Tesis de Posgrado

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

Goldberg Cavalleri, Alina Viviana

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Goldberg Cavalleri, Alina Viviana. (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. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3582_GoldbergCavalleri.pdf

Cita tipo Chicago:

Goldberg Cavalleri, Alina Viviana. "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 de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3582_GoldbergCavalleri.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**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 presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autor: Lic. Alina Viviana Goldberg Cavalleri

Director: Dr Víctor Romanowski
Directora Asistente: Ing. Agr. Alicia Sciocco de Cap

Lugares de Trabajo
Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA Castelar
Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, FCE, UNLP

2003

W 3 5 8 2

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi familia. Por todo. Por su constante apoyo sin el cual hubiese sido imposible realizar este trabajo.

Quisiera agradecer a mis directores Dr Victor Romanowski e Ing. Alicia Sciocco-Cap, por darme la oportunidad de realizar el proyecto. Y por haberme guiado y brindado su experiencia. También quiero agradecerles por el buen trato que tuvieron, lo cual ayudó a que pueda disfrutar del trabajo.

Al Dr Daniel Ghiringhelli, por su guía y aporte en el último capítulo de la tesis. Por su constante predisposición. Y por ayudarme siempre en mis enredos con la computadora.

A los tres, por la paciencia que tuvieron ante mis reiteradas impaciencias.

A Alicia Sciocco-Cap, por estar siempre. Por su invaluable ayuda tanto en lo profesional como en lo personal, fue un privilegio trabajar con ella todos estos años. Creo que nunca voy a encontrar palabras para agradecerle.

A Brian Federici, por introducirme en la patología de insectos, por el placer que me significó aprender en cada una de sus charlas.

A Adela Olmedilla Amal, por su gran ayuda en los experimentos de hibridación in situ.

A Julie Olszewski, por su desinteresada ayuda en los últimos experimentos.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya se fueron Eloisa, Alejandra M, Cristina, Diego, Marina, Agustín, Claudia, Ramiro, Alejandra T. A Alejandra M por los experimentos compartidos, por su buena predisposición a enseñarme muchas de las técnicas que utilicé en la tesis.

A mis compañeros del IBBM, los verdes, los del medio y los del fondo, por la ayuda recibida y todo lo compartido.

A Carlitos, Caty y Rubencito, por la gran ayuda en las autoclavadas, medios, competentes, arreglos y por la buena predisposición a realizar cualquier pedido.

A las autoridades del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola y del Instituto de Biotecnología del INTA, por el trato recibido.

A mis compañeros del IMYZA, y de Biotecnología, Guillermo Cap, Marcelo, Gabriela, La Pepa, Felix, Silvia, Marisa F, Alicia A, por la ayuda recibida. A Guillermo y La Pepa, por los almuerzos compartidos. Siempre los extraño.

A María, Débora y Marcelo por la buena predisposición y colaboración con las Epinotias.

A mis viejas y muy queridas amigas Mariana, Mariela, Ale, Tamara, Cecilia, Laura, Ana, Valeria, Carolina, La Tana y Laura M.

Al clan Arana, Lili, Eloísa, Dalmiro y Anahí, por recibirme todas las semanas, por hacerme sentir una mas de la casa, por los té de tilo de todas las roches. Gracias a ellos pude trabajar todos los días en La Plata.

A Victoria Micelli, al igual que la familia Arana, por brindarme su casa en La Plata (las casas, fueron varias) desde los primeros años, cuando aún casi ni nos conocíamos.

A Eloisa, por la ayuda de todos lo días, por acompañarme en todos mis estados de ánimos, fue también un placer trabajar con ella.

A Mariano y Claudia, por los viajes compartidos (Bs AS-La Plata y viceversa), que me salvaron de tomar el poco cómodo y agradable tren de Constitución. También gracias a ellos pude trabajar el último período de la tesis en La Plata.

RESUMEN

El "barrerador de los brotes", *Epinotia aporema*, es una de las principales plagas de leguminosas en América del Sur. Las larvas de esta plaga, son infectadas por un granulovirus (EpapGV) el cual representa una de las principales causas de epizootias esporádicas en poblaciones de *E. aporema*. En el trabajo de tesis, se realizaron estudios biológicos y patológicos sobre EpapGV en larvas del insecto huésped, los cuales establecieron una base de conocimientos importante para determinar distintos aspectos de la interacción virus-huésped. Ensayos en laboratorio demostraron que el virus es altamente virulento y especie específico, lo que indica que es un buen candidato para ser utilizado en el control biológico de la plaga. Larvas infectadas con EpapGV sufrieron un retraso en el desarrollo, siendo inhibido el proceso de muda. Además, exhibieron un incremento en el peso mayor al observado en larvas sin infectar. Esto pudo deberse a la expresión del gen viral *egt* cuyo producto altera la fisiología de los insectos. Mediante exámenes de tejidos al microscopio óptico y electrónico, por medio de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (ARN-ARN), se observó que EpapGV causa infecciones de tipo poliorganotrópicas. Los principales tejidos afectados fueron el adiposo, la epidermis y la matriz traqueal. Luego de infectar el intestino medio, la diseminación del virus hacia otros tejidos se produce aparentemente vía hemolinfa. Los viriones producidos en células infectadas se acumulan entre la membrana plasmática y la lámina basal, lo que indica que dicha lámina constituye una barrera efectiva para diseminación de la infección. Mediante la técnica de inmuno-oro se detectó expresión de granulina dentro del núcleo, lo cual indica que la expresión de genes tardíos ocurre luego de la ruptura de la membrana nuclear. Análisis computacional de las secuencias de los extremos de clones de la biblioteca genómica de EpapGV generada en el laboratorio, permitieron identificar una posible proteína de fusión (*Epap-F*). El gen completo fue subclonado, secuenciado y analizado mostrando motivos característicos de las proteínas F de *Nucleopolyhedrovirus* (involucradas en la entrada del virus a una nueva célula). Sin embargo, no se había demostrado la funcionalidad de proteínas F de *Granulovirus*. Mediante la técnica de *Northern blot* se confirmó la expresión de dicho gen y se estudió su expresión temporal. Posteriormente, a través de la técnica de RACE, se mapeó el extremo 5' no codificante demostrándose que la transcripción del gen se realiza a partir de un motivo típico de transcripción tardío (CAGT) y también a partir de un motivo no convencional ATGC. Para demostrar la actividad fusogénica de dicha proteína se realizó un ensayo de actividad transiente *in vitro*. Para ello, se transfectó un cultivo de células (*Spodoptera frugiperda*, Sf21) con un plásmido conteniendo el ORF completo de Epap-F bajo el promotor ie-1 de *Anticarsia gemmatilis* MNPV, se modificó el pH del medio a 5 y se registró formación de sincicios. Con el fin de producir anticuerpos que reconozcan a Epap-F, se expresó dicha proteína utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Los anticuerpos serán utilizados para la determinación de la ubicación subcelular de dicha proteína.

ABSTRACT

The bean shoot borer, *Epinotia aporema*, is a major pest of legume crops in South America. Larvae of this pest are infected by a granulovirus (EpapGV) that is the most important cause of sporadic epizootics in *E. aporema* populations. This PhD dissertation deals with the biological and pathogenesis studies on EpapGV on the host larvae that provide the basic information of the virus-host interaction. The high specificity and pathogenicity indicate that EpapGV is a good candidate for the biological control of this pest. Larvae infected by EpapGV, suffered a retardation of development and typically failed to pupate, but exhibited a weight increase greater than that of healthy larvae. It is possible that the effect observed was due to the expression of the *egt* viral gene whose product alters the insect physiology. Using immunohistochemistry and *in situ* hybridization (by both, light and electron microscope) we observed that EpapGV caused a polyorganotropic infection. We found that the fat body, epidermis and tracheal matrix were the main tissues infected. Virions liberated from the midgut may gain entry to other tissues via circulation through hemolymph. Virions produced by infected cells accumulated between the plasma membrane and basal lamina, this indicated that the basal lamina is an effective barrier for the spread of the infection. Granulin was detected in the nucleus by immuno-gold staining, indicating that late gene expression occurred prior to nuclear membrane disruption. Computer-assisted analysis of the sequence of the end sequences EpapGV clone library produced in our lab, revealed a putative fusion protein (*Epap F*). The complete gene was subcloned, sequenced and analyzed revealing aminoacids motif of characteristic for *Nucleopolyhedrovirus* F proteins (involved in virus entry to a new cell). However no functional F protein had been demonstrated in any *Granulovirus*. *Northern blots* were used to confirm the transcription of this gene and to study its temporal expression. Employing the RACE technique we mapped the 5' untranslated region and we found that the transcription starts at a typical late gene (CAGT) motif and also at an unconventional (ATGC) motif. In order to demonstrate the fusion activity of Epap-F, we carried out a transient expression assay. To this end, a *Spodoptera frugiperda* (Sf 21) cell line was transfected with an expression plasmid containing the Epap-F ORF under the control of the *Anticarsia gemmatilis* MNPV ie-1 promoter and, after lowering the pH to 5 many extensive syncytia were observed. With the aim of producing antibodies against Epap-F, the protein was expressed using a baculovirus expression system. The antibodies will be used to determine the subcelular localization of this protein.

INDICE

CAPÍTULO I Introducción General

Cultivo de soja	1
<i>Epinotia aporema</i>	1
Control Microbiano de Plagas	3
Control biológico de plagas: Uso de baculovirus	4
Baculovirus	5
Estructura de los baculovirus	5
Regulación de la transcripción de baculovirus	9
Reseña del uso de los baculovirus como bioinsecticidas	10
Virus de la granulosis de <i>Epinotia aporema</i>	11
OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS	12

CAPÍTULO II Determinación del potencial de EpapGV como agente de control biológico

Introducción	14
Materiales y Métodos	17
Resultados	21
Discusión	25

CAPÍTULO III Estudio sobre la patología producida por EpapGV en larvas del huésped

Introducción	29
Materiales y Métodos	35
Resultados	45
Discusión	54

CAPÍTULO IV Estudio molecular y funcional de una posible proteína de fusión de EpapGV (Epap-F) involucrada en la patogénesis

Introducción	59
Materiales y Métodos	64
Resultados	76
Discusión	89

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

93

BIBLIOGRAFÍA

95

ANEXO – Materiales y Métodos generales

104

CAPÍTULO I

Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

Cultivo de soja

La soja es un cultivo trascendente en la economía argentina. En las últimas décadas ha sido uno de los productos agrícolas que aportó el mayor beneficio para la economía nacional. Esta conclusión surge de su creciente participación en el área agrícola, en la producción del sector y en las exportaciones. La expansión del área destinada a la soja, acompañada de mejoras de productividad, dieron por resultado un impetuoso aumento de la producción de 4.2 millones de toneladas en la campaña 1981/2 (lo cual representa un 12% con relación a la producción de cereales y oleaginosas) a 30 millones de toneladas en la campaña 2001/02 (representando un 43% de la producción total de dichos cultivos) (www.mecon.gov.ar, 2002).

Desde principios de la década de los 80, las exportaciones del "complejo soja" (granos, aceites y pellets) han sido siempre crecientes, lo cual ha posibilitado que desde hace una década la soja lidere el ranking de las exportaciones del país. En este sentido, se calculó que en el 2002, la exportación del complejo de este cultivo representó un 23-25% del total de las exportaciones nacionales (www.mecon.gov.ar, 2002).

Las pérdidas de producción y calidad de granos de soja son producidas, principalmente, por la acción de insectos entre los cuales se consideran como plagas clave las isocas defoliadoras (*Anticarsia gemmatalis*, *Rachiplusia nu*), las chinches (*Nezara viridula* y *Piezodorus guildini*) y el "barrenador de los brotes" (*Epinotia aporema*) (Giorda y Baigorri, 1998).

Epinotia aporema

El "barrenador de los brotes", *Epinotia aporema* Walsingham 1914 (Lepidóptera: Tortricidae), presenta una amplia difusión en América constituyendo una de las principales plagas de leguminosas desde México hasta Argentina (Iede y Foerster, 1982). En nuestro país se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, y la región del NOA. Además de soja, este insecto perjudica otras leguminosas de importancia económica tales como poroto, arveja, lenteja, garbanzo y alfalfa (Villata y Ayessa, 1994).

La hembra coloca los huevos en los brotes jóvenes. Las larvas recién nacidas se alimentan preferentemente de brotes, tanto terminales como laterales. Unen las hojas con hilos sedosos que ellas segregan, dificultando el desarrollo normal de las mismas. El brote atacado puede secarse y, entonces, las larvas se trasladan a brotes vecinos o hacen galerías en pecíolos, ramas y tallos, deteniendo el crecimiento de la planta (Rojas, 1998) (Fig. I.1). Asimismo, en el período reproductivo atacan pedúnculos florales, vainas y granos en diferentes estados de desarrollo, pudiendo producir caída de flores y chauchas. Para empupar, generalmente se entierran a 1 o 2 cm de profundidad.

Fig. I.1. Daño producido por *Epinotia aporema*. A. Larva barrenando el tallo. B. Primer estadio larval en brote de soja. C. Daño en axila.

E. aporema transcurre el invierno en diapausa larval resguardada en hojas y brotes de sus plantas hospedadoras alternativas.

En las últimas décadas este insecto ha alcanzado altos niveles poblacionales, factor asociado al rápido incremento del área cultivada con soja y leguminosas forrajeras en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Además, existen muy pocos parasitoides que la controlen naturalmente en forma efectiva (Zerbino y Alzugaray, 1996).

Debido a la protección que le brindan al "barrenador de los brotes" las hojas acartuchadas, vainas y brotes, los insecticidas que permiten un control eficiente son aquellos que tienen propiedades sistémicas o de penetración (generalmente fosforados o mezclas de fosforados y piretroides), usados en dosis mayores a las necesarias para el control de orugas desfoliadoras. En el Cuadro I.1, se muestran los valores comparativos de cantidades de productos químicos usados para el control de *E.*

aporema en relación con lo que se usa para otros insectos habituales de los cultivos de soja (*Anticarsia gemmatalis*, *Rachiplusia nu*).

Cuadro I. 1. Lista parcial de productos y dosis registradas usados para el control de *E. aporema*, *Anticarsia gemmatalis* y *Rachiplusia nu*. Dosis expresadas en cm³/ha.

Principio activo	<i>Rachiplusia nu</i>	<i>Epinotia aporema</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Acefato 75%	1000	1300	700
Clorpirifos 48% E	400-500	1000-1100	600-650
Fentoato 50%	600	1400	
Metamidofos 60% L	650	1000-1200	
Monocrotofos 60% L		800-1000	
Monocrotofos + Deltametrina		700 + 100	
Monocrotofos + Cipermetrina		750 + 650	
Monocrotofos + Alfametrina		750 + 600	
Triazofos 40%	800	1100	1000
Alfametrina 15% E	25-30		35
Alfametrina + Clorpirifos		600 + 700	
Deltametrina 5% E	30-35		100-120
Deltametrina + Clorpirifos		1000 + 700	
Cipermetrina 5% + Clorpirifos 50% E	250	600	350
Cipermetrina 5% + Triclorfon 50% E	350	600	350

FUENTE: (Giorda y H. Baigorri, 1998)

Control Microbiano de Plagas

Desde finales de la Segunda Guerra Mundial, el control de poblaciones de insectos plaga se realiza mediante la aplicación de pesticidas químicos. Si bien estos productos alcanzaron un éxito comercial para el control de plagas de interés agrícola, médico o veterinario, su utilización no está exenta de problemas. La mayoría son de amplio espectro, algunos no son biodegradables y otros tienen elevada persistencia en el medio ambiente. El uso indiscriminado de estos compuestos ha roto el equilibrio de las comunidades de insectos y, como consecuencia, algunos fitófagos inicialmente sin interés económico adquirieron cierto nivel de densidad poblacional alcanzando el umbral de daño económico. Por otro lado, el uso continuo de los insecticidas químicos sobre las poblaciones de plagas ejerció una fuerte presión de selección favoreciendo a los individuos más resistentes. Como consecuencia, se incrementaron las dosis y el

número de aplicaciones necesarias para su control. Ello condujo a la acumulación de residuos químicos hasta niveles perjudiciales en el medio ambiente y en los distintos eslabones de las cadenas tróficas.

Es dentro de este contexto que surge el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP). El concepto de MIP fue articulado originalmente entre entomólogos (Stern *et al.*, 1959), para luego extenderse progresivamente a la protección vegetal en un sentido amplio. El objetivo no es desterrar el uso de insecticidas químicos, sino reducir su empleo complementándolo con otras estrategias de control. Entre las tácticas que involucra el MIP se cuenta, además del control químico, con prácticas culturales y de control biológico de plagas. Este último se relaciona con el uso de los enemigos naturales: predadores, parásitos, parasitoides y patógenos. En particular, el uso o manejo de patógenos de insectos (entomopatógenos) para reducir las poblaciones y los efectos de las plagas, define una rama del control biológico conocida como control microbiano. En dicha categoría se incluyen a virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos. Debido a su persistencia en el ambiente en ausencia de hospedantes y a su breve tiempo generacional, los mismos se consideran con mayor potencialidad de éxito que otros enemigos naturales de las plagas para ser utilizados como alternativa de control.

Los baculovirus (virus patógenos de insectos) junto con la bacteria esporígena *Bacillus thuringiensis* y algunas especies de hongos representan los tres grupos de entomopatógenos que mayor atención han recibido para su desarrollo como bioinsecticidas.

Los baculovirus son una parte integrante de los ecosistemas y desempeñan un importante papel en la regulación de las poblaciones de insectos, principalmente lepidópteros.

Control biológico de plagas: Uso de baculovirus

Los miembros de la familia Baculoviridae son altamente específicos, infectando solo a organismos del phylum Artropoda y mayoritariamente de la clase Insecta (Groner, 1986). La mayoría de los aislamientos presentan un reducido espectro de huéspedes, sin ser afectadas las plantas, los vertebrados incluyendo al hombre, los insectos benéficos que son parasitoides y depredadores de las plagas u otros insectos benéficos como las

abejas. En cuanto a las normas de bioseguridad, esto permite desarrollarlos como insecticidas, con un menor número de restricciones.

Otras ventajas de los baculovirus son su alta virulencia y la existencia de un fenotipo viral ocluido en una matriz proteica (*occlusion body*, OB) especializado en la transmisión horizontal del virus, el cual se produce en grandes cantidades. Este fenotipo es capaz de persistir en la naturaleza durante largos períodos de tiempo (principalmente en el suelo y hojarasca) constituyendo una fuente de inóculo para generaciones subsiguientes de la plaga. Por otro lado, la persistencia en el medio ambiente permite prolongar el efecto de una aplicación o el establecimiento de un factor regulador de las poblaciones del insecto huésped. Este último fenómeno se presenta cuando el baculovirus provoca epizootias naturales, lo cual es un factor dependiente de la densidad poblacional del insecto (Kalmakoff y Crawford, 1982).

Por último, la alta producción de cuerpos de inclusión por larva, sumado a la factibilidad de producción a gran escala, hace de los baculovirus organismos potenciales para el desarrollo de producción con fines industriales.

Baculovirus

Estructura de los baculovirus

La familia *Baculoviridae* comprende un grupo de virus ocluidos específicos de artrópodos. Dentro de esta familia, se distinguen dos géneros fácilmente diferenciables por la forma y el tamaño de sus cuerpos de inclusión y por aspectos citopatológicos de interés taxonómico: *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs, virus de la poliedrosis nuclear) y *Granulovirus* (GVs, virus de la granulosis) (Blissard *et al.*, 2000). Los NPVs presentan cuerpos de inclusión de forma poliédrica, de 1 a 15 μ de diámetro. Los GVs, en cambio, presentan cuerpos de inclusión elipsoidales y pequeños ($< 1 \mu$ m) (Fig.1.2).

Género *Granulovirus*

Género *Nucleopolyhedrovirus*

Fig. 1.2. Microscopía electrónica mostrando la morfología de un granulovirus (GV) y de un nucleopoliedrovirus (NPV). Barra = 0.5 y 1 μ en GV y NPV, respectivamente.

La habilidad de los baculovirus para replicarse eficientemente dentro del hospedador y expandir la infección dentro de una población de insectos se debe principalmente a la presencia de dos fenotipos distintos de viriones (o partículas infectivas) dentro del ciclo de vida del virus: virus ocluidos (*occlusion-derived virus*, ODV) responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad entre los individuos susceptibles de una población, así como de iniciar la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón (Granados y Williams, 1986) y virus brotantes (*budded virus*, BV), responsables de transmitir la infección de una célula a otra, de un tejido a otro, dentro del insecto.

Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer un genoma compuesto por una molécula de ADN circular cuyo tamaño varía entre 90 y 180 kpb, empaquetada dentro de una cápside proteica (Volkman *et al.*, 1995; Blissard *et al.*, 2000). La función de la nucleocápside (formada por el ADN y la cápside proteica) es la de transportar la información genética altamente compactada, a la célula huésped. El ADN genómico se encuentra condensado alrededor de 100 veces y esto es posible gracias a una proteína básica, rica en arginina, denominada P6.9 la cual se une al ADN neutralizando sus residuos ácidos favoreciendo la compactación del DNA. Aparentemente, eventos de fosforilación y desfosforilación juegan un papel clave en la regulación de esta proteína provocando el desempaquetado del DNA al ser fosforilada (Funk *et al.*, 1997; Caballero *et al.*, 2001) (Fig. I.3).

Entre las proteínas presentes en la cápside, se distinguen la VP39 y la fosfoproteína PP78/83 que intervienen activamente en el desplazamiento de la nucleocápside en la célula huésped gracias a su asociación con filamentos de actina (Charlton y Volkman, 1995).

Asociada a la cápside también se encuentra una proteína con actividad quinasa que cataliza la fosforilación de la proteína básica P6.9 produciendo el desempaquetamiento del ADN y su liberación en el núcleo de la célula huésped para iniciar la replicación (Wilson y Consigli, 1985; Miller *et al.*, 1983).

En un momento dado de la replicación, las nucleocápsides adquieren una envoltura lipoproteica para dar paso a la formación de los viriones, principales elementos infecciosos de los baculovirus (Federici, 1986). El origen de esta envoltura, y por lo tanto su composición de proteínas, lípidos y ácidos grasos, es distinta para cada uno de los fenotipos de viriones (ODV o BV) (Braunagel y Summers, 1994).

Los BVs se forman cuando las nucleocápsides brotan a través de la membrana plasmática de la célula en puntos concretos donde se encuentra insertada una glicoproteína codificada por el virus (Blissard y Rohrmann, 1990). Esta glicoproteína está involucrada en la entrada del virus a una nueva célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptor (Blissard y Wenz, 1992; Monsma y Blissard, 1995). En el caso del nucleopoliedrovirus *Autographa californica* (AcMNPV), se han encontrado una serie de proteínas asociadas a la envoltura de los viriones brotantes, sin embargo aún no es claro si son incorporadas al azar en el proceso de brotación o realmente cumplen un rol particular en la estructura o función del virión.

Algunas nucleocápsides permanecen en la célula adquiriendo una membrana lipoproteica dando lugar a la formación del fenotipo de virión ODV (Wood *et al.*, 1993). En los GVs cada virión contiene una sola nucleocápside, mientras que en los NPVs, los ODV pueden ser de dos tipos: los que contienen una sola nucleocápside por virión (denominados viriones simples), y los que contienen un número variable de nucleocápsides por virión (denominados viriones múltiples) (Fig.1.3).

El origen de dicha membrana no es aún claro. Algunos autores sugieren que es sintetizada *de novo* mientras que otros sostienen que el origen de la envoltura está asociada a la formación de microvesículas a partir de la invaginación de la membrana nuclear interna (Braunagel y Summers, 1994; Hong *et al.*, 1994).

Ambos fenotipos de viriones comparten la misma estructura de nucleocápside y llevan exactamente la misma información genética (Rohrmann, 1992; Blissard, 1996). Sin embargo, la diferente composición de lípidos, ácidos grasos y proteínas de la envoltura lipoproteica no solo es un reflejo de su distinta morfogénesis sino que, además, es un indicio de las diferentes funciones que ambos tipos de viriones cumplen en el ciclo biológico de los baculovirus. Mientras que la envoltura de los BVs está adaptada a expandir la infección dentro del insecto, la envoltura de los ODV está adaptada a interactuar con la estructura del granulo o poliedro, contribuye a la estabilidad del virión en el medio hostil del intestino y facilita la infección en células del intestino medio de las larvas. En una etapa tardía de la infección, los ODV son encapsulados dentro de una matriz proteica formando el cuerpo de oclusión (OB), compuesta principalmente por una proteína llamada poliedrina en el caso de los NPVs y granulina en el caso de los GVs (Fig.1.3). En los NPVs varios ODVs quedan ocluidos en la matriz proteica mientras que en los GVs se encuentra normalmente un solo virión por cuerpo de oclusión.

El OB es insoluble en agua, resistente a la putrefacción y a la desintegración por agentes químicos (Benz, 1987) y también a tratamientos físicos como la congelación, la desecación o la liofilización (Jacques, 1985). Estas características les confieren la capacidad de persistir en el medio una vez que son liberados del huésped y hasta ser consumidos por un nuevo insecto susceptible. Recubriendo a los cuerpos de ocusión, se encuentra una envoltura electrodensa compuesta por carbohidratos y proteínas (Caballero *et al.*, 2001).

Fig. I. 3. Características morfológicas y localización de las principales proteínas presentes en los baculovirus. Los GVs, presentan una única nucleocápside por cuerpo de inclusión. Los NPVs se dividen en SNPV (*single nucleocapsid NPV*) si poseen una nucleocápside por virión o MNPV (*multi nucleocapsid NPV*) si poseen varias nucleocápsides por virión.

En los OBs de algunos baculovirus, se encuentra además una proteína (enhancina) que actúa digiriendo las proteínas de alto peso molecular de la membrana peritrófica del tubo digestivo de los insectos (Lepore *et al.*, 1996), cuya acción aumenta la susceptibilidad de las larvas a las infecciones por baculovirus y disminuye su tiempo de supervivencia (Derksen y Granados, 1988; Gallo *et al.*, 1991).

Regulación de la transcripción de baculovirus

La expresión de genes virales está regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía. La expresión de los genes tempranos se produce previo a la replicación del virus. Durante esta fase se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del ADN viral y muchos de los transactivadores necesarios para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos. Estos genes son transcritos por la *RNA polimerasa II* de la célula huésped. Muchos de los promotores tempranos, se parecen a los promotores de la *RNA polimerasa II* y por lo general contienen un TATA *box* típico aproximadamente 30 nucleótidos antes del sitio de iniciación de la transcripción (Romanowski y Ghiringhelli, 2001). Frecuentemente se encuentra la secuencia conservada CAGT, similar a la de genes de insectos transcritos por la *RNA polimerasa II*, siendo el nucleótido A el correspondiente al inicio de la transcripción (Blissard y Rohrmann, 1990; Cherbas y Cherbas, 1993). Además, en algunos genes de expresión temprana, se han identificado ciertas secuencias consenso reconocidas por factores de transcripción eucarióticos: T/A GATA A/G y CACGTG (Kogan y Blissard, 1994; Kogan *et al.*, 1995; Pullen y Friesen, 1995b).

La expresión de los genes tardíos y muy tardíos se produce luego de la replicación viral. Aparentemente, la replicación del ADN es un prerequisite para el comienzo de la expresión de estos genes. Esto se apoya en la evidencia de que la inhibición de la replicación del ADN por afidicolina también bloquea la transcripción de este grupo de genes. (Miller, *et al.*, 1981). Salvo raras excepciones, la transcripción de estos genes se inicia en la primer A de la secuencia conservada TAAG. Esta secuencia se encuentra generalmente precedida por una A y menos frecuentemente por una T o G. La presencia de estos últimos nucleótidos esta asociada a promotores menos fuertes que los que contienen la secuencia ATAAG (Romanowski y Ghiringhelli, 2001).

En la fase tardía se expresan, entre otros, genes que codifican para proteínas estructurales dando comienzo a la etapa de ensamblaje de nucleocápsides en el núcleo de la célula infectada. (Fraser, 1986; Young *et al.*, 1993). La fase muy tardía se

caracteriza por la reducción o cesación de la transcripción de muchos de los genes tardíos y por la expresión en proporciones muy elevadas de genes tales como *poliedrina* o *granulina*, y de otras proteínas necesarias para formar los cuerpos de oclusión (Faulkner *et al.*, 1997; Braunagel *et al.*, 1999).

Reseña del uso de baculovirus como bioinsecticidas

La primera descripción de una enfermedad producida por un baculovirus fue realizada por un obispo italiano en el siglo XVI. Sin embargo, recién en el siglo XIX y gracias a las técnicas de microscopía, se correlacionó la aparición de cristales poliédricos con la enfermedad descrita anteriormente. A partir de las investigaciones realizadas en la primera mitad del siglo XX, se pudo determinar que los cristales poliédricos contenían partículas virales en forma de bastón y se iniciaron los primeros estudios bioquímicos sobre estos virus (Benz, 1986).

El potencial de los baculovirus para el control de insectos defoliadores fue reconocido a principios de la década de los cuarenta cuando una infección empezó a diezmar poblaciones del tentredínido exótico *Gilpina* (Diprion) *hercyniae*, en Canadá, con resultados notables (Cameron, 1973). Como disciplina propia, el estudio de la patología de insectos y su aplicación para el control biológico de poblaciones de plagas se inició a finales de los años cuarenta (Steinhaus, 1963). El desarrollo de los baculovirus como pesticidas biológicos estimuló la realización de estudios para comprender la biología molecular de estos virus, y esto a su vez despertó el interés en desarrollar bioinsecticidas a escala industrial.

En 1981, en Estados Unidos se desarrolló el primer formulado bioinsecticida que utilizó un baculovirus como ingrediente activo para la lucha contra *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Desde entonces se han comercializado distintos productos que utilizan aislamientos determinados de baculovirus efectivos en la lucha contra plagas, tanto en los ecosistemas agrícolas como en los forestales (Entwistle, 1998; Moscardi, 1999). Actualmente, hay comercializados más de treinta bioinsecticidas basados en baculovirus (Tabla I.1). El programa más importante de control de insectos plaga, mediante uso de baculovirus, se lleva a cabo en Brasil donde casi dos millones de hectáreas de soja son tratadas anualmente para el control del lepidóptero *Anticarsia gemmatilis* (Moscardi *et al.*, 2002).

En Argentina, el IMYZA-INTA (Castelar), desarrolló una formulación a base del virus de la granulosis de *Cydia pomonella*, constituyéndose en el primer baculovirus que cuenta con registro de uso comercial ante SENASA.

Tabla.I.1. Principales bioinsecticidas comerciales basados en baculovirus.

Insecto plaga	Virus	Registrado en	Cultivos
<i>Cydia pomonella</i>	CpGV	Argentina , UE, Canadá, EE.UU.	Manzana, Pera
<i>Plutella xylostella</i> ,	PxGV	China	Repollo
<i>Phthorimaea operculella</i>	PhopGV	Perú, Colombia, Ecuador, Bolivia, Egipto	Papa
<i>Helicoverpa zea</i> y <i>Heliothis virescens</i>	HZNPV	EE.UU.	Algodón
<i>Spodoptera exigua</i>	SeMNPV	EE.UU., U.E., India	Algodón, hortalizas, etc
<i>Spodoptera littoralis</i>	SlitNPV	UE	Algodón
Varios lepidópteros plaga	AcMNPV	EE.UU., Guatemala	Brócoli, algodón, tomate
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	OpMNPV	EE.UU.	Forestales
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	AgMNPV	Brasil	Soja
<i>Lymantria dispar</i>	LdMNPV	EE.UU.	Forestales

Virus de la granulosis de *Epinotia aporema*

En 1982 en Chile, se colectaron por primera vez larvas muertas de *E. aporema* con signos característicos de infección viral (Ripa, 1982). Por medio de estudios realizados en microscopio óptico se detectaron cuerpos de inclusión en tejidos de estas larvas y se asoció la patología a una infección producida por baculovirus.

En Oliveros (Santa Fe, Argentina), se realizaron estudios sobre la dinámica poblacional de *E. aporema* en cultivos de soja y se identificaron sus principales agentes de control biológico natural. Producto de dichas investigaciones, se detectó un granulovirus con alta incidencia en la mortalidad natural de larvas de dicha especie (Diez y Díaz, 1989), el cual fue denominado posteriormente EpapGV.

Ensayos preliminares a partir del aislamiento argentino, indicaron una alta virulencia de EpapGV sobre los diferentes estadios larvales de la plaga, sugiriéndose que el mismo podría poseer potencialidad de uso para el control de *Epinotia aporema* en áreas de alta incidencia del insecto (Moscardi y Sosa Gómez, 1992).

En 1996, en el marco de un convenio de colaboración entre el IBBM (Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP) y el IMYZA (INTA Castelar) se inicia el proyecto multidisciplinario "Caracterización de un virus de la granulosis y desarrollo de un insecticida para el control biológico de *Epinotia aporema*". Este proyecto contempló la caracterización morfológica, bioquímica y biológica de EpapGV.

Al inicio de este proyecto sólo se contaba con antecedentes de estudios a nivel de microscopía óptica y evaluaciones preliminares sobre el posible potencial del virus en el control de la especie homónima. Se desconocía, entonces, el grado de virulencia de EpapGV y la patología producida por este virus en larvas de la especie homónima. Es dentro de este contexto que surge el trabajo de mi Tesis donde se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS

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.

Objetivos particulares

1- Determinar el potencial de EpapGV como agente de control biológico

- Estimar la virulencia de EpapGV en larvas de *E. aporema*.
- Estudiar su actividad biológica sobre otros lepidópteros plaga.

- Analizar los efectos de EpapGV en el crecimiento y desarrollo larval.

2 - Estudiar la patología producida por EpapGV en larvas del huésped

- Determinar el tropismo tisular y el curso temporal de la infección.
- Estudiar los cambios histopatológicos producidos por el virus.
- Analizar las posibles vías de infección sistémica dentro del insecto.

3 - Estudio molecular y funcional de una posible proteína de fusión de EpapGV (Epap-F) involucrada en la patogénesis

- Identificar, subclonar y secuenciar el gen de dicha proteína.
- Realizar un análisis transcripcional.
- Estudiar la posible actividad fusogénica de Epap-F.

CAPÍTULO II

**Determinación del potencial de EpapGV
como agente de control biológico**

INTRODUCCIÓN

Determinación del grado de virulencia de un baculovirus

La susceptibilidad del huésped depende del aislamiento viral, del insecto (estado de desarrollo), de la dosis suministrada y de otros factores tanto nutricionales y como ambientales. Ante iguales condiciones de ensayo, existe una amplia evidencia de que diferentes estadios larvales varían en susceptibilidad a los patógenos y que, en algunos casos, el insecto incrementa su resistencia con el desarrollo. En el caso de los baculovirus, se observa que los estados inmaduros son los más susceptibles a la infección, aunque existen antecedentes de susceptibilidad en adultos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los adultos infectados no muestran diferencias en longevidad ni en fecundidad, tal como ocurre en el caso de otras virosis entomopatógenas (Tanada y Kaya, 1993).

El éxito del uso de baculovirus como agentes de control de plagas depende, principalmente, de sus características intrínsecas. En este sentido es importante conocer tanto el grado de virulencia como la velocidad de acción del virus sobre la población de insectos susceptibles.

Los baculovirus con menor virulencia y de acción más lenta, estarían más adaptados a ser utilizados en sistemas forestales, los cuales resisten un mayor nivel de defoliación sin sufrir una pérdida económica importante. Mientras, aquellos más virulentos y de acción rápida son adecuados para el control de plagas en cultivos de ciclo anual que no soportan grandes niveles de defoliación (Anderson y May, 1981; Alves y Lecuona, 1998). Estos últimos no son tan eficientes a largo plazo, ya que descensos bruscos en la población del huésped podrían llevar a la extinción del patógeno, en caso de que éste no disponga de mecanismos de persistencia adecuada.

La adquisición de una dosis efectiva es un factor crítico para el éxito de cualquier insecticida. En los insecticidas químicos que actúan por contacto, esta se consigue cuando el insecto se mueve por la superficie vegetal tratada. En cambio, la dosis efectiva de un baculovirus se consigue cuando el insecto ingiere una cantidad de virus suficiente para iniciar una infección sistémica (Black *et al*, 1997).

Los parámetros más utilizados para estimar la susceptibilidad de un insecto a un baculovirus son la Dosis Letal Media (DL_{50}) y el Tiempo de Supervivencia Medio (TS_{50}).

La DL_{50} se refiere al número de cuerpos de oclusión necesarios para matar al 50% de la población experimental, mientras que el TS_{50} se refiere al tiempo en el cual sobrevive el 50% de la población experimental luego de ingerir una dosis de virus determinada. Tanto la DL_{50} como el TS_{50} varían con la especie, estadio, condiciones fisiológicas, sexo, condiciones de temperatura, etc. (Ibarra y Castro, 2001).

La realización de bioensayos para la estimación de los parámetros mencionados es de importancia fundamental en la caracterización biológica de un aislamiento viral y brinda información sobre el potencial de un virus para ser utilizado como bioinsecticida. Además, es la única herramienta disponible para monitorear la calidad de un producto ya desarrollado, en relación con su actividad insecticida (Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

Efecto de los baculovirus en el crecimiento y desarrollo larval

Entre las características patológicas de ciertos baculovirus, se destaca su habilidad en retrasar o suprimir el desarrollo normal de los insectos infectados. Esto constituye una estrategia de supervivencia del virus ya que al afectar el metabolismo del huésped y prolongar su etapa larval, el virus dispone de más tiempo para llevar a cabo un mayor número de eventos de replicación y producción de progenie (O'Reilly y Miller, 1989; Park y Burand, 1996).

Sin embargo, desde el punto de vista del control de plagas, esta característica constituye una desventaja ya que la larva sigue alimentándose provocando daños en el cultivo.

En el caso particular de EpapGV, al no disponer de antecedentes en cuanto a su actividad biológica, consideramos de interés evaluar el comportamiento del huésped ante el suministro de diferentes dosis del virus.

Espectro de huéspedes

El espectro de huéspedes de un virus está determinado por su habilidad para penetrar en células o tejidos de uno o más hospederos, replicarse y producir una nueva progenie viral infecciosa (Ibarra y Castro, 2001).

Para algunos virus como los de *Lymantria dispar* (LdMNPV) o *Spodoptera exigua* (SeMNPV), el espectro de huéspedes está confinado a una sola especie de insectos,

mientras que otras especies virales -como el NPV de *Autographa californica* (AcMNPV)- pueden replicarse en una amplia gama de huéspedes (Groner, 1986; Hostetter y Puttler, 1991). Entre los GVs conocidos, la infección cruzada es menos frecuente que entre los NPVs, pero también puede ocurrir, como en el caso de los GVs de *Xestia c-nigrum* (XnGV; Goto *et al.*, 1992) o de *Agrotis segetum* (AgseGV; Zethner, 1980).

El hecho de que un virus pueda replicarse en más de una especie de insecto, no implica que los valores de DL_{50} sean similares para cada huésped. De ahí que se pueda establecer una distinción entre el espectro de huéspedes biológicos, que comprenden a todas las especies que pueden ser infectadas en el laboratorio, y el espectro de huéspedes económico, que está restringido a aquellas especies que pueden ser controladas de forma efectiva mediante la aplicación de cantidades de virus económicamente aceptables (Black *et al.*, 1997)

La especificidad representa una gran ventaja en términos de bioseguridad, ya que no ofrece riesgos para el hombre, animales domésticos y enemigos naturales. Sin embargo, a veces tal especificidad es comercialmente desfavorable ya que el bioinsecticida no es capaz de combatir el complejo de plagas que normalmente ataca un cultivo.

En este contexto, un factor importante a tener en cuenta es conocer cómo se acopla el espectro de huéspedes de un baculovirus al complejo de plagas existentes en un cultivo determinado. En el caso de la soja y otras leguminosas, si bien *Epinotia aporema* es una de las principales plagas, estos cultivos son también atacados por otros insectos lepidópteros tales como *Anticarsia gemmatilis*, *Rachiplusia nu* o *Spodoptera frugiperda*. Es por ello que además de conocer la actividad biológica de EpapGV sobre su huésped homónimo, se contempló también conocer el grado de virulencia del virus sobre los insectos mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Cría artificial de *E. aporema*

El establecimiento de la colonia de *E. aporema* se realizó a partir de larvas colectadas en Oliveros (Santa Fe), Manfredi (Córdoba) y Castelar (Buenos Aires). Las larvas empleadas tanto en la multiplicación del virus como en los estudios posteriormente realizados, fueron provistas por el Insectario del IMYZA (INTA).

La cría de insectos se realizó bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (50-70%) y fotoperíodo 14:10 h L/O). Los adultos se ubicaron en recipientes de plástico de 2 litros de capacidad, forrados interiormente con papel toalla como superficie de ovoposición. Los mismos fueron alimentados mediante el suministro de una solución de miel al 10%. Los papeles conteniendo desoves fueron cortados en tiras de aproximadamente 5 x 3 cm y colocados en recipientes plásticos (1 litro de capacidad) que contenían en su interior cubos de dieta artificial (Green et al., 1976). Las larvas eclosionadas se mantuvieron en dichos recipientes hasta alcanzar el estado pupal, siendo posteriormente removidas y sexadas. Un total de veinticinco parejas fueron colocadas en cada jaula de oviposición, dando continuidad a la cría.

II.2. Multiplicación del virus sobre el hospedador natural

El material objeto de estudio fue provisto gentilmente por la Prof. Sara Lorenzatti de Diez y el Ing. Juan C. Gamundi (E.E.A. Oliveros, INTA Santa Fe). Se recibieron larvas de *E. aporema* colectadas en campos de soja de la estación experimental, las cuales fueron analizadas mediante microscopía óptica por contraste de fases, con el fin de identificar preliminarmente el agente causal de mortalidad. Una de las larvas infectadas presuntamente por granulovirus, fue macerada en agua destilada. Una alícuota de la suspensión resultante fue utilizada como fuente de inóculo inicial (preparación cruda, no purificada). Amplificaciones posteriores se efectuaron con inóculos purificados y titulados mediante el uso de una cámara Petroff-Hausser (profundidad: 0.02 mm).

La multiplicación masiva del virus se realizó sobre larvas de *E. aporema* de cuarto estadio, las que fueron transferidas a bandejas plásticas de 9 x 14 cm conteniendo dieta artificial (sin formaldehído) contaminada superficialmente con cuerpos de inclusión (10^4

gránulos/mm²). En cada caja de multiplicación se colocaron aproximadamente 200 larvas. Las larvas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad relativa (50%), hasta el momento de recolección del material infectado.

II.3. Aislamiento y purificación de cuerpos de oclusión y partículas virales

El aislamiento de los cuerpos de oclusión o gránulos se realizó a partir de larvas muertas, macerándose los cadáveres en agua destilada (100 larvas por cada 200ml de agua), durante tres semanas a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró a través de tres capas de gasa y se centrifugó en un gradiente continuo de sacarosa (40-65% p/p) durante una hora, a 20.000 rpm (rotor Beckman SW-28). Luego de la centrifugación se colectó la banda correspondiente a los gránulos y se la diluyó en tres volúmenes de agua para luego concentrarla por centrifugación durante 20 minutos, a 10.000 rpm (rotor Sorvall SS34). Este último paso se repitió tres veces para eliminar restos de sacarosa. El inóculo obtenido se conservó a -20°C para su posterior utilización.

Previo a la realización de los estudios posteriores, el inóculo fue caracterizado morfológicamente (ver Capítulo II) y bioquímicamente.

II.4. Bioensayos

Se realizaron bioensayos con el fin de estimar la dosis (DL_{50}) y tiempo de supervivencia medios (TS_{50}) del EpapGV en larvas de primero y cuarto estadios, según la metodología descrita por Hughes y Wood (1986). Para ello, en primer lugar se determinó la cantidad de suspensión ingerida por cada larva, por diferencia de peso de las larvas antes y después de la ingestión. Los insectos fueron desprovistos de alimento durante 12 h y luego se les suministró una gota de suspensión viral dispuesta sobre *Parafilm*, utilizándose sacarosa al 1% como fagoestimulante y *Coomassie Brilliant Blue* al 0,1%, como colorante para la verificación final de la ingesta.

Tanto para la estimación de volumen ingerido como para la selección de los individuos en los bioensayos, se escogieron aquellos en los que se observó el contenido de la suspensión hasta la mitad del tracto digestivo (una sola ingestión completa), siendo descartados los restantes. Los ensayos se condujeron en una cámara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% de H.R. y 14:10 horas F/E.

Se ensayaron cinco dosis para cada uno de los mencionados estadios larvales más un control en el que se utilizó agua en lugar de inóculo. Cada dosis se ensayó sobre un mínimo de 30 individuos y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. En larvas neonatas se ensayaron dosis comprendidas entre 1 y 16 gránulos/larva, mientras que para las de cuarto estadio estuvieron comprendidas entre 3×10^2 y $1,6 \times 10^4$ gránulos/larva. Se determinó la concentración de gránulos del inóculo inicial utilizando una cámara Petroff-Hausser (profundidad: 0.02 mm) y luego se realizaron las diluciones correspondientes. Una vez ingerida la dosis, las larvas se transfirieron a recipientes individuales conteniendo dieta artificial.

La mortalidad fue registrada a intervalos de 12 horas y los resultados se analizaron por *probits* (Finney, 1971). Mediante este análisis, se obtiene una línea de regresión entre las dosis transformadas a logaritmos y los porcentajes de mortalidad transformados a unidades Probit. La estimación del tiempo de supervivencia medio se realizó en base a los resultados obtenidos en la menor dosis donde se registró el 100% de mortalidad (16 y 8000 gránulos/larva para 1^{er} y 4^{to} estadio, respectivamente). El cálculo de los respectivos tiempos de supervivencia medios se realizó utilizando el programa Vistat® (Cornell University) especialmente diseñado para ensayos con baculovirus.

II.5. Efecto de la infección producida por EpapGV, sobre el crecimiento y el desarrollo de larvas de *E. aporema*

Con el fin de evaluar la influencia en el crecimiento y desarrollo larval, se condujeron ensayos con larvas de *E. aporema* de cuarto estadio. A las mismas se les suministraron diferentes dosis según la metodología de Hughes y Wood (1986): 6×10^3 , 6×10^4 , 6×10^5 , y 6×10^6 gránulos/larva.

Se registró diariamente el peso de las larvas y la fecha de ecdisis o muda de los insectos, evaluándose la influencia de la infección en el desarrollo larval y pupal de larvas sanas e infectadas.

Los datos fueron analizados por medio de un Anova de Medidas Repetidas (Microsoft Statistic Package).

II.6. Rango de hospedadores

Se efectuaron pruebas para la determinación de la susceptibilidad al EpapGV de larvas neonatas de diferentes especies de lepidópteros plaga: *Anticarsia gemmatalis*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). La metodología utilizada fue la descrita anteriormente (Bioensayos). Se probaron en cada caso cuatro dosis entre 4 y 256 gránulos por larva más un control en el que se utilizó agua en vez de inóculo. Cada dosis se ensayó en un total de 30 individuos y se realizaron tres repeticiones por ensayo. La mortalidad fue registrada a intervalos de 12 horas.

RESULTADOS

Estimación de la virulencia de EpapGV

La técnica utilizada para la estimación de la DL_{50} y TS_{50} permite determinar con precisión el momento de adquisición del virus, además, minimiza los efectos de las diferencias en el comportamiento alimenticio de las larvas y los efectos de interacción del inóculo con la dieta. Asimismo, es un método altamente eficiente y reproducible ya que se realiza un tratamiento sincronizado de una cantidad considerable de larvas, con una dosis definida de virus.

Dicha técnica demanda la previa determinación del volumen promedio de suspensión ingerida por las larvas a ensayar. En tal sentido, se obtuvo como resultado un promedio de 0,016 μ l ($\pm 0,001$) de suspensión por larva neonata y de 2,4 μ l ($\pm 0,2$) de suspensión por larva de cuarto estadio.

La DL_{50} se incrementó de 5.6 gránulos/larva para larvas neonatas a 4×10^3 gránulos/larva, para larvas de cuarto estadio (Tabla II.1). Los TS_{50} calculados fueron de 105 y 119 horas, respectivamente (Tabla II.2).

Tabla II.1. Estimación de la dosis letal media de Epap GV, en larvas de *E. aporema*. Se ensayaron cinco dosis para cada uno de los estadios larvales comprendidas entre 1 y 16 gránulos/larva para neonatas y entre 3×10^2 y $1,6 \times 10^4$ gránulos/larva para larvas de cuarto estadio. Cada dosis se ensayó sobre un mínimo de 30 individuos y se realizaron tres repeticiones por tratamiento

Estadio larval	DL_{50} (gránulos/larva)	Límites de confianza (95%)	Pendiente	Factor de heterogeneidad (χ^2/df)
Primero	5.6	3.64 – 7.34	2.08	1.14
Cuarto	4000	3.800 – 5.200	1.42	0.6

Las pendientes obtenidas se encuentran dentro del rango observado para virus de insectos. Por otro lado, el factor de heterogeneidad también se encuentra dentro de los parámetros esperados (Burges y Thomson, 1971).

Tabla.II.2. Estimación del tiempo letal medio de *Epap* GV, en larvas de *E. aporema*. Los valores corresponden a la mínima dosis que causó el 100% de mortalidad

<i>Estadio larval</i>	<i>TL50(Horas)</i>	<i>Intervalo de confianza</i>	<i>Rango (horas)</i>
Primero	90	0.95	85.6 - 94.4
Cuarto	105	0.95	89 -121

Efecto de la infección producida por *Epap*GV, sobre el crecimiento y el desarrollo de larvas de *E. aporema*

Luego de mudar al último estadio larval, las larvas controles presentaron un color verde pálido y su tegumento translúcido. Asimismo respondían activamente a estímulos táctiles. Incrementaron su peso hasta el 2^{do} día post-muda cuando alcanzaron su máximo valor. A partir del tercer día dejaron de comer, y entraron en el período de pre-pupa tornándose de color rosado. Se registró entonces pérdida de peso hasta alcanzar el estado pupal, lo cual ocurrió al 7^{mo} día post-muda.

Cuando las larvas fueron infectadas con *Epap*GV, cambiaron tanto su apariencia como su comportamiento. La Fig.II.1 y la Tabla II.3 muestran los efectos de *Epap*GV en el crecimiento y desarrollo larval. Aquellas larvas que consumieron la dosis más baja (6×10^3 gránulos/larva) exhibieron un color blanquecino a partir del segundo día post-infección. Posteriormente, se tornaron blancas, letárgicas y sufrieron un aumento de volumen debido a la proliferación del tejido adiposo y a la presencia de cuerpos de inclusión. A diferencia de lo ocurrido con las larvas controles, éstas se alimentaron activamente hasta el 4^{to} día post-infección. Una vez muertas adquirieron una coloración castaño oscura y su tegumento se rompió con facilidad, permitiendo la liberación de los OBs en el ambiente. Solo el 21% alcanzó el estado pupal, al 7^o día p.i. A partir del 3^{er} día post-muda el peso medio se incrementó significativamente (Anova; $p < 0.05$) con respecto a los valores registrados para larvas controles.

Fig.II.1. Efectos de la infección producida por EpapGV sobre el peso en el último estadio larval. Las barras muestran el promedio del peso calculado en base a individuos en los que se desarrolló la infección. Las desviaciones standards se indican sobre las barras. Se ensayaron las siguientes dosis: 6×10^3 ; 6×10^4 , 6×10^5 , y 6×10^6 gránulos/larva.

En general, la sintomatología de las larvas que recibieron las dosis intermedias (6×10^4 ó 6×10^5 OBs/larva) fue similar a la descrita anteriormente: Ninguna alcanzó el estado pupal, muriendo todas al 8^{vo} día p.i. El peso máximo alcanzado se produjo al 3^{er} día, decreciendo levemente hasta producida su muerte. Las larvas que consumieron la mayor dosis (6×10^6 OBs/larva) no alcanzaron el estado pre-pupal. Como consecuencia de la rápida infección, las larvas mostraron mayor letargo. Al 4^{to} día p.i. se observó una diferencia de peso significativa en comparación con el control; sin embargo, en este caso la diferencia se debió a una disminución del peso promedio en las larvas control al entrar en pre-pupa y no al incremento de la ingesta por parte de las larvas infectadas. Todas las larvas murieron al 5^{to} día p.i.

Por otra parte, no se encontraron diferencias de pesos entre larvas machos y hembras, en ninguno de los tratamientos efectuados.

Tabla II.3. Efecto de diferentes dosis sobre la mortalidad y el desarrollo de larvas de cuarto estadio infectadas con EpapGV. Las larvas control y aquellas que recibieron la menor dosis empuparon al séptimo día.

Dosis	n	Mortalidad Acumulada (% , por día)									Pupas* (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Control	51	0	0	0	0	0	0	0	-	-	100
6×10^3	47	0	0	0	0	0	10.6	44.6	66	78.8	21.2
6×10^4	68	0	0	0	0	26.3	70.8	90.2	100	-	0
6×10^5	65	0	0	0	0	60	86.1	92.3	100	-	0
6×10^6	62	0	0	0	38.7	100	-	-	-	-	0

Rango de hospedadores

Se analizó el efecto de la ingestión de EpapGV sobre larvas neonatas de las principales especies de lepidópteros que también afectan al cultivo de la soja: *Anticarsia gemmatilis*, *Rachiplusia nu*, y *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) y sobre una especie taxonómicamente lejana *Diatraea saccharalis* (Lep. Pyralidae) plaga de maíz. La tabla II.4 muestra los valores de mortalidad registrados al infectar las distintas especies de lepidópteros con EpapGV.

Tabla II.4. Mortalidad (%) producida por el EpapGV, en diferentes especies de lepidópteros plaga. Promedios de tres experimentos. Las desviaciones estandar se indican entre paréntesis

Especie	Control	Dosis (gránulos/larva)			
		4	16	64	256
<i>Epinotia aporema</i> (Lep. Tortricidae)	0	43,3 (± 5,4)	78,8 (± 1,6)	100	100
<i>Rachiplusia nu</i> (Lep. Noctuidae)	4,4 (± 1,5)	2,2 (± 1,5)	3,3 (± 2,6)	3,3 (± 2,6)	3,3 (± 2,6)
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (Lep. Noctuidae)	0	3.3 (± 2,6)	0	0	0
<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep. Pyralidae)	5,5 (± 4)	5,5 (± 1,5)	2,2 (± 2,1)	3,3 (± 2,6)	2,2 (± 1,5)
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep. Noctuidae)	3,3 (± 2,6)	0	0	2,2 (± 1,5)	0

En ninguna de las dosis ensayadas (entre 4 y 256 OBs/larva) se registró mortalidad producida por EpapGV, ni efectos en el crecimiento o desarrollo larval.

DISCUSIÓN

Como se mencionó con anterioridad, la dosis letal media depende de una serie de factores entre los que se destacan el aislamiento viral, la edad y peso del insecto, las condiciones ambientales, etc. Por otra parte, en el caso de los baculovirus, no existe una estandarización del método de bioensayo ni la posibilidad de utilizar patrones para estimar potencia de su actividad (tal como ocurre con otros entomopatógenos). Es por ello que la comparación de los resultados obtenidos, respecto a otros baculovirus, presenta mayor dificultad. Sin embargo, es posible tomar ciertos ejemplos como parámetros de estimación, - en los que se usó la misma técnica de bioensayo -, principalmente especies de virus y de insectos relacionados taxonómicamente con *Epinotia aporema* y su granulovirus homólogo.

En tal sentido, los valores obtenidos para EpapGV fueron similares a los registrados para el granulovirus *Cydia pomonella* (CpGV). Hasta el presente, CpGV ha sido considerado como uno de los GVs más virulentos (DL_{50} menor a 5 gránulos/larva.neonata) (Sheppard y Stairs, 1976, 1977; Allaway y Payne, 1984; Huber, 1986).

Según Federici (1993), la velocidad de acción de los granulovirus está relacionada con el tropismo de infección. Aquellos GVs que infectan un solo tejido pueden tardar en causar la muerte de larvas infectadas recién al cabo de 10 -15 (Sciocco-Cap, 2001). Esto no ocurre cuando las infecciones son del tipo poliorganotrópicas (ej. CpGV), donde la muerte de larvas en estadios avanzados se produce entre los 5 y 6 días post-infección. Dada la similitud entre nuestros resultados y los mencionados para CpGV, podemos inferir que EpapGV afecta a diferentes tejidos dentro del insecto.

Las infecciones poliorganotrópicas son las más frecuentes en enfermedades producidas por NPVs en larvas de lepidópteros. Entonces, los granulovirus que responden a este patrón de infección son los que más se asemejan patológicamente a los NPVs.

A modo de ejemplo la DL_{50} del virus de *Autographa californica* (AcMNPV) es de 3.6 poliedros/larva cuando se infectan larvas neonatas de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), mientras que la DL_{50} en larvas de cuarto estadio es de 639 poliedros (Bianchi *et al.*, 2000). La DL_{50} en larvas neonatas y de 4^{to} estadio del virus de *Spodoptera exigua* es de 4 y 1219 poliedros/larva respectivamente en su especie homónima (Tuan-ShuJen *et al.*, 1994). Es importante destacar que ambos virus son poliedrosis múltiples y por lo tanto presentan

varios nucleocápsides por virión y numerosas partículas virales por cuerpo de oclusión. Es por ello que es de esperar que los valores de DL_{50} sean menores que los registrados en infecciones producidas por granulovirus donde presentan una sola nucleocápside y un solo virión por cuerpo de oclusión.

Tanto CpGV, como los virus AcMNPV y SeMNPV, son actualmente comercializados para el control de plagas agrícolas (Cherry y Willams, 2001). La virulencia del aislamiento de EpapGV evaluado fue similar a la de estos virus, lo cual permite suponer que EpapGV puede ser considerado efectivamente un buen candidato para el control microbiano de larvas de *E. aporema*.

Su potencial de utilización incluye no solo el cultivo de soja, sino también otras leguminosas de importancia económica tales como alfalfa o porotos, entre otras. Sin embargo es necesario evaluar su eficacia real en condiciones de campo ya que existen distintos factores relacionados con los hábitos del huésped y del ambiente que pueden alterar la eficacia del bioinsecticida. En este sentido la radiación solar en el rango del ultravioleta (254 a 310 nm) es el principal factor de inactivación de los baculovirus (Entwistle y Evans, 1985). Según Ignoffo *et al.*, (1977), los baculovirus son rápidamente inactivados (< de 24 horas) cuando son expuestos directamente a la luz del sol, o pueden persistir hasta 6 meses cuando se encuentran a la sombra (Benz, 1987). Para contrarrestar tal efecto, es importante incluir en las formulaciones sustancias protectoras y realizar la aplicación del virus en horarios de menor radiación solar. La estructura física de la planta y sus componentes químicos como exudados en la superficie foliar, pueden también alterar la persistencia del virus (Vasconcelos, 2001). Los hábitos alimenticios del insecto son también un factor importante a tener en cuenta. Como se mencionó anteriormente la larva recién nacida de *E. aporema* se alimenta de brotes y folíolos, uniendo a éstos con hilos sedosos que ellos segregan. Esto ofrece un refugio contra los depósitos de virus para lo cual es importante dirigir las aplicaciones hacia esta parte de la planta.

Los resultados aquí obtenidos sirvieron como base para el diseño de estrategias de formulación y aplicación del virus para el control de la plaga en plantas de soja, bajo condiciones controladas. Además, constituyen el parámetro de comparación de actividad de las preparaciones virales (puras o formuladas) generadas con posterioridad y se incluyen entre la información necesaria para la futura tramitación del registro de uso experimental de EpapGV.

Por otra parte, a partir de los bioensayos, se observaron diferencias en la susceptibilidad a EpapGV según el estadio larval, siendo más susceptibles las larvas de primeros estadios. Este fenómeno fue también observado en infecciones producidas por otros baculovirus (Bourcias *et al.*, 1980; Teackle *et al.*, 1986; Smith y Vlak, 1988; Sait *et al.*, 1994; Engelhard y Volkman, 1995; Kirkpatrick *et al.*, 1998). Rovesti *et al.*, (2000) sugieren que este fenómeno puede deberse a modificaciones en el pH del intestino medio o a cambios en la estructura de la membrana peritrófica, haciendo que los estadios larvales más avanzados resulten más resistentes a la infección. En este contexto, y para optimizar el control de *E. aporema*, es importante determinar el momento adecuado de aplicación del bioinsecticida. Debido al corto intervalo entre la eclosión y penetración en los tallos o brotes, es importante asegurar el control durante los primeros estadios larvales, cuando las larvas están más expuestas y son más susceptibles al virus. Para ello se requieren de estudios complementarios de la dinámica poblacional de *E. aporema* y la implementación de un sistema de alarma para monitorear la densidad poblacional de adultos mediante trampas de luz o feromonas.

El rango de huéspedes de un patógeno es un factor importante a tener en cuenta en la determinación de su potencial como agente de control biológico. Los bioensayos realizados sobre otros insectos plaga, *Anticarsia gemmatalis*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) y *Diatraea saccharalis* (Lep. Pyralidae), demostraron que EpapGV no es infectivo para ninguna de las especies mencionadas. Si bien la especificidad representa una ventaja en términos de bioseguridad, comercialmente es importante poder combatir al complejo de plagas de un cultivo. Es por ello que podría resultar interesante modificar el espectro de huéspedes de EpapGV a otros insectos plaga del mismo cultivo. En general, los baculovirus son capaces de entrar en un amplio número de células diversas pero la expresión de genes virales en células de insectos permisivas o semi-permisivas parece estar bloqueada en diferentes puntos. Generalmente la expresión de genes tempranos, dependiente de la transcripción por la ARN polimerasa II, no se ve entorpecida, pero la expresión de genes tardíos se ve disminuida o anulada (Romanowski y Ghiringhelli, 2001). Hasta el presente se han encontrado varios genes que influyen sobre la capacidad de replicación o expresión de genes tardíos de algunos baculovirus en ciertas líneas celulares (Lu y Carstens, 1991; Clem *et al.*, 1991; Lu y Miller, 1995). Sin embargo estos hallazgos sobre los determinantes moleculares del rango de huésped no son directamente extrapolables a todos los sistemas virus-huésped. Por lo tanto la modificación del espectro de huésped

de EpapGV requeriría de estudios adicionales para determinar en cada caso particular, las limitaciones al proceso de infección.

Al estudiar los efectos de EpapGV en el desarrollo y crecimiento larval, observamos que ambos se ven afectados y además, este efecto resultó ser dependiente de la dosis de virus. Se registró un incremento de peso en larvas infectadas en comparación con los controles e inhibición del proceso de pupa. En estudios anteriores se demostró que algunos baculovirus tienen la capacidad de afectar la regulación hormonal y el desarrollo del huésped a través de la glicosilación de la ecdisona (O'Reilly y Miller, 1989; Murray, *et al.*, 1991). En este sentido, en numerosos baculovirus se ha identificado y caracterizado un gen que codifica para una enzima llamada ecdisona UDP-glicosil transferasa (O'Reilly *et al.*, 1991). El producto de dicho gen, cataliza la transferencia de un monosacárido desde un UDP-azúcar a la ecdisona (hormona involucrada en la muda de insectos). Su función es la supresión de la muda del huésped y la detención del desarrollo del mismo. (O'Reilly *et al.*, 1998; Evans y O'reilly, 1999). Consecuentemente, se prolonga el tiempo en que el hospedador se alimenta y hay una mayor producción de la progenie viral. En nuestro laboratorio se demostró la presencia del gen *egt* en EpapGV, por lo que sería posible que los efectos observados en las larvas infectadas, se deba al resultado de la expresión de dicho gen (Manzán *et al.*, 2002). Estudios realizados en un virus modificado de AcMNPV en el que se eliminó el gen *egt*, mostraron una reducción significativa en la cantidad de alimento consumido por el insecto plaga (cerca del 40%) y una reducción de aproximadamente del 20% en el TS_{50} . (O'Reilly y Miller, 1991).

En resumen, EpapGV resulta ser altamente virulento sobre su hospedador natural siendo efectivamente un buen candidato para el control de dicha plaga. Estos resultados sumados a la información acerca de la patogénesis de EpapGV en su huésped y a los estudios moleculares del virus, permitirán tener un mayor conocimiento de las interacciones virus-huésped y permitirán diseñar estrategias orientadas al mejoramiento de la eficacia de EpapGV.

CAPÍTULO III

**Estudio sobre la patología producida por
EpapGV en larvas del huésped**

INTRODUCCIÓN

Patología producida por baculovirus

Las patologías causadas por los dos grupos principales de baculovirus (NPVs y GVs) muestran diferencias en cuanto a la invasión, replicación, desarrollo y diseminación dentro del insecto según el huésped y el aislamiento viral (Sciocco-Cap, 2001). Los virus de poliedrosis nucleares se han detectado en más de 400 especies, en siete órdenes de insectos pero sólo en insectos lepidópteros causan infecciones poliorganotrópicas (Federici, 1997) (Tabla III.1).

Tabla III.1: Principales órganos y tejidos infectados por Baculovirus. (*) Si bien hay replicación y formación de nueva progenie, en general no se producen cuerpos de oclusión aún en estados avanzados de la enfermedad. (+/-) Puede o no producirse infección en el tejido. (+) Se observa replicación y formación de cuerpos de oclusión. (**) En los crustáceos, el órgano afectado es el hepatopáncreas (Sciocco-Cap, 2001).

Tipo de Baculovirus	Principales tejidos infectados						
	Intestino medio	Hemocitos	Tejido adiposo	Matriz traqueal	Epidermis	Tejido muscular	Tejido nervioso
NPVs							
Lepidópteros	*				+	+	+
Himenópteros	+	-	-	-	-	-	-
Dipteros	+	+/-	-	-	-	-	-
Crustáceos	+	-	-	-	-	-	-
GVs							
Lepidópteros							
Tipo I	*	-					
Tipo II	*	+/-					
Tipo III	+	-					

Los granulovirus, solo han sido aislados de los insectos del Orden Lepidoptera (Blissard *et al.*, 2000). Según Federici (1993, 1997), existen tres tipos de granulovirus que se diferencian según el tropismo de infección que presentan hacia determinados tejidos. (Tabla III.1). En el tipo I (*Trichoplusia ni* GV y otros granulovirus que infectan larvas de noctuidos) el virus invade el intestino en forma transitoria y posteriormente la infección se ve limitada al tejido adiposo (infección monoorganotrópica). Las larvas mueren entre los 8 y 12 días post-infección. En los GVs del tipo II la infección es poliorganotrópica y de características patológicas similares a las producidas por NPVs en lepidópteros. Son ejemplos de este tipo de GVs, los virus de la granulosis de *Pieris brassicae* y de *Cydia pomonella*. Por último los GVs del tipo III también producen

CAPÍTULO III

**Estudio sobre la patología producida por
EpapGV en larvas del huésped**

infecciones monoorganotrópicas, pero en este caso limitadas al intestino medio del insecto. El único virus de este tipo registrado hasta el presente, fue aislado de larvas de *Harrisinia brillians* (Federici y Stern, 1990) (Tabla III.1).

Ciclo de infección

Tanto los estudios histopatológicos como los referidos al ciclo de infección dentro del insecto han sido realizados principalmente en NPVs, facilitados por la disponibilidad de cultivos de células permisivas a la replicación viral (Volkman y Knudson, 1986; Williams y Faulkner, 1997). Esto permitió, entre otras cosas, la construcción de virus recombinantes con genes marcadores que permitieron seguir el curso de la infección dentro del insecto (Engelhard *et al.*, 1994).

En el caso de los GVs, estos estudios han sido realizados solo *in vivo* y con virus silvestres. Como consecuencia de estas limitaciones, existe gran cantidad de procesos a nivel citológico e histopatológicos que aún quedan por resolver.

A continuación se explicará en forma general, el ciclo de infección de los baculovirus. Debido a las razones antes mencionadas, muchos de los procesos citopatológicos fueron estudiados solo en los NPVs. Cuando sea oportuno, mencionaré las diferencias encontradas entre los NPVs y GVs.

Infección primaria

Si bien se sabe que la infección puede iniciarse a través de los espiráculos (Kirkpatrick *et al.*, 1994), o por transmisión vertical (Smith y Vlak, 1998; Fuxa y Richtier, 1991; Kukan, 1999), la principal vía de infección es por ingestión de los cuerpos de inclusión al ingerir el insecto alimento contaminado (Fig.III.1.A). En el intestino medio, donde el pH es de 9.5-11, se produce la disolución de los cuerpos de inclusión facilitada por la acción de una proteasa alcalina (Granados y Williams, 1986; Horton y Burand, 1993) (Fig. III.1.B).

En el lumen del intestino, los viriones (ODV) liberados, deben atravesar la membrana peritrófica del intestino (Derksen y Granados, 1998). Esta membrana constituye la primera barrera potencial a la infección. Está compuesta principalmente por quitina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas y proteínas; y le confiere a los insectos, entre otras cosas, cierta protección contra organismos patógenos. Aún no es claro como los

viriones atraviesan esta membrana. En el cuerpo de inclusión de algunos virus, se ha identificado una proteína denominada *VEF*, (*viral enhancin factor*) que actúa digiriendo las proteínas de alto peso molecular que forman la membrana peritrófica lo cual hace que aumente la susceptibilidad de las larvas a infecciones por baculovirus (Derksen y Granados, 1988; Wang y Granados, 1994; Lepore *et al.*, 1996).

En las células del intestino medio se produce la infección primaria, la envoltura del virión se fusiona con la membrana citoplasmática aparentemente a través de proteínas específicas que podrían inducir este proceso (Horton y Burand, 1993; Engelhard *et al.*, 1994; Braunagel *et al.*, 1996; Theilmann *et al.*, 1996).

Las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen hacia el núcleo en un proceso que aparentemente involucra la formación de microfilamentos de actina (Charlton y Volkman, 1993). El DNA es liberado a través de los poros nucleares (Granados y Williams, 1986) (Fig. III.1.D) gracias a la fosforilación de la proteína p6.9 (Wilson y Consigli, 1985b) por parte de una quinasa asociada a la cápside (Miller *et al.* 1983; Wilson y Consigli 1985a). Dentro del núcleo se produce la transcripción y replicación viral (Granados y Lawler, 1981). Se genera una nueva progenie y se producen alteraciones en las funciones fisiológicas del insecto en beneficio de un mejor desarrollo de la enfermedad en el huésped (Sciocco-Cap, 2001). En general, en las células del intestino no se producen cuerpos de inclusión aún en estados avanzados de la enfermedad.

A nivel histopatológico, el cambio más característico es el agrandamiento del núcleo de las células infectadas. En los GVs, la replicación del virus comienza en el núcleo pero, inmediatamente, se rompe la membrana nuclear y la replicación y transcripción de genes virales continúan en la mezcla núcleo-citoplasma (Tweeten *et al.*, 1981; Tanada y Hess, 1991) (Fig. III.1.D). En los NPVs, no se produce ruptura de la membrana nuclear y la progenie viral se observa dentro del núcleo.

Fig. III.1. Esquema del ciclo biológico de un granulovirus. (A) La larva ingiere los cuerpos de inclusión al alimentarse. (B) En el intestino medio se disuelven los cuerpos de inclusión y quedan así liberados los viriones (V) que luego de atravesar la membrana peritrófica (mp), se unen por fusión a las microvellosidades del intestino medio. (C) Las nucleocápsides pueden atravesar la célula sin establecer una infección o (D) pueden replicarse en las células columnares. Las nucleocápsides se dirigen al núcleo donde liberan el DNA, se produce la lisis de la membrana nuclear y la progenie viral será la responsable de diseminar la infección dentro del insecto. (E) Luego de atravesar la lámina basal (lb) las partículas virales (v) entran a las células de tejidos susceptibles. (F) Se inicia un nuevo ciclo de replicación, que culmina con la formación de nuevos viriones (BV) y de viriones que se incluyen en los cuerpos de inclusión. (G) Finalmente, se rompe el tegumento larval y quedan liberados los cuerpos de inclusión en el

Las nuevas nucleocápsides brotan a través de la membrana plasmática en sitios específicos donde se encuentra una proteína codificada por el virus, esencial para producir la infección en otros tejidos (Monsma *et al.*, 1996). Esta proteína está involucrada también en la entrada del virus a otras células. Los viriones resultantes (BV), son los responsables de diseminar la infección en el insecto produciendo la infección secundaria.

Existen evidencias de que algunas nucleocápsides no establecen infección en el intestino medio y pasan directamente a través de las células alcanzando el hemocèle (Granados y Lawler, 1981; Keddie *et al.*, 1989) (Fig.III.1.C).

Infección secundaria

Los viriones brotantes entran a las células por endocitosis mediada por receptor (Volkman y Goldsmith, 1985). En estas nuevas células infectadas se producen dos ciclos de producción de viriones: el primero corresponde a la producción de viriones brotantes que infectarán a células vecinas, mientras que el segundo corresponde a la producción de viriones que serán ocluidos (Fig III.1.E y F).

Avanzada la infección, se produce la lisis celular, adquiriendo la hemolinfa la característica coloración blanquecina opaca debido a la acumulación de cuerpos de inclusión. Este último proceso es dependiente de la presencia de una proteína llamada p10 (Willams *et al.*, 1989; van Oers *et al.*, 1993), de la acción de una proteína quinasa y de captesina codificadas por el virus (Lanier *et al.*, Willams y Faulkner, 1997).

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 cuerpos de inclusión, ayudado este proceso por la acción de la quitinasa codificada por el virus (Hawtin *et al.*, 1995). Los cuerpos de inclusión permanecerán en el ambiente hasta ser ingeridos por otra larva, y así comenzará un nuevo ciclo de infección.

Si bien el descrito es el ciclo más común entre los baculovirus, el tropismo tisular, las vías de diseminación dentro del insecto y las barreras a la infección son particulares de cada sistema virus-insecto. En relación con las vías de diseminación se han descrito diferentes mecanismos que pueden involucrar el sistema traqueal, la hemolinfa, los hemocitos o una combinación de éstos (Federici, 1997).

A diferencia de los NPVs, muy pocos GV's han sido propagados exitosamente *in vitro* y como resultado, el conocimiento acerca de su patogénesis y replicación es limitado

(Williams y Faulkner, 1997). Ellos se basan en análisis de tejidos por técnicas histoquímicas y de microscopía electrónica, encontrándose limitados a solo unas pocas especies de granulovirus (Begon *et al*, 1993; Federici y Stern, 1990; Hess y Falcon, 1987; Tanada y Hess, 1991; Walker *et al.*, 1982)

Una vez conocidas la actividad biológica de EpapGV en su hospedador nos propusimos analizar, mediante diferentes técnicas, la patología producida por EpapGV en larvas de *Epinotia aporema* y analizar las posibles vías de infección sistémica.

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Infección de larvas para estudios histopatológicos

Tanto para los estudios de microscopía óptica como electrónica, se suministró a larvas de cuarto estadio una solución de virus suficiente para causar el 100% de mortalidad (6000 gránulos/larva). Al igual que para los bioensayos, se dejaron en ayunas por 12 horas larvas de tercer estadio pre-muda, se seleccionaron las que mudaron a cuarto estadio, y luego se les suministró la suspensión viral utilizando el método de alimentación por gota (ver Materiales y Métodos, Capítulo II). Los controles se trataron de igual forma, utilizándose agua en lugar de inóculo.

La fijación de larvas y/o tejidos sanos y enfermos se realizó a las 1/2, 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post-tratamiento, siguiendo la metodología adecuada para cada técnica de microscopía en particular.

III.2. Microscopía óptica: Fijación y embebido de tejidos para inmunohistoquímica e hibridación *in situ*

Para la fijación de los tejidos se utilizó solución Bouin-Dubosq Brasil. Las larvas fueron inmersas en el líquido fijador por 24 h, cortadas transversalmente en tres partes y fijadas por 48 h. Posteriormente, el material se deshidrató mediante pasajes a través de una serie gradual de etanol al 30%, 70%, 90%, 100% (v/v) (una hora cada paso) y *Ter*-butanol (dos pasos de una hora). El embebido se realizó a través de tres pasajes en una mezcla de concentración creciente de Paraplast® en *Ter*-butanol, de la siguiente manera:

Reactivo	Relación	Tiempo
<i>Ter</i> -butanol/Paraplast	3:1	12 Horas
<i>Ter</i> -butanol/Paraplast	1:1	12 Horas
<i>Ter</i> -butanol/Paraplast	1:3	12 Horas
Paraplast	Puro	48 Horas

El embebido final se realizó en Paraplast® puro, orientándose el material para la obtención de cortes transversales y longitudinales. De los bloques obtenidos se realizaron cortes de 5 μ de espesor. Con el fin de lograr una mejor adhesión de las secciones al portaobjeto, las mismas se mantuvieron en estufa a 40°C durante 48 horas.

III.3. Microscopía electrónica: Fijación y embebido de tejidos

Para facilitar la penetración de los reactivos se realizó la disección de las larvas. El intestino medio, el cuerpo graso y la epidermis, fueron fijados con glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato 0.1M (pH 7.4) - sacarosa 0.25M, durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se efectuaron tres lavados en el mismo tampón disminuyendo la concentración de sacarosa (0.25M, 0.125M, sin sacarosa). Las muestras se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón de fijación, durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la fijación, el material se deshidrató gradualmente utilizándose soluciones acuosas de etanol al 30%, 50%, 70%, 90% v/v durante media hora cada paso y en etanol 100% v/v (dos cambios, durante una hora cada uno). Posteriormente, el disolvente empleado se cambió por una mezcla de etanol absoluto: óxido de propileno (1:1) durante una hora y finalmente, por óxido de propileno también durante una hora.

La infiltración se realizó gradualmente a través de varios pasos de mezcla de concentración creciente de resina (Epon-araldita) y óxido de propileno:

Mezcla	Relación	Tiempo
óxido de propileno-resina	3:1	2 horas
óxido de propileno-resina	1:1	12 horas
óxido de propileno-resina	1:3	2 horas
Resina-pura		2 horas

Para la infiltración final, las muestras se orientaron debidamente y se polimerizaron a 60°C durante 48 horas. De cada bloque se obtuvieron secciones semifinas (de 1 μ) y luego de seleccionar el área de interés se realizaron secciones ultrafinas (de 70nm) de

espesor. Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo al 5% (p/v) en agua bidestilada durante 30 minutos y con citrato de plomo durante 10 minutos. Las observaciones se realizaron en un microscopio de transmisión JEM-1200.

III.4. Microscopía electrónica: Fijación y embebido de tejidos para inmunohistoquímica

Para la fijación de los tejidos disecados se ensayaron distintas relaciones de paraformaldehído-glutaraldehído:

Paraformaldehído 4% - glutaraldehído 0.5%

Paraformaldehído 2% - glutaraldehído 0.5%

Glutaraldehído 3%

Para cada una de las distintas relaciones la fijación se realizó durante 3 horas en una solución tampón cacodilato 0.1M (pH 7.4) - sacarosa 0.25M. Posteriormente, se efectuaron tres lavados en el mismo tampón disminuyendo la concentración de sacarosa (0.25M, 0.125M, sin sacarosa) y los tejidos se deshidrataron gradualmente en soluciones acuosas de etanol al 30%, 50%, 70%, 90% v/v durante media hora cada paso. Algunas muestras fueron deshidratadas también en etanol 100%. Para la infiltración se utilizaron primero mezclas de etanol: resina Unicryl™ (1:1) durante una hora y luego los tejidos se incubaron una hora más en resina pura. El embebido se realizó en Unicryl™ y la polimerización se llevó a cabo bajo luz UV a 4 °C durante 72 horas. Se realizaron cortes semifinos de 1 μ y ultrafinos de 70 nm de espesor. Las secciones ultrafinas se colocaron en grillas de níquel cubiertas con Formvar®.

III.5. Inmunohistoquímica en microscopía óptica

Las secciones adheridas al portaobjeto se desparafinaron incubando las muestras 2 veces en xilol durante 10 min e hidrataron gradualmente por pasajes de 5 min en soluciones decrecientes de etanol en agua destilada (100%, 96%, 80%, 70%, 59%, 30% v/v, dH₂O). Posteriormente, se lavaron en PBS e incubaron en H₂O₂ 3% durante 20 segundos. Para evitar reacción inespecífica, las muestras se incubaron en solución de bloqueo BSA 5% en PBS, durante 1 hora. Luego se incubaron con el anticuerpo específico para granulina de EpapGV (Parola *et al.*, 1999) ensayándose tres diluciones

distintas: 1:200, 1:500 y 1:1000 diluidas en PBS - 1% BSA. La incubación se realizó *overnight* a 4 °C. Al cabo de ese lapso, los portaobjetos se lavaron en PBS - 1% BSA e incubaron con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (Sigma Chemical Co.), durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 4 lavados con PBS conteniendo 1% BSA y, para amplificar la señal, las muestras fueron incubadas con ExtrAvidin® conjugada con peroxidasa (Sigma Chemical Co.). Finalmente se incubó con el sustrato de la enzima peroxidasa: diaminobenzidine (DAB).

III.6. Inmunohistoquímica en microscopía electrónica

Las secciones ultrafinas fueron hidratadas en dH₂O e incubadas en PBS. Luego de bloquear una hora con BSA 5% en PBS a temperatura ambiente, se incubaron con el primer anticuerpo (anti-granulina de EapGV) *overnight* a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS – 1% BSA y se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 15 nm (Electron Microscopy Science). Las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo al 5%, durante 10 min. Las observaciones se realizaron en microscopio electrónico de transmisión JEM-1200

III.7. Hibridación *in situ*:

III.7.A. Construcción del plásmido recombinante y síntesis de la sonda no radioactiva

Los estudios de hibridación *in situ* se realizaron utilizando una sonda de ARN no radioactiva marcada con digoxigenina (DIG-UTP). En relación con las restricciones de seguridad y con la estabilidad de la marca, los métodos de marcación no radioactivos ofrecen ciertas ventajas sobre los métodos radioactivos.

Para generar la sonda, se utilizó el *kit DIG ARN labeling* (Boehringer Mannheim). El gen de granulina se subclonó en el vector pZERTM-2 y, usando la ARN polimerasa del fago T, se realizó la transcripción *in vitro*.

Como controles negativos de este experimento, se efectuaron la hibridación sobre tejidos infectados con sonda *sense* y la hibridación sobre tejidos sanos con sonda *anti-sense*. Los pasos seguidos se resumen en la Fig. III.2.

III.7.A.1. Amplificación por PCR del fragmento de ADN que contiene el gen *granulina*

A partir del clon *EcoRI*-G de la biblioteca genómica de *EpapGV* (generada en el laboratorio), se amplificó por PCR el gen de *granulina* utilizando los siguientes pares de *primers*:

Granulina - *upstream*: TTACAACAGCGACGTGT

Granulina - *dowstream*: GCGTTGACTCAGTAGAT

La mezcla de reacción consistió en *buffer* de la enzima *PFU* 1X; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dNTP; 0.5 μM de *primer* 5' y 3'; 0,25 unidades de la enzima *Taq* polimerasa, 1.25 unidades de enzima *PFU* y 5 ng del ADN molde. La reacción de amplificación del gen completo consistió en 35 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 50 °C, 1 min a 72 °C. El producto de la amplificación se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa 1%.

III.7.A.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La banda correspondiente al ADN amplificado (750 pb) se cortó y purificó por adsorción a polvo de sílice (*GENECLEAN™*, *Bio 101 Inc.*). Se incubó en 500 μl de *NaI* saturado durante 5 min a 60 °C. Posteriormente, se agregó 5 μl de polvo de sílice y se incubó con agitación constante durante 15 min. Se centrifugó 10 s a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó 3 veces con 400 μl de solución *New Wash* (*NaCl*, etanol y agua). El *pellet* se resuspendió en 20 μl de agua destilada y se incubó 20 min a 60 °C. Finalmente, la mezcla se centrifugó 4 min a 14000 rpm y el sobrenadante conteniendo el ADN de interés se transfirió a otro tubo que se conservó a -20 °C hasta su uso.

II.7.A.3. Ligación del ADN viral al vector pZERTM 2

El producto de la amplificación se clonó en el vector pZERTM- 2 previamente digerido con *EcoRV*. El sistema de clonado en pZERTM-2/*E. coli* TOP 10, posee la ventaja de minimizar la obtención de colonias no recombinantes debido a la presencia del gen letal para *E. coli*, *ccdB* fusionado al C-terminal de la proteína LacZ α (Bernard *et al.*, 1994).

La inserción de ADN foráneo impide la expresión del gen de fusión lacZ α -ccdB, permitiendo el crecimiento de las bacterias recombinantes.

Este vector contiene, además, un sitio múltiple de clonado con 18 sitios de restricción. El marcador de selección *E. coli* es el gen de resistencia a kanamicina. Flanqueando el *polylinker* se encuentran secuencias promotoras para la transcripción *in vitro* Sp6 y T7.

La ligación se realizó utilizando una relación molar vector-inserto 1:10 en un volumen final de 15 μ l; en presencia de T4-ligasa (3U/ μ l, Promega) y *buffer* de ligación durante 1 hora a 16°C.

III.7.A.4. Transformación de células *E. coli* TOP10

Las transformaciones se realizaron por electroporación. Las bacterias se sometieron a un campo eléctrico que les crea poros transitorios en su membrana y permite el ingreso del material externo. Se mezclaron 5 μ l del producto de ligación con 100 μ l de bacterias electrocompetentes. Las condiciones de capacitancia y campo eléctrico, en el GEN-PULSER de Bio-Rad fueron de 25 μ F y 2.2 kV. Las bacterias se resuspendieron en 500 μ l de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37 °C durante 1 hora, con agitación. Luego una alícuota de 300 μ l se plaqueó sobre placas de LB-agar con kanamicina.

III.7.A.5. Análisis y selección de los clones

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

Las bacterias depositadas en el tubo se resuspendieron en 10 μ l de dH₂O. y se hirvieron durante cinco minutos. Cada tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min.

La reacción de amplificación se realizó utilizando 1 μ l de este sobrenadante y los *primers* Granulina -*upstream* y Granulina - *downstream*. Las colonias que dieron una señal positiva de amplificación, se cultivaron en medio líquido, para purificar sus plásmidos y analizarlos por digestión con endonucleasas de restricción.

III.7.A.6. Purificación de los clones recombinantes (*miniprep*) y análisis del ADN con enzima de restricción

Los clones recombinantes se purificaron por el método de lisis alcalina (Birnboim, 1979), y la orientación del inserto se determinó digiriendo con la enzima *EcoRI*. El gen de granulina tiene un sitio de corte para esta enzima en el nucleótido 47 río arriba del extremo AUG. El vector pZERTM 2 cuenta también en el *polylinker* con una secuencia que es reconocida por esta enzima (Fig.III.2).

Se seleccionaron dos clones cuyos insertos estaban en orientaciones opuestas. Para la transcripción *in vitro* se usó la ARN polimerasa del fago T7. Aquellos clones que contenían el extremo AUG del inserto cercano al primer T7, dieron como resultado un transcripto *sense*, mientras que aquellos clones en los que el AUG del inserto se encontraba opuesto al primer T7, dieron como resultado un transcripto *antisense* (Fig.III.2).

III.7.A.7. Transcripción y purificación de las sondas

Previo a la transcripción, los plásmidos fueron linealizados con la enzima de restricción *HindIII*. Las reacciones de transcripción se realizaron utilizando: *buffer* de transcripción 1 X, 40 unidades de *RNAsin*, 500 μ M de ATP, GTP, CTP, 325 μ M de UTP, 175 μ M de DIG-UTP, 40 unidades de las ARN polimerasas y 1 μ g de ADN molde. Estas mezclas se incubaron a 37 °C durante 1 h. El transcripto fue analizado en gel de agarosa 1.5% (Fig. III.3).

Finalizada la reacción de transcripción, se agregaron 0,5 unidades de ADNasa para eliminar el ADN molde. Al cabo de 10 min a 37 °C se agregó 2 μ l de EDTA para detener la reacción y luego los transcriptos se purificaron por *RNAid* (*Bio 101, Inc.*).

A B

Fig.III.3. Análisis del producto de transcripción *in vitro* por electroforesis en gel de agarosa. Calle A. 100ng de RNA control de 760pb (kit Boehringer Mannheim) B: RNA *antisense* transcripto a partir del plásmido recombinante.

Se comenzó agregando a la mezcla anterior 3 volúmenes de *RNA binding salt*, se mezcló bien e inmediatamente se adicionaron 2 μ l de polvo de vidrio. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó 10 s a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó tres veces con solución de lavado. Dicho *pellet* se resuspendió en 20 μ l de agua y se incubó 15 min a 45-55 °C. Finalmente, la mezcla se centrifugó dos minutos a 14000 rpm y el sobrenadante conteniendo el ARN de interés se transfirió a un tubo limpio y se diluyó en 20 μ l de H₂O.

Cada preparación se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1.5 %, para asegurar que los ARNs estuvieran intactos y que la recuperación fuera la esperada.

III.7.B. Hibridación sobre tejidos fijados y embebidos en Paraplast

III.7.B.1. Pre-tratamiento de las muestras

Previo a la hibridación las secciones adheridas al portaobjeto fueron tratadas de la siguiente manera:

Los portaobjetos se incubaron en xilol dos veces durante 10 min. Seguidamente las muestras se hidrataron gradualmente e incubaron en HCL 0.2M durante 20 min. Luego de 2 lavados con SSC 2X se trataron con 1 μ g/ml de μ proteinasa K durante 30 min. a 37°C. La acción de esta enzima fue bloqueada con 2 mg/ml de glicina en PBS y finalmente los tejidos se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS. Luego de dos lavados en este buffer, las muestras se deshidrataron gradualmente hasta incubarlas en etanol 100%. Se dejaron secar y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de la hibridación.

III.7.B.2. Hibridación de los tejidos.

La solución de hibridación consistió en: SSC 6X, SDS 2%, formamida 50%, ARN de levadura 200 μ g/ml y la sonda correspondiente (600 ng/ml).

Previamente la ribosonda y el ARN de levadura fueron calentados a 85°C durante 3 min e incubados durante 5 min en hielo.

Se aplicaron 100 μ l de solución de hibridación a cada portaobjeto y éstos se incubaron durante toda la noche a 55°C en cámara húmeda.

Figura III. 2: Hibridación *in situ*. El fragmento de PCR que contiene el gen de granulina, fue clonado en ambas direcciones en el vector pZErO™-2. Por medio de la transcripción *in vitro*, (la flecha roja muestra el sentido de la transcripción) se obtuvieron las sondas marcadas con digoxigenina las cuales fueron utilizadas para hibridar los tejidos fijados y embebidos en Paraplast.

III.7.B.2. Lavado y detección

Al cabo de 12 horas, las secciones fueron lavadas en SSC 2X, SDS 0.1% dos veces durante 5 min a temperatura ambiente y en 0.2X SSC y en SDS 0.1% dos veces durante 10 min a 55°C. Posteriormente fueron incubadas en solución de bloqueo (BSA 0.5% en TBS) durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, se lavó tres veces con TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 400mM NaCl) y se incubó con los sustratos de la fosfatasa alcalina: 3,3 μ l de 5-bromo-4cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y 4,4 μ l de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) en 1 ml de *buffer* fosfatasa 1 X al resguardo de la luz, hasta que la señal se consideró apropiada. En ese momento se detuvo la reacción lavando las secciones con agua destilada.

RESULTADOS

Estudios histopatológicos

Por medio de diferentes técnicas de microscopía óptica (M.O.) y electrónica (M.E.) se realizaron estudios sobre el curso de la infección en el hospedador y los cambios histopatológicos producidos por EpapGV. Debido a que las observaciones bajo microscopio electrónico permiten examinar una limitada porción de tejido, con el fin de obtener una visión general sobre los tejidos infectados, se realizaron en primer lugar estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in-situ* por microscopía óptica.

Tropismo tisular

Mediante el examen inmunohistoquímico de cortes de larvas utilizando anticuerpo anti-granulina de EpapGV, se detectó que el tejido adiposo y la epidermis fueron los principales tejidos afectados.

Fig. III.4. Análisis inmunohistoquímico sobre cortes de tejidos de larvas sanas A y B e infectadas de *Epinotia aporema*. C, D y E. Larvas infectadas: La tinción oscura de los tejidos muestra la presencia de granulina (cabeza de flecha). Tejido adiposo (ta), epidermis (e), hemolinfa (h), matriz traqueal (mt), túbulos de Malpighi (tm), testículos (t), músculos (m). A y B: Los tejidos no se encuentran teñidos. Músculo(m), tejido adiposo (ta), intestino (i), hemolinfa (h). (A = 120X, B = 680X, C = 120X, D = 80X y E = 680X).

Tanto en larvas sanas como infectadas, el intestino medio, los túbulos de Malpighi, los testículos y las glándulas de la seda se tiñeron solo ocasionalmente. En músculos y matriz traqueal no se observó reacción positiva (Fig.III.4).

Complementariamente, se generó una sonda de ARN *antisense* de granulina la cual fue utilizada en experimentos de hibridación *in situ* (ARN-ARN) realizados sobre secciones de tejidos. No se detectó reacción positiva en ninguno de los controles (Fig. III.5 A y B).

Esta técnica resultó ser más específica que la inmunohistoquímica, permitiendo diferenciar con mayor precisión los tejidos infectados. Los primeros signos de infección se observaron a las 36 h p.i., cuando tanto el tejido adiposo como la epidermis presentaron células aisladas con reacción positiva (Fig.III.5 C y D). En el tejido adiposo solo se detectó tinción en aquellas células que estaban en contacto con el hemocele (Fig.III.5 E) y posteriormente la marca avanzó hacia células internas del tejido. A las 48 h post-infección se detectaron células teñidas de la epidermis, intercaladas con células aparentemente sanas (Fig.III.5 F).

Posteriormente (72 h post-infección), casi la totalidad de las células de la epidermis se encontraba infectada (Fig. III.5 G). Recién a las 96 h post-infección, se detectó por primera vez síntesis de granulina en células de la matriz traqueal (Fig.III.5 H).

Figura III.5. Hibridación *in situ* utilizando una sonda de ARN *antisense* de granulina. A: Control. Hibridación *in situ* sobre tejidos de larvas infectadas con una sonda de ARN *sense* de granulina B: Control. Hibridación *in situ* sobre larvas sin infectar con una sonda de RNA *antisense* de granulina. C y D: 36 h post-infección. La infección de células de la epidermis (e) y del tejido adiposo (ta) se produce simultáneamente. La flecha muestra las células infectadas. E: 48 h post-infección. En el tejido adiposo (ta), la infección comienza en las células en contacto con el hemocele; (mt) matriz traqueal. F: 48 h post-infección, en epidermis se observan células infectadas alternadas con células sanas. G: 72 h post-infección H: 96 h

densamente granular, debido a la formación de OBs en la mezcla núcleo-citoplásmica (Figs.III.6 A y B).

Fig.III.6. Secciones de larvas sanas e infectadas embebidas en Epon-Araldita. Cortes semifinos de larvas sanas (A) e infectadas (B). Epidermis (e), cutícula (c), núcleo (N), nucleólo (cabeza de flecha). La flecha muestra un área densamente granular en el lado opuesto al hemocele debido a la acumulación de los cuerpos de oclusión (OB). C: Micrografía electrónica de tejido adiposo en un estadio temprano de infección. Membrana nuclear (mn), viriones (v). D: Sección ultrafina de epidermis. Complejos membranosos (cm), material electrodens (me), Cuerpo de oclusión (OB). (A y B = 1200 X. Barra C y D = 1 μ).

El examen de tejidos por M.E. mostró que la morfogénesis de las nucleocápsides se inicia tras la lisis de la membrana nuclear (Fig.III.6 C). En el citoplasma de células infectadas se observaron complejos membranosos dispuestos en forma paralela y rodeando material electrodensos (Fig.III.6 D).

Caracterización morfológica de los cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión presentaron la forma ovoide característica de los *Granulovirus*. Se estimó un tamaño promedio de los OBs de $296 (\pm 6,0)$ nm de ancho y $466 (\pm 8,9)$ nm de largo. El tamaño promedio de los viriones y de las nucleocápsides fue de $290 (\pm 10,9) \times 61 (\pm 1,8)$ nm y $226 (\pm 8,9) \times 41 (\pm 4,1)$ nm, respectivamente. Salvo raras excepciones, se detectó un solo virión por cuerpo de inclusión (Figs.III. 7).

Fig. III 7. Microscopía electrónica mostrando las características morfológicas de EpapGV. A y B: Corte transversal y longitudinal de cuerpos de inclusión (OB), nucleocápside (n) y viriones (v). Virión parcialmente ocluido en granulina (flecha) C: Múltiples viriones embebidos en un gránulo. D: Cuerpos de inclusión en una célula de epidermis infectada. (A = 200 nm, B = 100 nm, C = 100 nm, y D = 2 μ)

Eventos temporales de la infección.

1/2-24 h p.i. No se detectaron signos de pasaje de virus en ninguno de los distintos tipos celulares que componen el intestino medio, ni se evidenciaron signos de infección en este tejido. Dado que el epitelio intestinal constituye un paso obligatorio para lograr la infección de otros tejidos, la imposibilidad de detección de infección sugiere que el pasaje de los viriones hacia el hemocoele se produciría en una porción reducida del intestino, no detectable mediante las técnicas utilizadas en el presente estudio.

36 h p.i. Mediante la técnica de inmuno-oro con anticuerpos específicos, se evidenció la presencia de granulina en cortes ultrafinos.

Fig. III.8. Inmunohistoquímica sobre secciones ultrafinas tejido adiposo de larvas infectadas (A, B, y C) y control (D). A: El núcleo aún se encuentra intacto. La tinción con oro (flecha) muestra la presencia de granulina en regiones electrodensas. Membrana nuclear (cabeza de flecha) B: Estado avanzado de infección. La granulina se acumula en regiones electrodensas específicas de la mezcla núcleo-citoplasma. C: Cuerpos de inclusión (OB). D: Célula sin infectar. (Barra: A = 500 nm, B = 200 nm, C = 200 nm y D = 500 nm).

Se advirtió reacción positiva en regiones electrodensas de los núcleos de células aparentemente infectadas (Fig.III.8 A). Una vez producida la lisis de la membrana nuclear, se detectó granulina en regiones específicas de la mezcla núcleo-citoplasma (Fig.III.8 B). Como era de esperarse, se observó reacción positiva en la matriz proteica de los OBs (Fig.III.8 C).

48 h p.i. El tejido adiposo y la epidermis presentaron gran cantidad de células infectadas. Se observaron grupos de nucleocápsides dentro de estructuras con aspecto de vesículas, entre la membrana plasmática y la lámina basal (FIG.III.9 A).

Fig.III.9. Secciones ultrafinas de tejido adiposo (48 h p.i.). A: Nucleocápside (n) dentro de estructuras membranosas (flecha) por debajo de la lámina basal (lb). Viriones (v). B: Estructura tipo vesícula encerrando nucleocápsides y (n) y organelas citoplasmáticas. Mitocondria (m). C: Nucleocápsides brotando de estructuras tipo vesículas. Hemolinfa (h). D: Viriones agrupados bajo la lámina basal (Barra: A = 200 nm, B = 200 nm, C = 200 nm y D = 200 nm).

No se observaron evidencias de infección en células de la matriz traqueal, inclusive en aquellas en contacto íntimo con tejidos infectados.

72 h p.i. El tejido adiposo se encontró altamente infectado. Los hemidesmosomas (que normalmente mantienen las células adheridas a la lámina basal) y las uniones intercelulares, se vieron afectados. Esto no sucedió en la epidermis, donde a pesar de encontrarse altamente infectada, si bien se perdieron las uniones con la lámina basal, las células se mantuvieron unidas (Fig.III.10 A). En este tejido, la producción de virus brotantes fue menor que la detectada en el tejido adiposo. Los gránulos formados se agruparon principalmente en la región próxima al hemocele.

96 h p.i. El tejido adiposo mostró un alto grado de disociación. Se observaron células con roturas en la membrana plasmática mezclando su contenido con la hemolinfa. Si bien, se encontraron OBs en el citoplasma de hemocitos, el núcleo de estas células se veía intacto. La falta de evidencias de replicación viral sugiere que la presencia de los gránulos en este tipo celular se deba a un proceso de fagocitosis (Fig.III.10 B). Por su parte, la matriz traqueal parecería ser un tejido resistente a la infección, ya que a pesar del avanzado estado de la enfermedad, las células infectadas aparecieron alternadas con células sanas (Fig.III.10 C).

Del análisis de los cortes realizados, no surgieron evidencias de infección en músculos, túbulos de Malpighi, glándulas de la seda, células nerviosas, ni intestino medio.

Fig.III.10. Microscopía electrónica de tejidos infectados con EpapGV. A: Célula de epidermis en un estado temprano de formación de viriones (v) y ensamblaje de cuerpos de oclusión (OB). Nucleocápsides (n). (48 h post-infección) B: Uniones intercelulares (ui) entre células de epidermis infectadas. (72 h post-infección) C: Hemocitos conteniendo cuerpos de inclusión en el citoplasma. Núcleo (N). D: Matriz traqueal infectada con EpapGV (96 h post-infección). Células sanas (cs) se intercalan con células infectadas (ci). (Barra: A = 500 nm, B = 100 nm, C y D = 1 μ).

DISCUSIÓN

Como se explicó anteriormente, el desarrollo de líneas permisivas a la infección para diversos nucleopoliedrovirus permitió, entre otras cosas, el desarrollo de baculovirus recombinantes con genes marcadores que permitieron estudiar en detalle el curso de la infección dentro del insecto (Engelhard *et al.*, 1994). En el caso de los granulovirus, muy pocos aislamientos han sido propagados con éxito *in vitro* y, por lo tanto, los conocimientos sobre los efectos citopatológicos y sobre el progreso de la infección dentro del insecto son muy limitados. Hasta el presente, los únicos estudios sobre patogénesis producida por GVs se realizaron a través de observaciones al microscopio electrónico y el análisis histoquímico de tejidos de larvas infectadas. Además, estos estudios se limitaron a unas pocas especies de virus (Walker *et al.*, 1982; Hess y Falcon, 1987; Federici y Stern, 1990; Tanada y Hess, 1991; Begon *et al.*, 1993).

Este es el primer trabajo de patogénesis en granulovirus en el que se utilizan las técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Estas técnicas permitieron un estudio más preciso acerca del patrón temporal de la infección y posibles vías de diseminación de EpapGV en su hospedador. En una primera aproximación, para los ensayos de hibridación *in situ*, se seleccionó un gen temprano (*egt*) y uno tardío hiperexpresado (*granulina*). Sin embargo la detección del producto del gen *egt* no fue exitosa debido, probablemente, a sus bajos niveles de expresión. Al momento de realizar los experimentos, el laboratorio contaba con poca información acerca del genoma del EpapGV y aún no se había identificado la secuencia de otros genes tempranos. Es por ello que estos experimentos se llevaron a cabo solo detectando la expresión del gen de granulina.

A partir del análisis de los resultados obtenidos mediante dichas técnicas, pudimos determinar que los principales tejidos infectados fueron el tejido adiposo, la epidermis y la matriz traqueal.

En relación con el tropismo tisular, nuestras observaciones ubican a EpapGV dentro de los granulovirus del tipo II, que causan infecciones poliorganotrópicas y agudas en el huésped. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los bioensayos donde los bajos valores de DL_{50} y TL_{50} reflejan una rápida progresión de la infección.

Otro aspecto importante de la patología desarrollada por los GVs tipo II es que brindan un mayor rendimiento de cuerpos de oclusión por gramo de larva, factor importante a considerar en el desarrollo de un bioinsecticida (Federici, 1998).

En general, los cambios citológicos producidos por EpapGV fueron similares a los observados en las infecciones producidas por otros granulovirus. Tweeten *et al.*, (1981) sostienen que la lisis de la membrana nuclear puede ocurrir antes o después del ensamblaje de la progenie viral. A partir de observaciones al microscopio electrónico de células infectadas con el CpGV, Winstanley y Crook (1993), sugieren que las nucleocápsides se forman en el núcleo previo a la ruptura de la membrana nuclear, mientras que la oclusión de los viriones se produce luego de este evento. Sin embargo ninguno de los autores correlacionó el curso temporal de la síntesis de granulina con el momento de lisis de la membrana nuclear. El análisis de células infectadas por EpapGV, mediante la técnica de inmuno-oro, reveló que la expresión de genes tardíos como *granulina* se produce antes de la ruptura de la membrana nuclear. No obstante, la progenie viral se observó luego de la disrupción de dicha membrana.

A diferencia de lo descrito en otras infecciones producidas por GVs, donde la replicación ocurre inicialmente en células del intestino medio (Summers, 1969; Hess y Falcon, 1987), no se detectó replicación dentro de estas células. Existen numerosos ejemplos de infecciones producidas por baculovirus, en las que se establecen infecciones transitorias en intestino, pero no se producen partículas virales ocluidas (Granados, 1980, Flipsen *et al.*, 1993). Por otro lado, en nuestras observaciones bajo microscopio electrónico tampoco se detectó invasión del virus en este tejido, lo cual indicaría que el pasaje a través del intestino medio se da en una limitada porción de tejido o que, alternativamente, los viriones pasan entre las células sin establecer infección.

Utilizando la técnica de hibridación *in situ* la primera reacción positiva se observó a las 36 h post-infección, simultáneamente en células de la epidermis y del tejido adiposo. Esto es lo esperado cuando la diseminación del virus se da vía hemolinfa o a través de hemocitos infectados, donde los tejidos susceptibles están expuestos al virus de manera simultánea.

En la epidermis se observaron células infectadas alternando con células sanas. Esto contrasta con lo observado por Keddie *et al.*, (1989) en infecciones producidas por

AcMNPV, donde en la epidermis se observó la aparición de focos de infección y expansión de éstos hacia células vecinas.

El patrón de tinción observado en el tejido adiposo apoya también la hipótesis de transmisión vía hemolinfa o hemocitos. Las primeras células infectadas fueron aquellas que se encontraron en contacto con el hemocele y luego la infección progresó hacia células internas del tejido.

La lámina basal es una matriz extracelular fibrosa que rodea todos los tejidos. Los viriones no pueden atravesarla ya que solo es permeable a partículas menores a 15 nm (Keddy *et al.*, 1990). Utilizando un baculovirus recombinante de AcMNPV, el cual contenía el gen *reporter LacZ* bajo el promotor de *Drosophila hsp70*, Engelhard *et al.* (1994) propusieron que el virus traspasa dicha lámina a través del sistema traqueal.

El sistema traqueal es un tejido que participa en el intercambio gaseoso entre los tejidos y el medio externo mediante invaginaciones de la pared del cuerpo formando finos tubos llamados traqueas. El lumen de las traqueas se encuentra revestido por una cutícula quitinosa secretada por las células que componen el tejido. Dentro del insecto, las traqueas se bifurcan creando nuevos conductos cada vez más finos hasta que el lumen de cada conducto se convierte en una estructura intracelular llamada traqueola. La célula que contiene la traqueola se llama traqueoblasto y es la que mantiene un contacto íntimo con células de otros tejidos para realizar el intercambio gaseoso (Whitten, 1972). Maina (1989) demostró que los traqueoblastos de *Chotogonus senegalensis* penetran la lámina basal que rodea el intestino medio estableciendo un contacto directo con este tejido.

En estudios sobre patogénesis de AcMNPV, Engelhard *et al.*, (1994) observaron que luego del intestino medio, los traqueoblastos son las primeras células en infectarse. De esta manera propuso que éstos serían los responsables de la infección sistémica sirviendo como portal para el pasaje bidireccional de los viriones brotantes a través de la lámina basal.

En nuestros experimentos encontramos infecciones en células de la matriz traqueal solo en un estado avanzado de la infección. Inclusive, en regiones afectadas de este tejido, se encontraron células infectadas intercaladas con células sanas. Esto indicaría que la infección en la matriz traqueal se produciría por viriones provenientes del

hemocelo y no por pasaje de partículas virales de célula en célula dentro del mismo tejido.

Por otro lado, en los tejidos infectados observamos gran acumulación de viriones entre la membrana plasmática y la lámina basal indicando que dicha lámina constituye una barrera efectiva para la diseminación sistémica. Esto mismo fue observado en larvas infectadas con *Cydia pomonella* GV (Hess y Falcon, 1987), otro granulovirus que produce infecciones del tipo II. El mecanismo por el cual los viriones atraviesan luego dicha barrera no es aún claro. Federici (1997) propuso que este evento estaría mediado por un proceso enzimático, siendo probable que la membrana del virión contenga alguna enzima capaz de degradar los componentes de dicha lámina.

Con relación a los hemocitos, se pudo observar que tampoco serían los responsables de diseminar la infección producida por EpapGV dentro del hemocelo del insecto. El hecho de encontrar gránulos en el citoplasma de células que presentaban el núcleo intacto sugiere que el rol de los hemocitos es el de fagocitar cuerpos de oclusión libres en hemolinfa. En este sentido, en un estudio realizado en infecciones producidas por el granulovirus *Plodia interpunctella*, Begon *et al.*, (1993) proponen que los hemocitos aparentemente fagocitan cuerpos de oclusión para traspasarlos a los túbulos de Malpighi, donde son eliminados al exterior.

Al microscopio electrónico observamos vesículas tipo membranosas llenas de nucleocápsides, entre la membrana plasmática y la lámina basal. Sin embargo no es claro si estas vesículas son el producto de exocitosis o de plegamientos de la membrana plasmática de células infectadas. De ser producto de una exocitosis, estas vesículas estarían involucradas en el transporte de las nucleocápsides al hemocelo y consecuentemente estas nucleocápsides serían las responsables de diseminar la infección dentro del insecto. Estructuras membranosas similares fueron descritas en infecciones producidas por el granulovirus de *Trichoplusia ni*. (Granados, 1986).

Estudios realizados *in vitro* en infecciones producidas por nucleopoliedrovirus, demostraron que las nucleocápsides brotan de la célula a través de la membrana plasmática modificada por una glicoproteína codificada por el virus (Blissard y Wenz, 1992; Pearson *et al.*, 2001). Esta glicoproteína, con actividad fusogénica, participa en la entrada del virión a una nueva célula a través de un proceso de endocitosis mediada por receptor.

Si bien este proceso no fue aún descrito en infecciones producidas por granulovirus, las vesículas membranosas aparentemente juegan un rol en la formación de viriones brotantes ya que se observaron nucleocápsides brotando a partir de dichas estructuras. El conocimiento general acerca del ingreso de los virus envueltos a una célula, nos llevó a pensar que los granulovirus deberían expresar también una proteína de fusión involucrada en la entrada del virión a una nueva célula. Esta proteína probablemente exhibe cierta polaridad acumulándose en porciones específicas de la célula, ya que las vesículas membranosas que contenían nucleocápsides solo se observaron próximas a la región basal celular.

CAPÍTULO IV

**Estudio molecular y funcional de una proteína
de EpapGV con posible actividad fusogénica,
(Epap-F), involucrada en la infección**

INTRODUCCIÓN

Mecanismos de entrada de un virus a una célula

Las infecciones producidas por virus envueltos se inician cuando las membranas del virus y de la célula huésped entran en contacto a través de la interacción de una glicoproteína viral con el receptor celular. Luego, la nucleocápside o el material genético es liberado dentro del citoplasma mediante la fusión de ambas membranas. Este proceso puede producirse a nivel de la membrana plasmática o luego de una serie de pasos que involucran la formación de un endosoma. En ambos casos la fusión es inducida por la acción de una proteína que, dependiendo del virus, puede ser la misma glicoproteína involucrada en el reconocimiento del receptor celular u otra proteína integral de membrana (Flint *et al.*, 2000).

Ingreso de ODVs y BVs a una célula

La entrada de los ODVs a las células del intestino del insecto se produce aparentemente a través de un proceso directo de fusión entre las membranas del virión y célula del huésped (Granados y Lawler, 1981; Horton y Burand, 1993). En tal sentido, se ha identificado y caracterizado una proteína (p74) involucrada en este proceso (Kuzio *et al.* 1989) la cual es esencial para que los ODVs puedan producir la infección en células del mesenterón.

Los BV entran a las células por endocitosis mediada por receptor. Este tipo de proceso, ha sido bien caracterizado en distintos virus envueltos tales como el de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) y la gripe (Wiley y Skehel, 1987; Sattentau y Moore, 1991).

En primer término se produce el reconocimiento y unión del virión al receptor celular a través de una glicoproteína presente en la envoltura del virus. El complejo virus-receptor es luego internalizado formándose una vesícula en el interior del citoplasma.

Esta vesícula se fusiona con un endosoma primario y, como resultado del transporte de protones hacia el interior, el endosoma se acidifica. El cambio de pH produce un cambio conformacional en una proteína asociada a la envoltura del virión y como

consecuencia se fusionan las membranas liberando la nucleocápside al interior de la célula (Flint *et al.*, 2000) (Fig. IV.1).

Fig. IV.1. Ingreso de un virus envuelto a una célula a través de un proceso de endocitosis mediado por receptor. A. Se produce la unión del virión al receptor celular mediante una glicoproteína presente en la envoltura del virus. B. El complejo virus-receptor es internalizado por medio de un proceso de endocitosis. C. La vacuola endocítica se fusiona con un endosoma. D. El pH de la vacuola disminuye debido al bombeo de H^+ hacia el interior de ésta. E. Como consecuencia, se produce un cambio conformacional de una glicoproteína asociada al virión exponiendo el péptido fusogénico y catalizando la fusión entre las membranas del endosoma y del virión. E. La nucleocápside es liberada al citoplasma.

Proteínas de fusión de baculovirus

En 1989, Blissard y Rohrmann caracterizaron una glicoproteína (GP64) asociada a los viriones brotantes de los nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) y de *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV). Esta proteína, requerida para el proceso de

brotación de las nucleocápsides a nivel de membrana plasmática (Monsma *et al.*, 1996; Oomens y Blissard, 1999), está también presente en otros NPVs como los de *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) y de *Bombyx mori* (BmNPV) (Hill y Faulkner, 1994). Además, cumple una función doble mediando tanto la unión del virus al receptor celular como la fusión entre las membranas del virus y del endosoma (Blissard y Wenz, 1992; Hefferon *et al.*, 1999; Kingsley *et al.*, 1999; Plonsky *et al.*, 1999).

El análisis del genoma completo de distintos baculovirus reveló, tanto en ciertos NPVs como en GVs, la ausencia de un gen homólogo a la proteína GP64 (Ijkel *et al.*, 1999). Sin embargo, el hecho de que el ciclo de vida de estos virus sea similar al de AcMNPV o de OpMNPV llevó a pensar que deberían expresar una proteína de fusión diferente.

En el año 2000, Pearson *et al.* identificaron en el genoma del nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* (LdMNPV) una proteína (Ld130) funcionalmente análoga a GP64 y, por ende, capaz de mediar fusión celular a bajo pH. En otros baculovirus se identificaron luego, secuencias homólogas a este gen (Rohrmann y Karplus, 2001; Lung *et al.*, 2002).

De esta manera se ha propuesto la división de los baculovirus en dos grupos filogenéticos basados en el tipo de proteína de fusión presente en la envoltura del virión: El grupo I está compuesto -entre otros- por los NPVs AcMNPV y OpMNPV y contienen la proteína GP64 en su envoltura. El grupo II lo componen aquellos NPVs que presentan un marco de lectura homólogo a la proteína Ld130 de LdMNPV: *Spodoptera exigua* MNPV, *Mamestra configurata* MNPV y los granulovirus de *Plutella xylostella* (PxGV), *Xestia c-nigrum* (XcGV) y *Cydia pomonella* (CpGV) (Ijkel *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 1999). Los productos homólogos de Ld 130, presentan características encontradas en proteínas de fusión de virus que infectan a vertebrados (Pearson y Rohrmann, 2002a) y se los denomina proteína F (fusión) de baculovirus.

Los virus pertenecientes al grupo II no contienen en su genoma una secuencia homóloga a GP64, mientras que los virus que codifican para la proteína GP64 presentan además, una secuencia homóloga a la proteína F (Ac23 en el caso de AcMNPV y Op21 en el de OpMNPV). Sin embargo, el producto de este gen no es capaz de mediar fusión de membranas a bajo pH. (Lung, *et al.*, 2003). Contrariamente,

la proteína F del grupo II puede reemplazar funcionalmente a la proteína GP64 (Lung *et al.*, 2002).

A diferencia del alto grado de homología que existe entre los genes de los virus que codifican para GP64 (>80% de identidad en secuencia de aminoácidos), los genes homólogos a Ld130 son altamente variables (20 a 40 % de identidad en secuencia de aminoácidos). Esto sugiere que la proteína GP64 fue incorporada en el genoma de los baculovirus recientemente, desplazando la función de la proteína F (Pearson, *et al.*, 2000).

Proteína F de baculovirus: Propiedades

Las proteínas pertenecientes a este grupo son moderadamente grandes conteniendo entre 350-650 aminoácidos. Poseen, además, motivos estructurales encontrados en proteínas de membrana incluyendo el péptido señal y dominio transmembrana en el extremo amino y carboxi-terminal, respectivamente. Asimismo, presentan 11 cisteínas conservadas distribuidas a lo largo de la proteína.

Contienen un sitio consenso de clivaje de furina (K/RXXK/R). Estudios en SeMNPV demostraron que la proteína F es clivada formando dos subunidades (F1 y F2). Ambas se encuentran unidas por puente disulfuro (Westenberg *et al.*, 2002).

A continuación de este sitio conserva un motivo compuesto por los siguientes 21 aminoácidos: GXΦBΦGXΦXKΦΦGXΦDXXD, donde Φ representa un aminoácido hidrofóbico, B representa D o N y X cualquier aminoácido. Este motivo está ausente en las secuencias de Ac23 y Op21.

Por último, estas proteínas presentan un motivo tipo α -hélice *coiled-coil*. Este motivo, involucrado en la oligomerización de cadenas polipeptídicas, está presente en un número elevado de proteínas de fusión de virus (Chambers *et al.*, 1990) incluyendo dos glicoproteínas oligoméricas de transmembrana: hemaglutinina del virus influenza (HA) y la glicoproteína variable de superficie (VSG) de tripanosoma (Freyman *et al.*, 1984). Se forma en regiones carentes de prolina, que constan de 7 residuos repetidos periódicamente (a, b, c, d, e, f, g) donde la cadena lateral de los aminoácidos en posición a y d son predominantemente voluminosos e hidrofóbicos o neutros. Como

consecuencia, las interacciones de las α -hélice dentro o entre cadenas polipeptídicas son de índole hidrofóbica (Cohen y Parry 1986).

Proteína de fusión de EpapGV

A partir de los estudios sobre la patogénesis de EpapGV en su huésped, se consideró relevante estudiar la proteína que podría estar involucrada en los mecanismos de brotación y de entrada de los viriones en las células susceptibles. Al momento en que tales estudios fueron iniciados, no se contaba con ningún antecedente en relación con este tema en el género *Granulovirus*.

En una primera instancia -no disponiendo de cultivos celulares susceptibles a EpapGV-, se procedió al análisis de proteínas estructurales de viriones brotantes aislados a partir de homogenatos de larvas infectadas. Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida y se purificó y secuenció el extremo amino-terminal de productos mayoritarios. Este procedimiento no arrojó resultados positivos en cuanto a la búsqueda de moléculas involucradas en los procesos mencionados anteriormente.

Posteriormente, el análisis de secuencias de los extremos de los clones de la biblioteca genómica de EpapGV generada con la enzima de restricción *EcoRI*, permitió la identificación de una secuencia que presentaba alta homología con las proteínas F de baculovirus. A partir de ahí, nos propusimos identificar y estudiar a nivel molecular y funcional esta posible proteína de fusión de EpapGV (Epap-F). Asimismo, verificamos que dicho gen se expresaba en los organismos huésped infectados y, analizamos la regulación de unidad transcripcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las metodologías empleadas en el subclonado de fragmentos de ADN, selección de clones, y purificación de ADN plasmídico fueron descritas en el Capítulo III. Aquí solo se detallarán métodos adicionales utilizadas en el análisis estructural y funcional de la proteína Epap-F. Por otra parte, la composición de las soluciones utilizadas se describen en el Anexo: Materiales y métodos generales.

IV. 1. Mapeo del gen *Epap-F*

Como se describió en la introducción, el análisis de las secuencias de los extremos de clones de las diferentes genotecas de EpapGV permitió la ubicación de distintos genes (Parola *et al.*, 2002). De esta manera, se pudo identificar en la genoteca *EcoRI*, una posible proteína de fusión (a la que se denominó Epap-F). El análisis del mapa físico del genoma de EpapGV permitió inferir que el gen *Epap-F* se encontraba íntegro en el clon *BamHI*-I de la biblioteca genómica de EpapGV de fragmentos generados con la enzima *BamHI* (Manzán, *et al.*, 2002). A su vez, a partir de alineamientos múltiples con otras proteínas de fusión, inferimos que la secuencia de dicho gen, se encontraba en un fragmento *BglII*-*BglII*, del clon *BamHI*-I (17.8 kpb) (Fig.IV.2).

Fig.IV.2. Esquema del clon *BamHI*-I. A partir de la secuencia de los extremos de la genoteca de EpapGV generada con la enzima de restricción *EcoRI* (*), se identificó la secuencia de una posible proteína de fusión. Dicha secuencia se localizaba íntegra en un fragmento *BglII* de 4.1 kpb (3.3 + 0.8 kpb).

El clon *BamHI*-I fue digerido con la enzima *BglII* generándose 4 fragmentos de 8.9, 3.1, 4.1 y 2.7 kpb, respectivamente. El producto de digestión se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y la banda correspondiente al fragmento de 4.1 kpb se purificó por adsorción a polvo de sílice (*GENECLEAN™*, *Bio 101 Inc.*). Finalmente, el

inserto fue subclonado en el plásmido pZErO™- 2, previamente digerido con la enzima *Bam*HI generándose el plásmido pZErO C.

Los plásmidos recombinantes se purificaron a partir de cultivos en pequeña escala (*minipreps*) utilizando el método de lisis alcalina y luego por precipitación con PEG 8000 13%.

El fragmento de 4.1 kpb fue secuenciado desde ambos extremos, para lo cual se realizó una caminata genómica utilizando un secuenciador automático. Los *primers* utilizados fueron diseñados sobre la base de la secuencia que se obtenía en cada paso (CRC-Chicago Sequencing Center). En cada etapa se secuenciaron hasta 700 nucleótidos y el diseño de los nuevos *primers* se realizó a partir del nucleótido 500, resultando en un solapamiento de 200 nucleótidos. Se secuenciaron ambas cadenas de ADN. Las lecturas de dichos solapamientos y de ambas cadenas presentaron diferencias de alrededor del 1%. Las diferencias fueron corregidas manualmente en base al análisis de los cromatogramas .

IV.2. Análisis de las secuencias del gen *Epap-F* y de proteínas F de diferentes baculovirus

Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas con el programa Clone Manager (www.scied.com/ses_cm5.htm). Las predicciones del dominio transmembrana, péptido señal y motivo *coiled coil* fueron predichos con rutinas existentes en el servidor <http://www.expasy.ch>. Los análisis comparativos y las búsquedas en base de datos fueron llevadas a cabo utilizando los programas provistos por el servidor de internet NCBI-Blast (Blast N y Blast P, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) junto al paquete de programas del GCG Gap disponibles a través del nodo de EMBNET que se encuentra en el IBBM (GCG, Madison, Wisconsin). El alineamiento de las secuencias de las proteínas F de baculovirus se realizó por intermedio del programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1974, 1994). Las estructuras secundarias fueron predichas con el servidor JPred2 (www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred) y las comparaciones fueron hechas con rutinas diseñadas *ad hoc* por el Dr. Daniel Ghiringhelli.

IV.3. Análisis transcripcional del gen *Epap-F*

Como primera etapa se analizó la cinética de expresión viral del gen *Epap-F* en el organismo huésped infectado. Para ello, se realizó un ensayo de *Northern blot* sobre

ARN total extraído de larvas sanas e infectadas a diferentes tiempos post-infección. A partir de estos resultados se diseñó el experimento de mapeo transcripcional del extremo 5' utilizando la técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

IV.3.A. Extracción de ARN total de larvas sanas e infectadas con EpapGV

La extracción de ARN total de larvas se realizó siguiendo el método de extracción con isotiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi, 1987). El isotiocianato de guanidinio es un potente agente caotrópico y su uso permite inactivar rápidamente la ARNasa endógena de las muestras. Las larvas fueron infectadas con una dosis de virus suficiente para causar el 100% de mortalidad (ver Materiales y Métodos punto III.1). Para cada uno de los tiempos post infección (24, 36, 48, 56, 72 h.). Se tomaron cinco larvas que se trituraron en 300 µl de solución de GTC (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM, sarkosyl 0.5% y 2-mercaptoetanol 90 mM). La suspensión resultante se centrifugó a 14000 rpm, en microcentrífuga, durante 10 min. El sobrenadante se trató con fenol ácido (pH 4) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) agitando por inversión después de cada agregado. El ARN total se obtuvo por precipitación de la fase acuosa con el agregado de 0.1 volúmen de AcNa 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%. El *pellet* de ARN se lavó con etanol 75%, se secó y resuspendió en agua bidestilada estéril y se conservó a -70 °C. El ARN fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1%.

IV.3.B. Northern blot

Esta técnica se usó para determinar el tamaño de la o las especies de ARNm del gen de Epap-F en las preparaciones de ARN total. Para ello, el ARN se fraccionó por tamaño mediante electroforesis en gel desnaturizante de agarosa, su transfirió a membrana (inmovilización), y se detectó la especie de interés por hibridación con una sonda marcada. La marcación y detección de la sonda se realizó utilizando el *kit* Gene Images™ AlkPhos Direct™ (Amersham Pharmacia Biotech). También se utilizaron las soluciones de hibridación y de lavado del mismo *kit*. Este sistema se basa en la unión

covalente al ADN de una fosfatasa alcalina termoestable y posterior revelado de los híbridos ARN:ADN con el sustrato (1,2 dioxietano).

IV.3.B.1. Geles desnaturalizantes para ARN

Las muestras de ARN total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1%, con formaldehído como agente desnaturalizante. En este sistema se pueden resolver moléculas de tamaño de entre 500 pb y 10.000 pb, evitando la formación de estructuras secundarias.

La preparación de la agarosa y de las muestras se realizó a partir del siguiente protocolo:

<u>Preparación de la Agarosa</u>		<u>Preparación de las muestras</u>	
Agarosa	1.0 g	Muestra (4µg/µl)	4.0 µl
MOPS 10X	50.0 ml	Formamida 2X	6.0 µl
Formaldehído	10.0 ml	Formaldehído	1.8 µl
Agua	40.0 ml	MOPS 10X	1.0 µl
BrEt (20 mg/ml)	0.5 µl		

El formaldehído se adicionó previo a volcar la solución de agarosa en el portageles cuando la temperatura de la misma no superaba los 50°C. Se le agregó *loading buffer* 6X (Promega, USA) a las muestras que ya contenían formamida y, antes de sembrar, éstas se sometieron a calentamiento a 95°C durante 5 minutos, seguido de enfriamiento rápido en agua-hielo. La electroforesis se llevó a cabo a 80 voltios durante dos horas.

IV.3.B.2. Transferencia a membrana

Una vez terminada la electroforesis, los geles se sometieron a varios lavados en agua para eliminar el formaldehído. El ARN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham-Pharmacia) durante una noche (Sambrook *et al.*, 1989)

mediante buffer SSC 10X. Transcurrido el tiempo de la transferencia, la membrana se lavó brevemente con SSC 2X y luego se dejó secar a temperatura ambiente.

IV.3.B.3. Marcación de sonda de ADN

El fragmento de ADN usado como sonda se obtuvo a partir de la digestión del plásmido pZErO-C que contenía el gen *Epap-F*. Este se purificó a partir de gel de agarosa con polvo de sílica (*GENECLEAN™, Bio 101 Inc*). La marcación de la sonda se realizó mediante la unión covalente al ADN de una fosfatasa alcalina termoestable siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

IV.3.B.4. Hibridación

La hibridación se realizó a una temperatura de 55°C durante 12 horas. Las membranas se dispusieron en tubos de vidrio con solución de hibridación provista por el *kit* Gene Images™ AlkPhos Direct™ (0.125 ml/cm² de membrana). Esta misma solución se utilizó como bloqueante en un paso de pre-hibridación de 30 min, a la que luego se le agregó la sonda con la que se incubó durante toda la noche.

A la mañana siguiente, se realizaron dos lavados sucesivos con soluciones de lavado provistas por el *kit* a 50 °C y un último lavado a temperatura ambiente.

La detección final se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia (*CDP-star*). Para ello, la membrana se puso en contacto con el sustrato de la fosfatasa alcalina, 1,2 dioxietano durante dos minutos y luego se expuso a una placa radiográfica. Las placas se revelaron a las dos y cuatro horas post-exposición.

IV.3.B. RACE

Esta técnica se realizó utilizando el *kit* RLM-RACE (Ambion) y permite conocer el tamaño y la secuencia exacta de cada uno de los extremos no codificantes del ARN. Para ello, el ARN total purificado fue tratado con la pirofosfatasa ácida de tabaco (*Tobacco Acid Pyrophosphatase, TAP*) de manera de eliminar el *cap* del extremo 5'. Seguidamente, se ligó a este extremo una secuencia de 45 nucleótidos de ARN (*adapter*) utilizando la ARN ligasa del fago T4. El extremo 5' del gen de interés es

amplificado luego de una reacción de transcripción reversa mediante la técnica de *random-primed* y amplificación por PCR anidada. Para ello, se utilizan *primers* internos y externos específicos del *adapter* y de la secuencia de interés. El ensayo se realizó a partir de ARN de larvas sanas e infectadas extraído a las 36 h post infección.

Los *primers* específicos de la secuencia de *Epap-F* fueron:

5' outer Epap-F : 5' TACGCGTATTGAGCTCCGGTGTACA 3'

5' inner Epap-F : 5' CTGTACCAACATCGATACCCGCCAGAAG 3'

Los *primers* específicos de la secuencia del *adapter* fueron:

5' outer adapter: 5' GCTGATGGCGATGAATGAACACTG 3'

5' inner adapter: 5'CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG 3'

La mezcla de reacción para ambos pares de *primers* (5' *outer adapter* + 5' *outer Epap-F* y 5' *inner adapter* + 5' *inner Epap-F*, respectivamente) consistió en *buffer* de la enzima ADN polimerasa 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 0.5 µM de *primer* 5' y 3' y 0,25 unidades de la enzima ADN polimerasa. Para la PCR a partir de los *outer primers*, se utilizó como molde 1 µl de solución de reacción de transcripción reversa, mientras que la segunda reacción (*inner*) se realizó a partir de 1 µl de la primera mezcla de reacción de PCR (*outer*). El volumen final de las reacciones fue de 50µl en ambos casos. La reacción de amplificación para ambos pares de *primers* consistió en 35 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 60 °C, 2 min a 68 °C.

IV.4 Actividad fusogénica de Epap-F

Con el fin de asegurar la funcionalidad del gen *Epap-F*, se realizaron ensayos de expresión transitoria *in vitro*. Las líneas celulares utilizadas, *Anticarsia gemmatralis* UFL-AG-286 (Sieburth y Maruniak, 1988) y *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF21 (SF-21, Vaughn, 1977) fueron mantenidas en medio TC100 pH 6 (GIBCO/BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (BIOSER, Nutrientes Celulares, Buenos Aires, Argentina).

IV.4.A Construcción del plásmido recombinante

Se construyó un plásmido recombinante conteniendo el gen completo *Epap-F* bajo el promotor *ie-1* de *A. gemmatalis* MNPV (Bilen *et al.*, 2000). La transcripción del gen *ie-1* ocurre en una fase temprana de la infección y por ende su expresión no requiere de proteínas virales adicionales. Es por ello, que el promotor de dicho gen es utilizado para realizar ensayos de expresión transitoria en cultivos celulares.

El ORF completo del gen *Epap-F* se obtuvo por amplificación utilizando la técnica de PCR a partir del plásmido PZErO-C y *primers* homólogos a los cuales se les adicionaron sitios específicos de corte *HindIII* y *XhoI*.

Los oligonucleótidos sintéticos usados como *primers* en la PCR fueron los siguientes:

5' AATTAAGCTTCACAATGTTGTTAC3'

HindIII

5' GATTTCGAGGGTCTGTTA3'

XhoI

La mezcla de reacción consistió en *buffer* PFU 1X; 1 mM MgSO₄ 0,2 mM de cada dNTP; 0.5 μM de *primer* 5' y 3'; 1 unidad de la enzima Pfu ADN polimerasa y 3 ng del ADN molde. La reacción de amplificación consistió en 35 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 50 °C, 2 min a 68 °C.

El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* y luego ligado al vector pIEup491 previamente digerido con *HindIII* y *SalI* utilizando una relación molar vector:inserto 1:3. Las enzimas de restricción *XhoI* y *SalI* dejan extremos cohesivos compatibles. Dicho vector contiene el gen *LacZ* y las regiones *upstream* y *downstream* del gen *ie-1*. De esta manera el gen *LacZ* fue liberado y reemplazado por el gen *Epap-F* conformándose el plásmido IEup Epap-F. En la figura IV.3 se muestra un esquema del plásmido resultante:

Fig.IV.3. Esquema del plásmido utilizado en el ensayo de fusión. El ORF *Epap-F* se encuentra entre las secuencias *upstream* y *downstream* del gen *IE-1* de *A. gemmatalis*. La flecha indica la polaridad de dicho gen.

IV.4.B Ensayo de transfección

Los ensayos se realizaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Se sembraron 1.5×10^6 células en medio TC-100 (pH 6.2), las que se incubaron de 2 a 4 horas para favorecer la adhesión a la superficie. Posteriormente se retiró el medio sobrenadante y se transfectaron 5 μ g de ADN plasmídico utilizando los lípidos de transfección CellfectinTM (Invitrogen), de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante. A las 48 h post-transfección el medio fue reemplazado por medio TC100 (pH 5) y las células fueron observadas a cabo de de 5 horas. El valor de pH 5 fue seleccionado ya que es el registrado en endosomas de células eucariotas luego de la acidificación (Helenius *et al.*, 1982). Además, este valor fue suficiente para mediar fusión de membranas en ensayos de expresión transitoria mediante las proteínas Ld130 y Se8 (Pearson *et al.*, 2000; Ijkel *et al.*, 2000).

Como control negativo se transfectaron células con el plásmido pIEup-Epap-F a las que no se las sometió a cambio de pH, mientras que como controles positivos se realizaron infecciones con *A. gemmatalis* MNPV (AgMNPV) y transfecciones con el plásmido pLd130FL (Pearson *et al.*, 2000). Este último plásmido presenta el ORF completo de la proteína de fusión Ld130 bajo el promotor *ie-1* de *Autographa californica* MNPV (AcMNPV).

Una vez producida la transfección y el cambio de pH, los efectos fueron observados por microscopía óptica de contraste de fase.

IV.5 Expresión del gen *Epap-F* en *E. coli*

IV.5.A Clonado molecular en el vector de expresión procariota

Con el fin de obtener la proteína *Epap-F* en abundante cantidad y con la pureza necesaria para la obtención de anticuerpos policlonales, se utilizó un sistema de alto nivel de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. El ORF de *Epap-F* se clonó en el vector de expresión pRSET (C) (Invitrogen). Este plásmido incluye una secuencia promotora de T7 ARN polimerasa y, para facilitar la purificación de la proteína a expresar, una extensión de polihistidina fusionada al extremo 3' del ORF de interés.

El ORF *Epap-F* fue recuperado del plásmido recombinante pZErO-C por digestión con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. Este último sitio se encuentra en el nucleótido 492 dentro de la secuencia codificante mientras que el sitio *HindIII* se encuentra dentro de la secuencia del *polylinker* del plásmido pZErO. De esta manera, se eliminaron secuencias que presentaban codones "raros" (AGA y AGG) que no son expresados eficientemente en *E. coli* debido a la baja proporción de los respectivos tRNAs. El fragmento liberado se purificó a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (*GENECLEAN™*, *Bio 101 Inc.*), y se ligó al vector de expresión pRSET (C) digiendo previamente con las mismas enzimas de restricción utilizando una relación molar vector-inserto 1:3.

IV.5.B Expresión en *E.coli* BL-21

Cada clon recombinante fue cultivado durante toda la noche a 37 °C y con agitación en presencia de 100 µg/ml de ampicilina. Cada cultivo fue diluido 1/100 en LB-ampicilina y cultivado a 37 °C y 190 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6-0,7. En ese momento se indujo la expresión de la proteína heteróloga con el agregado de 1 mM IPTG. Las bacterias se sedimentaron a distintas horas post-inducción y la proteína se purificó mediante una columna de intercambio iónico de níquel (resina Probond, Invitrogen) en condiciones desnaturizantes siguiendo las indicaciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron por medio de la técnica de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-histidina como se describe mas adelante.

IV.5. C. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS

Las muestras de proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970). El gel separador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), en *buffer* de separación 1 X. El gel concentrador (*stacking*) contenía acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) 5 % en *buffer* concentrador 1 X. Los geles se tiñeron con la solución de tinción durante 30 min a 65 °C. La tinción no específica se eliminó con lavados en una solución 30 % de etanol y 10 % de ácido acético.

IV.5. D. Western blot

Luego de la electroforesis en gel de poliacrilamida, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 4 °C y a 200 mA en *buffer* 192 mM glicina, 25 mM Tris base, metanol 20 % y SDS 0,01 %, pH 8,3

La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada al 5 % en TBS 1X. Luego de lavar tres veces durante 15-20 min cada vez con solución de lavado (0,02 % Tween 20-TBS 1X) se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con la dilución apropiada del suero de ratón anti-hexa-histidina (Invitrogen).

Posteriormente, se lavó tres veces durante 15-20 min cada vez con solución de lavado y se incubó con el suero de cabra anti-Ig de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente, se lavó tres veces con solución de lavado y se incubó con los sustratos de la fosfatasa alcalina: 3,3 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y 4,4 µl de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) en 1 ml de *buffer* de fosfatasa 1 X al resguardo de la luz, hasta que la señal se consideró apropiada. En ese momento se detuvo la reacción lavando los filtros con agua destilada.

IV.6. Expresión del gen *Epap-F* en un sistema de baculovirus: bAcGOZA

Este sistema se basa en la utilización del genoma del baculovirus AcMNPV modificado, capaz de replicarse en *E. coli* gracias a la presencia en su genoma de un replicón miniF. Este bácmido, denominado bAcGOZA, es deficiente en una porción del ORF

1629 cuya expresión es esencial para su replicación en células de insectos. Este defecto puede ser revertido cuando este gen se recupera por recombinación homóloga con un vector de transferencia conteniendo el ORF 1629 intacto. La recombinación ocurre entre el ORF 1629 intacto y secuencias de la región *upstream* de *poliedrina*, que flanquean el gen de interés (Esquema IV 1). La cotransfección del ADN bAcGOZA y el vector de transferencia pBacPak, se produce en células de insecto recuperándose sólo virus recombinantes ya que a partir del ADN parental no es posible obtener progenie viable. Luego de la recombinación, además de recuperar el ORF 1629 completo, el baculovirus resultante contiene el gen de interés bajo el promotor de *poliedrina* y, además, el gen de *poliedrina* bajo el promotor de *p10* (Je *et al.*, 2001). El sistema bAcGOZA se detalla en el siguiente esquema:

Esquema IV 1: El baculovirus recombinante con el gen de interés se obtiene por recombinación homóloga entre el bAcGOZA y el vector de transferencia pBacPak 8. La recombinación ocurre entre el ORF 1629 intacto y secuencias de la región *upstream* de *poliedrina*, que flanquean el gen de interés. El baculovirus recombinante contiene, además, el gen de *poliedrina* bajo el promotor de *p10*.

IV.6.A Clonado molecular en el vector de transferencia

El vector de transferencia utilizado fue el pBacPAK8 (Biosciences Clontech). Dicho vector contiene, flanqueando al *polylinker* el ORF 1629 íntegro. El gen *Epap-F* fue recuperado del plásmido pZErO-C por digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI*. El fragmento liberado se purificó a partir de gel de agarosa y se ligó al vector pBacPAK8 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción utilizando una relación molar vector-inserto 1:3.

IV.6.B Generación de AcMNPV recombinante

Se sembraron 1.5×10^6 células de *S. frugiperda* Sf-9 en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Una vez adheridas las células, se retiró el medio sobrenadante y se transfectaron 2 µg de plásmido de transferencia y 0.5 µg de ADN viral utilizando los lípidos de transfección Cellfectin (Invitrogen), de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante. Luego de 5 h se retiró la mezcla de transfección y las células se incubaron en 2 ml de medio TC-100. A las 48 h post infección, doscientos microlitros del sobrenadante obtenido se utilizaron como inóculo para infectar monocapas de células cultivadas también en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Luego de 72 h de incubación, se colectaron las células y se lavaron en 3 ciclos de centrifugación a 1000xg durante 3 minutos a 4 °C y resuspendieron PBS 1X. El *pellet* de células se resuspendió en *buffer* de siembra 1 X y las proteínas se visualizaron por tinción con *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

Los lisados celulares se resolvieron por SDS-PAGE y la banda correspondiente a la proteína que se deseaba purificar, se cortó del gel y la proteína se electroeluyó en el mismo buffer de corrida durante 3 h a 200V.

Para la producción de anticuerpos contra la proteína Epap-F se inocularon tres ratones. Antes de la primera inoculación, se tomó una muestra de sangre (control pre-inmune). Cada ratón fue inoculado en forma subcutánea con la proteína electroeluida y adyuvante completo de Freund (5µg en 200 µl de adyuvante). Quince días después se tomó una muestra de sangre y se volvió a inocular con una preparación similar a la descrita, excepto por la utilización de adyuvante incompleto de Freund. Pasados el mismo lapso se tomó una muestra de sangre.

RESULTADOS

Identificación de una posible proteína de fusión de EpapGV (Epap-F)

Como se explicó en el apartado IV 1, la secuencia de la proteína Epap-F se encontraba íntegra en uno de los clones de la biblioteca de EpapGV generada con la enzima *Bam*HI. Debido al tamaño de este clon (17.8 kpb), se aisló un fragmento *Bgl*II-*Bgl*II de 4.1 kb que contenía dicho gen, y se subclonó en el plásmido pZEROTM-2. De esta manera, se generó un plásmido recombinante (pZEROTM-C) y se determinó su secuencia mediante una estrategia de "caminata". Se reveló la presencia del ORF completo de EpapGV-F flanqueada por otros dos ORFs adicionales (Fig IV.4 A y B).

El análisis de la secuencia de dicho fragmento reveló un ORF de 1623 pb, cuyo producto sería la proteína Epap-F de 541 aminoácidos. Por comparación con otras proteínas de fusión puede predecirse la secuencia de 19 aminoácidos en el extremo N-terminal que correspondería a un péptido señal. Una vez eliminado este péptido, la proteína Epap-F tendría una masa teórica de 60 kDa. Presenta, además un dominio transmembrana y comparte otra característica con las proteínas F de baculovirus que consiste en un sitio consenso de clivaje de furina (K/RXXK/R) (Fig. IV.5).

Fig. IV. 4: La leyenda se muestra en la página siguiente

Fig.IV.4 A. Mapa de restricción del fragmento de 14.5 kpb de *Bam*HI I (genoteca EpapGV-*Bam*HI) que contiene al gen Epap-F completo. El fragmento *Bgl*II-*Bgl*II, fue subclonado en el plásmido pZErOTM-2 y secuenciado. En el esquema se indican también la ubicación y polaridad (mediante flechas celestes) de los ORFs completos de: Epap-F, DUTPasa y del ORF parcial IAP. **B. Mapa físico lineal del genoma de EpapGV.** En la figura se muestran los mapas de restricción generados con las enzimas *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, y *Bgl*II. En el mapa (Parola *et al.*, 2002), se remarca en rojo la posición relativa de los genes Epap-F y de su homólogo (cp 31) en el genoma de *Cydia pomonella* GV

```

      TATA INRt      TATA      INR      INRt
-130 AGATCTTATTAAAGAGAATTATTAATAAAATTTAAAGAGAGTCACTCTCGTGCGAAATGAAGTAAGTTTGAGATGTGTAATATGTTTC
-43 TTTTGTATTATAATAATTAATAAAATTAATAAAATGACATGTTGTTACTTTTTTTTATTTCCCTTGTGGCGGGTATCGATGT
1   M L L L L F F I S L V A G I D V
44 TGGTACAGATATTGGGTCGTATATATCGATAAATCGTGTAAACGCGAGCGGTTTTCATCTAGAGTTTCAGAATAAATGGGGTTTGT
   S T D I G S Y I S I N R V N A S G F H Y E F Q N K L G F V
131 GGTCAACACTTGGACATTTATTTTAAATGTCGACTATAACGTGATTAGGGTAGGTTGGTAAAGTTGAAGAGTGTCAATTGTACACC
45 V N T W T F I F N V D Y N V I R D R L V K L K S V N C T P
218 GGAGCTCAATACGCGTATAGATAAATTGTTAGAACTCACGATAATATTAGGTTTTGTTGGGTCATAAAAAAATGGCGGTCGTGCG
74 E L N T R I D N L L E T H D N I R F L L G H K K I G G R R
305 CAGTAAGCGTAGTTTGGGGGCACATTTAATTTTGTGCGTAGATTTTACAAGTCCACTATCGGGCTGATGGATGACACGGACGCTGAG
103 S K R S I F G G T F N F V G R F Y K S T I G L M D D T D A
      ▲
392 TGAGCTGCTTTATGAGATGGCTCGGCGCGAGAATAGTACAGAATATAGGGTTAAATGTTGACCGACGCCACGCTACAACATAGCAGA
132 E L L Y E M A R R E N S T E Y R V K M L T D A T L Q L A E
479 GTACATGAAACACGACGACTGTACCGTTGATGTTAAAGATAGTTTGCAGGAAATGAGTCTATGCTTAATAAAATATGACAGGTAT
161 Y M K H D D C T V D V K D S L Q E I E S M L N K I M T G I
566 ACAAATGGCGTTGTACAACAATAAACTCCTCTTTTATGTTACACCCAGTGTGCTTTTAGAAGAGCTGATGTTGGTGAATTTCGGA
190 Q M A L Y N N K L S S F M L H P S V L L E E L M L V N S D
653 CGCTGAGACCGAATGGATCGTGCCGCCACCAAGGAGAATATGCCCTCTTGATACATTGTTAAATGTTCACGTTTCTCTAGATCC
219 A E T E W I V P P T K E N M P L L I H L L N C H V F L D P
740 AGATGATAAAATATTGTTTATGTTAGAGGTGCCCCGCGTGACAAAGAGTAAATTTTCACTTTACAAACCGTGTCCATCCCCCATG
248 D D K I M F M V E V P R V D K S K F S L Y K P V S I P H C
827 CCATCAACAACGACTGTGTAAGTTTCTTACGCCCAACAGTCAGTATATTGGTTTTGACAAAAACGCTATGTCAGACTGGACGATTT
277 H H N R L C K F L T P N S Q Y I G F D K K R Y V R L D D L
914 GTCGCGTCGCGACAATCTCAACGATATGATTCTATGCTATGGCTCGATTACGAGTGAAAAAATGAATTTGTACAGGTTGTGACAT
306 S A C D N L N D M I L C Y G S I T S E K I E F A T G C D I
1001 CAACATGTTTATTAAACCCCAACGTTACGCACGCGAGGTGCGATGTGCGCGGCCAAATTTAACTCTGAAATTTTCTACAGTCTAAA
355 N M F I K P N V T H A G C D V R A A K F N S E I F Y S L N
1088 TAGCATCAACAAATGGTTGTATATGGTGGAGAAACAAGCGCACATTAGACTGACATGCGGCACGGGCCAGTACAAGTCTACAATTTT
364 S I N K W L Y M V E K Q A H I R L T C G T G Q Y K S T I L
1175 AAAAGGTACCGGTATTATTACACTAAACAATATTGTAACTTAAACGGGACGAACGGTGCTAGTGTCCAAGCGTATAGACAATGA
393 K G T G I I T L K Q Y C K L K T G R T V L V S K R I D N D
1262 CGGGCTTAATAACAAATACAACTAGCCCATTTAATTTTCAAACCTATTAACAAATAACACCGCCATTTCAACGCTGTCTTC
422 G L N N K Y K L A P F N F S N Y L L T N N T A I S T L S S
1349 CATAAAACAACGACTACGACGACTTAGCGACATTGCCGTAATCTAGACAACTACTAACCAAGGAACAGACGGACGCGAGATTT
451 I K Q L D Y D G L S D I A R N L D K L L T K E Q T D A D L
1436 AGTTATACCCGCATATGACAACAGTAACGCAAACTGGTACACTAATTTATTTGGCAACTGGTGGTGGGAATTAATTTTATACCTA
480 V I P A Y D N S N A N W Y T N L F G N W W W E L K F I T Y
1523 CGCTGTGTAATTTGTTCTAATAGTCATCTTTGTTTATACCTTGCAATTTGTTGTTGGCAACTCACACATCAGTCTACCTATATT
509 A V V I V L I V I F C L Y L H N C C C G N S H I S L P I F
1610 TTCACCGAAATTTTACAGACCACCCAGAAATCCCATGAGCCAGAATCCCCACCCCACTAAAAAGTTTCAAGATTAGATAACGATATC
538 S P K I *
1697 TCTGTGATTAACGGGTATAAAATACGCTGCAACGGTCCCAATTTGGCACAACAATCAACAATCAACATGGACGCCTACACCAACA
1784 CCGAAACTCCAACGCTGGACCGATGCGTAGAGCGAGAACAAGTAAAGTTGCCACGATTTCTATGCAAGAGGCCATTGAAGAACAGC
1871 AGCAGCTCATCAAGACACTGCAAGAGACCAACAAGAAAA

```

Fig. IV.5. ORF completo del gen *Epap-F* y secuencias flanqueantes. El producto de traducción se indica con códigos de una letra bajo los codones del ORF limitado por los codones de iniciación y terminación (recuadrados). El péptido señal y el dominio transmembrana, se encuentran sombreados en negro y gris, respectivamente. Los aminoácidos subrayados en gris representan la secuencia consenso de clivaje de furina y con la flecha se indica el sitio potencial de clivaje. Los aminoácidos subrayados con una línea negra, representan una α -hélice posiblemente involucrada en la formación de una estructura *coiled-coil*. Los nucleótidos subrayados en la región 5' no codificante representan posibles motivos TATA y sitios de iniciación de la transcripción temprana (INR). Con INRt se indica el posible motivo de iniciación de la transcripción tardía.

El análisis de la región *upstream* de la secuencia del ORF del gen *Epap-F* (Fig. IV. 5.), reveló la presencia de varios motivos que, según la bibliografía, son posibles sitios iniciadores o reguladores de la transcripción. Se destaca la presencia de dos elementos "TATA box" a la altura de los nucleótidos -123 y -111 y el motivo iniciador de la transcripción CAGT (INR). Ambos motivos están involucrados en la expresión de genes tempranos (mediada por la ARN polimerasa II y factores de transcripción del huésped). Asimismo, se distinguen dos motivos involucrados en la expresión tardía, TAAG (mediada por la ARN polimerasa viral).

Downstream del sitio consenso de clivaje de furina, la secuencia contiene el motivo de 21 aminoácidos típico de esta familia (Rohrmann, y Karplus, 2001): gXΦBΦΦGXΦXKΦΦGXΦDXXD donde Φ representa un aminoácido hidrofóbico, B representa D (ácido aspártico) o N (asparagina), X cualquier aminoácido y G, glicina (Fig. IV. 6).

Epap-F	ELNTRID-----NLETHDNI--RFLLG-----HKKIG---GR RSKR SIFG STF
Cp31	DYKQEV DY-LLYE-KTATLLETHTSI--EFLLL-----HKRLP-NLRH HR K RGL FGGAF
Px26	ANVNFEH-----KLHNLHSLHDII--HYSLA-----HRK-- KQRRE ----LLGGAF
Xc27	YSDEASFI-IN-T-TAEDLIERHNEL--EFMLA-----HKRV TKPV KNGAKRNIFGGAL
Mc9	AEYMLMI-KPLKNRISAMVKTHALIDQKLAKTPKGTKLDDVTLP-----PP RRRR RGAF
Ld130	NAIIESEINTYILKRILYLQVQHTIDDKIKANAEGDAPDSRWELNTKDPLAP RRKR GV
Se8	VKYLKLEIDHMLSTVIPNLAQQHNLDDQKVPLTPSNATLTKATLS----PT KRRS K RGL F
Epap-F	NFVGRFYKSTIGLMDTDIAELLYEMARRENSTEYRVKMLTDATLQLAEYMKHDD-----
Cp31	NFMGRFYKYTMGVMDDRDAALLYEVAEHTNNTFRVKTLTNETINIIKYLSNVHSELDAA
Px26	NFVGRFNKYVYGTMDDEDALDYDVVRHENNTEYRVVLSQQTCLKIANIEKVMQSEAVT
Xc27	NFVGRVDKYLFGVMDKDAELLYKLAIARENSTHYRIKQLTVDTIKITNIEALKPELIQV
Mc9	DFVGHIDKFLFGIMDADDAHTLHKLANSTNSLNKQVAQLTDELIKLTVDYVDHETTISYQ
Ld130	NFVGTVDKFLFGVMDSDARELHDLAKTSNALNEQIKEVTDELVNIKFEHKKQCLERQR
Se8	NFMGHVDKYLFGIMSDDAHELHMLANTTNSLNSQVKQLNDELIVLADYVDHEFHASMR

Fig. IV.6. Alineamiento múltiple de parte de la secuencia de aminoácidos de *Epap-F*, *Cydia pomonella* GV (Cp31), *Plutella xilostella* GV (Px 26), *Xestia c-nigrum* GV (Xc27), *Mamestra configurata* MNPV (Mc9), *Lymantria dispar* MNPV (Ld130) y *Spodoptera exigua* MNPV (Se8). El motivo K/RXXK/R (secuencia consenso de clivaje de furina) se encuentra en negritas, y sombreado en negro se visualizan los aminoácidos G, K y D pertenecientes al motivo de 21 aminoácidos conservados río abajo del sitio potencial de clivaje.

Asimismo, presenta el patrón de 11 cisteínas distribuidas a lo largo de la proteína (Rohrmann, G.F and Karplus, P.A. 2001). Tabla.IV.1.

Tabla.IV.1. Patrón espacial de cisteínas (*)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
Ld130	125	117	5	29	7	14	18	34	27	128	
Se8	123	115	5	27	7	14	17	34	31	130	
Px26	101	115	5	25	7	14	12	34	21	115	
Xc27	112	115	5	26	7	14	17	34	20	121	
Epap-F	98	109	5	25	8	14	14	33	21	120	

(*) A la izquierda se indican las proteínas de fusión de distintos baculovirus y los números indican las cantidades de residuos de aminoácidos que se encuentran entre cada cisteína conservada

Similitudes entre Epap-F y otras proteínas de fusión de baculovirus

La secuencia de aminoácidos predicha para Epap-F posee una identidad entre 45-35% y una similitud entre 55-65% con proteínas de fusión de otros granulovirus. Asimismo, presenta valores de identidad y similitud entre 25-27% y 43-45%, respectivamente, con respecto a proteínas de fusión de nucleopoliedrovirus. Entre los GVs, el mayor grado de similitud se observa con la proteína F de *C. pomonella* GV, mientras que entre los NPVs la proteína de *M. configurata* MNPV es la que presenta mayor grado de similitud.

A partir de la secuencia de aminoácidos, se comparó la estructura secundaria deducida de Epap-F con otras proteínas F de baculovirus. Para ello, se consideraron tres estados alternativos a los que se les asignó un número arbitrario: *helix* (1), *sheet* (-1) y *loop* (0) (Fig. IV. 7 A y B). Como se desprende de las figuras, el patrón de estructura secundaria de Epap-F coincide con el patrón sugerido para otras proteínas F de baculovirus.

En particular se conserva la porción de las regiones de α hélice que incluye los posibles dominios de dimerización *coiled coil* y posible dominio transmembrana.

Análisis transcripcional del gen *Epap-F*

Inicialmente realizamos un estudio de cinética de expresión *in vivo* a partir de ARN de larvas extraído a distintos tiempos post-infección. Luego, por medio de la técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), nos propusimos identificar los motivos de iniciación de la transcripción de dicho gen para conocer en qué fase, temprana (por medio de la ARN pol II y factores de transcripción del huésped) y/o tardía (mediante la ARN pol viral) de la infección se produce la expresión de dicho gen.

Fig. IV.7. Análisis de la estructura secundaria de Epap-F deducida a partir de la secuencia de aminoácidos y comparación con la estructura de otras proteínas F de baculovirus. Se estudiaron tres estados alternativos: helix, loop y sheet. Se asignaron valores arbitrarios para cada uno de los estados: α -helices (+1), β -sheets (-1) y loops (0). En el panel A se muestra la estructura para Epap-F mientras que en el panel B, la estructura secundaria consenso de las proteínas de fusión de: EpapGV, CpGV, PxGV, XcGV, McMNPV, SeMNPV, LdMNPV. Las estructuras deducidas de cada una de las proteínas fueron alineadas con el programa Clustal X, utilizando una matriz de identidad. La línea negra corresponde al promedio de cada posición mientras que las barras azules muestran la dispersión.

Fig.IV.8. Cinética de expresión del gen *Epap-F*. *Northern blot* realizado sobre ARN total de larvas infectadas y sin infectar. A la izquierda se muestra el gel de agarosa desnaturalizante teñido con BrEt. A la derecha el resultado del *Northern blot*. El tamaño de la principal banda observada fue levemente superior a 1.9 kpb. El producto transcripto comienza a ser visible a las 36 h p.i. siendo más intenso a las 56 h p.i. El control negativo (C), no presenta señal.

El resultado del *Northern blot* permitió confirmar la expresión del gen *Epap-F*, se observó la presencia de dos bandas de aproximadamente de 1.9 y 2.6 kpb. Ambas se detectaron a las 36 h.p.i. con un pico a las 56 h.p.i., la señal se mantuvo hasta las 72 h.p.i. La calle del gel correspondiente al control negativo (larvas sin infectar) no presentó señal (Fig.IV.8). Ambas bandas podrían representar isoformas correspondiente a la expresión gen *Epap-F*.

Determinación de los extremos de los ARN mensajeros de *Epap F*

Con el fin de determinar con mayor precisión en qué fase de la infección se produce la transcripción del gen *Epap-F* realizamos un ensayo de RACE (Rapid amplification of cDNA ends-). Los resultados fueron comparados con la información teórica sobre las secuencias *upstream* de este ORF.

En la figura IV. 9, se muestra un esquema con la posición de los *inner* y *outer primers* específicos para el gen *Epap-F* y del *kit* RLM-RACE

Como resultado de la amplificación con los *outer primers* se obtuvieron dos bandas de alrededor de 400 y 280 pares de bases. La re-amplificación con los *inner primers* dio como resultado dos bandas mayoritarias de alrededor de 200 y 100 pb (Fig IV.9). La diferencia de movilidad entre ambos productos de PCR, se corresponde con la diferencia de nucleótidos que existe entre ambos pares de *primers*. Los fragmentos de ADN fueron clonados en el sitio *EcoRV* de pZErO-2 y los clones recombinantes se seleccionaron analizando las colonias por PCR con *primers* universales. Para la

determinación precisa del extremo 5' se aislaron y secuenciaron 10 clones correspondientes al inserto de 100 y otros 10 de 200 pb.

primers específicos para el gen *Epa*

Fig. IV. 9. Esquema de la posición de los primers *inner* y *outer* específicos para el gen de *Epa-F* y del kit RLM-RACE. Los primers *inner* y *outer* de *Epa-F* se encuentran a una distancia del codón AUG de 52 y 123 pb respectivamente. En la foto se muestra el producto de amplificación obtenido con ambos pares de primers. Los fragmentos correspondientes a las bandas de 200 y 100 pb (flecha) fueron clonados en el vector pZErO-2 y secuenciados.

El resultado se observa en la figura IV. 10. El análisis de la secuencia mostró un sitio de iniciación en el nucleótido A de la secuencia consenso de iniciación tardía TAAG de la *ARN polimerasa* viral ubicado a -123 nucleótidos del ATG. Por otro lado se registró un inicio de la transcripción en el nucleótido T en posición -6 con respecto al comienzo del ORF. Este último motivo no está descrito como secuencia consenso de iniciación temprana (donde se utiliza la *ARN polimerasa* II del hospedador) ni tardía.

No se detectaron productos de RACE que indicaran el uso del motivo iniciador temprano CAGT


```

      ⌞
AGATCTTATTAAGAGAATTATTAATAAAGAGAGTCAGTCTCGTGCGAAATGAAGTAAGTTGAGATG TG TAAATATGTTCTTTT
      ⌞
GTATTATAATAATTAATAAAATAAATTAATAAATG CACAATGTTGTAC TTTTITTTATTCCTTGTGGCGGGTAICGATGTTGGTACAG TATTG
GGTCGTATATCGATAAATCGTGTAACGCGAGCGGTTTCACTATGAGTTTCAGATAAATGGGGTTGTGGTCAACACTTGGAC
ACATTATTTTAAATGTCGACTATAACGTGATTAGGGATAGGTTGGTAAAGTTGAAGAGTGTCAAT GTACACCGGAGCTCAATACGC

```

INNER PRIMER

OUTER PRIMER

Figura IV. 10. Esquema de los sitios de iniciación de la transcripción del gen *Epap-F*. El codon de iniciación de la traducción (AUG) se encuentra subrayado. Las flechas señalan ambos sitios de iniciación de la transcripción. Uno de ellos se encuentra dentro de un motivo de transcripción tardía (TAAG) mientras que el otro no está descrito como secuencia consenso de iniciación temprana (donde se utiliza la *RNA polimerasa II* del hospedador), ni tardía. La secuencia de los *primers inner* y *outer* se encuentran sombreadas en negro.

Ensayo de actividad fusogénica inducida por *Epap-F*

Para corroborar si el gen *Epap-F* codifica una proteína de fusión, se realizaron ensayos de expresión transitoria en cultivos celulares (UFL-AG 286 y Sf21). Para ello se construyó un vector recombinante con el ORF *Epap-F* bajo el control transcripcional del promotor ie-1 y la secuencia de terminación y poliadenilación del mismo gen ie-1 de AgMNPV. (IEup-*Epap-F*). Como control positivo se transfectaron células con el plásmido pLd130FL, el cual presenta el ORF completo de *Ld130* bajo el promotor ie-1 de *Autographa californica* (Pearson, y Rohrmann, 2000).

Los resultados fueron similares para ambos tipos celulares. Cuando las células fueron transfectadas con los plásmidos pIEup-*Epap-F* y pLd130FL, y el pH del medio se redujo de 6 a 5, se observaron células fusionadas multinucleadas (Fig. IV 11). Si bien algunos eventos de fusión se produjeron al poco tiempo de cambiar el pH del medio, la formación de sincicios fue sustancialmente evidente luego de las 4 h del cambio de pH. En las células Sf-21 la formación de sincicios fue más evidente cuando se transfectó con el plásmido pLd130FL. Las células transfectadas que no fueron sometidas a modificación del pH, no experimentaron fusión celular.

Fig. IV. 11. Expresión de *Epap-F* en células de insecto. Panel 1. Se transfectaron células SF-21 con el plásmido IEup-Epap-F y luego de 48 h, se trataron con TC100 pH 5 (A y B). La formación de células multinucleadas se registró luego de 4 h de incubación. C. Células transfectadas con IEup-Epap-F mantenidas a pH 6. D Células transfectadas con pLd130FL y luego tratadas a pH 5. **Panel 2.** Formación de células multinucleadas luego de transfectar células UFL-AG-286 con el plásmido IEup-Epap-F (A), infectar con el virus AgMNPV (B) y transfectar con el plásmido pLd130FL (C). En todos los casos, luego de 48 h producida la transfección, las células se trataron con medio TC100 pH 5. D. Células sin transfectar con medio TC100 pH 5. La flecha muestra la formación de sincicio

Expresión del gen Epap-F en *E. coli*

Con el fin de obtener anticuerpos que reconozcan a la proteína Epap-F, en una primera etapa, se intentó producir esta proteína en un sistema procarionta. El gen correspondiente a dicha proteína fue clonado y expresado en *E. coli*. Mediante un análisis por *Western-blot* se detectó un polipéptido cuyo tamaño, levemente superior a 40 kDa, era similar al estimado en forma teórica (Fig. IV. 12). El máximo de expresión se observó a las 3 h post inducción. Es probable que luego de ese tiempo la proteína haya sido degradada y, por ello, los niveles detectados a las 12 y 24 horas post-inducción fueron menores.

Fig. IV.12. Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína Epap-F en *E. coli*. La proteína previamente purificada, se resolvió por SDS-PAGE, se transfirió a membrana de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo antihistidina.

Solo se observa reacción positiva en bacterias sedimentadas 3, 12 y 24 horas post inducción con 1 mM IPTG detectándose un polipéptido cuyo tamaño es de aproximadamente 40 kDa.

Si bien en el ensayo por *Western blot* se apreció una banda definida, cuando las proteínas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y luego teñidas con *Coomassie Brilliant Blue*, no se distinguió la expresión de proteínas heterólogas.

Es por ello que decidimos expresar la proteína Epap-F en otro sistema que resultara más eficiente.

Expresión del gen Epap-F en un sistema de baculovirus

Debido a las dificultades en la expresión del gen *Epap-F* en *E. coli*, se ensayó la expresión de dicha proteína en células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante.

Con este fin, se utilizó el sistema bAcGOZA. Dicho sistema se basa en la recombinación homóloga en cultivo de células entre un vector de transferencia (conteniendo el gen de interés y el ORF 1629 completo) y el genoma de *AcMNPV* modificado, conteniendo un replicón mini F y el ORF parcial 1629. Sólo los virus recombinantes que adquieran el ORF completo 1629 y, por lo tanto, también el gen de interés, se podrán replicar en células de insectos luego de la cotransfección. Los virus recombinantes recuperados del medio sobrenadante de las monocapas celulares transfectadas se utilizaron como inóculo para infectar una nueva monocapa. Dado que el recombinante contenía un gen de poliedrina, el curso de la infección se pudo seguir a través de la formación de poliedros (Fig. IV.13).

Fig. IV. 13. Microscopía óptica de células Sf-9 infectadas con el bácmido recombinante (A), y sin infectar (B). La foto fue tomada a las 48 h post infección. La flecha muestra la formación de poliedros en la mayoría de las células infectadas.

Para analizar la producción de la proteína Epap F en este sistema de expresión el lisado de células de insectos infectadas con el baculovirus recombinante se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida. (Fig. IV. 14).

Fig. IV. 14. Las proteínas totales del lisado de células de insectos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Calle 1. Lisado de células infectadas con el baculovirus recombinante. Calle 2. Lisado de células sin infectar. Las flechas muestran los productos de expresión del gen heterólogo *Epap-F* y la expresión del gen de poliedrina a la altura de 62 y 32.5 kDa, respectivamente.

La diferencia con el cálculo teórico (60 kDa) puede deberse a modificaciones post-traduccionales como glicosilación de residuos, que incrementen levemente su peso molecular.

Esta proteína se utilizó en la generación de anticuerpos específicos para realizar, en un futuro, estudios bioquímicos y ensayos de inmuno-marcación con oro sobre cortes ultrafinos para microscopía electrónica, con el fin de determinar su localización sub-celular.

DISCUSIÓN

Los estudios presentados en este capítulo, permitieron identificar y caracterizar la proteína Epap-F, demostrando su actividad fusogénica a bajo pH.

Los valores de identidad y similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína Epap-F con otras proteínas de fusión de baculovirus no son elevados, se encuentran dentro de los esperados cuando se comparan distintas proteínas F de baculovirus. A diferencia de la alta homología que existe entre las proteínas homólogas a GP64 (> 74%), los porcentajes de identidad entre las proteínas F no superan el 43% (Pearson *et al.*, 2002). A modo de ejemplo, las proteínas F de LdMNPV y SeMNPV (cuyas actividades fusogénicas han sido comprobadas) comparten una identidad de secuencia del 41% (Ijkel, *et al.*, 2000). Se especula que el mayor grado de variabilidad presente en esta familia de proteínas en relación con lo observado en la familia de las GP64, se deba a que estas últimas han sido incorporadas más recientemente en el genoma de los baculovirus.

A pesar de la modesta similitud que existe entre Epap-F con otras proteínas F de baculovirus, la secuencia presenta motivos altamente conservados. Entre ellos podemos destacar un posible péptido señal, un dominio transmembrana y una secuencia consenso de clivaje de furina. En este sentido, Westenberg *et al.* (2002) demostraron que la proteína de fusión SeMNPV se expresa como un precursor F_0 . Dicho precursor es clivado mediante la acción de una furina presente en la célula huésped en dos subunidades (F1 y F2) unidas por puentes disulfuro. Inmediatamente después de dicha secuencia, se encuentra un dominio hidrofóbico intercalado con aminoácidos cargados. Este dominio presenta similitudes con los motivos de los péptidos fusogénicos presentes en otras proteínas de fusión de diferentes familias de virus (Nobusawa *et al.*, 1991). En ellos se incluye la presencia de un número determinado de glicinas, intercaladas con aminoácidos hidrofílicos de cadenas laterales voluminosas que conservan la posición en las distintas proteínas. Pearson *et al.* (2002) observaron que la sustitución de aminoácidos conservados cargados por hidrofóbicos en esta región de la proteína LD130, reduce significativamente la capacidad de dicha molécula de mediar fusión a pH 5.

Seguido a este dominio, Epap-F contiene un motivo *coiled coil*, también característico de esta familia. En otras proteínas de fusión, se conoce que este motivo está involucrado en la trimerización de moléculas.

Las proteínas de fusión virales están generalmente conformadas por más de una subunidad. En la mayoría de los casos, los oligómeros se forman a través de interacciones no covalentes. En el caso de la proteína de fusión de baculovirus GP64, las tres subunidades están unidas por interacciones no covalentes y por puentes disulfuro (Oomens, *et al.*, 1995). Epap-F contiene en su secuencia 11 cisteínas características de la familia F; diez de ellas se encuentran *upstream* del dominio transmembrana. Si bien hasta el presente no se han realizado estudios sobre la síntesis, el procesamiento y oligomerización, es probable que estos aminoácidos estén involucrados en el último proceso.

En el presente capítulo caracterizamos, además, la expresión del gen *Epap F*. El resultado del *Northern blot* permitió confirmar la expresión del gen. Se observó la presencia de dos bandas de 1.9 y 2.6 kpb respectivamente que podrían representar isoformas del ARN mensajero. Esto podría deberse a diferencias en la longitud de las regiones no codificantes tanto *upstream* como *downstream*.

Como fue descrito en la Introducción general, la expresión de los genes virales tempranos durante el ciclo de infección de un baculovirus, depende de promotores reconocidos por la ARN polimerasa II de la célula huésped. Es por ello que en estos genes de baculovirus se observa el elemento TATAA seguido por el sitio de iniciación CAGT a unos 24pb. Como estos elementos regulatorios son utilizados al inicio de la infección, se los denomina promotores tempranos. Luego de la replicación del DNA viral, se transcriben los genes tardíos por medio de una ARN polimerasa codificada por el virus a partir de promotores que contienen el motivo A/G/TTAAG. El inicio de transcripción se realiza dentro de este motivo.

La secuencia 5' no codificante de *Epap-F* presenta motivos consenso de transcripción temprana y tardía. A partir del ensayo de RACE se obtuvieron dos productos cuya secuencia demostró que la transcripción del gen se realiza a partir de un motivo de transcripción tardío y a partir de un motivo no convencional ATGC. En este sentido, según Blissard *et al.* (1992) en algunos genes de baculovirus existen motivos promotores e iniciadores no convencionales que serían dependientes de la expresión

de otros factores virales durante el curso de la infección. Asimismo, Blissard y Rohrmann (1989) sugieren que pueden existir varias categorías de promotores tempranos que reflejen diferencias de regulación de la transcripción a tiempos cortos post-infección. Sin embargo, para conocer con exactitud la naturaleza de dicha secuencia y determinar si la expresión de dicho gen se produce antes o después de la replicación viral se deberían realizar ensayos en cultivo de células sincronizando la infección. La sincronización se puede lograr infectando un cultivo de células a 4°C (a esta temperatura se produce el “pegado” de los viriones a las células pero no su internalización) y con una alta multiplicidad de infección y luego cambiar la temperatura a 27°C para que continúe el ciclo de infección. Lamentablemente, no existen hasta el momento líneas celulares susceptibles a Granulovirus. A pesar de los esfuerzos realizados durante más de diez años, solo se ha podido obtener una línea celular donde se replica de manera subóptima CpGV (Winstanley y Crook, 1993).

Los resultados del mapeo del extremo 5' no codificante de esta tesis no son coincidentes con los obtenidos por Pearson *et al.* (2002), quienes encontraron que *Ld130* y *Op21*, se expresan a partir de secuencias promotoras consenso tempranas y tardías. Esto mismo fue observado en la regulación de la proteína GP64 de AcMNPV y OpMNPV (Blissard y Rohrmann, 1989; Blissard *et al.*, 1992). Sin embargo, en general se ha observado que la utilización de ambos elementos promotores en virus de la granulosis es significativamente menor que en poliedrosis (1-2% vs. 15%) (Pearson *et al.*, 2002).

Para determinar si la proteína Epap-F era capaz de mediar la fusión de membranas a bajo pH, se realizó un ensayo de expresión transiente en células de insectos de *Anticarsia gemmatralis* (UFL-AG-286) y de *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF21). La elección del tipo de células se basó en resultados de experiencias anteriores, en las que se realizaron con éxito ensayos similares transfectando SF-21 con un vector que contenía el ORF Se8, lo que indicaba que esta línea celular era apropiada para realizar ensayos de fusión con proteínas F de baculovirus (Ijkel, 2000). Por otro lado, la elección de las células UFL-AG-286 se basó en el hecho de que la transfección se realizó con un vector donde el gen *Epap-F* estaba bajo el promotor ie-1 de *Anticarsia gemmatralis* MNPV. Se observó fusión en ambos tipos celulares. Sin embargo, la frecuencia de este evento fue mayor al transfectar células UFL-AG. Esto pudo deberse a la existencia de

factores de transcripción necesarios para la expresión de dicho gen presentes en este tipo celular, o a diferencias en la eficiencia de transfección.

Si bien en varios genomas de baculovirus se identificaron secuencias homólogas a las de proteínas F, hasta el presente sólo se ha demostrado la función fusogénica de las proteínas F de dos nucleopoliedrovirus (Ld130 y Se8, de LdMNPV y SeMNPV, respectivamente) (Pearson *et al.*, 2000; Ijkel *et al.*, 2000). Los intentos en detectar esta actividad en granulovirus no tuvieron éxito (Rhormann, comunicación personal)

En este trabajo no sólo identificamos una proteína de fusión en EpapGV (Epap-F), sino que además demostramos por primera vez la actividad fusogénica de dicha molécula en un miembro del género *Granulovirus*.

En base a los conocimientos acerca de la entrada de los NPV a una nueva célula, los resultados de este trabajo sugieren que la proteína Epap-F podría jugar un rol esencial en el proceso de infección secundaria de una larva susceptible a Epap GV. Para confirmar esta hipótesis, será necesario realizar ensayos adicionales que involucren la neutralización de la infección mediante anticuerpos que reconozcan la proteína Epap-F. La generación de anticuerpos anti-EpapF aquí iniciada, constituye un aporte de importancia para futuros estudios orientados en tal sentido.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Los valores de DL₅₀ y de TS₅₀ demostraron que EpapGV es altamente virulento, principalmente para larvas neonatas de *Epinotia aporema*. La disminución de la susceptibilidad larval acorde con la edad, y considerando los hábitos barrenadores de la plaga, indican la necesidad de desarrollar un sistema de alarma que permita aplicar el bioinsecticida durante los primeros estadios larvales.
- EpapGV no resultó infectivo para otras especies plagas del cultivo de soja. El estudio de los determinantes genéticos del rango de huéspedes podría permitir el diseño de estrategias tendientes a la ampliación de dicho rango hacia otras especies plaga de soja.
- La infección producida por EpapGV es poliorganotrópica, lo cual se traduce en una alta velocidad de acción y gran producción de cuerpos de inclusión por larva. El rendimiento de OBs y la facilidad de dispersión de éstos en el ambiente tras la liquefacción de los tejidos de las larvas, son factores que facilitan la transmisión horizontal de la enfermedad y su persistencia en el ambiente para la infección de generaciones sucesivas.
- La expresión de genes tardíos como *granulina* se produce antes de la ruptura de la membrana nuclear. No obstante, la progenie viral se observó solamente después de la disrupción de dicha membrana. Una vez que los viriones atraviesan el intestino la infección secundaria se produce aparentemente vía hemolinfa, siendo la lámina basal una barrera efectiva contra la dispersión de los viriones hacia el hemocoele.
- Los estudios biológicos e histopatológicos establecieron una base de conocimientos importante para determinar distintos aspectos de la interacción virus-huésped. Estos conocimientos podrán ser aprovechados en el mejoramiento del bioinsecticida.
- En tal sentido, el desarrollo de baculovirus recombinantes que expresen proteínas que alteren el equilibrio hormonal del insecto o que, luego de atravesar el intestino medio, permitan establecer más rápidamente una infección sistémica, podrían acelerar más aún la velocidad de acción del bioinsecticida. Está comprobado que la expresión de ciertas proteasas favorece la infección sistémica.

- Las alteraciones en el desarrollo y comportamiento alimenticio observadas en larvas infectadas con EpapGV podrían deberse a la expresión del gen *egt*. La delección de este gen podría disminuir el consumo de alimento y el tiempo letal.
- Por otro lado, con el fin de aumentar la eficacia del bioinsecticida, se podrá evaluar el agregado de ciertos compuestos que incrementen la virulencia del formulado (como por ejemplo abrillantadores ópticos que actúan sobre la membrana peritrófica del insecto).
- Se identificó y secuenció una proteína de fusión (Epap-F), cuyos motivos en la secuencia nucleotídica la ubican dentro de la familia las proteínas F de baculovirus.
- La expresión del gen *Epap-F* se encuentra bajo el control de un promotor tardío típico reconocido por la *RNA polimerasa* del baculovirus. Por otro lado, se registró un inicio de la transcripción dentro de un motivo no descrito como secuencia consenso temprana o tardía. Para determinar si esta secuencia es reconocida por la *RNA polimerasa* del virus o la del huésped deberían realizarse ensayos en cultivos de células sincronizando la infección. Actualmente estos ensayos no son posibles de realizar ya que no se dispone de líneas celulares permisivas a la infección de EpapGV.
- En ensayos de transfección en cultivo de células se demostró la actividad fusogénica de Epap-F. Este es el primer trabajo donde se comprueba la actividad de una proteína responsable de la fusión en el género Granulovirus. Esta proteína participaría en una etapa clave de la infección secundaria.
- Los resultados obtenidos brindaron información fundamental sobre caracterización morfológica y biológica de EpapGV, indispensable para su identificación y para la tramitación de registro de uso experimental del virus.
- Finalmente, los estudios acerca de la patogénesis de EpapGV y la relación estructura-función de la proteína Epap-F, constituyen un aporte original importante al conocimiento del género *Granulovirus*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Allaway, G.P. and Payne, C.C. 1984. Host range and virulence of five baculovirus from lepidopterous hosts. *Ann. Appl. Biol.* 105, 29-37.
- Alves, S.B. y Lecuona, R.E. 1998. Epizootiología aplicada ao controle microbiano de insetos. En: S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Biblioteca de Ciencias Agrarias Luiz de Queiroz, Vol. 4, p. 97-169. FEALQ, Piracicaba, Brasil.
- Anderson, R.M. and May, R.M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate host. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 291, 451-524.
- Begon, M.; Haji Daud, K.D.; Young, P., and Howells, R.E. 1993. The invasion and replication of a granulosis virus in the Indian Meal Moth, *Plodia interpunctella*: an electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 281-295.
- Benz, G.A. 1986. Historical perspectives. En: R.R. Granados and B.A. Federici (eds.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. I, p. 1-35. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Benz, G. 1987. Environment. En: J.R. Fuxa y Y. Tanada (eds.), *Epizootology of infectious diseases*, p. 177-214. John Wiley y Sons, NY.
- Bianchi, F.J.; Snoeiijing, I; Van der Werf, W; Mans, R.M.W.; Smits, P.H. and Vlak, J.M. 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invert. Pathol.* 75, 28-35.
- Bilen, M. F.; Pilloff, M. G.; Morais Ribeiro, B., Romanowski, V.; Lozano, M and Ghiringhelli, P. D. 2000. Molecular cloning and sequence analysis of the immediate early 1 gene of *Anticarsia gemmatilis* MNPV. 33rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology - V International Conference on Bacillus thuringiensis. Guanajuato, México.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Black, B.C.; Brennan, L.A.; Dierks, P.M. and Gard, I.E. 1997. Commercialization of baculoviral insecticides. En: L.K. Miller (ed), *The Baculoviruses*, p. 341-387. Plenum Press, N.Y..
- Blissard, G.W. and Rohrmann, G.F. 1989. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 170, 537-555.
- Blissard, G.W. and Rohrmann, G.F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 127-155.
- Blissard, G.W. and Wenz, R.J. 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology* 66, 6829-6835.
- Blissard, G.W., Kogan, P.H., Wei, R. and Rohrmann, G.F. 1992. A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology* 190, 783-793.
- Blissard, G.W. 1996. Baculovirus cell-interaction. *Cytotechnology* 20, 73-93.
- Blissard, G.W., Black, B., Crook, N., Keddle, A., Possee, R., Rohrmann, G., Theilmann, D., and Volkman, L. 2000. Family Baculoviridae. En: *Virus Taxonomy*, VII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, (Eds.), p. 195-202. Academic Press, London.

- Bourcias, D G., Johnson, D.W., and Allen, G.E. 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Envirom. Entomol.* 9, 59-61.
- Burges H.D. and Thomson, E.M. Standarization and assay of microbial insecticides. En: *Microbial Control of Insects and Mites*. H.D. Burges and N.W. Hussey (eds.), pp. 591-622. Academic Press, New York.
- Braunagel, S.C. and Summers, M.D. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202, 315-328.
- Braunagel, S.C, Burks, J.K., Rosas-Acosta, G., Harrison, R.L., Ma, H., and Summers, M.D.. 1999. Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J. Virol.* 8559-8570
- Caballero, P., Williams, T. y López Ferber, M. 2001. Estructura y clasificación de los baculovirus, p. 15-46. En: P. Caballero, M. López Ferber y T. Williams (eds.) *Los baculovirus y sus aplicaciones como insecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Cameron, J.W.M. 1973. *Insect Pathology*. *Annu. Rev. Entomol.* 18, 285-306
- Charlton, C.A. and Volkman, L.E. 1993. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* 1, 245-54.
- Cherbas, L. and Cherbas, P. 1993. The arthropod initiator: the cap-site consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23: 81-90.
- Cherry, A. y Williams, T. 2001. Control de insectos plaga mediante los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. eds., Cap. 12 pp. 389-450. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Chomczynski P and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1621, 156-159.
- Clem, R.J. Fechheimer, M. and Miller, L.K. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.
- Cohen, C. and Parry, D.A.. 1986. α helical coiled coils: a widespread motif in proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 11, 245-248.
- Derksen, A.C.G. and Granados, R.R. 1988. Alteration of lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection. *Virology* 167, 242-250.
- Diaz, B. y Diez, S. 1989. Presencia de un virus de la granulosis en larvas de *Epinotia aporema* (Wals.), en cultivos de soja, p.1588-1592. En: *IV Conferencia Mundial de Investigación en soja*. Vol. III, Buenos Aires, Argentina
- Engelhard, E.K.; Kam-Morgan, L.N.W., Washburn, J.O. and Volkman, L.E. 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc.Acad. Sci. USA* 1, 3224-3227.
- Engelhard, E.K. and Volkman, L.E. 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 209, 384-369.
- Entwistle, P.F. and Evans, H.F. 1985. Viral control, p. 347-412. En: L. I. Gilbert y G. A. Kerkut (ed). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 12. Pergamon Press Oxford.

- Entwistle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, p. 189-200. En F.R. Hunter-Fujita, P.F. Entwistle, H.F. Evans y N.E. Crook (eds.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley and Sons, Chichester, U.K..
- Evans, O.P. and O' Reilly, D.R. 1999. Expression and structural characterization of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *J. Gen. Virol.* 80, 485-492.
- Federici B.A. and Stern V.M., 1990. Replication and occlusion of a granulosis virus in larval and adult midgut epithelium of the western grapeleaf skeletonizer *Harrisina brillians*. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 401-414.
- Federici, B.A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. En: *Parasites and Pathogens of Insects*. N. E. Beckage, S. N. Thompson y B. A. Federici. (eds.). Vol. 2, p.81-101. Academic Press, San Diego.
- Federici, B.A.. 1997. Baculovirus pathogenesis. En: L.K. Miller. (ed.), *The Baculoviruses*, p.33-59. Plenum Press, N.Y.
- Federici, B.A. 1998. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control, p. 301-320. En: F.R. May y J.J. Menn (eds.), *Biopesticides: Use and delivery*. Humana Press, New Jersey, U.S.A.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis, 3rd Edition, Cambridge University Press. London
- Flipsen, J.T.M, van Lent, J.W.M., Goldbach, R.W. and Vlak, J.M. 1993. Expression of polyhedrin and p10 in the midgut of AcMNPV-infected *Spodoptera exigua* larvae: An immunoelectron microscope investigation. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 17.
- Flynt, S.J.; Enquist, L.W.; Krug, R.M.; Racaniello, V.R. and Skalka, A.M. 2000. Virus entry into cells. En: *Principles of Virology, Molecular biology, Pathogenesis, and Control*, p. 133-161. ASM Press. Washington D. C.
- Freymann, D.M.; Metcalf, P.; Turner, M. and Wiley, D.C. 1984. 6A resolution X-ray structure of a variable surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei*. *Nature* 311, 167-169.
- Funk, C.J., Braunagel, S.C. and Rohrmann, G.F. 1997. Baculovirus structure, p. 7-32. En: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York.
- Fuxa, J.R. and Richter, A.R. 1991. Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* 20, 603-609.
- Giorda, L. y Baigorri, H. 1998. El cultivo de soja en Argentina. INTA
- Goto, C.; Minobe, Y. and Iizuka, T. 1992. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. *J. Gen. Virol.* 73, 1491-1497.
- Granados, R.R. 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology.* 90, 170-174.
- Granados, R.R and Lawler, K.A. 1981 *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology.* 180, 297-308.
- Granados, R.R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1377-1980.
- Granados, R.R. and Williams, K.A..1986. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. En: Granados, R.R. and Federici, B.A. (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. I, , pp. 89 – 108. CRC Press, Boca Raton, FL
- Green, G.L., Leppla, N.C., and Dickerson, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 447-448.

- Groner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. En: R.R. Granados y B.A. Federici (eds.), *The Biology of Baculoviruses*. Vol.1, p, 177-202. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hashimoto, Y.; Hayakawa, T.; Ueno, Y. Fugita, T.; Sano, Y. and Matsumoto, T. 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* 275, 358-372.
- Hayakawa, T.; Ko, R.; Okano, K. Seong, S.; Goto, C. and Maeda, S. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* 262, 277-297.
- Hawtin, R.E., Arnold, M.D. Ayres, Zanotto, P.M. de A., Howard, S.C., Gooday, G.W., Chappel, L.H., Kitts, P.A., King, L.A., and Possee, R.D. 1995. Identification and preliminary characterization of the chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*. 212, 673-685.
- Hefferon, K.L.; Oomens, A.G.P.; Finnerty, C.M. and Blissard, G.W.. 1999. Host cell receptor binding baculovirus gp64 and kinetics of virion entry. *Virology* 258, 455-468.
- Helenius, A. Mellman, I., Wall, D., and Hubbard, A. 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* 8, 245-250.
- Hess, R.T. and Falcon, L.A. 1987. Temporal events in the invasion of the codling moth, *Cydia pomonella*, by a granulosis virus: An electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.* 50, 85-105.
- Hill, J. E. and Faulkner, P. 1994. Identification of the gp67 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1811-1813.
- Hong, T.; Braunagel, S.C. and Summers, M.D. 1994. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 204, 210-22.
- Horton, H.M. and Burand, J.P. 1993 Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 67, 1860-1868.
- Hostetter, D.L. and Puttler, B. 1991. A new broad host spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby); (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 20, 1480-1488.
- Huber, J. 1986. Use of baculovirus in pest management programs, p. 182-202. En: R.R. Granados y B.A. Federici (eds.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. 2. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Hughes, P. and Wood, H.A. 1986. *In vivo* and *in vitro* bioassay methods for baculovirus, pp 1-10. En: R.R. Granados y B.A. Federici (eds.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. 2. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F. and Crook, N.E. 1998. *Insect Viruses and Pest Management*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, England; 620 pp.
- Ibarra, J.E y Castro, M.C. 2001. Capacidad insecticida de los baculovirus En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. (eds.), pp. 204-226. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Ijkel, W.F.J.; van Strien, E.A.; Heldens, J.G.; Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W. and Vlak, J.M. 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 80, 3289-3304.
- Iede, E.T. y Foerster, M. 1982. Biología de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae), em soja. *Anais Soc. Entom. Brasil* 11, 13-21.

- Ignoffo, C.M.; Hostetter, D.L.; Sikorowski, P.P.; Sutter, G. and Brooks W.M. 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultra-violet light source. *Environ. Entomol.* 6, 411-415.
- Jacques, R.P. 1985. Stability of insect virus in the environment, p. 285-359. En: K. Maramorosh and K. E. Sherman (eds.), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press Inc., Orlando.
- Je, Y. H.; Chang, J. H., Choi, J. Y., Roh, J. Y.; Jin B. R., O'Reilly D. R. and Kang S. K. 2001. A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for the generation of baculovirus expression vectors. *Biotechnology Letters*. 23, 575-582.
- Kalmakoff, J. and Krauford, J.M. 1982. Enzootic virus control of *Wiseana* spp. in the pasture environment, p. 435-448. En: G. Kurstak (ed.), *Microbial and Viral Pestides*. Marcel Dekker, New York.
- Kingsley, D.H.; Behbahani, A.; Rashtian, A.; Blissard, G.W., and Zimmerberg, J. 1999. A discrete stage of baculovirus gp64- mediated membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* 10, 4191-4200.
- Kirkpatrick. B.A., Washburn, J.O and Volkman, L.E. 1998. AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 63-72.
- Kirkpatrick, B.A, Washburn, J.O., Engelhard, E.K., and Volkman, L.E. 1994. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 2031, 184-6.
- Keddle, B.A., Aponte, G.W., and Volkman, L.E., 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243, 1728-1730.
- Kogan, P.H. and Blissard, G.W. 1994. A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. *J. Virol.* 68, 813-822.
- Kogan, P.H., Chen, H. and Blissard, G.W. 1995. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. *J. Virol.* 69, 1452-1461.
- Kukan, B. 1999. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *J Invertebr Pathol.* 42:103-11.
- Kuzio, J., Jaques, R. and Faulkner, P. 1989. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*. 32, 759-63.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G.V. and Wilson, J.A. 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 78, 3091-3100.
- Fraser, M.J. 1986 Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res.* 95: 189-195.
- Lanier, L.M., Slack, J.M., and Volkman, L.E. 1996. Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. *Virology* 2162, 380-8.
- Lepore, L.S., Roelvink, P.R. and Granados, R.R. 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus infections, is a metalloprotease. *J Invertebr. Pathol.* 82, 131-40.
- Lu, A and Carstens, E.B. 1991. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 181, 336-347.

- Lu, A. and Miller, L.K. 1995. Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *J. Virol.* 69, 6265-6272.
- Lung, O.; Westenberg, M.; Vlak J. ; Zuidema, D and Blissard, G.W. 2002. Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F Proteins from grupo II NPVs are functionally analogous to AcMNPV gp64. *J. Virol.* 76, 5729-5736.
- Lung, O.; Cruz-Alvarez, M and Blissard, G.W. 2003. Ac23, an envelope fusion protein homolog in the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, is a viral pathogenicity factor. *J. Virol.* 77, 328-339.
- Maina, J. N. 1989. Scanning and transmission electron microscopic study of the tracheal air sac system in a grasshopper *Chrotogonus senegalensis* (Kraus)--Orthoptera: Acrididae: Pyrgomorphinae. *Anat Rec.* 3, 393-405
- Manzan, M.A., Lozano, M.E. Sciocco-Cap, A.; Ghiringhelli, P.D. and Romanowski, V. 2002. Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-Glycosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus. *Virus Genes* 24, 119-130.
- Miller, L.K; Jewell, J.E. and Browne, D. 1981. Baculovirus induction of a DNA polymerase. *J. Virol.* 40, 305-308.;
- Miller, L.K, Adang, M.J. and Browne, D. 1983. Protein kinase activity associated with the extracellular unoccluded form of the baculovirus AcMNPV. *J. Virol.* 46, 275-278.
- Miller, L. 1996. Insect viruses. En: *Fields Virology*. Third Edition. Raven Publishers, Philadelphia, pp.553-556.
- Monsma, S.A., Oomens, A.G.P. and 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. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 44, 257-289.
- Moscardi, F; Morales, L and Santos B. 2002. The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *A. gemmatilis*, in soybean in Brazil. XXXV SIP Meeting at Iguazu, Brazil, pp 86-91.
- Murray, K.D., K.S. Shields, Burand, J.P. and Elkinton, J.S. 1991. The effect of gypsy moth metamorphosis on the development of nuclear polyhedrosis virus infection. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 352-361.
- Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y., and Nakajima, K. 1991. Comparison of compete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* 182, 475-485.
- Oomens, A.G.P., Monsma, S.A. and Blissard, G.W. 1995. The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization, and processing. *Virology* 254, 592-603.
- O'Reilly, D.R. and Miller, L.K. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 245, 1110-1112.
- O'Reilly, D.R., Howarth, O.W., Rees, H.H., and Miller, L.K. 1991. Structure of the ecdysone glucoside formed by a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Insect Biochem.* 21, 795-801.
- O'Reilly, D.R. and Miller, L.K. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Bio/Technology* 9, 1086-1089.
- O'Reilly, D.R.; Hails, R.S. and Kelly, T.J. 1998. The impact of host developmental status on baculovirus replication. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 269-275.

- Park, E.J., Yin, C.M. and Burand, J.P. 1996. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. *Journal of General Virology* 77, 547-554.
- Parola, A., Manzán, M.A., Lozano, M., Ghiringhelli, P., Sciocco-Cap, A and Romanowski, V. 2002. Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* 25, 327-339
- Pearson, M.N.; Groten, C. and Rohrmann, G.F. 2000. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrosis envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the *Baculoviridae*. *J. Virol.* 74, 6126-6131.
- Pearson, M.N., Russell, R.L.Q., and Rohrmann, G.F. 2001. Characterization of a baculovirus -encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virology* 291, 22-31.
- Pearson, M.N. and Rohrmann, G.F. 2002a. Transfer, incorporation and substitution of envelope proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (insect retrovirus) families *J Virol.* 76, 5301-4.
- Pearson, M.N., Russell, R.L.Q., and Rohrmann, G.F. 2002b. Functional analysis of a conserved region of the baculovirus envelope fusion protein, LD 130. *Virology* 304, 81-88.
- Pearson, M.N., Russell, R.L.Q., and Rohrmann, G.F. 2002c. Transcriptional mapping of two genes encoding baculovirus envelope-associated proteins. *J. Gen. Virol* 83, 937-943..
- Plonsky, I.; Cho, M.S.; Oomens, A.G.; Blissard, G. y Zimmerberg, J. 1999. An analysis of the role of the target membrane on the gp64-induced fusion pore. *Virology* 253, 65-76.
- Pullen, S.S. and Friesen. P.D. 1995. Early transcription of the *ie1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polybedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *J. Virol.* 69, 156-165.
- Reddy, J.T. and Locke, M. 1990. *J. Insect. Physiol.* 36, 397-408.
- Ripa, R. 1982. Presencia de dos nuevos patógenos en *Epinotia aporema* Wals. *Agricultura Técnica (Chile)* 41: 55-56.
- Rohrmann, G.F and Karplus, P.A. 2001. Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evol. Biol.* 1:1.
- Romanowski, V and Ghiringhelli, P. D. 2001. Biología molecular de los baculovirus (replicación y regulación de la expresión génica) En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. eds., Cap. 5 pp. 120-142. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Rovesti, L. Crook, N.E. and Winstanley, D. 2000. Biological and biochemical relationship between the nucleopolyhedrovirus of *Mamestra brassicae* and *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 2-8.
- Sciocco-Cap, A.. 2001. Biología y patogénesis de los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. eds., Cap. 2 pp. 47-72. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Sait, S.M., Begon, M., and Thompson, D. J. 1994. The influence of larval age on the response of *Plodia interpunctella* to a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 107-110.
- Sambrook, J., Fristch, E.J. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattentau, Q.J., and Moore, J.P. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 174, 407-415.

- Sheppard, R.F. and Stairs, G.R. 1976. Effects of dissemination of low dosage levels of a granulosis virus in populations of the codling moth. J. Econ. Entomol. 69, 583-586.
- Sheppard, R.F. and Stairs, G. R. 1977. Dosage-mortality and time mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. J. Invertebr. Pathol. 29, 216-220.
- Smith, P.H. and Vlak, J.M. 1988. Biological activity of *Spodoptera exigua* NPV against *Spodoptera exigua* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 51: 107-114.
- Steinhaus, E.A. 1963. Insect Pathology, an advance treatise E. A. Steinhaus (ed.) Vol. 2. Academic Press, N.Y.
- Summers, M.D. 1969. Apparent *in vivo* pathway of granulosis virus invasion and infection. J. Invertebr. Pathol. 4, 188 –190.
- Tanada, Y. and Hess, R.T. 1991. *Baculoviridae*. Granulosis virus. En: Adams, J.R. Bonami, J. R. (eds), Atlas of Invertebrate Viruses, pp 225-257. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. Academic Press Inc., San Diego, 665 p.
- Teackle, R.E., Jensen, J.M., and Giles, J.B. 1986. Age-related susceptibility of *Heliothis punctiger* to a commercial formulation of nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 47, 82-92.
- Theilmann, D.A., Chantles, J. K. Stewart, S. Flipsen, H. T. Vlak, J.M. and Crook N.E. 1996. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions. Virology. 218, 148-158.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25, 4876-4882.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22, 4673-4680.
- Tuan-Shujen, Kai-SueySheng, Cheng-DorJih, Tuan, S. J.; Kao, S. S. and Cheng, D. J. 1994. Histopathology and pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus isolated in TAIWAN. China. J. Entomol. 14, 33-45.
- Tweeten , K.A.; Bulla L.A. and Consigli, R.A. 1981. Applied and molecular aspects of insects granulosis virus Microbiol. Rev. 45, 379-407.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J and McCawley, P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect Lepidoptera: Noctuidae. In vitro 13, 213-217.
- Van Oers, M.M., Flipsen, J.T., Reusken, C.B., Sliwinsky, E.L., Goldbach, R.W., and Vlak, J.M. 1993. Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Gen Virol. 74, 563-74.
- Vasconcelos, S. D. Ecología de los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. (eds)., Cap. 6, pp., 143-201. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Villata, C.A. y Ayessa, A. M. 1994. Manejo integrado de plagas en soja. Agro de Cuyo. 7, 71p.
- Volkman L.E. and Goldsmith, P.A. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. Virology. 143, 185-195.

- Volkman, L.E. and Knudson, D.L. 1986. *In vitro* replication of baculovirus, p. 109-128. En: Granados R.R. and Federici B.A. The Biology of Baculoviruses. Vol I. Biological Properties and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friesen, P., Keddie, B.A., Possee, R. and Theilmann, D.A.. 1995. *Baculoviridae*. In "Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses" F.A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, Eds, pp. 104-111. Springer-Verlag, New York.
- Walker, S., Kawanishi, C.Y. and Hamm, J.J., 1982. Cellular pathology of a granulosis virus infection. J. Invertebr. Pathol. 80, 163-177.
- Wang, P., Hammer, D.A., and Granados, R.R. 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. J. Gen. Virol. 75, 1961-1967.
- Watanabe, H. and Kobayashi, M. 1970. Histopathology of a granulosis in the larva of the Fall Webworm, *Hyphantria cunea*. J. Invertebr. Pathol. 16, 71 –79.
- Westenberg, M.; Wang, H.; Ijkel, W.F.J.; Goldbach, R.W.; Vlak, J.M. and Zuidema, D. 2002. Furin is involved in baculovirus envelope fusion protein activation. J. Virol. 76, 178-184.
- Whitten, J.M. 1972. Annu. Rev. Entomol. 17, 373-402.
- Wiley, D. C. and Skehel, J. J. 1987. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Annu. Rev. Biochem 56, 365-394.
- Wilson, M.E. and Consigli, R.A. 1985a. Characterization of a protein kinase associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. Virology. 143, 516-525
- Wilson, M.E. and Consigli, R.A. 1985b. Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. Virology. 143, 526-535.
- Winstanley, D. and Crook, N. 1993. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus cell cultures. J. Gen. Virol. 74, 1599-1609.
- Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J., and Faulkner, P. 1989. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus AcNPV p10 gene function using insertion/deletion mutants. J. Gen. Virol. 70, 187-202.
- Williams, G.W. and Faulkner, P. 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection p. 61-107. En: L. K. Miller (ed), The Baculoviruses Plenum Press, N. Y.
- Young, J.C., Mackinnon, E.A. and Faulkner, P. 1993. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells *in vitro* infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Structural Biology 110, 141-153.
- Zerbino, M.S. y Alzugaray, R. 1996. *Epinotia aporema* en cultivos de leguminosas. Hoja de Divulgación N° 23. INIA, Uruguay.
- Zethner, O. 1980. Control of *Agrotis segetum* (Lep.: Noctuidae) on root crops by granulosis virus. J. Econom. Entomol. 25, 27-35.

ANEXO

Materiales y Métodos generales

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

MATERIALES GENERALES

1. Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (La Jolla, USA), Promega (Madison, USA), New England Biolabs (Beverly, USA) y Gibco BRL-Life Technologies (Grand Island, USA). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministradas por Gibco BRL (Grand Island, USA) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina) o GEN (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (USA). El agua utilizada fue destilada, desionizada y esterilizada por autoclave a 120 °C, en el laboratorio de Virus del IBBM, dado el requerimiento de una máxima calidad y pureza en los protocolos de biología molecular. Las fotografías se obtuvieron con un equipo FOTODYNE (Polaroid) o con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak digital science). Para la toma de imágenes se utilizó un scanner VistaScan 240. La cuantificación de muestras se realizó por medidas de absorbancia ó con el programa Gel Compare (Applied Math).

2. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron bacterias de la especie *Escherichia coli* con genotipos modificados genéticamente.

DH α F': {endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, ϕ lacU169 F' [f80 lac ϕ M15]}.

Hanahan (1983); BRL (1986).

Top 10: F' mcrA ((mrr-hsdRMS-mcrBC) (80lacZ (M15 (lacX74deoR recA α 1 araD139 ((ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

MEDIOS

1) Medios para cultivo de bacterias

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de bacto triptona y 5 g de extracto de levadura en 900 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1000 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Medio Terrific Broth: se disuelven 12 g de bacto triptona y 24 g de extracto de levadura en 800 ml de agua destilada, se

agregan 4 ml de glicerol y luego se lleva el volumen a 900 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Antes de usar se agregan 100 ml de una solución estéril de KH₂PO₄ (0,17M) y K₂HPO₄ (0,72M).

Para preparar medios sólidos se agregan 15 g de agar para cada 1000 ml de medio líquido.

1-1) Antibióticos para cultivo de bacterias

Ampicilina: se disuelven 100 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Kanamicina: se disuelven 500 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

2) Medios para cultivo de células de insectos

TC-100 (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina), L-glutamina (Gln, 2mM) y glucosa (4,5 g/l)

Sf-900 (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina)

2-1) Antifúngicos y Antibióticos para cultivo de células

El medio de cultivo se prepara con el agregado de anfotericina B (1,5 μ g/ml) y gentamicina (50 μ g/ml).

3) Medios para el desarrollo de Competencia

Medio SOB (por litro)

Extracto de levadura 5,0 g

Tryptona 20,0 g

NaCl 0,5 g

SOLUCIONES

1. Soluciones para la extracción de plásmido

Buffer TE 1 X

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA 1 mM

10 % SDS

10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. se esteriliza por autoclavado a 121°C. Se mantiene a temperatura ambiente.

Solución I

Glucosa 50 mM

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA 10 mM

Se esteriliza por filtración. Se mantiene a 4°C.

Solución II

NaOH 0,2 N

SDS 1 %

La solución se prepara en el momento de uso, a partir de soluciones stock de NaOH y SDS.

Solución III

AcK 5 M, pH 4,8.

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

Preparación de RNasa libre de DNasa

La RNasa-pancreática (RNasa A), se disuelve a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 15 mM NaCl. Se calienta 15 min a 100 °C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se mantiene a -20°C.

NaAc 3 M

Se disuelven 408,1 g de acetato de sodio en 800 ml de H₂O. Se ajusta el pH a 5,2 con ácido acético glacial, se ajusta el volumen a 1 litro y se esteriliza por autoclave.

2. Solventes Orgánicos

etanol 96 % y 70 %.

Fenol (pH 8): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (V/V).

Cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 24:1 (V/V).

El alcohol isoamílico no es esencial y se utiliza para mejorar la separación de fases.

PEG8000 13% (P/V) en agua bidestilada estéril. Se esteriliza por autoclave.

3. Soluciones para la extracción de RNA

1X TCG (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM, sarkosyl 0,5% y 2-mercaptoetanol 90mM)

DNasa libre de RNasa, 5-15 U/μl, RQ1 DNasa (Promega Corp, USA) o similar.

Fenol (pH 5): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (V/V).

Cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 24:1 (V/V).

etanol 96 % y 70 %.

4. Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa Nativos

Gel: agarosa 0.8 %- 1 %- 2 % ó 2,5 %. Esta solución contiene *buffer* TAE 1 X/ TBE 1X y bromuro de etidio 0,5 μg/μl.

Buffer de corrida TAE 1 X

Tris-Acetato 40 mM

EDTA 1 mM

El TAE se prepara como solución concentrada 50 X: 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial y 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) por litro de solución.

Buffer de corrida TBE 1 X

Tris 100 mM

Ac.Bórico 90 mM

EDTA 1 mM

El TBE se prepara a partir de una solución concentrada 5 X: 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

A cada uno de los *bufferes* se le adicionan 20 μ l de la solución stock 20 mg/ml de bromuro de etidio.

Bromuro de etidio

Se prepara una solución concentrada hasta 20 mg / ml de bromuro de etidio en H₂O y se mantiene a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. Esta solución se debe manejar con precaución extrema debido al alto poder mutagénico del BrEt.

Solución para siembra de muestras

TAE 1 X ó TBE 1 X, glicerol 50 %, colorantes: xylene cyanol FF, azul de bromofenol y orange-g.

5. Gel desnaturizante para RNA

Gel: agarosa 0.7-1%, 1X buffer MOPS, 0.7M formaldehído. Para preparar 100ml de esta agarosa se disuelven 0.7- 1.0 grs de agarosa en 84.0 ml de agua (libre de nucleasas). Se adicionan 10 ml de buffer 10X MOPS y 5.8 ml de formaldehído.

MOPS 10 X: 41.2 gr de MOPS, 10.9 gr de acetato de sodio trihidrato y 3.7 gr de EDTA. Se lleva a pH 7.0 con hidróxido de sodio.

Buffer de corrida MOPS 1 X/ FA

MOPS 20 mM

Acetato de Sodio 5 mM

EDTA 1 mM

Cada 980 ml de buffer MOPS 1X se adicionan 20 ml de formaldehído 37% (12.3 M).

El *buffer* MOPS 1X se prepara a partir de una solución de MOPS 10 X.

Solución para siembra de muestras

0.5X MOPS buffer, 50 % formamida, 20 mM EDTA, 2.2M formaldehído, azul de bromofenol, xylene cyanol. Previo a la siembra las muestras se calientan en el buffer de siembra, a 65°C durante 15' y se colocan en agua-hielo mientras se siembran.

6. Materiales para Hibridación**Soluciones utilizadas los ensayos de hibridación *in situ***

SSC 20X: se disuelven 175,3 gr de NaCl y 88,2 gr de citrato trisódico en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 7 con HCl y luego se lleva el volumen a un litro. Se esteriliza en autoclave.

SDS 10%: se disuelven 100 g en 900 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con HCl y se lleva el volumen a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave.

Buffer fosfato salino PBS 10 X (POR LITRO): KCl 2 g, PO₄H₂K 2 g, NaCl 80 g, PO₄HNa₂ 11,5 g.

TBS (por litro): NaCl 8 g, KCl 0.2 g, y Tris base 3 g, ajustar pH a 7.4 con HCl.

Membranas

Hybond-N+, provista por Amersham-Pharmacia.

Zeta-probe, provista por Bio-Rad.

Soluciones para transferencia de ácidos nucleicos**Northern blot:**

- a) solución de desnaturalización 1: NaCl (10 mM), NaOH (50 mM).
- b) solución de neutralización 1: *buffer* fosfato 25 mM.
- c) solución de transferencia 1: *buffer* fosfato 25 mM.
- d) solución de transferencia 2: SSC 10X.

7. Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS**Geles de poliacrilamida Tris-glicina-SDS**

Gel separador: 18, 12, ó 10 % dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* de separación 1 X: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01 %, respectivamente.

Gel concentrador: 5 %. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* concentrador 1 X: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01 %, respectivamente.

Buffer de corrida 1 X

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

Solución para siembra de muestras 4 X

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

Solución de tinción

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

Solución de destinción

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

8. Soluciones para tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Solución de fijación: ácido acético glacial 10% (V/V) en agua bidestilada.

Solución de tinción: nitrato de plata 0,2% (P/V) disuelto en agua bidestilada con el agregado de 250 µl de formaldehído 40%.

Solución de revelado: carbonato de sodio 3% (P/V) disuelto en agua bidestilada con el agregado de 200 µl de formaldehído 40% y 24 µl de tiosulfato de sodio de concentración inicial 10 mg/ml por cada 100 ml de solución.

Solución de stop: ácido acético glacial 10% (V/V) en agua bidestilada.

Solución de tinción

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

Solución de destinción

etanol 30 % v/v

ácido acético 10 % v/v

9 BUFFERS UTILIZADOS EN REACCIONES ENZIMÁTICAS

Ligación 10 X:

Tris-HCl pH 7,8 300 mM

MgCl₂ 100 mM

Dithiotreitol 100 mM

ATP 5 mM

PCR 10 X (Taq Pol)

Tris-HCl pH 9,0 100 mM

KCl 500 mM

Tritón X-100 1 %

PCR 10 X (Pfu Pol)

Tris-HCl pH 8,8

200 mM

KCl

100 mM

MgCl₂

20 mM

(NH₄)₂SO₄

100 mM

BSA

1 mg/ml

Tritón X-100

1 %

10. Digestión con endonucleasas

Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el molde de ADN a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el *buffer* de digestión, cantidad de enzima y tiempo de incubación recomendado por el proveedor.

**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 Doctoral

Alina Viviana Goldberg Cavalleri

2003

Fe de Erratas

Página 32. Leyenda Figura III. 1. Se omite la palabra ambiente al final de la última frase.

Página 64. Sección IV.1. Donde dice *Bam*HI-I debería decir *Bam*HI-C.

Capítulo III. Resultados. El encabezado dice Materiales y Métodos debería decir Resultados.

Página 82. Leyenda Figura IV. 9. Donde dice 52 y 123 pb debería decir 52 y 233 pb.