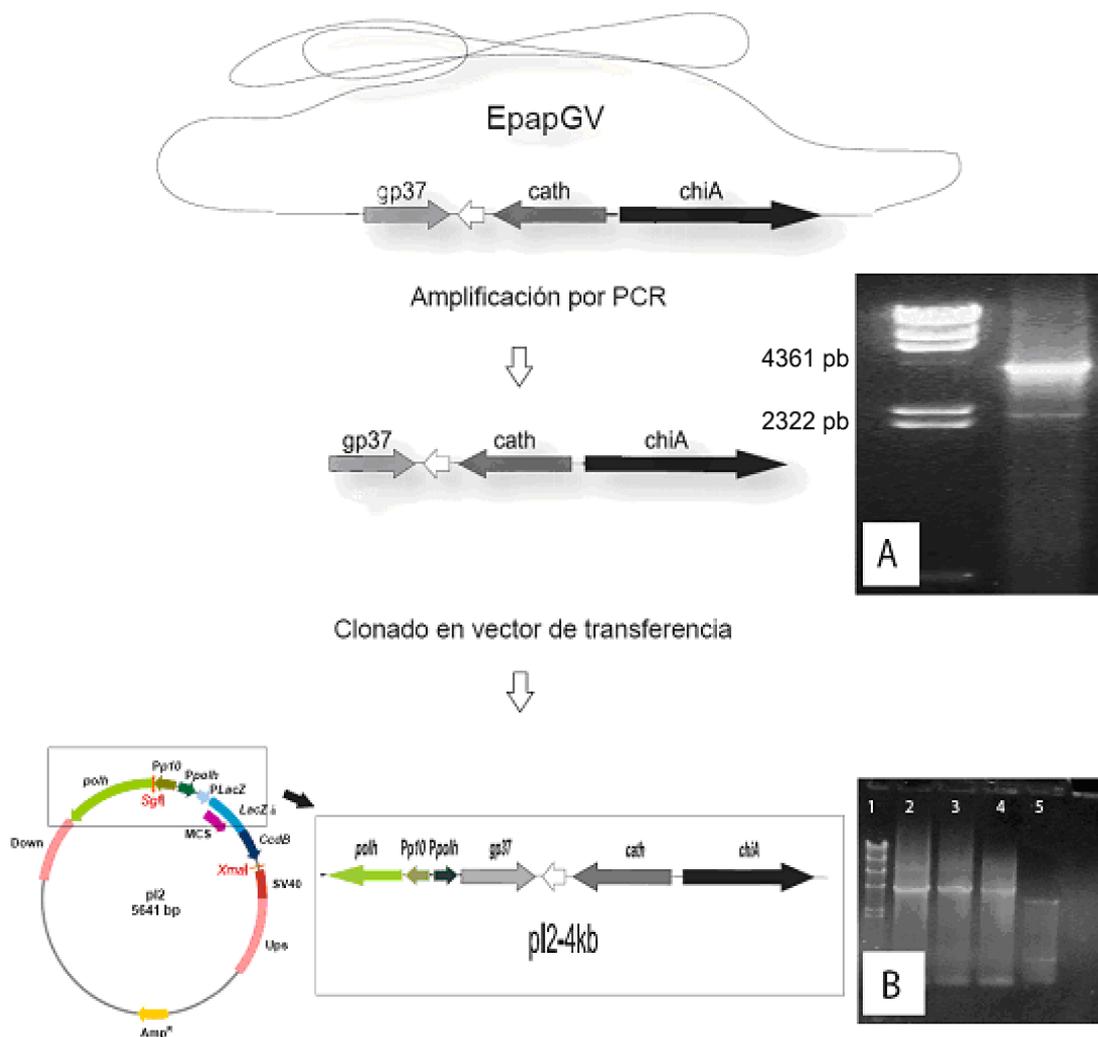


Fig. 5.3: Esquema de amplificación por PCR y clonado del fragmento de 4 kpb *gp37-cath-chiA*.
 A: amplificación por PCR del fragmento 4 kpb. En la parte inferior del gráfico se observa la estructura definitiva del plásmido de transferencia con el bloque amplificado a partir del ADN de EpapGV. B: Colony PCR realizadas en clones de pI2 4kb.

Generación de recombinantes de AgMNPV.

Para obtener el virus rAgMNPV/*gp37-polh+*, se utilizó la estrategia clásica de intercambio alélico. Células UFLAg-286 fueron cotransfectadas con los plásmido recombinantes (pI2-*gp37*) y el DNA viral AgMNPV-IP*pol* linealizado. Para la transfección se utilizaron de forma individual tres clones diferentes del plásmido pI2-*gp37* (denominados I, II y 19II). El virus usado como parental en todos los experimentos de generación de recombinantes, posee el gen *lacZ* flanqueado por las secuencias de corte para la enzima *I-Ppol*, las que están rodeadas por las

secuencias no-codificantes *upstream* y *downstream* del gen de poliedrina. Dos eventos de recombinación homóloga intercambiarán las secuencias presentes en el vector de transferencia por las del DNA viral utilizado como parental, generando así un doble recombinante.

El análisis de las células reveló que solo las transfectadas con el plásmido pI2-*gp37*-19II y el DNA viral linealizado presentaban poliedros. En las restantes, transfectadas con los clones pI2-*gp37*-I y II, si bien no se observaron poliedros, las células presentaron síntomas de infección. El virus recombinante rAgMNPV/*gp37-polh*+ obtenido, fue purificado mediante ensayos de placa sucesivos, reconocido por la aparición de poliedros y ausencia de coloración azul en las placas. Para confirmar la presencia de recombinantes, se utilizó DNA extraído de BV, el cual fue utilizado para la amplificación por PCR del ORF *gp37* de EpapGV en el rAgMNPV (Fig. 5.4). Los resultados muestran sólo reacción positiva en el DNA proveniente de BVs obtenidos de células en las cuales fue posible observar poliedros.

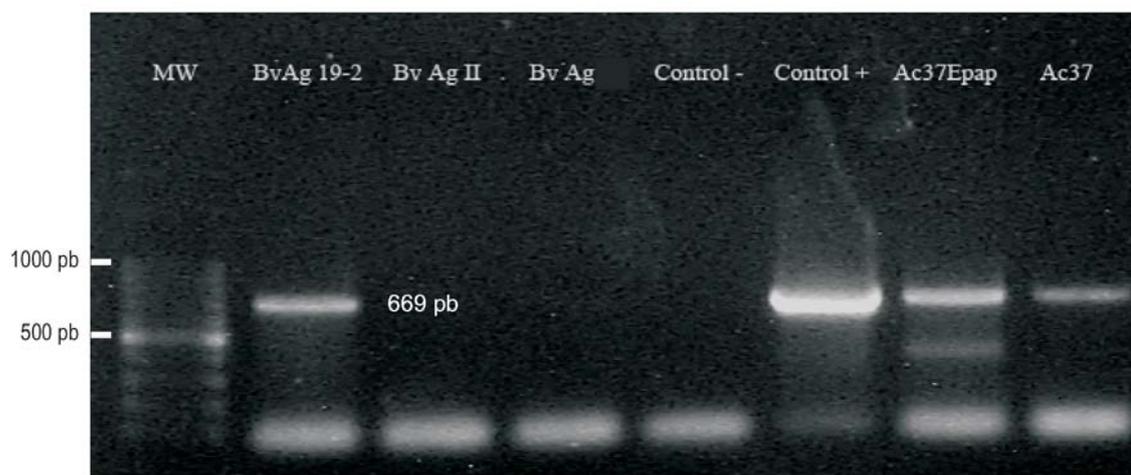


Fig. 5.4. PCR a partir de sobrenadantes de células infectadas con rAgMNPV-*gp37*.

Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2: de BVs de rAgMNPV-*gp37*-II19. Calle 3: de BVs de rAgMNPV-*gp37*II. Calle 4: de BVs de rAgMNPV-*gp37*. Calle 5: control negativo (AgMNPV). Calle 7: control positivo (plásmido I2-*gp37*). Calle 8: ADN de rAcMNPV-*gp37*-I. . Calle 9: ADN de rAcMNPV-*gp37*-II.

Evaluación de la expresión de genes de interés mediante *Western Blot*.

Se utilizaron BVs del virus rAgMNPV /*gp37-polh+* para infectar células UFLAg-286 y evaluar la expresión de GP37 mediante *Western Blot*. Como control positivo se utilizaron extractos proteicos de células HighFive infectadas con el virus Acgp37EpapGV y como controles negativos células infectadas con el virus salvaje AgMNPV (wt) y células sin infectar.

Los resultados muestran que no pudo detectarse la proteína GP37 en las células infectadas con el virus AgMNPV recombinante (Fig.5.5).

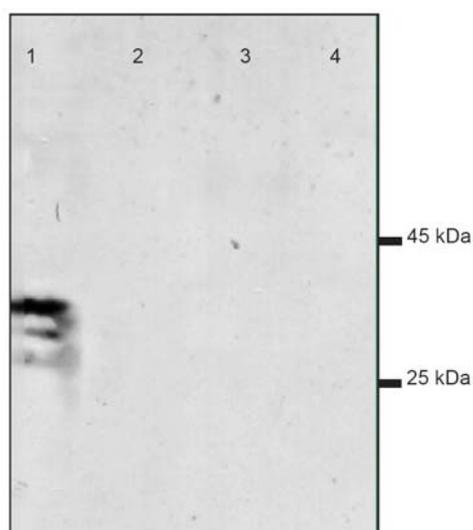


Fig. 5.5. Detección de GP37 en extractos de cultivos celulares. 1. Extracto de células HighFive infectadas con Acgp37EpapGV (control positivo). 2. Extracto de células UFLAg-286 infectadas con rAgMNPV/*gp37-polh+*. 3. Extracto de células UFLAg-286 infectadas con AgMNPVwt. Extracto de células UFLAg-286 sin infectar.

Intentos sucesivos de expresión con éste y otros recombinantes generados con el mismo vector de expresión evidenciaron la falta de expresión proteica haciendo suponer fallas en la construcción del vector de transferencia o niveles indetectables de expresión de proteínas.

En este estudio, el vector de transferencia (pI2) fue utilizado para la inserción de los genes provenientes de EpapGV en el virus de AgMNPV. El primer gen clonado fue *gp37* y luego el gen *chiA* de EpapGV y el bloque de 4 kb de tamaño que incluye a *gp37*, *cath* y *chiA*. Los ensayos en cultivos celulares demostraron mediante la técnica de PCR la obtención del virus recombinante de rAgMNPV/*gp37-polh+* pero mediante *Western blot* se comprobó la ausencia de expresión de GP37. Estos resultados indican que deberá revisarse la capacidad del vector pI2 (Haase, 2010).

Evaluación de virus recombinantes de AcMNPV

Con el objetivo de confirmar y avanzar en la evaluación de factores proteicos que pudieran estar involucrados en la alteración de la MP observada en el capítulo 2 y poner de manifiesto en forma indirecta dicha alteración, se generó un baculovirus recombinante que expresa un gen marcador (*GFP-green fluorescent protein*). La multiplicación de viriones brotantes postransfección en células HighFive permitió comprobar la presencia del recombinante no sólo por la aparición de poliedros en el cultivo celular sino también por la visualización de fluorescencia (Fig. 5.6).

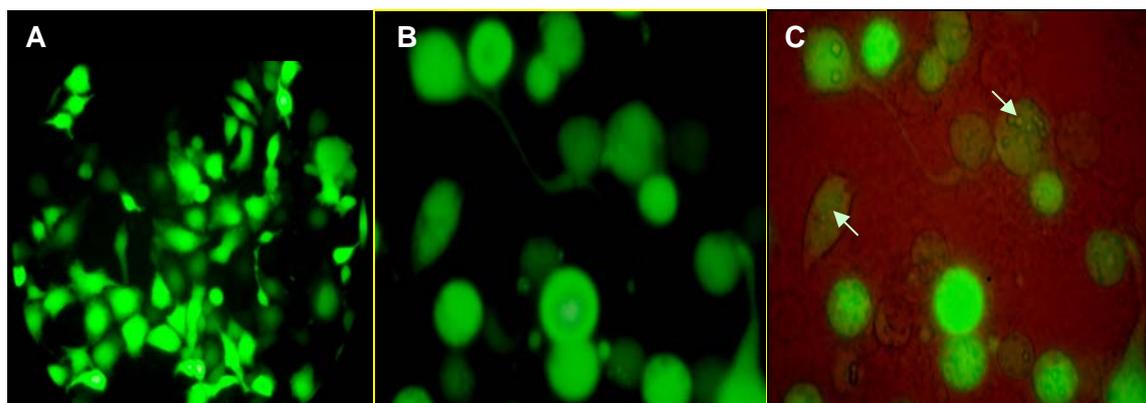


Fig. 5.6: Células High Five infectadas con AcGFP observadas bajo microscopio de epifluorescencia (A: 400X; B y C: 1000X). Con flechas se indica la presencia de poliedros.

La obtención del virus *AcMNPV-GFP-polh+* aporta una herramienta que posibilita determinar cualitativamente el desarrollo de la infección en el hospedador. Este virus resulta infectivo por vía oral y ofrece la posibilidad de evaluar en diferentes tejidos la evolución temporal del proceso infectivo. Trabajos previos indican que un daño sobre la membrana peritrófica en etapas iniciales de la infección se traduce en una rápida diseminación sistémica del virus y descensos en los parámetros biológicos de TL_{50} y DL_{50} (Derksen & Granados, 1988a; Lara-Reyna *et al.*, 2003; Lepore *et al.*, 1996; Mitsuhashi *et al.*, 1998; Mitsuhashi *et al.*, 2007; Mitsuhashi & Miyamoto, 2003; Mitsuhashi & Sato, 2000; Peng *et al.*, 1999; Takemoto *et al.*, 2008; Tanada *et al.*, 1973). Por lo expuesto, la realización de ensayos con larvas co-infectadas *per os* con mezclas de este virus marcado y los recombinantes de AcMNPV conteniendo genes de EpapGV obtenidos previamente, nos permitiría

determinar de forma indirecta el posible daño que los recombinantes podrían ocasionar.

En una primera instancia, se evaluó la capacidad infectiva de OBs y BVs de AcGFP en larvas de *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* y *Epinotia aporema* (Fig 5.7). Al momento de la realización de los ensayos no existían antecedentes sobre la patogénesis de AcMNPV sobre *A. gemmatalis* y *E. aporema*. En relación a *S. frugiperda*, todos los estudios fueron realizados sobre los últimos estadios larvales (Clarke & Clem, 2002; Haas-Stapleton *et al.*, 2003; 2005), no habiendo referencias respecto a lo que sucede cuando AcMNPV es administrado en las primeras etapas del desarrollo larval. Por tal motivo se decidió evaluar el efecto de AcGFP sobre el 3^{er} estadio de las larvas mencionadas anteriormente, utilizando dosis calculadas en base a la dosis letal media reportada para larvas de 5^{to} estadio de *S. frugiperda* (DL₅₀ 9200 OBs/larva) (Hass-Stapleton *et al.*, 2005) (Ver Tabla 5.1).

Los resultados del ensayo realizado con el virus AcGFP administrado vía *per os* e intrahemocélica en larvas de *A. gemmatalis*, *E. aporema* y *S. frugiperda* indicaron que solo se detecta infección con la administración de BV por inyección en larvas de *S. frugiperda* y más tardíamente en *A. gemmatalis* (Fig.5.7); mientras no se observaron células infectadas en los insectos tratados, cuando se suministraron OBs vía oral. Ningún síntoma de infección fue observado en larvas de *E. aporema* sometidas a los mismos tratamientos (datos no mostrados).

Estudios recientes indican que el virus de AcMNPV infecta larvas del 5^o estadio de *A. gemmatalis* vía *per os*, solo a muy elevadas dosis (DL₅₀ > 5.5 x 10⁵ OB/larva) y solo unos pocos tipos celulares parecen permitir la replicación viral cuando este virus es administrado vía *per os* o intrahemocélica a dosis también elevadas (Chikhalya *et al.*, 2009).

La falta de infección vía *per os* en larvas de *A. gemmatalis* y *S. frugiperda* determinada en este trabajo podría ser debida a la utilización de dosis insuficientes como para causar la infección, aunque probablemente este inconveniente podría estar relacionado con la interacción entre el ODV y receptores presentes en las células del intestino del hospedador (Haas-Stapleton *et al.*, 2005). En cambio, el uso de BVs inyectados vía intrahemocélica mostraron resultados coincidentes con lo

descrito por otros autores (Clarke & Clem, 2002; Chikhalya *et al.*, 2009; Haas-Stapleton *et al.*, 2003; 2005).

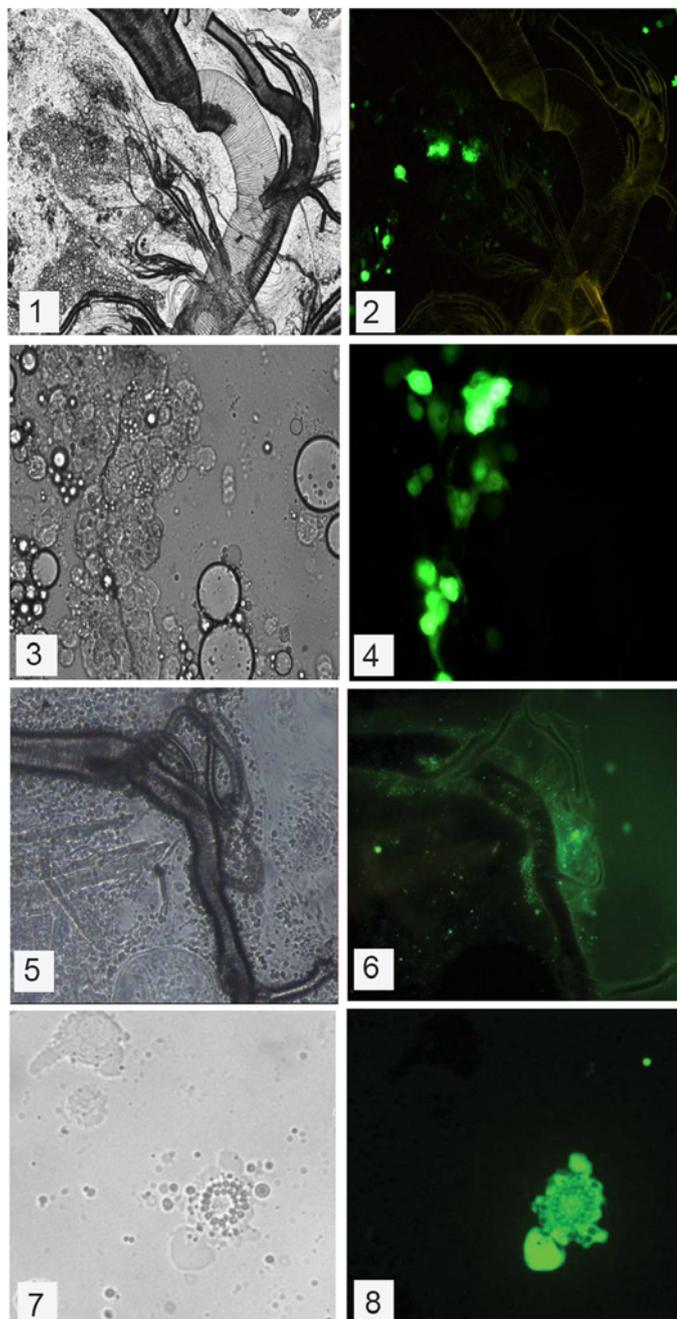


Fig. 5.7. Evaluación del virus AcGFP en larvas de *A. gemmatalis* y *S. frugiperda* mediante inyección intrahemocélica. En todas las fotos la columna de la izquierda representa la observación con luz blanca y la columna de la derecha con luz UV. 1-2. Tráqueas y tejido adiposo de *A. gemmatalis* (Aumento 1000x). 3-4. Tejido adiposo de *A. gemmatalis* (Aumento400x). 5-6. Tráqueas de *S. frugiperda* (Aumento 400x). 7-8. Hemolinfa de *S. frugiperda*, en el interior de las células infectadas es posible observar la presencia de poliedros (Aumento 400x).

Evaluación de Acgp37EpapGV y AcchiAEpapGV en combinación con AgMNPV

Considerando lo expuesto anteriormente, se propuso evaluar si el agregado de los rAcMNPVs que expresan genes de EpapGV presentaba algún efecto sobre la mortalidad producida por AgMNPV en su hospedante natural y, de manera indirecta, su acción sobre la MP.

Se evaluaron entonces mezclas de OBs de los recombinantes Acgp37EpapGV, AcchiAEpapGV y de OBs de AgMNPV, en larvas de 3^{er} estadio y en una dosis inferior a la DL₅₀ calculada para este estadio (168 OBs/larva).

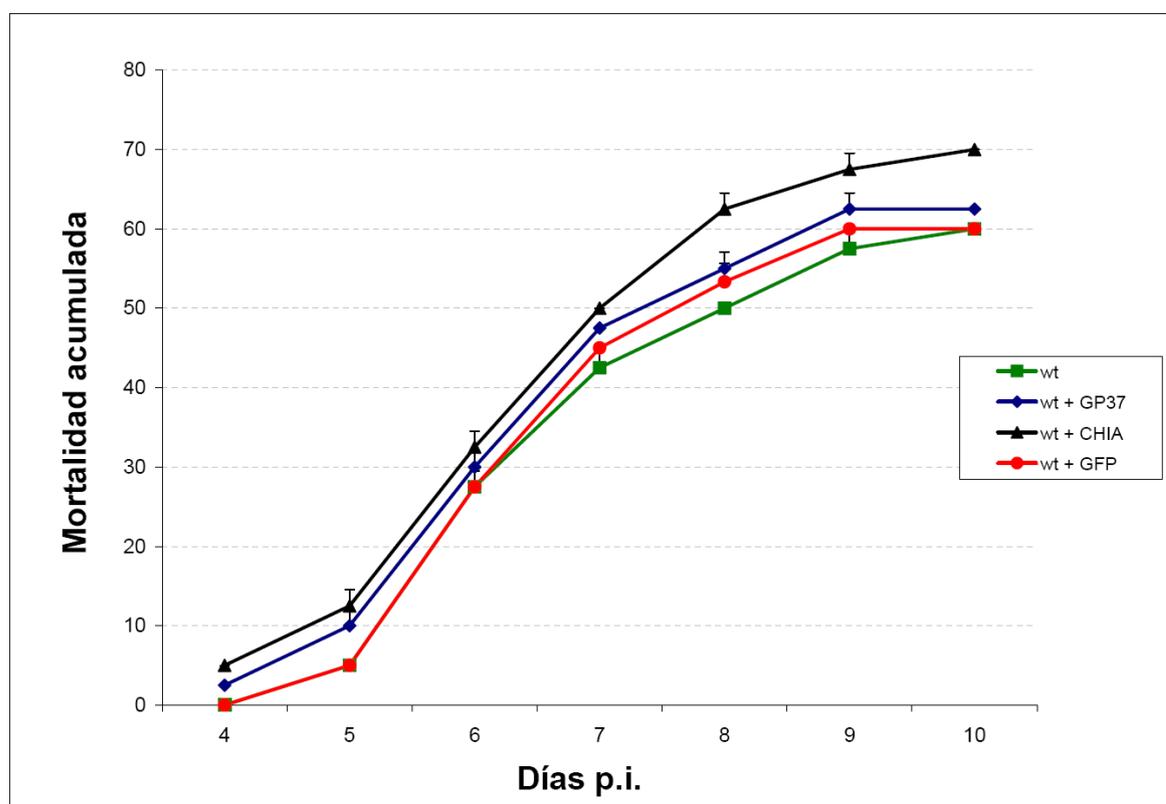


Fig. 5.8. Efecto de la administración de mezclas virales compuestas por OB de AgMNPV (wt) y de virus recombinantes de AcMNPV (GP37, CHIA y GFP respectivamente) sobre larvas del 3er estado de *A. gemmatalis*

Los resultados indican que la adición de OBs de recombinantes del virus de AcMNPV a OBs de AgMNPV genera un aumento de la mortalidad en larvas de 3^{er} estadio de *A. gemmatalis*. El efecto más notorio se observa con el agregado de OBs del recombinante de AchiAEpapGV, aumentando en un 10% la mortalidad de las larvas en relación a la mortalidad ocasionada por el virus de AgMNPV salvaje. El

agregado de OBs de Acgp37EpapGV y AcGFP producen un leve incremento de la mortalidad en relación al virus salvaje pero que no es tan notorio como el ocasionado por el virus que sobreexpresa CHIA.

En relación con los resultados mostrados anteriormente y considerando que estos recombinantes a las dosis evaluadas no son capaces de generar una infección por administración oral de OBs, se puede sugerir que el aumento en la mortalidad es debida a factores que están asociados a los OBs de los recombinantes.

En el capítulo anterior de esta tesis se evidenció la presencia de CHIA en los OBs y que esta enzima es capaz de retener su actividad en medios alcalinos. Por tal motivo se realizaron experimentos complementarios para determinar si el incremento en la mortalidad observado en los bioensayos con mezclas de OBs del virus de AgMNPV salvaje y los recombinantes, había sido producido por factores asociados a los OBs de estos últimos

Los mismos tratamientos usados en los bioensayos descritos anteriormente (Tabla 5.3), fueron administrados a larvas del 3^{er} estadio de *A. gemmatalis* a las cuales posteriormente se les extrajo la membrana peritrófica para su evaluación mediante microscopia electrónica de barrido (MEB). Lo observado indica que solo en las MP extraídas de larvas tratadas con mezclas conteniendo OB de AchiAEpapGV pudo visualizarse alteraciones en la estructura, en comparación con MP de larvas tratadas con las otras mezclas virales. Estas alteraciones consisten en regiones con estructura irregular en las cuales se evidencian perforaciones o poros que interrumpen la continuidad de la membrana (Fig.5.7).

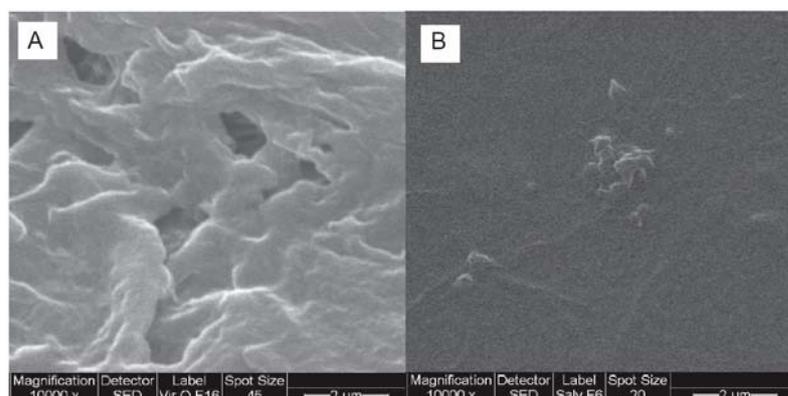


Fig. 5.7. MEB de membranas extraídas de larvas tratadas con virus AchiAEpapGV (A) y con virus AcGFP (B)

Antecedentes previos describen la presencia de CHIA en poliedros (Hawtin *et al.*, 1997). Además, estudios realizados *in vitro* sobre MP con CHIA de AcMNPV expresada y purificada de bacterias, indicaron que el daño ejercido sobre la membrana es proporcional a la concentración de la CHIA administrada. Una elevada concentración de CHIA administrada *in vivo* junto con OBs, no solo deteriora la MP sino también genera un aumento en la mortalidad larval (Rao *et al.*, 2004). Pero ningún estudio había evaluado tales aseveraciones *in vivo*, siendo este es el primer trabajo que analiza *in vivo* (en larvas de insecto) los efectos sobre la MP, de poliedros provenientes de virus modificados genéticamente

En las membranas sometidas a las mezclas virales conteniendo AgMNPV y Acgp37EpapGV y posteriormente analizadas mediante microscopia electrónica no se observaron los cuerpos proteicos descritos en el capítulo 2, por lo tanto se concluye que los mismos son codificados por el genoma de EpapGV y su naturaleza proteica aún debe ser determinada.

Referencias

- Bora Inceoglu, S. G. K., and Bruce D. Hammock (2006). Genetically modified baculoviruses : A historical overview and future Outlook. In: *Advances in Virus Reserarch*.
- Biedma, M. E. (2009). "Desarrollo de un sistema de recombinación para su aplicación al estudio de determinantes genéticos que afectan la infectividad debaculovirus de interés agronómico". *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP La Plata*.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. & Miller, L. K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 68, 2521-2528.
- Bischoff, D. S. & Slavicek, J. M. (1997). Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 71, 8133-8140.
- Black, B. C., Brennan, L. A., Dierks, P. M., and Gard, I. E. (1997). Commercialization of baculoviral insecticides. In "The Baculoviruses" (L. K. Miller, ed.), pp. 341-387. Plenum Press, New York.
- Burden, J. P., Hails, R. S., Windass, J. D., Suner, M. M. & Cory, J. S. (2000). Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. *J Invertebr Pathol* 75, 226-236.
- Carbonell, L. F., Hodge, M. R., Tomalski, M. D. & Miller, L. K. (1988). Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* 73, 409-418.
- Clarke, T. E. & Clem, R. J. (2002). Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelic injection. *J Gen Virol* 83, 1565-1572.
- Cory, J. S. & Bishop, D. H. (1995). Use of baculoviruses as biological insecticides. *Methods Mol Biol* 39, 277-294.
- Cory, J. S., Hirst, M. L., Williams, T., Halls, R. S., Goulson, D., Green, B. M., Carty, T. M., Possee, R. D., Cayley, P. J., and Bishop, D. H. L. (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature (London)* 370:138-140.
- .Chikhalya, A., Luu, D. D., Carrera, M., De La Cruz, A., Torres, M., Martinez, E. N., Chen, T.,

- Stephens, K. D. & Haas-Stapleton, E. J. (2009). Pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in fifth-instar *Anticarsia gemmatalis* larvae. *J Gen Virol* 90, 2023-2032.
- Derksen, A. C. & Granados, R. R. (1988a). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* 167, 242-250.
- Derksen, A. C. & Granados, R. R. (1988b). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* 167, 242-250.
- Greene, G. L., Leppla, N. C. & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol* 69, 487-488.
- Gross, C. H., Wolgamot, G. M., Russell, R. L., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1993). A 37-kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies. *J Virol* 67, 469-475.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O. & Volkman, L. E. (2003). Pathogenesis of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus in fifth instar *Spodoptera frugiperda*. *J Gen Virol* 84, 2033-2040.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O. & Volkman, L. E. (2005). *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *J Gen Virol* 86, 1349-1355.
- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R. D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238, 243-253.
- Hughes, P. R. W., H., A. (1986). In vivo and In vitro Bioassay Methods for Baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses, Biological Properties and Molecular Biology*. Edited by R R G a B A Federeci Boca Raton, Florida: CRC Press
- Katou, Y., Ikeda, M. & Kobayashi, M. (2006). Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions. *Virology* 347, 455-465.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
-

- Lara-Reyna, J., Del Rincon-Castro, M. C. & Ibarra, J. E. (2003). Synergism between the nucleopolyhedroviruses of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni*. *Acta Virol* 47, 189-194.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol* 68, 131-140.
- Levidow, L. (1995). The Oxford baculovirus controversy: Safely testing safety? *Biosci.* 45(8):545-551.
- .Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y. & Pang, Y. (2003). Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* 96, 113-122.
- Lopez-Ferber.(2001). Baculovirus recombinantes en el control Integrado. En Los baculovirus y sus aplicaciones en el control biológico de plagas. Caballero P., Williams T. y Lopez-Ferber M.
- Martens, J. W., Honee, G., Zuidema, D., van Lent, J. W., Visser, B. & Vlak, J. M. (1990). Insecticidal Activity of a Bacterial Crystal Protein Expressed by a Recombinant Baculovirus in Insect Cells. *Appl Environ Microbiol* 56, 2764-2770.
- McCarthy, C. B. (2005). Generación de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, p 339 La Plata: Universidad Nacional de La Plata.*
- McCarthy, C. B. & Theilmann, D. A. (2008). AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology* 375, 277-291.
- Mitsubishi, W., Furuta, Y. & Sato, M. (1998). The spindles of an entomopoxvirus of coleoptera (*Anomala cuprea*) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 71, 186-188.
- Mitsubishi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K. & Wada, S. (2007). Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *J Virol* 81, 4235-4243.
- Mitsubishi, W. & Miyamoto, K. (2003). Disintegration of the peritrophic membrane of silkworm larvae due to spindles of an entomopoxvirus. *J Invertebr Pathol* 82, 34-40.
- Mitsubishi, W. & Sato, M. (2000). Enhanced Infection of a *Nucleopolyhedrovirus* in a
-

- Lepidopteran Pest (*Spilosoma imparilis*) by Spindles of a Coleopteran Entomopoxvirus (EPV) (*Anomala cuprea* EPV). *Japanese Forestry Society* 5, 3.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. & Luckow, V. A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York: WH Freeman and Company.
- Oliveira, J. V., Wolff, J. L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E., de Souza, M. L., Moscardi, F., Maruniak, J. E. & Zanotto, P. M. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 87, 3233-3250.
- Peng, J., Zhong, J. & R, R. G. (1999). A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J Insect Physiol* 45, 159-166.
- Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., Arciello, S., Corrado, G. & Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 1205-1213.
- Richards, A., Matthews, M. & Christian, P. (1998). Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Annu Rev Entomol* 43, 493-517.
- Rincón-Castro, D. (1997). Tesis. *Guanajuato. Irapuato. Mexico*.
- Sieburth, P. J. (1988). Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 24, 195-198.
- Stewart, L. M., Hirst, M., Lopez Ferber, M., Merryweather, A. T., Cayley, P. J. & Possee, R. D. (1991). Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* 352, 85-88.
- Takemoto, Y., Mitsuhashi, W., Murakami, R., Konishi, H. & Miyamoto, K. (2008). The N-terminal region of an entomopoxvirus fusolin is essential for the enhancement of peroral infection, whereas the C-terminal region is eliminated in digestive juice. *J Virol* 82, 12406-12415.
- Tanada, Y., Himeno, M. & Omi, E. M. (1973). Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm. *J Invertebr Pathol* 21, 31-40.
-

- Tomalski, M. D. & Miller, L. K. (1991). Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* 352, 82-85.
- Ure, A. (2009). Tesis Doctoral: "Desarrollo de proteínas recombinantes para el diagnóstico y prevención de la fiebre hemorrágica argentina". Fac. Cs. Exactas. UNLP.
- Vialard, J. E., Yuen, L. & Richardson, C. D. (1990). Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, an entomopoxvirus protein. *J Virol* 64, 5804-5811.
- Wang, P. & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6977-6982.
- Wood, H. A., Hughes, P. R., and Shelton, A. (1994). Field studies of the cocclusion strategy with a genetically altered isolate of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* 23(2):211-219.

Conclusiones Generales
y Perspectivas

Conclusiones

- En ensayos de inoculación conjunta de EpapGV y AgMNPV en larvas de *A. gemmatalis* se observó un incremento de la virulencia de AgMNPV cuando se administraba en forma simultánea con EpapGV. Los efectos resultaron más notorios a dosis bajas de AgMNPV.
- Luego de la aplicación de la mezcla viral se observaron alteraciones sobre la membrana peritrófica del hospedador y variaciones en el perfil proteico obtenido de dichas membranas.
- La búsqueda de genes del tipo *vef* en el genoma de EpapGV no dió resultados positivos; estos fueron coherentes con el análisis de la secuencia completa que se obtuvo recientemente, el cual confirmó la ausencia de este gen
- Se determinaron las secuencias nucleotídicas completas de los genes *gp37*, *chiA* y *cath*. Se dedujeron las secuencias aminoacídicas de sus productos y se definieron motivos característicos.
- Los ORFs de *gp37* y *chiA* fueron clonados y expresados en células de insecto usando baculovirus recombinantes. Las proteínas obtenidas de ambos genes permitieron realizar estudios de caracterización estructural y funcional de los mismos.
- Este trabajo constituye el primer análisis de GP37 en granulovirus. La reactividad cruzada de esta proteína con anticuerpos específicos contra las fusolinas de entomopoxvirus confirmaron la similitud aminoacídica descrita entre éstas y las GP37 baculovirales.

- Los recombinantes obtenidos con los genes de *gp37* y *chiA* de EpapGV permitieron evaluar el efecto de la sobre-expresión proteica de los mismos cuando son administrados vía oral.
- La obtención de un virus recombinante AcMNPV con un gen marcador (GFP) permitió analizar indirectamente el efecto de la alteración de la membrana peritrófica de larvas de AgMNPV, producida por la acción de la quitinasa de EpapGV.
- La presencia de inclusiones proteicas detectadas mediante microscopía electrónica hace suponer la cristalización de GP37 de EpapGV. La ausencia de reactividad con anticuerpos específicos puede haberse debido a la escasa cantidad de cristales presentes en preparados de OBs obtenidos de larvas infectadas con este virus.
- El uso de las secuencias disponibles de estos genes permitió la realización de un análisis filogenético, que en base a los resultados obtenidos hace posible plantear nuevos eventos de transferencia genética entre los baculovirus, los entomopoxvirus y las bacterias.

Perspectivas

Los ensayos *in vivo* utilizando mezclas virales permiten evaluar el tipo de interacciones existentes entre sus componentes y determinar la viabilidad de formulaciones que contengan más de un agente de biocontrol. Actualmente se conocen numerosos baculovirus de hospedadores que coexisten en un mismo nicho ecológico generando perjuicios a los cultivos. El hallazgo de interacciones que optimicen la actividad insecticida como la demostrada en este estudio entre EpapGV cuando es aplicado en forma conjunta con AgMNPV sobre *A. gemmatalis* permite el diseño de estrategias de aplicación conjunta que por un lado amplía el número de plagas a controlar con una misma aplicación, y por el otro incrementa su efectividad como agente de control.

Otra alternativa para optimizar la acción de los baculovirus en el control de especies plaga se basa en su modificación genética. En este sentido, se obtuvieron AcMNPVs recombinantes que expresan los genes gp37 y chiA de EpapGV, sobre-expresados bajo el promotor de poliedrina, que podrán ser empleados en ensayos sobre especies permisivas a la infección por AcMNPV (como por ejemplo *Rachiplusia nu*, plaga polífaga y clave en el cultivo de girasol), con el fin de evaluar su potencial de utilización.

En forma indirecta se logró evaluar el efecto de la quitinasa de EpapGV en el incremento de la virulencia de AgMNPV y sobre membranas peritróficas de las larvas tratadas. Tales efectos no han podido ser verificados aún con el AcMNPV que expresa GP37 de EpapGV. Cabe considerar que ambas proteínas, así como

CATH, podrían interactuar en ese proceso. Por lo tanto, será necesario evaluar su efecto en inoculaciones conjuntas y generar nuevos recombinantes que expresen estos genes en combinaciones y el bloque de los genes *gp37*, *chiA* y *cath*. Estas actividades se verán facilitadas sobre la base de las herramientas generadas en este trabajo.

Por otra parte, no pudo asociarse los cuerpos presentes en mezclas de OBs de EpapGV con la proteína GP37. En este sentido será necesario obtener anticuerpos específicos que permitan completar los estudios de localización subcelular y/o su posible asociación con el cuerpo oclusión viral.

Recientemente se ha obtenido un nuevo vector para permitir la expresión de genes de interés en el genoma de AgMNPV. Los genes clonados y caracterizados en esta tesis, podrán ser utilizados en la generación de nuevos recombinantes AgMNPV con eficiencia mejorada genéticamente.

