



Turco, Cecilia Soledad

Estudios básicos y aplicados sobre los genes pif de Baculoviridae



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Turco, C. S. (2016). Estudios básicos y aplicados sobre los genes pif de Baculoviridae. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3961>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudios básicos y aplicados sobre los genes *pif* de *Baculoviridae*

TESIS DOCTORAL

Cecilia Soledad Turco

ceciliaturco@gmail.com

Resumen

La actividad agrícola es una de las principales actividades económicas de nuestro país. Por ello, la preservación de los cultivos resulta de gran interés, siendo la sanidad vegetal uno de los objetivos más importantes. Dada la tendencia al monocultivo de soja en grandes extensiones de tierra, se generó un ambiente propicio para la expansión de plagas. Entre las más importantes en nuestro país, se encuentran las especies fitófagas, y, en particular en la región, la oruga de las leguminosas *Anticarsia gemmatalis*. Esta especie pertenece a la familia *Noctuidae*, dentro del orden *Lepidoptera* y constituye el defoliador de soja más importante del hemisferio occidental. Por ende, desarrollar nuevas tecnologías para el control de esta plaga resulta de gran importancia. Dentro de los mecanismos de control, y como una alternativa al uso excesivo de plaguicidas químicos, se destaca el baculovirus que infecta específicamente a dicho organismo, AgMNPV. Este virus pertenece a la familia *Baculoviridae*, familia de entomopatógenos que infecta artrópodos y, en particular, insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Diptera*. Una de las características de estos virus es la especificidad por sus hospedadores, determinada por un grupo de genes virales que determinan el rango de infección, a través de un mecanismo de interacción patógeno-hospedador que ocurre en el intestino medio de las larvas, una vez que ocurrió la ingesta de las partículas virales. Este grupo de genes se denominan *pifs*, y la ausencia de al menos uno de ellos en la molécula de DNA viral impide la infección por vía oral. Es por ello, que el estudio exhaustivo de estos genes podría significar mejoras en el agente de control, a través de modificaciones genéticas a realizarse en el DNA viral.

Por lo antes expuesto, este trabajo de tesis se enfoca en el estudio de los genes *pif*, dentro de la familia *Baculoviridae*, y en especial del virus AgMNPV. La tesis se encuentra dividida en 8 capítulos, el primero de ellos comprende la Introducción de los temas tratados, como también las Hipótesis y Objetivos del trabajo. Luego se desarrollan los capítulos II-VI de Resultados y Discusiones, que comprenden los estudios filogenéticos basados en los genes

pif, como su localización genómica (Capítulo II); el desarrollo de una metodología clasificatoria en base a la secuencia aminoacídica parcial de estos genes, su validación y aplicación de casos (Capítulo III); determinación de la cinética transcripcional de los genes *pif* y análisis de probables regiones promotoras (Capítulo IV); estudios estructurales de las proteínas PIF y, en particular, de PIF-0, además de la evaluación de un posible mecanismo de control viral contra varios lepidópteros en base al baculovirus AcMNPV (Capítulo V); y desarrollo de una plataforma para la generación de virus AgMNPV con limitación de propagación natural y una línea celular transgénica empaquetadora (Capítulo VI). Finalmente, el capítulo VII de Conclusiones y Perspectivas, en el cual se debaten los resultados obtenidos y se postulan nuevas formas de continuar el trabajo.

Tesis de doctorado
Universidad Nacional de Quilmes

**Estudios básicos y aplicados sobre los genes *pif* de
*Baculoviridae***



Autor: Lic. Cecilia Soledad Turco

Director: Dr. Pablo Daniel Ghiringhelli

Codirector: Dr. Mariano Nicolás Belaich

**Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular
Área Virosis de Insectos**

LIGBCM-AVI, Dpto. de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

Abril de 2016

Abreviaturas.....	10
I-Introducción.....	15
Agricultura y plagas.....	15
Rol de la soja en la agricultura argentina.....	15
Principales plagas.....	19
Soluciones tecnológicas.....	20
Insecticidas químicos.....	22
Control biológico.....	24
Los baculovirus y el control biológico de plagas.....	31
Plantas transgénicas.....	35
Manejo Integrado de Plagas.....	36
Los baculovirus.....	39
Características principales.....	39
Hospedadores naturales.....	41
Morfología.....	44
Cuerpos de oclusión.....	45
Viriones derivados de los cuerpos de oclusión –ODVs.....	47
Viriones brotantes – BVs.....	48
La nucleocápside.....	49
Clasificación de la familia <i>Baculoviridae</i>	50
Otros virus relacionados con la familia <i>Baculoviridae</i>	51
Ciclo viral.....	55
Infección primaria – per os.....	55
Infección secundaria – Sistémica.....	59
Expresión génica durante el ciclo viral.....	62
Rango de hospedador.....	64
Proteínas <i>PIFs</i>	66
PIF-0/P74.....	68
PIF-1.....	70

PIF-2	72
PIF-3	72
PIF-4/19 k	73
PIF-5/ODV-E56	74
PIF-6/Pr96	75
VP91/P95 – ¿PIF-7?	76
Complejo <i>PIF</i>	78
Anticarsia gemmatalis y AgMNPV	80
Anticarsia gemmatalis Hübner	80
Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de Anticarsia gemmatalis - AgMNPV	83
Hipótesis de trabajo	85
Sobre el conocimiento básico de <i>pifs</i>	85
Sobre el conocimiento aplicado de <i>pifs</i>	85
Objetivos	86
Generales	86
Específicos.....	86
II –Resultados y conclusiones I	89
GENES PIF EN VIRUS DE INSECTOS Y SU LOCALIZACIÓN GENÓMICA	89
Filogenia de <i>pifs</i>	89
Localización genómica de <i>pifs</i>	99
III –Resultados y conclusiones II	103
SISTEMA DE DETECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS BACULOVIRUS EN BASE A LOS GENES	
<i>PIF</i>	103
Diseño de <i>primers</i> para amplificación por PCR de los genes <i>pif</i>	103
Evaluación de los <i>primers</i> en virus representativos	109
Inferencia filogenética obtenida con el sistema desarrollado	116
Comparación de matrices de distancias entre el sistema PIF y el vigente	121
Aplicación del sistema en aislamientos virales de Colombia	127
¿Co-existencia de genomas o duplicación génica de <i>pif-1</i> ?.....	131
Ensayo de Real Time PCR cuantitativa con sondas Taqman	134
Evaluación del contexto génico de <i>pif-1</i>	139
IV –Resultados y conclusiones III.....	143
Temporalidad en la expresión de los genes <i>pif</i> durante un ciclo de infección viral	143

Estudios de secuencias promotoras	144
Diseño de <i>Reverse Transcription quantitative PCR</i> para genes <i>pif</i> de AgMNPV.....	150
Generación de patrones y curvas de calibración	151
Cinética de transcripción de genes <i>pif</i> en AgMNPV	154
V –Resultados y conclusiones IV	161
Caracterización de los dominios estructurales y funcionales de las proteínas PIF.	
Estudios generales predictivos y particulares sobre PIF-0	161
Estudios composicionales de las proteínas PIF.....	161
PIFs en AgMNPV	165
PIF-0 en <i>Alphabaculovirus</i>	167
Generación de quimeras para PIF-0.....	169
Estudios de localización subcelular de PIF-0	172
Generación de un AcMNPV defectivo en PIF-0.....	174
VI - Resultados V.....	179
Desarrollo de una plataforma celular para complementar virus defectivos en PIF-0...	179
Elección de línea celular y gen de selección	180
Elección de los componentes sintácticos del gen empaquetador	182
Generación de la línea transgénica	187
Generación de un AgMNPV defectivo en <i>pif-0</i>	191
Complementación de variantes virales defectivas en <i>pif-0</i>	197
VII- Conclusiones y perspectivas	203
Genes <i>pif</i> en virus de insecto y su localización genómica.....	204
Sistema de clasificación y detección de los baculovirus en base a los genes <i>pif</i>	205
Temporalidad en la expresión de los genes <i>pif</i> durante un ciclo de infección.....	209
Caracterización de los dominios estructurales y funcionales de las proteínas PIF.	
Estudios generales predictivos y particulares sobre PIF-0	212
Desarrollo de una plataforma celular para complementar virus defectivos en PIF-0...	213
VIII - Materiales y Métodos	221
Generales	221
Plásmidos, cepas bacterianas, líneas celulares y enzimas utilizadas	221
Oligonucleótidos.....	223
Reacciones de PCR.....	225
Mantenimiento de células de insecto y virus	226
Electroforesis	227

Purificación de DNA.....	227
Purificación a partir de geles de agarosa	228
Purificación de DNA genómico viral a partir de virus brotantes.....	228
Purificación del ADN genómico viral a partir de los cuerpos de oclusión (OBs) ...	228
Purificación de DNA genómico a partir de líneas celulares y sobrenadante de cultivo.....	229
Purificación de DNA plasmídico	229
Purificación de RNA total a partir de cultivos celulares infectados.....	230
Purificación de proteínas a partir de monocapa celular	231
<i>Southern Blots</i>	231
Reacciones de secuenciación	231
Observaciones microscópicas.....	232
Ensayos de transfección	232
<i>Western blots</i>	232
Programas bioinformáticos utilizados	233
Específicos.....	234
Estudios bioinformáticos de pifs.....	234
Filogenia de genes pifs	234
Diseño de primers pifs generalistas y ensayos de PCR para genotipificación viral	237
Filogenia a partir de la secuencia parcial de genes pif y lef-8/lef-9/ poliedrina-granulina	238
Caracterización molecular de aislamientos de granulovirus colombianos	239
Diseño de Real Time PCR con sondas.....	239
Geles poliacrilamida de DNA.....	239
RFLPs fragmentos pLef1c/pP48c.....	240
Promotores de los genes <i>PIFS</i>	240
Estabilidad de la doble hélice del DNA.....	240
<i>REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE PCR PARA GENES PIF DE AGMNPV</i>	241
Plásmidos para la curva de calibración	241
Curva de calibración Real Time PCR.....	241
Temporalidad en la expresión de los genes pif de AgMNPV	242
Localización PIFS en viriones ODVS	244
Construcciones plasmídicas para las quimeras <i>PIF-0</i>	245
pQ-30 con regiones Nt y Ct de PIF-0	245

pFB-GFP_íntegras, amino terminal p74 y quimeras p74.....	246
pFB con dsred2 y Nt o Ct p74 de AcMNPV.....	249
Localización subcelular de PIF-0	250
Generación de un ACMNPV defectivo en <i>PIF-0</i>	251
Plásmido donador pz-p74up_PHN-CAT_p74down	251
Ensayo de co-transfección, transformación y análisis genotípicos.....	252
Línea celular <i>High Five</i> TM transgénica	253
Estudios de toxicidad de puromicina en <i>High Five</i> TM	253
Ensayo de actividad del promotor hsp70.....	254
Plásmido de transferencia p(hsp)p74-PURO.....	254
Línea celular <i>High Five</i> transgénica	255
Caracterización molecular de las células transgénicas para pif-0.....	255
AGMNPV defectivo en <i>PIF-0</i>	256
Construcción plásmidos donores	256
Recombinación homóloga y selección de recombinantes	258
Caracterización genotípica de los genomas recombinantes seleccionados	258
Complementación de variantes virales defectivas en <i>PIF-0</i>	259
IX- Bibliografía	263
X- Agradecimientos	283

NPV: nucleopolihedrovirus

µg: microgramos

µl: microlitros

µM: concentración micromolar

DNA: ácido desoxirribonucleico

RT-PCR: *reverse transcription*-PCR

RNA: Ácido ribonucleico

BV: virus brotante

g: gramos

GV: Granulovirus

kDa: kilo Dalton

kpb: kilopares de bases

l: litro

M: concentración molar

mA: miliamperios

MCS: *Multiple Cloning Site*, sitio de clonado múltiple.

mg: miligramos

ml: mililitro

nm: nanómetros

mM: concentración milimolar

MNPV: múltiple nucleopolihedrovirus

MOI: multiplicidad de infección

OB: *Occlusion Body*, cuerpos de inclusión

ODV: virus derivado del cuerpo de inclusión

ORF: marco de lectura abierto.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso Molecular

PolyA: señal de poliadenilación

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto

SMNPV: single nucleopolyhedrovirus

UFP: unidades formadoras de placa

wt: wild type

pif: *per os infectivity factor*

TSS: *transcription start site*, sitio de inicio de la transcripción

INR: *transcriptional initiator*, iniciador de la transcripción

RT-qPCR: *Reverse Transcription-quantitative PCR*

hpi: horas post-infección

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Rol de la soja en la agricultura argentina

La actividad agrícola es un pilar de la economía argentina. El ecosistema propicio de nuestro país permitió el amplio desarrollo de actividades agrícolas y ganaderas desde los inicios de la civilización sedentaria. Cuando los colonizadores europeos llegaron a América en el siglo XV, se encontraron con poblaciones originarias que practicaban una agricultura diversa de plantas valiosas, como maíz, papa, batata, zapallo, tomate, ají, maní, poroto y mandioca. Estas plantas de cultivo fueron incorporadas a la agricultura europea, enriqueciéndola notoriamente. Dicha actividad agrícola estaba centrada en las regiones del Noroeste y Cuyo, mientras que en la región Pampeana no se realizaban estas prácticas. Con el descubrimiento del Río de la Plata, el ingreso de equinos y bovinos de Europa, la conquista de los pueblos originarios hasta la Patagonia, la incorporación del ferrocarril y el desarrollo de nuevas tecnologías ganadera y agrícola se potenció hacia finales del siglo XIX el inicio de actividad agroexportadora de Argentina (*Parodi, 1966; Giberti, 1970; Carrasco et al, 2012*). Dado la importancia que tenía la actividad ganadera, las pasturas naturales de la estepa pampeana necesitaban, por consecuencia, ser mejoradas con pasturas de alfalfa más nutritivas para la cría del ganado. De esta manera, la agricultura nació en la pampa en función de la ganadería.

Entre los años 1930 y 1960 el modelo agroexportador argentino tuvo una importante crisis debido a una serie de factores dinámicos internos (escaso desarrollo tecnológico, cambios de políticas agrarias, modificación del sistema de arrendamiento, entre otras) y factores externos (cambios en los mercados internacionales) (*Barzki, 1988*). A mediados de la década del cuarenta, el estado intervino activamente con el fin de promover el mercado

interno. Así, con la idea de que el modelo agrícola era un pilar fundamental de la economía del país, se realizaron inversiones y alianzas estratégicas para promover dicha actividad. Se propició la modernización tecnológica con la creación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en 1957, y la incorporación de semillas híbridas de maíz y trigo. Esto permitió que la Argentina, al igual que otros países como Canadá y Australia, comenzara a destacarse por abastecer importantes cantidades de carne vacuna, cereales y girasol al resto del mundo. Con el afán de encontrar otros cultivos sustentables propicios para la región y desplazar la siembra de la caña de azúcar, desde fines de los años 60 el INTA desarrolló un programa de mejoramiento de distintas variedades así como también se fundó la empresa Agrosoja con el fin de incluir lo que hasta el momento era una curiosidad botánica. Así es como surge a principios de la década del 70 la soja (*Glycine max*) como un cultivo nuevo sustentable. Es así que hacia mediados de los '70 aparecen las primeras producciones en la zona este de Córdoba y sur de Santa Fe, compitiendo con las tierras dedicadas al cultivo del maíz (*Carrasco et al, 2012; Centro de Economía Política Argentina, 2014*).

Desde mediados de los '70s hasta mediados de los '90s operaron factores que potenciaron la producción agrícola en detrimento de la ganadería, lo cual determinó que el stock ganadero se redujera hasta límites desconocidos. Tanto las modificaciones en el mercado internacional como la tecnología utilizada (aparición de cultivos transgénicos y tecnología de siembra directa) y la política económica (como la reducción de las retenciones al agro) implementada por la dictadura militar, constituyeron factores de relevancia para explicar el predominio de la agricultura sobre la ganadería (*Arceo y Basualdo, 2006*).

Por otro lado, diversos factores potenciaron la aparición de la soja como cultivo principal en la década del 90. Primero, el Decreto de Desregulación de 1991, que convirtió a la Argentina en uno de los países con menos regulación a nivel mundial, haciendo que los pequeños productores se vieran enfrentados con las grandes empresas internacionales y con los grandes productores (*Teubal y Giarraca, 2005*). También, la incorporación de la soja transgénica *Roundup Ready* (Monsanto) en el año 1996. Sumado a la siembra directa y el creciente uso de fertilizantes, se libera a la venta la semilla de soja transgénica y se termina

de articular el paquete tecnológico, dada la capacidad del vegetal modificado de resistencia al herbicida glifosato.

Esta variedad vegetal es un representante originario de la China, miembro de la familia de las leguminosas fabáceas. Los motivos que han transformado a esta planta en un éxito mundial podrían resumirse en las excelentes características nutritivas que posee, y en los múltiples subproductos que ofrece (harina, aceite, símiles de carne, brotes, leche, tofu o queso de soja, biocombustibles, etc.). Atendiendo a la repercusión mundial que tiene este vegetal en el mundo actual, países agrarios como el nuestro han incrementado notoriamente el área de siembra para el mismo, llevando a que la Argentina se transforme en el tercer productor a nivel mundial (Figura I.1). Entre los años 1982 y 2003 la superficie sembrada de soja se multiplicó por 6, pasando de ocupar algo más de 2 millones de hectáreas a 12, 6 millones en el 2003, representando más del 46% de siembra del país (Teubal y Giarraca, 2005) (Figura I.2).

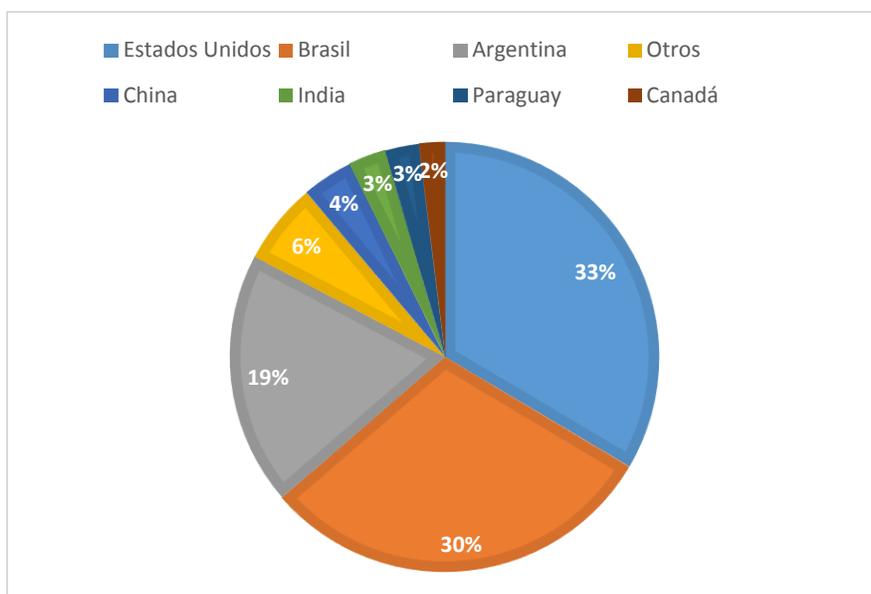


Figura I.1. Producción mundial de soja 2014/2015. Valores de la cosecha de soja en la campaña 2014/2015 en toneladas métricas. Estados Unidos: 106878000; Brasil: 96200000; Argentina: 60800000; Otros: 19570000, China: 12350000, India: 9000000; Paraguay: 8100000; Canadá: 6049000 (Fuente: ProduccionMundialSoja.com octubre de 2015)

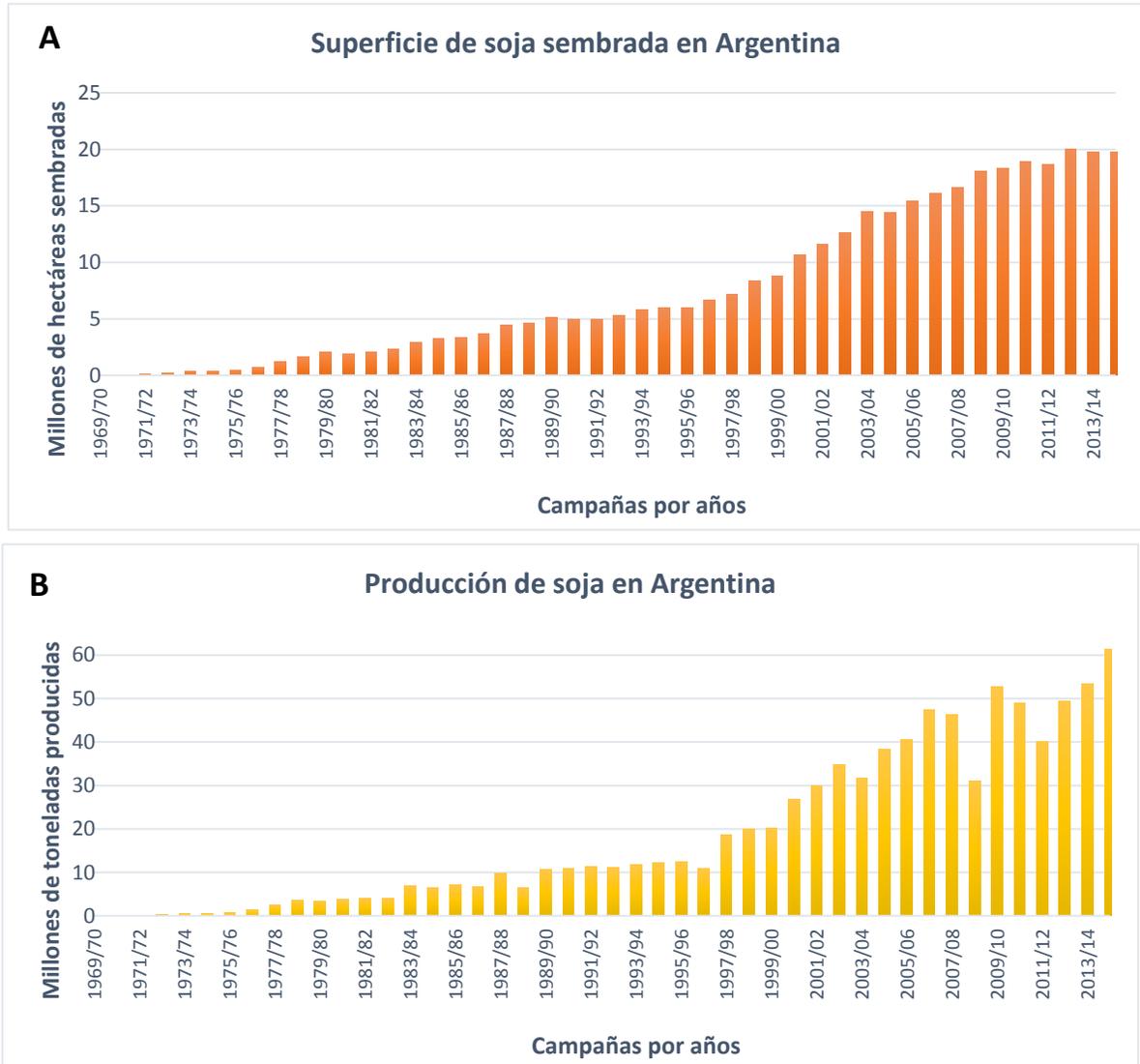


Figura 1.2. Siembra y producción de soja en Argentina desde la década del 70 hasta la actualidad. Los gráficos muestran la evolución en las diferentes campañas de la Argentina en la superficie sembrada (A) y en la producción (B). Se aprecia la importante inserción en los años de esta oleaginosa, como también el récord productivo en la última campaña. (Fuente: Sistema integrado de información agropecuaria – Ministerio de agricultura, ganadería y pesca www.siaa.gov.ar/series)

Principales plagas

La extensión de tierra cultivada por soja, casi en tendencia al monocultivo, propició un escenario favorable para la expansión de plagas. Dentro de ellas destacan muchos invertebrados fitófagos. En particular, se han registrado más de 40 especies (orugas, chinches, arañuelas, tucuras, babosas, grillos) que se alimentan de semillas, raíces, tallos, hojas, vainas o granos de la oleaginosa. De hecho, la soja es atacada por una gran diversidad de especies de orugas defoliadoras durante el período vegetativo, mientras que durante la etapa de fructificación se incrementan las poblaciones de chinches, insectos que representan una seria amenaza al cultivo por su gran efecto en el rendimiento y la calidad de la semilla. Estos insectos y arácnidos se pueden clasificar en diferentes categorías: plagas potenciales, esporádicas, principales, directas, o indirectas, entre otras. En la **Tabla I.1** se presentan las más comunes, y se consignan los daños directos e indirectos causados en el cultivo de la soja (*Massaro, 2008*).

Especie		Daño al cultivo			Frecuencia	
Nombre	Nombre vulgar	Indirecto	Directo	Potencial	Esporádica	Principal
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Oruga militar tardía	Hojas			X	
<i>Rachiplusia nu</i>	Oruga medidora	Hojas			X	
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	Oruga de las leguminosas	Hojas	Vainas			X
<i>Epinotia aporema</i>	Barrenador de los brotes	Brotes	Granos en vainas		X	
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Barrenador menor del tallo	Tallos			X	
<i>Nezara viridula</i>	Chinche verde		Granos en vainas			X
<i>Piezodorus guildinii</i>	Chinche de la alfalfa		Granos en vainas			X
<i>Dichelops furcatus</i>	Chinche de cuernitos		Granos en vainas		X	
<i>Edessa meditabunda</i>	Alquiche chico		Granos en vainas		X	

<i>Caliothrips phaseoli</i>	Trips	Hojas		X
<i>Helicoverpa sp.</i>	Oruga cogollera o bolilleras	Brotos	Granos en vainas	X
<i>Spodoptera litifascia</i>	Oruga de las vainas	Hojas	Vainas	X

Tabla 1.1. Clasificación de especies fitófagas clasificadas según el tipo de daño y la frecuencia de aparición en cultivos de soja de la región pampeana durante los últimos 10 años (Massaro, 2008).

Dentro de los insectos defoliadores, las larvas de lepidópteros son la principal amenaza para la soja, por lo que se conocen con el nombre de orugas defoliadoras. Las mismas difieren en su capacidad de daño y susceptibilidad a insecticidas. Por otro lado, las chinches pueden considerarse entre las plagas más importantes de la soja. Varias especies invaden los cultivos a partir de la floración y formación de vainas.

Con la gran cantidad de plagas existentes, surge el desarrollo de tecnologías varias para controlarlas. En la próxima sección se detallarán las mismas.

Dada la gran importancia de la soja en nuestro país e inclusive a nivel mundial, un aumento en los rendimientos de este cultivo es de vital trascendencia. Para colaborar y aportar en dicho objetivo, esta Tesis de Doctorado intenta sumar información biológica y sugerir posibles caminos en el diseño de agentes de control biológico para insectos plaga, en particular, para el caso de *Anticarsia gemmatalis*.

Soluciones tecnológicas

El éxito de los agroecosistemas depende de múltiples variables, pero sin dudas las más importantes están dadas por aquellas que involucran las condiciones fisicoquímicas del suelo, la disponibilidad de agua y nutrientes, el clima y la sanidad vegetal. Con respecto al último, el ser humano ha desarrollado herramientas, los pesticidas, que le permitieron

tratar la disminución del rendimiento de los cultivos a causa de organismos plaga. De acuerdo a la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) un pesticida es cualquier sustancia o mezcla de ellas destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier peste, incluyendo vectores de enfermedades en humanos o animales, especies no deseadas de plantas o animales que causan daño o interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento o comercialización de comida, materias primas agrícolas, madera o productos derivados, o alimentos para animales, como también aquellos que pueden administrarse a animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas que los afecten (*Zacharia, 2011*).

Dentro de los métodos o técnicas para controlar las plagas se encuentran el control cultural, biológico, etológico, mecánico, físico, químico y el uso de plantas transgénicas. Todas estas se realizan con la finalidad de mantener las poblaciones de plagas en un nivel en el cual no cause un daño económico importante.

CONTROL CULTURAL, ETOLÓGICO, MECÁNICO Y FÍSICO

En cuanto al control cultural, éste es preventivo y consiste en el empleo de algunas prácticas agrícolas que se realizan en el manejo de un cultivo o algunas modificaciones de ellas, las cuales contribuyen a prevenir y disminuir las poblaciones de los insectos y daños haciendo el ambiente menos favorable para su desarrollo. Existen muchas prácticas culturales las cuales están orientadas a destruir las fuentes de infestación (destrucción de los residuos de cosecha y de pupas en el suelo, eliminación de plantas hospederas de las plagas de nuestros cultivos, etc.), a interrumpir sus ciclos de desarrollo, a fortalecer las plantas para que resistan el ataque de los insectos (abonamiento y fertilización adecuados, evitando los excesos, deficiencias y desbalances de los nutrientes), a formar condiciones desfavorables para el desarrollo de las plagas (manipulando fechas de siembra, rotación de cultivos, etc.), utilizar plantas con resistencia genética a las plagas (plantas que naturalmente son menos susceptibles al ataque por plagas).

El control etológico refiere al estudio del comportamiento de los animales (insectos) con relación a su medio ambiente. Por consiguiente, se aprovecha de los estímulos que sirven como atrayentes de los insectos. En general, el uso de esta estrategia incluye la utilización de cebos, atrayentes cromáticos (algunas especies de insectos se ven atraídas por ciertos colores) y feromonas para ser utilizadas a través de trampas.

En tanto, el control mecánico consiste en el uso de medios mecánicos que excluyen, evitan, disminuyen, eliminan o destruyen a los insectos y órganos infestados, como ser la eliminación de insectos levantando huevos, larvas o pupas, o el levantado de plantas dañadas o infestadas para su posterior destrucción, entre otras.

El control físico consiste en el uso de cualquier agente físico como la temperatura, humedad, luz solar, foto período y radiaciones electromagnéticas en intensidades que resulten mortales a los insectos plaga, pero sin alterar ninguna de las propiedades de la planta o cultivo (*Cañedo et al, 2011*).

| INSECTICIDAS QUÍMICOS

El objetivo del uso de este tipo de control es producir la muerte de insectos plaga mediante la inhibición de enzimas vitales, y así controlar plagas importantes para la agricultura, la industria, la salud humana, o los ámbitos domésticos. Si bien establecieron beneficios evidentes para el ser humano, también han producido serios inconvenientes debido a los efectos contaminantes que poseen, afectando los ecosistemas donde se los utiliza y por ende, a otros organismos que allí habitan, incluyéndolos.

Existen diversas clases de insecticidas químicos, en general, establecidas de acuerdo a la naturaleza y origen de las moléculas que los componen. Por ejemplo, se suele hablar de insecticidas orgánicos cuando el esqueleto de las mismas está basado en carbonos; o inorgánicos cuando son producidos con metales, arsénicos, sulfuros o fluoruros, entre otros (*Peter y Cherian, 2000*). También, están los insecticidas naturales, debido a que sus

moléculas tienen un origen biológico, como la nicotina y las piretrinas (*Copping y Duke, 2007*).

La primera generación de insecticidas químicos usados a mediados del siglo XIX eran inorgánicos y muy dañinos para el ambiente, basados en formulados con arsénico, plomo, sulfuro o cianuro de hidrógeno. Con el objetivo de generar compuestos menos agresivos y más efectivos, se desarrollaron luego un conjunto de sustancias que se denominaron organoclorados. Estas moléculas son hidrocarburos modificados con cloro que responden a la primera categoría de insecticidas mencionada, y entre los cuales el miembro más popular es el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), un compuesto que afecta los canales de sodio de las células nerviosas de los insectos, cuyo descubridor, Müller, fue galardonado con el premio Nobel por dichos estudios. Al inicio de su uso, el DDT fue aclamado como un milagro debido a su amplio espectro de acción, la persistencia, la insolubilidad, el bajo costo y la facilidad para aplicarlo (*Keneth, 1992*). Además de su uso en agricultura, también fue empleado durante la segunda guerra mundial para despiojar a los soldados y controlar así la fiebre tifoidea, y en la salud pública para el control de mosquitos vectores de malaria. Tal fue el furor por este compuesto, que a mediados del siglo XX existieron múltiples campañas publicitarias alentando los beneficios del producto. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el DDT posee una larga persistencia y debido a su naturaleza lipofílica, se acumula en las grasas de los organismos que habitan o dependen del ecosistema intervenido, por lo cual fue prohibido (*Beard, 2006*).

Para salvar este inconveniente surgieron luego los insecticidas organofosforados, los cuales se caracterizan por unirse específicamente y así inhibir a la acetilcolinesterasa y otras colinesterasas, produciendo de modo consecuente la disrupción del impulso nervioso y la muerte del insecto al interferir con su comportamiento normal. Si bien pueden ser menos dañinos, poseen efectos aditivos que también terminan afectando a las poblaciones que habitan el ecosistema tratado (*Wardhaugh, 2005*).

Ante esta situación, surgió como alternativa el uso de insecticidas naturales como las piretrinas. Estos compuestos, por ejemplo, derivan de la cubierta de las semillas de una

planta nativa de la región de Dalmacia (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Lo interesante de estas sustancias es que atacan al sistema nervioso de todos los insectos siendo mucho menos dañinos para las aves, el ser humano y otros mamíferos. Si bien son tóxicas para los peces, no suelen acumularse en el ambiente dado que son biodegradables e incluso fotosensibles (*Bradberry, 2005*). Otro ejemplo dentro de esta categoría lo constituye la nicotina, un alcaloide que se encuentra en una gran variedad de plantas, pero que comercialmente se extrae del tabaco.

Para el control de las larvas de *Anticarsia gemmatalis*, se ha visto que las diaminas muestran una buena performance con respecto a otros grupos de insecticidas químicos (los ya mencionados piretroides y fosforados, neonicotinoides, además de otros grupos como las vermetinas y los reguladores de crecimiento) (*Cortés, 2013*). Por ejemplo, la flubendiamida, estabiliza los canales de calcio sensibles a rianodina (receptores de rianodina o RyRs por su nombre en inglés) a un estado abierto, liberando el calcio de los depósitos intracelulares (*Ebbinghaus-Kintscher, 2006*). La acción de la flubendiamina es altamente específica para los RyRs de insecto, y resulta en una toxicidad selectiva para una taxa restringida, incluyendo a los lepidópteros (*Tohnishi, 2005*). Sin embargo, las diaminas son tóxicas para la vida acuática.

Por lo antes expuesto, si bien los compuestos denominados insecticidas químicos son muy eficientes en la lucha contra las plagas, es preciso notar que su aplicación conlleva peligros potenciales para el resto de los organismos que dependen del agroecosistema. Es por ello que aunque haya mejorado notoriamente su diseño para disminuir los efectos colaterales, y a pesar de ser la estrategia de control de insectos mejor probada, aceptada y difundida por los costos y facilidad de aplicación, otras estrategias han ido apareciendo para complementar su uso o incluso para reemplazarlo. Entre ellas, surgen como relevantes el control biológico de plagas y el uso de variedades vegetales transgénicas.

El control biológico es una metodología para el control de plagas con innegables ventajas ambientales que consiste en el uso de organismos vivos (incluyendo a los virus) para disminuir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga, y así convertirlo en menos abundante o menos perjudicial (*Eilenberg et al, 2001*). Se pueden distinguir dos grandes usos de control: lucha microbiológica(LBM), cuando se utilizan microorganismos entomopatógenos (virus, bacterias, hongos, nematodos, etc.); y lucha macrobiológica (LB), si se utilizan enemigos naturales artrópodos (insectos, ácaros, arañas) (*Hokkanen y Lynch, 1995*).

Hay fundamentalmente cuatro estrategias de aplicación del control biológico (*Eilenberg et al, 2001*):

- *Clásico*, que involucra la introducción intencional de enemigos exóticos del lugar de origen de la plaga para tener un agente de control permanente y a largo plazo;
- *Inoculativo*, que consiste en la introducción del enemigo natural en cantidades bajas, con el fin de que se multiplique en campo y controle la peste por un largo periodo de tiempo, pero no permanentemente;
- *Inundativo*, cuando la introducción del enemigo se realiza repetidamente y en grandes cantidades para un control suficiente de la plaga; o
- *Conservativo*, cuando el ambiente del cultivo se hace más favorable para los enemigos naturales presentes en el mismo, dándoles, por ejemplo, refugio o fuentes de alimentación alternativa con el fin de que controle a la plaga.

El Control Biológico está libre de los efectos secundarios indeseables asociados a los insecticidas de amplio espectro y es uno de los métodos de mejor relación entre costo y efectividad (*Zerba, 2011*). Sin embargo, es preciso que las estrategias basadas en su uso sean diseñadas y aplicadas por especialistas, bajo estrictos principios establecidos, para que el control biológico sea seguro y no tenga efectos adversos sobre el ecosistema intervenido (*van der Bosch et al, 1982*).

Considerando un supuesto insecticida biológico con características ideales, se debería exigir que el mismo pueda cumplir con:

- producir una alta virulencia en el hospedador (para lograr una muerte rápida),
- poseer una alta capacidad de transmisión (para asegurar afectar al mayor número de individuos posible),
- persistir en el campo (para mantener y prolongar el efecto protector),
- ser fácil y económico de producir en cantidades masivas (para poder competir con los insecticidas químicos),
- tener un rango de hospedadores limitado (para no afectar otros insectos presentes en el ecosistema que puedan desestabilizarlo),
- tener un alto grado de bioseguridad para el ser humano y para todos los miembros del ecosistema (para no afectarnos y no producir desequilibrios),
- ser aplicable con tecnología convencional (para no aumentar los costos de su utilización y así poder combinar estrategias insecticidas).

Probablemente la aplicación de insecticidas biológicos no sea suficiente para la erradicación o control definitivo de una plaga, pero al menos puede servir para disminuir el uso de los insecticidas químicos. Así, es posible atemperar los efectos adversos que estos tienen sobre los agroecosistemas involucrados, al combinarlos con estrategias naturales que no interfieren significativamente sobre el resto del ecosistema intervenido.

Los enemigos naturales de plagas generalmente utilizados incluyen parasitoides, depredadores o entomopatógenos. Los primeros son aquellos insectos cuyo desarrollo tiene lugar sobre o dentro de otro insecto fitófago, siendo una relación de parasitismo que sólo se presenta en insectos. El parasitoide se come vivo al insecto plaga, rompe el tegumento y la larva se convierte en pupa y de aquí en adulto, ejerciendo un papel muy importante en el control de plagas (**Figura I.3.A**) (*Carnero et al, 1988*). Los depredadores son

otros insectos o ácaros que no causan daño al cultivo pero capturan y se alimentan de otros insectos y ácaros fitófagos plaga. Difieren de los parasitoides porque atacan a varias presas durante su vida. En la mayoría de los casos son las larvas y los adultos de los depredadores los que buscan activamente a sus presas y se alimentan de ellas (Figura 1.3.B). En tanto, los entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades a los invertebrados, siendo el agente causal muy diverso. Penetran en la especie plaga a través del tubo digestivo o del tegumento dando lugar a la expresión de la enfermedad que provoca la muerte del hospedante. Los entomopatógenos son los únicos que no buscan de forma activa a sus presas, a excepción de los nematodos. Los principales son hongos (Figura 1.3.C), bacterias (Figura 1.3.D), virus (Figura 1.3.E) y nematodos (Figura 1.3.F).

Existen múltiples ejemplos del uso de los enemigos naturales para el control de ciertas plagas. El reporte más antiguo data del año 1200, cuando los agricultores chinos manipularon las hormigas *Oecophylla smaragdina* Fab. (Hymenoptera: Formicidae) para el control del gusano defoliador de los cítricos *Tessarotoma papillosa* Drury (Bahena, 2008).

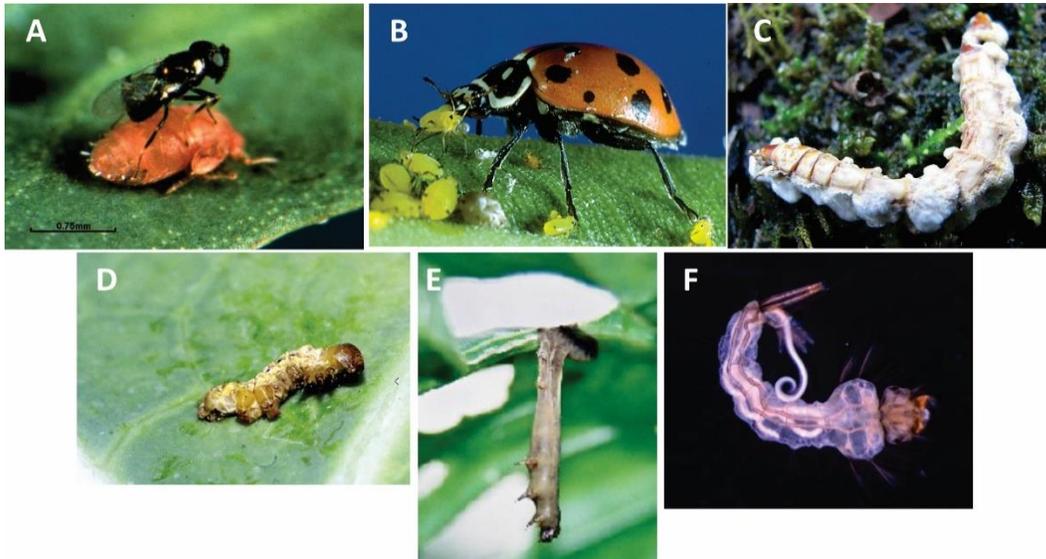


Figura 1.3. Enemigos naturales de plagas como agentes de control biológico. Las imágenes muestran los efectos de algunos enemigos naturales de insectos plagas. **A)** Avispa *Syrphophagus sp.* parasitoide del pulgón *Brevicoryne brassicae* y *Diaeretiella rapae*. **B)** Depredador *Hippodamia convergens* alimentándose de pulgones. **C)** Larva muerta por el hongo *Beauveria bassiana*. **D)** Larva muerta por infección de *Bacillus thuringiensis*. **E)** Larva muerta por infección del baculovirus *Spodoptera exigua*. **F)** Larva de mosquito infectada con el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*.

Con los años, y muchos recursos e investigación destinada, se han logrado incorporar en diversos países el uso de entes biológicos para el control de plagas. Si bien se han usado múltiples agentes durante los años, no fue hasta el registro del entomopatógeno *Bacillus thuringiensis*(Bt) en el año 1972 que este tipo de control se difundió ampliamente. Actualmente, existen muchos registros de entomopatógenos usados para el control de diferentes plagas. Dentro de los más importantes, se encuentran formulados basados en Bt, el uso de hongos, como *Beauveria bassiana* y los baculovirus (Lacey et al, 2015; Nava-Pérez et al, 2012).

El entomopatógeno *B. thuringiensis* fue descubierto en Japón y Alemania a principios del siglo XX a partir de polillas de la harina infectadas, y se caracteriza, al igual que las especies relacionadas *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, por producir y acumular durante el proceso de generación de las esporas unos cuerpos cristalinos de naturaleza

proteica constituidos por una toxina. En particular, Bt genera una toxina cuyo blanco de acción reside en los insectos, y a la cual se denominó delta endotoxina. De acuerdo a la morfología de estos corpúsculos cuando se los observa mediante microscopía electrónica, o por su diferente acción insecticida, las delta endotoxinas han sido clasificadas en cuatro tipos. Así, por ejemplo, se denominan cristales tipo Cry I a aquellos que son tóxicos para lepidópteros, Cry II a los que son tóxicos para lepidópteros y dípteros, Cry III a aquellos que afectan a coleópteros y Cry IV a los tóxicos sólo para dípteros (*Schnepf et al, 1998*). La gran variedad de formulaciones a base de cristales complejos de esporas destinados a ser ingeridos por el insecto objetivo, son el resultado de muchos años de investigación. El desarrollo de una gran variedad de matrices del complejo espora-cristal permite mejoras, tales como un aumento de la actividad tóxica, mayor palatabilidad a los insectos, o tiempos más largos de conservación (*Nava-Pérez, 2012*). Actualmente se siguen realizando investigaciones en esta bacteria, y se pretende desarrollar nuevos formulados que proporcionen un espectro de mayor actividad que impacten en un número mayor de plagas en otros cultivos y puedan ayudar a desarrollar una agricultura sustentable. La especificidad estricta de *B. thuringiensis* para ciertas especies de insectos se considera como una gran ventaja para su uso agrícola, ya que los efectos sobre los organismos no blanco, incluidos los depredadores y parasitoides, son mínimos (*Dror et al, 2009*). Tal es el efecto que tienen las endotoxinas, que se han desarrollado también OGMs (organismos genéticamente modificados), a cuyos genomas se les introdujo su secuencia codificante con el fin que cuando sean ingeridas por las larvas, las mismas mueran. Esto se detallará en la sección de plantas transgénicas.

Por otro lado, tenemos también el uso de hongos como agentes de biocontrol. Aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos tienen como agente causal un hongo. Sin embargo, la eficacia de los hongos es limitada debido a que son dependientes de factores medioambientales que sólo por momentos les pueden ser favorables. Dentro de los principales hongos entomopatógenos existen varias especies de las clases *Hyphomycetes* (como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium* y *Penicillium*), *Zygomycetes* (como *Entomophthora*, *Erynia* y *Entomophaga*) y *Oomycetes* (como *Pythium* y

Tarichium). El inicio de la infección se realiza por germinación de las esporas del hongo sobre el tegumento del individuo plaga. La dispersión de las esporas se realiza por contaminación ambiental a través del viento, la lluvia e incluso utilizando individuos enfermos. Normalmente son especies específicas o de amplio espectro de hospedadores. Los individuos enfermos no se alimentan, presentan debilidad y desorientación y cambian de color, presentando manchas oscuras sobre el tegumento, que se corresponden con las esporas germinadas del hongo. Se suelen comercializar en preparados a base de esporas que deben estar en agua unas 24 horas antes de su aplicación. Generalmente tardan una semana como mínimo en eliminar a la víctima, o al menos en que esta deje de alimentarse (*Badii y Abreu, 2006*). En la **tabla 1.2** se citan algunos productos comerciales basados en hongos entomopatógenos como agentes de control.

Agente biológico	Nombre comercial	Hospedadores	País
<i>B. bassiana</i>	Bea-Sin	Lepidópteros	México
	Ago Biocontrol	Coleóptera, Himenóptera	Colombia
	Mycotrol ES y WP	Hemíptera, Heteróptera, Coleóptera, Ortóptera, Lepidóptera	Estados Unidos
<i>B. bongniartii</i>	Engerlingspilz	Melolontha	Suiza
	Ago Biocontrol	Coleóptera, Hemíptera,	Colombia
	Beauveria 50	Díptera	
<i>Lagenidium giganteum</i>	Laginex	Mosquitos	Estados Unidos
<i>M. anisopliae</i>	Saltgreen	Aneolamia spp, Prosapia	México
	Biogreen	Adoryphouse couloni	Australia
<i>P. fumosoroseus</i>	Preferd	Mosquita blanca, áfidos	Japón

Tabla 1.2. Algunos productos comerciales basados en hongos entomopatógenos utilizados para el control de plagas (Fuente: [Nava-Pérez et al, 2012](#))

Respecto a los enemigos virales, la familia más estudiada como agente biológico de control de plagas corresponde a los baculovirus, tema a tratarse en el apartado siguiente.

Las familias de virus más comunes para el control de plagas son *Baculoviridae* (virus de la poliedrosis nuclear que atacan lepidópteros, dípteros e himenópteros), *Reoviridae* (virus de la poliedrosis citoplasmática que atacan lepidópteros y dípteros) y *Poxviridae* (virus entomopox que atacan lepidópteros y coleópteros). De los virus entomopatógenos, los baculovirus son los más utilizados con fines de control biológico.

Como se detallará más adelante, los baculovirus son una familia viral que infectan algunos órdenes de insectos (lepidópteros, dípteros, himenópteros). Inicialmente, fueron aislados de insectos muertos a causa de una enfermedad desconocida, que luego llamaron poliedrosis en vista de la acumulación de cristales proteicos en las células. Se han utilizado como agentes de control biológico de plagas en campos desde hace muchos años (*Inceoglu et al, 2006*) y presentan ciertas ventajas con respecto a los insecticidas químicos (*Possee et al, 1997; Inceoglu et al, 2006*):

- son patógenos naturales de insectos altamente específicos y evolutivamente relacionados con los artrópodos;
- son seguros para los vertebrados y otros organismos beneficiosos;
- tienen la capacidad de persistir en la naturaleza; y
- pueden ser producidos en gran escala, formulados, empacados, almacenados y comercializados de manera similar que los pesticidas químicos.

Aunque sus efectos como agentes de control se han demostrado en la protección de múltiples productos agrícolas, son insecticidas imperfectos desde un punto de vista agroindustrial y presentan algunas potenciales limitaciones, tales como:

- un mayor tiempo de letalidad (desde 5 días a 2 semanas) que los pesticidas químicos (actúan en horas);
- un rango de hospedador estrecho;

- poca estabilidad en campo, susceptibilidad a luz UV, vida media corta; y
- un mayor costo para su producción.

Por ello, muchos investigadores han focalizado su trabajo en superar estos inconvenientes mediante la introducción de modificaciones genéticas para acelerar los efectos letales de estos virus o expandir su rango de hospedador. Una estrategia que ha sido explorada es la introducción de genes que codifican hormonas o toxinas, como las neurotoxinas de organismos eucariotas o la proteína bacteriana Cry (*De Lima et al, 2007; Inceoglu et al, 2006; Jinn et al, 2006*). Estos virus genéticamente modificados (VGMs) podrían garantizar mejores rendimientos en la aplicación de biopesticidas. Además, se realizan trabajos de investigación para el desarrollo de nuevos formulados que permitan proteger a las partículas virales y así prolongar su vida media, como así también aumentar la letalidad (*Espinel-Correal et al, 2012; Santos et al, 2012*).

A pesar de las limitaciones observadas, los baculovirus han sido registrados en múltiples países para el uso como agentes de control biológico, sobre todo en los programas de manejo integrados de plagas (MIP). En la **tabla 1.3** se citan algunos ejemplos de productos comerciales registrados basados en baculovirus para el control de plagas.

Agente biológico	Hospedadores	Cosecha	Nombre comercial	País
<i>Adoxophyes orana</i> GV	<i>Adoxophyes orana</i>	Peras, manzanas	Capex 2	Suiza
<i>Agrotis segetum</i> GV	<i>Agrotis segetum</i>	Varios vegetales	Agrovir	Dinamarca
<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Soja	Baculo-soja, Baculovirus Nitral, Coopervirus SC, protégé, Multigen	Brasil
<i>Autographa californica</i> MNPV + <i>Spodoptera albula</i> NPV	<i>Autographa californica</i> <i>Trichoplusia ni</i> <i>Pseudoplusia includens</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Spodoptera exigua</i> <i>Estigmene acrea</i> <i>Plutella xylostella</i>	Alfalfa y otros vegetales	VPN-ULTRA	Guatemala

<i>Cydia pomonella</i> GV	<i>Cydia pomonella</i> <i>Grapholita molesta</i>	Manzanas, peras, nogales	Cyd-X, Virosoft CP4, Madex, Granupom, Granusal, Carpovirusine, Virin-CyAp, Carposin, Carpovirus SC	Francia, Estados Unidos, Canadá, Alemania, Suiza, Rusia, Argentina, Chile, Uruguay
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	<i>Helicoverpa</i> y <i>Heliiothis</i> <i>spp.</i>	Tomate, pimiento dulce, maíz, soja, tabaco, algodón, otros vegetales	Diplomata 13, Helicovex, Virin-HS, DOA BIO V2	Brasil, Rusia, Tailandia
<i>Helicoverpa zea</i> SPV	<i>Helicoverpa</i> y <i>Heliiothis</i> <i>spp.</i>	Maíz, tomate, algodón, tabaco	GemStar, HzNPV CCAB, Biotrol, Elcar	México, Brasil, Estados Unidos
<i>Erinnyis ello</i> GV	<i>Erinnyis ello</i>	mandioca, árboles de caucho	Baculovirus erinnyis	Brasil, Colombia
<i>Phthorimaea operculella</i> GV	<i>Phthorimaea</i> <i>operculella</i> <i>Tecia</i> <i>solanivora</i>	Papas	Baculovirus Corpoica, PTM baculovirus	Colombia, Perú, Costa Rica
<i>Spodoptera exigua</i> NPV	<i>Spodoptera exigua</i>	Tomate, pimiento picante, berenjena	SPOD-X LC, Spod-X, Vir-ex, Otienem- STM	México, Holanda, España, Estados Unidos
<i>Lymantria dispar</i> NPV	<i>Lymantria dispar</i>	Bosques	Disparvirus, Gypchek,	Estados Unidos, Canadá
<i>Mamestra brassicae</i> NPV	<i>Lepidoptera</i>	Varios vegetales	Mamestrin, Virin EKS	Francia, Rusia
<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	<i>Spodoptera littoralis</i>	Algodón, Maíz	Spodopterin	Francia

Tabla 1.3. Lista de productos registrados basados en baculovirus para el control biológico de plagas (Fuente: [Beas-Catena et al, 2014](#); [Haase et al, 2015](#))

Dentro de las campañas de control biológico realizadas mundialmente, se destaca la utilización del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) para el control de la plaga asociada, *A. gemmatalis*, la cual produce importantes pérdidas en la cosecha de soja en Brasil. Este virus fue aislado en la década del 70 del siglo pasado

en diferentes regiones de Brasil, indicando su potencial uso como bioinsecticida para la plaga que afecta (*Allen y Knell, 1977*). A principios de la década del 80, y con la creación de EMBRAPA (Corporación Brasileira de Investigación agropecuaria), se realizó la primera prueba piloto para el uso de AgMNPV como agente de control biológico en campos de soja cultivados (*Moscardi et al, 1999; Moscardi, 2007*). El ensayo resultó exitoso para el tratamiento de 21 campos comprendidos en 2000 hectáreas, utilizando un programa de manejo integrado de plagas previamente caracterizado. El éxito fue dado por la correcta capacitación de los trabajadores, ya que fue indispensable el monitoreo de la presencia de la plaga, la recolección manual de larvas muertas infectadas y la colección de datos estadísticos para el análisis. La demostración de la efectividad del programa fue fundamental para convencer a los dueños de los campos de los beneficios de esta metodología con respecto al uso de insecticidas convencionales. La forma de producir AgMNPV para utilizarlo como biopesticida era la recolección de larvas muertas en campo, que se transformaban en inóculo a usarse en la próxima campaña, haciendo que la producción sea de bajo costo, y transformándola en competitiva respecto al precio de producción de los insecticidas químicos. Luego, una combinación de la colección manual de larvas infectadas, junto con una producción controlada basada en la infección de larvas de *A. gemmatali* criadas en insectario y alimentadas con una dieta artificial permitió realizar campañas de biocontrol a mayor escala y con un menor costo que el uso de pesticidas convencionales (*Moscardi, 2007; Szewczyk et al, 2009*). De hecho, en el año 1986 se desarrolló un formulado en polvo para rociar conteniendo las partículas virales de AgMNPV, lo que permitió atraer a grandes empresas privadas para la producción a gran escala del virus dado el potencial económico que auguraba. Esto permitió expandir a 1 millón de hectáreas el uso de este virus en las campañas de 1990/91 y a 2 millones en las campañas 2002/03 (*Szewczyk et al, 2009*), convirtiéndose en la mayor campaña de uso de un baculovirus en el mundo.

Actualmente, se redujo notablemente el empleo de este agente dado los paquetes que ofrecen las grandes corporaciones de venta de granos asociados al uso de herbicidas previo a la siembra. Esto produjo una disminución notable de enemigos naturales y

aparición de otros. El uso actual ronda las 200000 hectáreas por año (*Moscardi, 2007; Sosa-Gómez, 2014*). Además, también se usa en Paraguay (*Haase et al, 2015*) y se han usado en pruebas piloto en Argentina y Colombia.

| PLANTAS TRANSGÉNICAS

Además de los controles ya descritos, y con el objetivo no sólo de controlar las plagas sino también con el fin de obtener variedades con mejores características fenotípicas, se han expandido durante las últimas décadas los cultivos con variedades genéticamente modificadas. Los descubrimientos relacionados con la ingeniería genética han permitido la incorporación de secuencias de DNA heterólogas al genoma de determinados cultivos con el fin de otorgarle un carácter benéfico (*Estruch et al, 1997*).

Sin embargo, aún hoy el uso de cultivos genéticamente modificados es resistido por muchas comunidades y estados. Esta situación se debe a los temores que existen sobre posibles riesgos, como por ejemplo que los organismos modificados puedan cruzar las barreras de los agroecosistemas invadiendo los entornos salvajes, o que los transgenes puedan pasar a nuevas especies por algún mecanismo de transferencia horizontal natural. Si bien la liberación a campo de plantas transgénicas es un aspecto muy bien regulado y controlado por instituciones públicas de los países que las propician, es probable que las controversias perduren a pesar de las ventajas indiscutibles que presenta esta estrategia en el mejoramiento de la sanidad vegetal.

Las principales aproximaciones desarrolladas para establecer cultivos resistentes a plagas se basaron en la introducción de genes que codifican para toxinas de insectos. Entre ellas, se destaca la utilización de secuencias nucleotídicas capaces de producir en las células vegetales toxinas naturales de las bacterias *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus luminescens* y *Xenorhabdus nematophilus* (*Wallimann et al, 2000; Chattopadhyay et al, 2004; Ffrench-Constant et al, 2007; Chakravarthy et al, 2014*). De este modo, cuando los

insectos se alimentan de las plantas transgénicas que expresan dichos factores, mueren o su fisiología es afectada seriamente, controlando así el tamaño poblacional de la plaga.

Por otro lado, se ha aplicado la tecnología de RNA de interferencia (RNAi) para el control de plagas, desarrollando vectores capaces de expresar dsRNA, que mediante la acción de la maquinaria celular específica involucrada en el procesamiento del RNAi, permite la interrupción de la traducción de mRNAs específicos de los patógenos plaga, una vez que son ingeridos (*Baum et al, 2007; Mao et al, 2007*). Dentro de las metodologías propuestas para el ingreso del dsRNA, se evaluó la generación de plantas transgénicas que expresan constitutivamente un RNA *hairping* específico complementario a un gen específico vital del organismo plaga. De esta manera, cuando el organismo ingiere la planta transgénica, incorpora el dsRNA, provocando una disminución en la presencia del producto proteico específico, afectando alguna función de la plaga (*Baum et al, 2007; Mao et al, 2007; Huvenne y Smaghe, 2010*).

Manejo Integrado de Plagas

En las últimas décadas, con la intensificación de la agricultura a través del uso de paquetes tecnológicos, los plaguicidas químicos de síntesis se han vuelto cada vez un medio más común para controlar las plagas de insectos, enfermedades, malezas y otros organismos que atacan a las plantas cultivadas. Sin embargo, estos productos, que en algún momento ofrecieron la posibilidad de solucionar problemas creados por plagas no manejadas por el sistema tradicional, han traído una serie de otros problemas, peligros y riesgos por su uso indiscriminado. Los peligros que se presentan se deben a que los plaguicidas no solo afectan a los organismos nocivos sino a muchos otros organismos de su entorno, incluyendo al ser humano. Además, el uso continuo y no controlado favorece el desarrollo de poblaciones resistentes de las plagas, y, en consecuencia, se incrementan las aplicaciones y la emergencia de nuevas pestes (*Röling y van de Fliert, 1998*). Por otro lado, el uso indiscriminado de plaguicidas de amplio espectro trae como consecuencia una

reducción, que en algunos casos es eliminación, de las poblaciones de insectos benéficos. Por todos los efectos antes mencionados es que surge una nueva forma de control, un manejo holístico, cuyo punto de origen es la visión del cultivo de interés creciendo en un agroecosistema determinado y, de esta manera, se puede realizar un control de plagas si se logra adaptar ese ecosistema.

Con esta idea surge lo que se conoce como Manejo Integrado de Plagas (MIP), cuya definición más difundida por la FAO es: “El Manejo Integrado de Plagas es una metodología que emplea todos los procedimientos aceptables desde el punto de vista económico, ecológico y toxicológico para mantener las poblaciones de organismos nocivos por debajo del umbral económico, aprovechando, en la mayor medida posible, los factores naturales que limitan la propagación de dichos organismos” (*Cañedo et al, 2011*).

Dado esta mirada global, uno de los objetivos del MIP es modificar o mejorar el ecosistema haciéndolo más favorable para que aumente la mortalidad de las plagas a causa de sus enemigos naturales (y de otros factores naturales de mortalidad) y para mejorar las condiciones que favorezcan el desarrollo y producción de las plantas cultivadas. Dentro de estos conceptos, existen objetivos fundamentales para el MIP. Por un lado, propone la ejecución del control de plagas en forma armoniosa con las leyes de la naturaleza siendo la base primordial la conservación de la biodiversidad local. En este sentido toma un rol altamente importante el control con enemigos naturales, de forma controlada para disminuir la presencia de la plaga de manera que no produzca pérdidas económicas para los agricultores. Sin embargo, el MIP no elimina la posibilidad de emplear insecticidas en algunas circunstancias pero hay que reducir o eliminar el uso de los productos extremadamente y altamente tóxicos, optimizando el control biológico natural. Un segundo principio básico del MIP es la intensidad de conocimiento de los recursos y procesos naturales existentes que requiere de los productores. El MIP busca reunir los conocimientos indígenas de los productores con la ciencia para que estos sean expertos en sus campos, capaces de observar, experimentar, anticipar y tomar decisiones adecuadas respecto al manejo de las plagas (*Röling y van de Fliert, 1998*).

Por todo lo expuesto, existen características deseables en los métodos de control apropiadas para el MIP, tales como:

- su efectividad contra la plaga;
- su compatibilidad con otros métodos de control;
- su impacto ambiental nulo o bajo;
- que tenga efectos prolongados en los campos, y que contribuyan a modificarlo para hacerlo más favorable al cultivo de interés y menos apropiado para la plaga;
- que sea económico, desde el punto de vista costo/beneficio;
- que la técnica de empleo sea factible; y
- que sea aceptado por productores y por la sociedad.

Con todo lo mencionado, los métodos más apropiados o recomendables para el MIP son aquellos basados en prácticas culturales, los basados en tolerancia o resistencia natural de las plantas al ataque o daño, los métodos de interferencia (por ejemplo el uso de feromonas y repelentes de insectos) y, como un pilar fundamental, el control biológico.

El uso de metodologías compatibles con el MIP son claves para la sostenibilidad de la agricultura. Conservar o mejorar la salud del ser humano, la diversidad biológica y los recursos naturales en general, como optimizar la acción de los factores naturales de mortalidad de plagas, la disminución y/o eliminación de productos químicos de alto impacto ambiental, son objetivos comunes del MIP y la agricultura sostenible.

La historia de los baculovirus se remonta 5000 años atrás junto al tan conocido gusano de la seda, que ha sido de gran importancia comercial para China y Japón. Como cualquier actividad ampliamente desarrollada, ha tenido dificultades causadas por enfermedades a los gusanos que ocasionaban grandes pérdidas. Incluso antes del conocimiento de gérmenes causantes de enfermedades, los antiguos comerciantes se han valido de herramientas para mitigar los efectos adversos de las pestes. Con el desarrollo del microscopio, se lograron identificar a mediados de 1800 partículas o cuerpos ocluidos refractantes dentro de células provenientes de los gusanos afectados, los cuales fueron nombrados como poliedros y a su enfermedad, poliedrosis.

Características principales

Los baculovirus constituyen una familia de patógenos virales que infecta artrópodos y, en particular, insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Diptera*. Junto a las familias *Asfaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Polydnaviridae*, *Mimiviridae*, *Phycodnaviridae*, *Nimaviridae*, *Adenoviridae* y *Poxviridae*, la familia *Baculoviridae* forma parte del grupo de los llamados virus con grandes genomas de DNA doble cadena (*Gao y Qui, 2007; King et al, 2012*).

Esta familia viral posee genomas de diversos tamaños, entre 80000 a 180000 pares de bases, comprendiendo entre 90 y 180 marcos de lectura abiertos (*ORFs*). De todos los genomas con secuencia completa reportada en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), se identificaron cerca de 900 *ORFs* diferentes, y solo una pequeña proporción corresponde a genes ortólogos, los que conforman el grupo de *core genes* (*Miele et al, 2011*). Esta peculiar característica que define solo el 4% del total de genes como genes ortólogos en la familia, revelaría eventos frecuentes de inserciones y deleciones a lo largo de la historia evolutiva, poniendo de manifiesto la existencia de genes

cruciales para el ciclo viral que son compartidos por todos los miembros conocidos, y otros sólo presentes en algunos, los cuales aportarían ventajas adaptativas probablemente no esenciales. Por otro lado, esta diversidad de secuencia incorporada a lo largo del tiempo haría difícil reconocer nuevos genes ortólogos. Hasta el momento hay descritos 37 *core genes*, que se pueden agrupar según la funcionalidad durante el ciclo viral (Tabla 1.4) (Garavaglia et al, 2012). De este grupo de genes, más de la mitad codifican para proteínas asociadas a los viriones, involucradas en la estructura de la cápside, la envoltura de los ODVs y la infectividad oral. Los otros genes están asociados a la replicación, procesamiento y transcripción tardía y muy tardía, denotando la importancia de estas funciones en la biología de esta familia viral.

Las moléculas genómicas se encuentran altamente condensadas y asociadas a proteínas, estando contenidas dentro de nucleocápsides con morfología baciliforme que dan el nombre a la familia viral. Estas estructuras son vainas polares de naturaleza proteica y forma cilíndrica, con un diámetro promedio de entre 40 y 70 nm, mientras que la longitud está comprendida entre 250 y 400 nm (Federici, 1986; Tanada y Hess, 1991; Boucias et al., 1998).

Nombre del gen	Función asociada	Nombre del gen	Función asociada
----------------	------------------	----------------	------------------

<i>lef-1</i>	Replicación	<i>p6.9</i>	Envoltura, ensamblado y liberación	
<i>lef-2</i>		<i>vp39</i>		
<i>Helicasa</i>		<i>vp1054</i>		
<i>DNA pol</i>		<i>vp91/p95</i>		
<i>alk-exo</i>		<i>gp41</i>		
<i>lef-4</i>	Transcripción	<i>38k</i>		Envoltura, ensamblado y liberación
<i>lef-8</i>		<i>p33</i>		
<i>lef-9</i>		<i>odv-ec43</i>		
<i>p47</i>		<i>p49</i>		
<i>lef-5</i>		<i>p18</i>		
<i>vlf-1</i>		<i>desmoplaquina</i>		
<i>ac81</i>	Desconocida	<i>p40</i>	Envoltura, ensamblado y liberación	
<i>pif-0/p74</i>	Infectividad oral	<i>ac53</i>		
<i>pif-1</i>		<i>ac78</i>		
<i>pif-2</i>		<i>p48</i>		
<i>pif-3</i>		<i>odv-e27</i>		
<i>pif-4/odv-e28</i>		<i>odv-e18</i>		
<i>pif-5/odv-e56</i>		<i>odv-e25</i>		
<i>pif-6/odv-nc42</i>				

Tabla I.4. Lista de los *core genes* de la familia *Baculoviridae* caracterizados asociados a la función que cumplen en el ciclo viral.

Hospedadores naturales

Desde el 1500 se conocen las enfermedades causadas a los gusanos de la seda, pero no fue hasta el desarrollo de la teoría de los gérmenes descrita por Pasteur, junto con el uso de la microscopía óptica que se encontró el agente etiológico causante de la enfermedad. Así, examinando tejidos de larvas muertas se identificaron en el núcleo celular estructuras tipo cristal, los poliedros (*Cornalia, 1856*). Después de la descripción de los cuerpos de oclusión en larvas del gusano de la seda, se fueron caracterizando también en otras especies de lepidópteros, como en la monja *Lymantria monacha*. Más adelante se aislaron cuerpos de oclusión de dípteros, la típula *Tipula paludosa* y de una especie de

himenóptero, el sínfito o mosca de la sierra *Gilpinia hercyniae*. Así logró describirse la enfermedad, que llamaron poliedrosis, que se caracterizaba por producir hinchazón y aumento del brillo en la piel de los insectos afectados con una posible ruptura del insecto y la liberación de un fluido. Y finalmente, ya en la década de 1920, se descubrió otro tipo de enfermedad de insectos, con características etiológicas diferentes en la larva *Pieris brassicae*, en donde se acumulaban pequeños gránulos, en vez de poliedros, dentro de las células y se llamó a la enfermedad granulosis (Arif, 2005).

Se han aislado baculovirus solo en artrópodos, lo que sugiere la evolución como una familia viral distintiva, habiendo comenzado en el periodo Silúrico de la era Paleozoica, más de 400 o 450 millones de años atrás. La co-evolución de esta familia viral con la rápida divergencia del *phyllum Arthropoda*, podría haber influido en la característica infectiva restringida a este grupo por parte de los baculovirus.

Así, dentro de los artrópodos, se han aislado baculovirus de los órdenes *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Diptera*, y se asignó como nombre el correspondiente a partir de la especie de donde se aisló por primera vez. Por ejemplo, la polilla de la alfalfa, *Autographa californica* (Ac), dio el nombre al baculovirus aislado por primera vez en este insecto, AcMNPV, virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica*. Si bien los baculovirus presentan un rango de hospedador estrecho, AcMNPV no infecta exclusivamente a *Autographa californica*, sino que es capaz de infectar a varios lepidópteros, pero se mantiene el nombre asociado al organismo en donde se aisló por primera vez. Por otro lado, en ciertos insectos se han aislado tanto poliedros como gránulos, demostrando ser hospedadores tanto de nucleopoliedrovirus como de granulovirus.

Por otro lado, la susceptibilidad de los hospedadores a la infección no necesariamente es mayor en el organismo del cual se aisló el virus originalmente. Una manera de determinarla, es a través del valor DL₅₀ (dosis letal media), que refiere a la cantidad de inóculo viral necesaria para matar a la mitad de la población estudiada. Teniendo en cuenta estas consideraciones, para el caso del virus aislado de *Mamestra brassicae*, cuyo hospedador dio origen al nombre MbMNPV (virus de la poliedrosis nuclear

múltiple de *Mamestra brassicae*), la DL₅₀ para este lepidóptero es menor que para *Lacanobia thalassina* y *Trichoplusia ni*, haciendo a estos dos hospedadores más susceptibles a la infección (Doyle et al, 1990).

Se han realizado estudios de la capacidad infectiva de ciertos baculovirus a diferentes hospedadores, obteniendo un grupo de virus generalistas, con un rango de hospedador amplio, y otros, monoespecíficos, con capacidad de infectar a sólo una especie. Como miembro del grupo generalista, se puede citar a AcMNPV, que en un estudio de infectividad realizado en 145 especies distintas de lepidópteros, ha sido capaz de infectar a 107, mientras que SeMPNV, virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Spodoptera exigua*, sólo es infectivo para la oruga de donde fue aislado, formando parte de los baculovirus especie-específico (Goulson, 2003). Aunque exista evidencia de baculovirus generalistas, no se ha logrado una asociación taxonómica clara entre los hospedadores susceptibles para cada virus. Además, es necesario tener presente que, por ejemplo, AcMNPV fue aislado sólo en California, haciendo imposible el contacto natural con aquellos hospedadores evaluados presentes en otras regiones geográficas, ocurriendo una limitante geográfica de contacto natural. Como se detallará más adelante, esta propiedad infectiva mono específica o generalista se puede aprovechar para el desarrollo de nuevos métodos de control biológico de plagas, ya que muchos de los hospedadores de los baculovirus son plagas de cultivos de alto interés agrícola.

A pesar de no poder realizar una asociación filogenética en cuanto al rango de hospedador de diferentes especies baculovirales, es posible mencionar que dentro de la familia *Noctuidae* de los hospedadores lepidópteros, existen baculovirus infectivos con rango estrecho, como los virus aislados de *Limantria dispar*, *Orgyia antiqua* y *Euproctis chrysorrhoea*, mientras que hay otros, aislados de *Autographa californica*, *Anagrapha falcifera* y *Mamestra brassicae* que infectan muchas especies de insectos y a miembros de distintas familias de lepidópteros, generando así una clasificación de especies altamente susceptibles o permisivas y aquellas no infectables o no permisivas (Bishop et al, 1995; Goulson, 2003). También es destacable que los granulovirus y los nucleopoliedrovirus de

himenópteros tienen un rango de hospedador más estrecho que los nucleopoliedrovirus de lepidópteros.

Morfología

Los miembros de la familia *Baculoviridae* se caracterizan por presentar dos fenotipos distintos a lo largo del proceso infeccioso. Dichos viriones diferenciales, sin embargo, poseen el mismo genotipo, y su generación es dependiente de la temporalidad de la infección. Así, podemos reconocer a las formas tempranas, conocidas con el nombre de formas brotantes o BV (*Budded Virus*), y a las formas tardías, denominadas cuerpos de oclusión u OB (*Oclusion Bodies*), los cuales contienen a los ODV (*Oclusion Derived Virus*) (Figura 1.4).

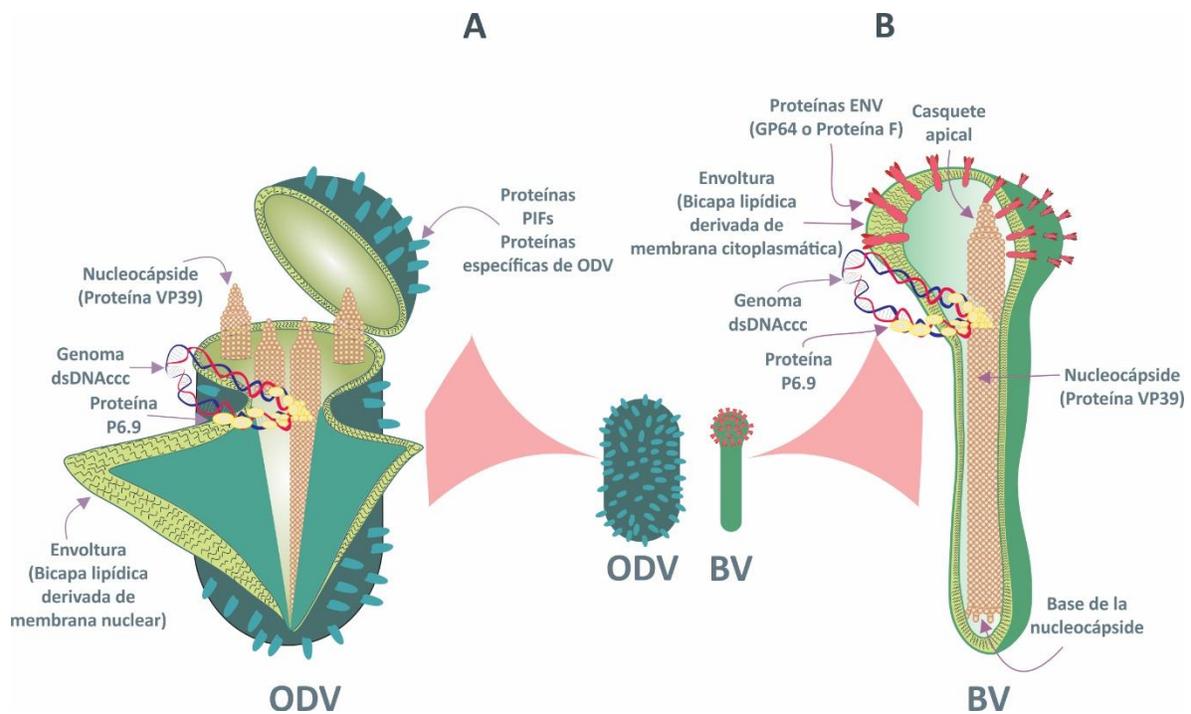


Figura 1.4. Morfología ODV - BV. El esquema representa los fenotipos virales durante el ciclo de infección de un baculovirus tipo MNPV. **A)** Representa una vista diseccionada de un ODV, conteniendo múltiples nucleocápsides y dentro de cada una, una molécula de genoma, pudiéndose observar como una expansión de la nucleocápside. **B)** Representa una vista diseccionada del fenotipo BV. El mismo contiene una nucleocápside la cual contiene una molécula del genoma, al igual que antes. En el extremo superior se aprecian las proteínas ENV, GP64 para el caso de los NPVs del Grupo I y proteína F para el caso de los NPVs del Grupo II. El gráfico no representa escalas reales. (Adaptado de Slack y Arif, 2007)

Los OBs representan el fenotipo viral que confiere la estabilidad fuera de su hospedador, asegurando perdurabilidad. Teniendo en cuenta la existencia temporal de las poblaciones de insectos hospedadores, los baculovirus desarrollaron una estrategia para permanecer en el ambiente a la espera de la aparición de su nicho infectivo. Estos OBs están formados principalmente por un polipéptido que forma una estructura cristalina que contiene a los ODVs. Esta estructura otorga una protección a las partículas infectivas de posibles agresiones ambientales, como por ejemplo las radiaciones UV o deshidratación por calores extremos. La proteína mayoritaria de los OBs se denomina poliedrina o granulina según el género del virus, nucleopoliedrovirus (NPVs; 3 géneros) o granulovirus (GVs; 1 género) respectivamente, dando lugar a cuerpos de oclusión denominados poliedros o gránulos (*Braunagel y Summers, 1994*). Estos polipéptidos tienen un peso molecular cercano a los 30 kDa y se caracterizan por presentar un gen ortólogo a uno u otro en toda la familia *Baculoviridae*, con excepción de un virus que infecta dípteros, cuya secuencia primaria aminoacídica no se relacionaría con las demás y posee un tamaño aproximado de 90 kDa, tres veces más que aquellas presentes en los otros virus (*Perera et al, 2006*). El tamaño promedio de los poliedros es entre 800-2000 nm de diámetro y es posible visualizarlos con microscopía óptica como cuerpos refringentes. Los gránulos, en cambio, son más pequeños, de forma ovoide de 500 nm de largo y 200 nm de ancho aproximadamente y son más difíciles de resolver por microscopía óptica ya que aparecen como cuerpos oscuros (*Bilimoria, 1991; Boucias y Pendland, 1998*) (Figura I.5-E y F). Si bien esta estructura es estable, es susceptible a pH básico, dejando libres a los viriones en estas condiciones, tal y como ocurre en el lumen intestinal.

Rodeando a los OBs, tanto en poliedros como gránulos, existe una estructura electrodenso denominada *calyx*, membrana del poliedro o envoltura del poliedro (*Polyhedral Envelope*, PE) compuesta por proteínas y carbohidratos que forman una matriz porosa (*Gross y Rohrmann, 1993; Gross et al, 1994*). La PE rodea al cuerpo de oclusión durante su formación y es la última separación física entre el OB y el ambiente, potenciando la

integridad de los mismos durante y después de su liberación. La fosfoproteína mayoritaria del *calyx* es la PEP (*polyhedral envelope protein*) o PP34.

Por otro lado, la proteína tardía P10 sería necesaria para la correcta formación de la PE, ya que en su ausencia, los OBs se visualizan igual que cuando no existe el *calyx*, generando una envoltura incompleta y exhibiendo cavidades en la superficie de los cuerpos de oclusión por donde los viriones podrían perderse. Además, este polipéptido forma estructuras filamentosas en el núcleo y citoplasma de las células infectadas, interactuando con los microtúbulos. En su ausencia, se ha evidenciado impedimento de lisis nuclear. Toda esta información sugiere que dicha proteína estaría involucrada en la correcta diseminación del virus y su estabilidad estructural (*Vlak et al, 1988; Gross et al, 1994; Carpentier et al, 2008*).

Además, se encuentran las metaloproteasas VEFs (*Viral Enhancing Factors*), presentes en los GVs y en algunos NPVs. Se ha descrito que se encuentran asociadas en la matriz proteica de los gránulos y asociado a la envoltura de los ODVs en NPVs (*Roelvink et al, 1995; Slavicek et al, 2005; Toprak et al, 2012*). Los genes que las codifican se encuentran en múltiples copias, y su ausencia baja la potencia de los virus, aumentando los valores de DL₅₀. Estas proteínas actuarían hidrolizando componentes específicos de la membrana peritrófica presente en el intestino medio de los hospedadores susceptibles. Dicha membrana forma una barrera protectora promoviendo un acceso limitado de los patógenos a las células epiteliales. El accionar de los VEFs genera poros en dicha membrana protectora, facilitando la interacción de los ODVs con las células del intestino (*Wang et al, 1997*).

A las 24 horas post-infección, ya es posible visualizar los cuerpos de oclusión a través de microscopía óptica de células infectadas, liberándose cerca de las 48-72 horas mediante la lisis de las células, producto de la acción de proteínas virales específicas.

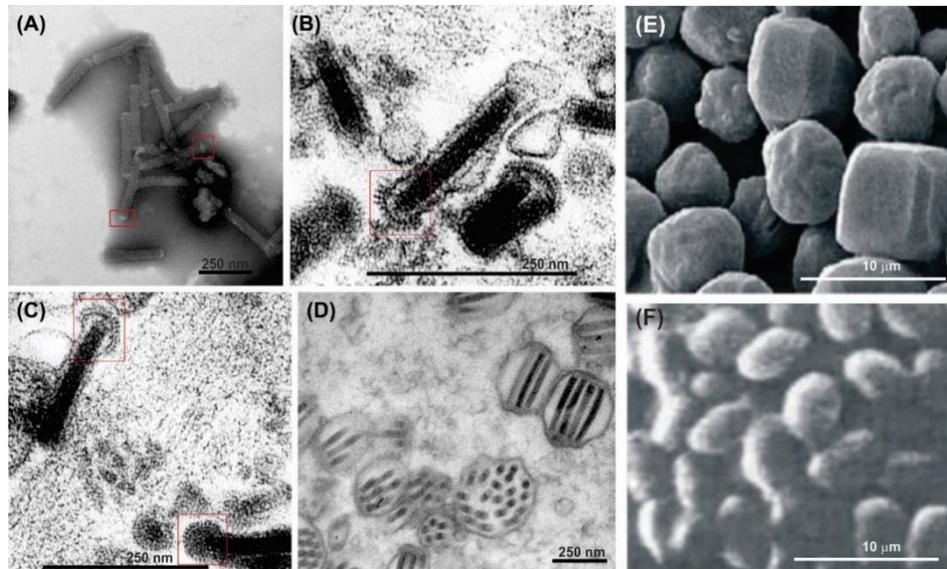


Figura 1.5. Micrografías de fenotipos baculovirales y nucleocápside. **A)** Microscopía electrónica de una tinción negativa de nucleocápsides de viriones de AcMNPV. En cuadro rojo se aprecian las terminales del casquete apical translúcidas (Harrison y Hoover, cap 4, 2012). **B, C)** Microscopía electrónica de partículas virales brotantes del virus AcMNPV. En el recuadro rojo se indican los extremos conteniendo la glicoproteína GP64 (Harrison y Hoover, cap 4, 2012). **D)** Microscopía electrónica de viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs) de AcMNPV, mostrando múltiples nucleocápsides envueltas en cada virión (Harrison y Hoover, cap 4, 2012). **E)** Microscopía electrónica de barrido del virus AcMNPV, donde puede apreciarse la forma poliédrica característica del género nucleopoliedrovirus. (© 2005, TREVOR WILLIAMS HOMEPAGE). **F)** Microscopía electrónica de barrido del virus PhopGV, donde puede apreciarse la forma ovoide típica de los OB en el género *Betabaculoviridae* (© 2001, CABALLERO ET AL, CAP I)

VIRIONES DERIVADOS DE LOS CUERPOS DE OCLUSIÓN –ODVs

En la etapa tardía del ciclo viral, cuando comienza la expresión de los genes controlados por promotores tardíos, se produce un cambio del estroma virogénico, dando lugar a la aparición de los viriones derivados de los cuerpos de oclusión, ODVs. Al poco tiempo, comienza también la morfogénesis de los cuerpos de oclusión por la expresión de las proteínas ya mencionadas, que asocian uno o más ODVs, dando lugar a los poliedros o gránulos. Los ODVs contienen una o varias nucleocápsides, dependiendo de la especie viral.

Estas partículas se generan en el núcleo de las células infectadas, donde allí se encuentran las nucleocápsides que son recubiertas con la envoltura, formando los ODVs (Figura I.4.A y I.5.D). Dicha envoltura deriva de la membrana nuclear interna, la cual genera invaginaciones dando a lugar a microvesículas intranucleares, que luego darán lugar a la envoltura viral (Braunagel et al, 1994; Braunagel y Summers, 2007). Dado que se ha demostrado que la composición lipídica de la membrana nuclear es levemente diferente a la de la envoltura de los ODVs, se realizaron estudios para evaluar la composición de la misma durante un ciclo de infección viral, demostrando cambios a medida que transcurre la infección (Braunagel y Summers, 2007). Esto permitió hipotetizar que los baculovirus inducen cambios en la membrana nuclear, convirtiéndola en apta para la envoltura viral.

Otra característica de los ODVs es la presencia de muchas proteínas específicas en su estructura. Dado la función que cumple este fenotipo viral, es necesario que lleve consigo todos los elementos que permitan establecer el rango de hospedador y dar comienzo a la infección. No por ello muchas de las proteínas que poseen forman parte de los *core genes* de la familia *Baculoviridae* (Miele et al, 2011). Algunas son exclusivas de los ODVs, mientras que otras fueron también aisladas de la envoltura de BVs (Braconi et al, 2014). Entre las funciones que cumplen destaca la de efectivizar la infección primaria, dando lugar a la traslocación de las nucleocápsides presentes en los ODVs al núcleo de las células del intestino medio, lugar en donde ocurre el inicio de la infección. Dentro de las mismas, un grupo específico de proteínas denominadas PIFs, por sus siglas en inglés *Per os Infectivity Factors*, presentan ortólogos en todos los miembros de la familia y la ausencia de alguna de las mismas bloquea la infección primaria, haciendo al organismo resistente a la infección.

| VIRIONES BROTANTES – BVS

En estadios tempranos de la infección, alrededor de las 12 horas de iniciado el ciclo en una célula, se producen viriones del fenotipo BV, *Budded Virions*. Esta estructura contiene una única nucleocápside, la cual se encuentra envuelta por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula infectada (Figura I.4.B y I.5.B y C). El análisis

del proteoma de la envoltura del BV demuestra que la glicoproteína GP64, o su homólogo funcional conocido como Proteína F (ambas también denominadas proteínas ENV), constituyen el componente principal. En cuanto a la distribución de estos polipéptidos, diferentes estudios mostraron que las proteínas ENV se concentran en uno de los extremos del virión, formando así una estructura característica en forma de espiga (*Volkman, 1986; Blissard y Rohrmann, 1990; Braunagel y Summers, 1994; Westenberg et al, 2002, 2004*). La proteína GP64 es una glicoproteína cuya actividad fusogénica se activa a pH ácido. Es una de las proteínas más abundantes asociadas a la envoltura de los BVs para las especies virales que la poseen (*Volkman, 1986; Wang et al, 2010*). Esta proteína es la mediadora de la entrada de los BVs a las células a través de su actividad específica, representando la principal función de este fenotipo viral: la dispersión sistémica de los virus en la larva infectada. Por otro lado, las especies que no la poseen, la proteína F es la responsable de dicha actividad.

LA NUCLEOCÁPSIDE

Ambos fenotipos virales contienen nucleocápsides con estructura y composición similar. Las mismas contienen el genoma viral completo y muchas proteínas en común. Son de entre 40-70 nm de diámetro y de 250-400 nm de longitud (*Boucias y Pendland, 1998*). Se supone que el tamaño del genoma es proporcional a la longitud de la nucleocápside. Poseen una estructura baciliforme que consiste en una vaina o cápside cilíndrica cubierta en ambos extremos (base y casquete apical), de naturaleza proteica (*Federici, 1986; Fraser, 1986, Rohrmann, 2013*) (Figura I.5.A). La proteína más abundante de la nucleocápside es VP39, que se organiza en forma de anillos apilados perpendiculares (*Federici 1986, Guarino and Smith, 1990*).

Existen otras proteínas asociadas a esta estructura, como ser la fosfoproteína PP78/83, que estaría involucrada en la traslocación de la nucleocápside al núcleo por interacción con los filamentos de actina (*Lanier y Volkman, 1998; Slack y Arif, 2007*).

Además, se ha observado que las nucleocápsides transportan proteínas virales involucradas en la replicación del DNA. Esto sería debido a que el primer blanco celular de una infección por baculovirus es el tejido formado por las células del epitelio intestinal de las larvas, las cuales están en G0 y por ende, la replicación viral estaría comprometida si fuese necesaria la síntesis completa *de novo* de cada uno de estos factores. Así, pueden hallarse IE-1, DNA pol, DNA Helicasa, Lef-1, Lef-2, Lef-3 y PCNA (*Braunagel et al, 2003; Iwahori et al, 2004*).

El DNA viral se encuentra altamente condensado dentro de la vaina formada por VP39, gracias a la presencia de la proteína básica P6.9 o VP12. Este polipéptido se caracteriza por tener un alto contenido de argininas, y es reconocido como una proteína del tipo Protamina (*Wilson y Price, 1988; Rohrmann et al, 2013*). Además, P6.9 es una fosfoproteína cuya fosforilación es inhibida por la presencia de Zn²⁺. Gracias a esta característica, en los poros nucleares o al ingresar al núcleo de la célula infectada, P6.9 es fosforilada por acción de quinasas asociadas a la cápside, alterando de este modo el PI de la misma e induciendo consecuentemente el desnudamiento del genoma viral (*Wilson y Consigli, 1985*).

Clasificación de la familia *Baculoviridae*

La clasificación de la familia *Baculoviridae* se ha modificado a lo largo de los años debido a la aparición de nuevo conocimiento sobre sus miembros. Así, gracias a la disposición de una mayor cantidad de información biológica y de secuencias genómicas, los baculovirus son clasificados en 4 géneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* y *Deltabaculovirus*. (*Jehle et al, 2006; Herniou et al, 2012; Rohrmann, 2013*).

En función de esta clasificación, se describen algunas características comunes:

Alphabaculovirus: incluye a los baculovirus que infectan lepidópteros con OBs compuestos por la proteína mayoritaria poliedrina y con un tamaño de entre 0,8-2 μm . Los mismos maduran dentro del núcleo de las células infectadas y contienen varios ODVs, los cuales pueden empaquetar una o varias nucleocápsides dentro de una partícula envuelta, clasificando a la especie en SNPV o MNPV respectivamente.

Este género se subdivide en dos clados, Grupo I y Grupo II (los primeros poseen proteína GP64 en la envoltura del BV, mientras que los segundos tienen sólo la proteína F). Todos los miembros producen BVs y ODVs y el tamaño del genoma oscila entre 110 y 170 kpb. La especie tipo es AcMNPV.

Betabaculovirus: incluye baculovirus que infectan lepidópteros, cuyos OBs están compuestos de la proteína granulina, ortólogo a poliedrina. Los cuerpos de oclusión tienen un tamaño promedio de 0,13-0,5 μm y contienen un solo ODV, el cual, típicamente contiene una única nucleocápside. El tamaño del genoma oscila entre 110 y 180 kpb. La especie tipo es CpGV.

Gammabaculovirus: incluye a los nucleopoliedrovirus (NPVs) que infectan himenópteros (NeleNPV, NeseNPV y NeabNPV). Presentan OBs de alrededor de 0,4-1,1 μm con nucleocápsides simples en sus viriones (SNPVs). Los tamaños de los genomas son de alrededor de 90 kpb y no presentan proteínas ortólogas a F o GP64, ni tampoco la presencia del fenotipo brotante. La especie tipo es NeleNPV.

Deltabaculovirus: incluye a los nucleopoliedrovirus (NPVs) que infectan dípteros, siendo CuniNPV el único con genoma completo descrito hasta el momento. Estos virus presentan los dos fenotipos, BVs y ODVs. Al nivel estructural, CuniNPV presenta un OB globular de alrededor de 400 nm de diámetro formado por una proteína no homóloga a la poliedrina o granulina de los otros géneros. La especie tipo es CuniNPV.

| OTROS VIRUS RELACIONADOS CON LA FAMILIA *BACULOVIRIDAE*

Además de los baculovirus, existen otros virus con genomas de DNA doble cadena que infectan invertebrados. Entre ellos tenemos a los nudivirus, ascovirus, iridovirus, entomopoxvirus, bracovirus, whispovirus, hytrosavirus. En la **tabla 1.5** se detallan las familias virales con genomas de DNA doble cadena que infectan artrópodos.

Virus		Virión/ Morfología de nucleocápside	Genoma (tamaño)	Lugar de replicación	Cuerpos de oclusión	Síntomas/ Histopatología	Familias hospedadores
Familia	Géneros						
Ascoviridae	Ascovirus	Envuelto, baciliforme, ovoide,	Circular 150-190	Núcleo	No	Hipertrofia nuclear, formación de vesículas en hemolinfa	Lepidoptera, Hymenoptera
Baculoviridae	Alpha, Beta, Gamma, Delta	Envuelto, baciliforme	Circular 90-180	Núcleo	Sí	Hipertrofia nuclear y celular	Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera
Hytrosaviridae	Glossinavirus, Muscaivirus	Envuelto, baciliforme	Circular 120-190	Núcleo	No	Hipertrofia de glándulas salivares, degeneración ovárica y testicular	Diptera
Iridoviridae	Iridovirus, Chloriridovirus	Envuelto o no envuelto, isométrico	Lineal 150- 280	Citoplasma	No	Iridiscencia	Lepidoptera, Diptera, Coleoptera
Nimaviridae	Whispovirus	Envuelto, ovoide o elipsoide tipo baciliforme	Circular 300	Núcleo	No	Síndrome de la mancha blanca	Crustaceae
Nudiviridae	Alpha, Beta	Envuelto o no- envuelto, baciliforme	Circular 125- 220	Núcleo	Sí/No	Hipertrofia nuclear y celular	Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Diptera
Polydnviridae	Bracovirus, Ichnovirus	Envuelto, pleomórfico, elipsoide	Lineal- Proviral	Núcleo	No	Inmunosupresión	Hymenoptera (Braconidae/ Ichneumonidae)
Poxviridae/ Entomopoxvirinae	Alpha, Beta, Gamma	Envuelto, ovoide, pleomórfico	Lineal 130- 300	Citoplasma	Sí	Formación de esferoides, cambio de color, mayor longevidad	Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Diptera

Tabla 1.5. Características de las familias virales de invertebrados con genoma de DNA de doble cadena. (Adaptado de [Jehle et al, 2013.](#))

Los nudivirus son una familia viral que se conocen como los “baculovirus desnudos” ya que se los conoció como no-ocluídos, característica que los desvinculó de la familia *Baculoviridae*, formando una nueva familia viral. Por otro lado, tienen un rango de hospedador que incluye además de lepidópteros y dípteros a coleópteros y ortópteros (*Wang et al, 2007*). A pesar de esta característica distintiva, se aisló un virus ocluído del zancudo *Tipula oleracea*, que luego de obtener la secuencia completa de su genoma, se lo clasificó en la familia *Nudiviridae* por tener más homología con los miembros representantes del grupo. Este virus, ToNV, posee 21 de los 37 *core genes* de los baculovirus, pero también comparte 52 genes con los nudivirus, característica que lo asigna a esta familia (*Bézier et al, 2014*). Otro caso similar es un virus ocluído aislado del camarón *Penaeus monodon*, PmNV o MNV, que luego de obtener datos de secuencia completa, se pudo clasificar dentro de la familia *Nudiviridae* pero a un género distinto de los ya existentes (*Yang et al, 2014*). Por ello, la ausencia de cuerpos de oclusión ya no sería una característica distintiva de la familia.

Con el aumento del conocimiento de secuencia de los genomas, se encontraron genes homólogos a ciertos genes baculovirales en otros virus de invertebrados. Esto podría deberse a la transferencia horizontal génica en el caso de una co-infección en el mismo hospedador (*Iyer et al, 2006*). Sin embargo, esto no pareciera ser el caso de los nudivirus, ya que comparten 20 de los 37 *core genes* de los baculovirus, favoreciendo la hipótesis de otro mecanismo de co-evolución de estos grupos virales.

Los hytrosavirus son una familia viral que infectan a dípteros. Ocasionalmente ocasionan la patología de hipertrofia de las glándulas salivares y malformación testicular y ovárica. Estos virus tienen 12 genes homólogos a los *core genes* de los baculovirus. Se caracterizan por ser no ocluídos aunque un virus aislado de la mosca *Musca domestica*, MdSGHV, codifica para un homólogo al gen poliedrina/granulina. Por ello, se cree que esta familia viral está filogenéticamente relacionada a los baculovirus pero evolucionó muy asociado a sus hospedadores específicos (*Jehle et al, 2013*).

Los bracovirus, uno de los géneros de la familia viral *Polydnaviridae*, también poseen genes homólogos a baculovirus. Son virus que parasitan avispas, e infectan a los

lepidópteros a través de la ovodepositación de las avispas en larvas para completar su ciclo de vida. Poseen un genoma fragmentado en pequeñas moléculas de cccdsDNA. Sin embargo, se integra al genoma de las células ováricas de las avispas parasitadas, utilizando la maquinaria celular para su replicación. Estos virus poseen varios genes homólogos a nudivirus y baculovirus, entre los que se encuentran la RNA polimerasa viral y varios componentes estructurales de los baculovirus (*Rohrmann, 2013*). Dada la presencia de estos genes y luego de realizar estudios evolutivos de la familia, se hipotetiza que un nudivirus parasitó una avispa, y al menos una parte de ese genoma se integró en el propio material genético, permitiendo la aparición de esta familia viral (*Bézier et al, 2009, Jehle et al, 2013*).

Por otro lado dentro de los whispovirus se encuentra el *white spot syndrome virus* (WSSV), agente causal del síndrome que da nombre al patógeno en varias especies de crustáceos acuáticos. Presenta nucleocápsides envueltas similares a los viriones brotantes de los baculovirus y junto a las demás familias virales, presentan regiones repetitivas en el genoma, también similares a las encontradas en el genoma de los baculovirus, más tres genes homólogos a dicho grupo de patógenos (*Rohrmann, 2013*).

Dado que todos estos virus poseen varios genes homólogos, estarían filogenéticamente relacionados, lo cual puede inferirse mediante un análisis en base a concatenados de las proteínas derivadas de los genes homólogos (**Figura 1.6**) (*Jehle et al, 2013; Bézier et al, 2014*).

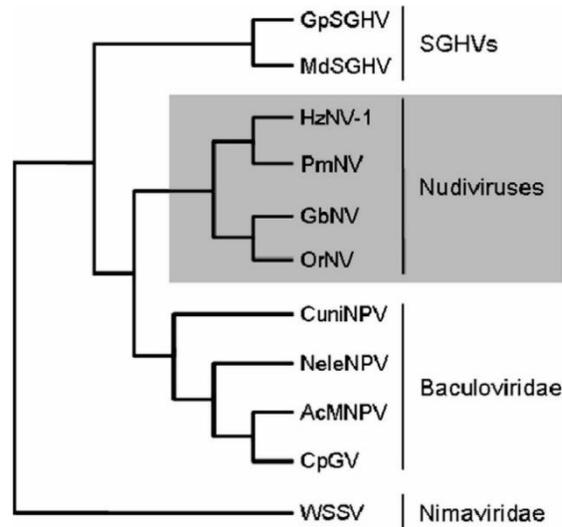


Figura 1.6. Árbol filogenético construido utilizando el método *supermatrix*, analizando en simultáneo un grupo de genes homólogos conservados presentes en nudivirus, baculovirus, nimavirus e hytosavirus (SGHVs). (Ref: [Jehle et al, 2013](#))

Ciclo viral

INFECCIÓN PRIMARIA – PER OS

En primera instancia es importante destacar que la trasmisión y replicación de los baculovirus ocurre en el estadio larval de los insectos hospedadores. El principal mecanismo de trasmisión es horizontal y ocurre por vía oral o *per os* cuando las larvas ingieren alimento contaminado con OBs, los cuales atraviesan el tracto digestivo hasta llegar al intestino medio, lugar en donde ocurre la infección ([Cory y Myers, 2003](#)). Además de este mecanismo, existe también la trasmisión vertical, de menor prevalencia, que consiste en la trasmisión a la progenie. Se piensa que este mecanismo tuvo fines de supervivencia siendo una estrategia de los virus para sobreponerse a largos periodos de ausencia de hospedadores susceptibles, en donde la trasmisión horizontal estaría impedida ([Cory y Myers, 2003](#)). En este caso, solo las partículas virales subletales tiene la capacidad de ser transmitidas de

manera vertical, permitiendo la sobrevivencia de la larva hospedadora. Este tipo de transmisión ocurre mediante transmisión transovárica o por contaminación en la superficie de los huevos por parte de parentales infectados, siendo el primer mecanismo mencionado el más frecuente (*Virto et al, 2013*).

La transmisión horizontal por ingesta ocurre en el intestino medio de las larvas que ingirieron los OBs. El tracto gastrointestinal de los insectos está compuesto de tres secciones: anterior, media y posterior. En lepidópteros, la sección anterior está involucrada en la captación, almacenamiento y procesamiento físico del alimento. Está separado de la sección media por una válvula. En el intestino medio es donde ocurre la digestión de los alimentos y está cubierta por una membrana peritrófica (PM). Esta membrana es una capa de quitina y glicoproteínas que recubre esta sección del intestino. Aunque es estructuralmente diferente a las secreciones mucosas del tracto digestivo de los vertebrados, su función es similar. Comprende una barrera física, protegiendo al epitelio del intestino medio de partículas de alimento abrasivas, enzimas digestivas y patógenos infectivos *per os*, como es el caso de los baculovirus. También es una barrera bioquímica, secuestrando y/o inactivando algunas toxinas ingeridas. Por último, la PM compartimentaliza el proceso digestivo, facilitando la eficiente adquisición de nutrientes. Su estructura consiste en una matriz de fibras de quitina unidas entre sí por proteínas específicas. Los glicanos completan el espacio intestinal, creando una especie de tamiz molecular, cuyas propiedades dependen del contenido iónico y del pH (*Hegedus et al, 2009*). En cuanto al epitelio del intestino medio, las células más abundantes son columnares, con bordes tipo cepillo, adyacente al lumen intestinal. En la base del epitelio hay células regenerativas, que reemplazan a células epiteliales dañadas y desprendidas. Además, están presentes células de Golbet, responsables de la regulación del pH.

Retomando la infección *per os*, los OBs que alcanzaron el lumen del intestino medio se encuentran en un ambiente con pH básico, entre 10-12 (*Dow, 1992*). Esta condición sumada a la acción de proteasas intestinales permite la hidrólisis del *calyx* del OB y de la proteína mayoritaria de los cuerpos de oclusión, liberando así los viriones derivados de los cuerpos de oclusión, ODVs, que son las partículas virales infectivas (*Terra y Ferreira, 1994*).

Teniendo en cuenta la fisiología del organismo infectado, la primera barrera para este tipo de patógenos es la membrana peritrófica. No se sabe con exactitud como los baculovirus superan este obstáculo, pero se han encontrado en algunas especies a las metaloproteasas VEFs (ver Morfología – Cuerpos de oclusión) asociadas al OB, que hidrolizan factores específicos de la PM, facilitando el tránsito hacia las células epiteliales. Por otro lado, los viriones podrían alcanzar las microvellosidades intestinales durante el proceso de muda del insecto, ya que allí la membrana peritrófica es liberada durante la ecdisis, y por ende, dejaría de ser una barrera para la infección (*Washburn et al, 1995*).

Una vez los ODVs se encuentran con las células columnares del epitelio intestinal, ocurre la fusión de las membranas mediada por interacciones específicas con receptores presentes en el sector apical de las células, resultando en la liberación de las nucleocápsides dentro del citoplasma celular (*Adams y McClintock, 1991; Horton y Burand, 1993; Haas-Stapleton et al, 2004*). Dicha interacción es específica y está mediada por factores presentes en la envoltura de los ODVs, productos de un grupo de genes denominados *pifs*, *per os infectivity factors*. Estos genes pueden ser eliminados del genoma viral, no afectando la infección viral en células *in vitro* ni tampoco la infección mediada por inyección de partículas virales en el hemocele del insecto. Sin embargo, sí se afecta la infección *per os*, impidiendo el proceso infectivo del virus. Los *pifs* presentan ortólogos dentro de toda la familia *Baculoviridae* (*Kikhno et al, 2002; Miele et al, 2011*). Más adelante se profundizará en esta familia de genes. Existen también otras proteínas presentes en la envoltura del ODV de ciertas especies de baculovirus que presentan dominios de unión a quitina, cuyo rol es similar al de las proteínas PIFs, pero facilitando la infección primaria por otros mecanismos. Las *microvilli* de las células epiteliales y las células traqueales presentan una enzima que cataliza la síntesis de quitina, principal componente de la PM, por lo que, los dominios de unión a quitina facilitarían la interacción de los ODVs con las membranas celulares, promoviendo el acercamiento necesario para el encuentro y posterior fusión de membranas (*Rohrmann, 2013; Zhu et al, 2013*) (Figura I.7).

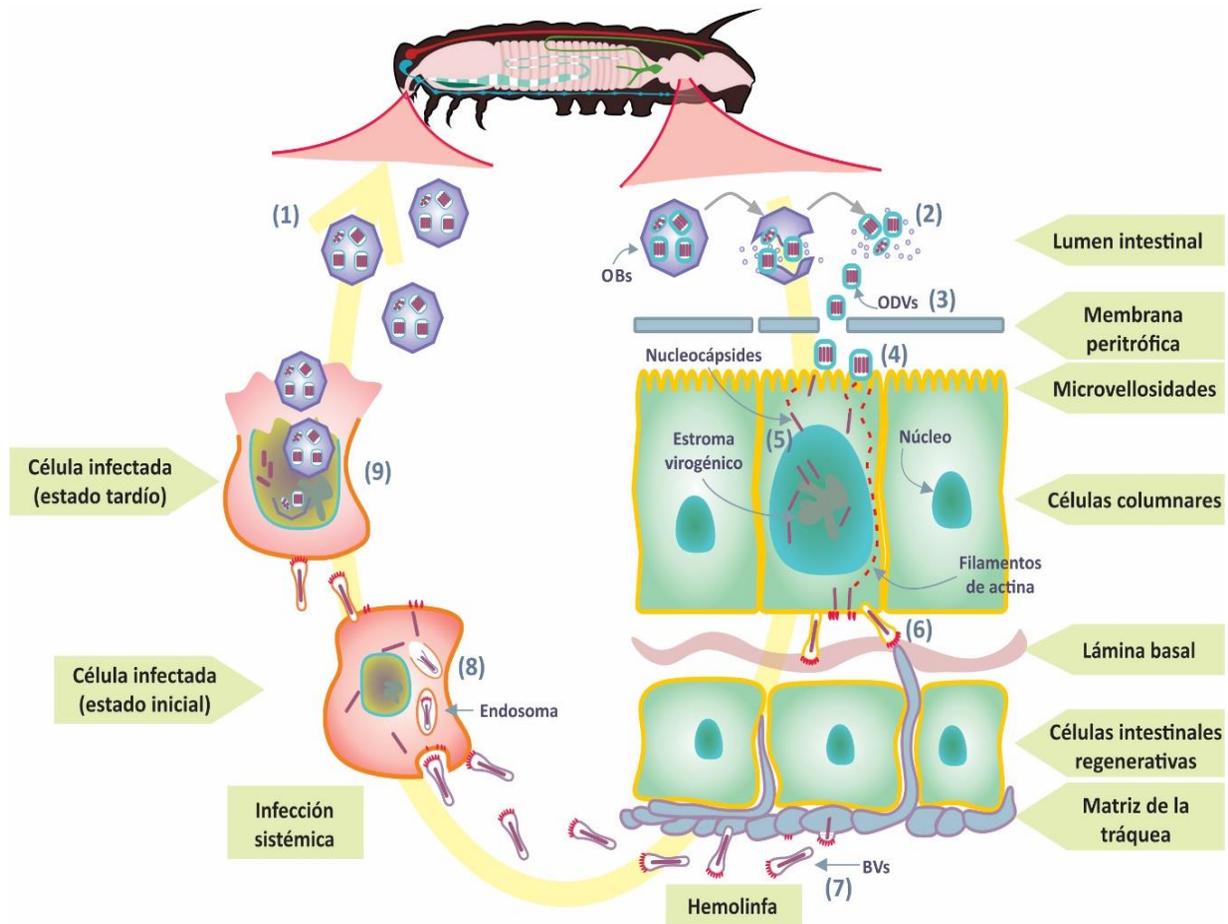


Figura I.7. Ciclo de infección en hospedador. En primer lugar, un lepidóptero ingiere OBs, que transitan el tracto digestivo hasta llegar al intestino medio (1). Las condiciones alcalinas presentes en este órgano generan la hidrólisis de las proteínas del OB, liberando al lumen los ODVs (2). Las partículas virales atraviesan la membrana peritrófica por la acción de VEFs (en algunos casos) o por acción de proteasas bacterianas empaquetadas en los Obs (3) para encontrarse con las microvellosidades de las células columnares del epitelio intestinal. Aquí ocurre la interacción específica mediada por proteínas PIFs presentes en la envoltura del ODV, hecho clave para el ingreso de las partículas infectivas al citoplasma (4). Una vez ingresadas, las nucleocápsides promueven la síntesis de filamentos de actina para ingresar al núcleo y dar comienzo a la síntesis de las proteínas tempranas o para llegar al sector basolateral de las células y brotar gracias a la expresión de las proteínas necesarias sintetizadas a partir de las nucleocápsides que alcanzaron el núcleo (5). A partir de allí comienza la infección secundaria, con la brotación de los primeros BVs. Con la ayuda de los vFGF, se degrada la membrana basal, permitiendo el encuentro de los BVs con las células traqueolares (6). La infección se propaga luego a la hemolinfa, cuerpo graso, dando lugar a la infección generalizada del organismo, gracias a la continua generación de BVs por parte de las células infectadas (8). Una vez avanzada la infección, y gracias a la expresión de las proteínas tardías y muy tardías, comienza la generación de nuevos ODVs y ensamblaje de nuevos OBs dentro del núcleo (9). Luego de la lisis de las células, quedan disponibles los OBs para dar comienzo a un nuevo ciclo infectivo.

Una vez dentro del citoplasma, las nucleocápsides promueven la síntesis de los filamentos de actina mediante la acción de la proteína VP78/83 presente en su extremo

apical. La misma es una proteína tipo *WASP* [*Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-like protein*], factor que promueve la nucleación de la actina (*Lanier y Volkman, 1998; Machesky et al, 2001; Goley et al, 2006; Ohkawa et al, 2010; Au et al, 2013*). Si bien no está del todo esclarecido, existe evidencia experimental que sugiere que la translocación al núcleo se da a través de los poros nucleares (*Ohkawa et al, 2010*). Luego se da comienzo a la expresión de los genes virales inmediatamente tempranos por acción de la RNA polimerasa II del hospedador, llevando a una cascada de señales que conllevan a la generación de la primera progenie viral de fenotipo brotante (BVs). A partir de allí, este fenotipo temprano será el responsable de la infección sistémica en el hospedador (**Figura I.7**).

| INFECCIÓN SECUNDARIA – SISTÉMICA

Con la translocación del DNA viral al núcleo se genera la primera progenie viral del fenotipo brotante. Los BVs tienen la capacidad de infectar varios tejidos del insecto, como ser traqueoblastos, hemocitos y cuerpo graso. El ingreso a las células es mediante receptor, endocitosis y fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal mediada por pH ácido (*Volkman y Goldsmith, 1985; Blissard y Wenz, 1992; Leikina et al, 1992*). Como se ha mencionado previamente, la envoltura de los virus brotantes es derivada de la membrana plasmática de las células. Durante el proceso de síntesis de proteínas virales, las proteínas ENV, aquellas que formarán parte de la envoltura de los BVs, son direccionadas a la membrana plasmática en forma de parches. Para el caso del Grupo I de NPVs, estas proteínas incluyen GP64 y Proteína F, mientras que los miembros del Grupo II sólo cuentan con la proteína F (*Blissard y Rohrmann, 1989; Pearson et al, 2000; Pearson et al, 2001*). Los BVs que brotan de las células conteniendo las proteínas ENV, son capaces de infectar células vecinas, mediada por la actividad fusogénica de dichas proteínas.

A pesar de que *gp64* es encontrado sólo en los miembros de alphabaculovirus del Grupo I, la secuenciación completa del betabaculovirus *Diatraea saccharalis* GV (DisaGV) permitió encontrar un gen ortólogo a *gp64* en su secuencia codificante. Es el primer caso reportado hasta el momento de un granulovirus conteniendo este gen. Estudios realizados

de complementación de mutantes en AcMNPV *knockout* para el gen *gp64*, demostraron la actividad de la proteína codificada por el gen de DisaGV, ya que produjo la correcta amplificación viral en células susceptibles. Se postula que dicha secuencia fue adquirida por algún ancestro a partir de un alphabaculovirus del grupo I y podría complementar la actividad de la proteína F, favoreciendo y acelerando la dispersión del virus dentro de su hospedador (Ardisson-Araújo *et al*, 2015).

Una vez producida la progenie de BVs, brotan de las células epiteliales para atravesar la lámina basal y continuar con la infección sistémica. La lámina basal es una matriz fibrosa compuesta por glicoproteínas que rodea el epitelio del intestino medio, siendo una barrera para infecciones sistémicas (Figura 1.7). Se sabe que traqueoblastos o células del epitelio de la tráquea tienen proyecciones dentro de la lámina basal, estando susceptibles a la infección por la progenie viral BV. De hecho, el sistema traqueal es el que primero se infecta, y a partir del cual, se continúa con la infección sistémica (Engelhard *et al*, 1991; Volkman 2007). Además del sistema traqueal, los hemocitos y epitelio muscular también son infectados, por lo que existe algún mecanismo a través del cual los BVs atraviesan la lámina basal (Flipsen *et al*, 1995). Evidencia experimental sugiere que dicha barrera se vería afectada por actividad de una proteína codificada por los baculovirus que infectan lepidópteros (NPVs y GVs), homóloga al factor de crecimiento de fibroblastos (fgf), denominada vFGF. Se supone que este factor ayuda a la infección permeabilizando la membrana basal por dos mecanismos; por un lado, vFGF proveniente de células epiteliales infectadas, se libera a la lámina basal atrayendo células traqueolares para que estén cercanas y así facilitar la infección. Por otro lado, este factor activa receptores específicos presentes en las células traqueolares, iniciando una cascada de señales que desembocan en la producción y liberación de metaloproteasas, y luego activando efectores caspasas que degradan los componentes de la lámina basal, facilitando el tránsito de las partículas BVs para infectar los tejidos mencionados (Detvisitsakun *et al*, 2007; Means y Passarelli, 2010). Una vez infectado el sistema traqueolar, nueva progenie viral infectará tejidos del hemocele, y así, a los hemocitos, células que alcanzan el sistema circulatorio y que son responsables de la inmunidad del insecto, por lo cual, la defensa del hospedador se ve afectada (Figura 1.7).

Diseminada la infección, se produce una abundante generación de progenie viral en el cuerpo graso (*Dean et al, 1985*). Esta estructura que actúa como el hígado del insecto, es un órgano amorfo localizado a lo largo de todo el animal y es el responsable del metabolismo y almacenamiento de azúcares y lípidos, como así también de la producción de vitelogenina (proteína mayoritaria del huevo). Como es sabido, los virus son entidades biológicas que se diferencian de los organismos por su incapacidad de almacenar y producir energía, aunque la requieran para asegurar su supervivencia. Es por ello que no es extraño que las células más ricas en energía se transformen en el principal productor de progenie viral en el insecto infectado.

Dado que los distintos baculovirus presentan diferentes tropismos celulares, el patrón de la infección es dependiente del patógeno y del hospedador en cuestión. Los más promiscuos son los NPVs que infectan lepidópteros, puesto que la infección comienza en el intestino medio y luego se disemina a la matriz traqueal y los hemocitos, al tejido adiposo, a la epidermis, al tejido muscular, glandular, reproductivo y nervioso. Los NPVs que infectan himenópteros y dípteros concentran su tropismo en el intestino medio, pudiéndose extender en algunos casos a los hemocitos. En tanto, los GVs presentan alta variabilidad en los tejidos que infectan, aunque generalmente no suelen extenderse hasta el tejido muscular y el nervioso (*Sciocco de Cap et al, 2001*).

A medida que avanza la infección sistémica, dentro de una determinada célula siguen expresándose genes específicos virales. Pasadas las 20 horas, comienza la expresión de los genes tardíos y muy tardíos, entre los que se encuentran los genes *poliedrina* y *p10*. Además, comienza el ensamblaje de los ODVs en el núcleo, envolviendo nucleocápsides con una membrana nuclear modificada (Ver Morfología – Cuerpos de Oclusión). La proteína Poliedrina se acumula en el núcleo, asociándose con los ODVs en formación para dar lugar a los OBs. Luego, la proteína P10 forma estructuras tipo tubos que atraviesan el núcleo y el citoplasma, además de estar involucrada en la correcta formación de la envoltura del poliedro (*Patmanidi et al, 2001; Carpentier et al, 2008*). Los OBs se acumulan en el núcleo, y luego, por ruptura de las membranas, se liberan (**Figura I.7**). Finalmente, debido al avance de la infección el insecto muere. En el caso particular de las infecciones poliorganotróficas,

donde también se afecta la epidermis como sucede en los NPVs, se produce la lisis del tegumento y la liberación de los OBs al ambiente. Estos procesos de licuefacción tisular y ruptura de la cutícula son facilitados por la interacción sinérgica entre la proteasa viral catépsina o V-CATH y la quitinasa viral o ChiA (*Ohkawa et al, 1994;*; *Slack et al, 1995;* *Hawtin et al, 1997;* *Fukamizo et al, 2011*). De este modo, se produce la contaminación de la superficie de las hojas y así se asegura la posibilidad de nuevas infecciones sobre larvas que se alimentan de las mismas (Figura 1.7).

EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL CICLO VIRAL

Los genes de los baculovirus se transcriben de manera temporal y este proceso está muy regulado por mecanismos derivados de la infección y por proteínas del hospedador y virales. Este modo de expresión génica gradual asegura la disponibilidad de los productos génicos requeridos para el progreso correcto de la infección a la siguiente etapa. Los baculovirus expresan sus genes en tres fases sucesivas: temprana, tardía y muy tardía. Los genes tempranos son transcritos por la RNA polimerasa II del hospedador antes del inicio de la replicación del DNA viral, proceso que, por obvias razones, ocurre en el núcleo celular. Muchos productos de los genes tempranos son necesarios para la expresión de genes tardíos, lo que asegura la cascada transcripcional requerida para el desarrollo de la infección. El progreso a la transcripción de los genes tardíos se correlaciona con la interrupción de la expresión de los genes tempranos y celulares. Sin embargo, algunos genes virales contienen promotores con secuencias características de los genes tempranos y tardíos, asegurando la expresión de los mismos en todo el ciclo infectivo (*Passarelli y Guarino, 2007*).

Los promotores de los genes tempranos en su mayoría contienen el elemento TATA box y, en algunos casos, un iniciador de la transcripción (INR) específico. Esto permite la transcripción por parte de la RNA pol II (*Friesen, 1997*). Dentro de este grupo de genes, existe una subdivisión en: genes inmediatamente tempranos (*immediate early, ie*) y genes

tempranos retardados (*delayed early, de*). Los genes *ie* no requieren factores virales para su expresión, mientras que los genes *de* requieren de la transactivación de un producto IE. El más conocido es el gen *ie-1* (*immediate early 1*), codificado por baculovirus que infectan lepidópteros y que da lugar a una proteína que funciona de factor de transcripción para varios genes tempranos retrasados, los que codifican para proteínas indispensables para la replicación viral y para la transcripción de los genes tardíos (*Bilen et al, 2007*).

Durante esta etapa temprana el núcleo celular infectado se expande e hipertrofia, generándose una región interna granular y electrodensa que se denomina estroma virogénico (**Figura 1.7**) y que es el sitio donde sucede la transcripción, replicación y encapsidación viral (*Harrap, 1972; Young et al, 1993*).

Luego de la replicación, ocurre la expresión de los genes tardíos. Se ha demostrado la existencia de una RNA polimerasa viral, responsable de dicha transcripción. Los genes tardíos comienzan a aparecer entre las 6-24 horas post infección (*hpi*) y los muy tardíos entre las 18-72 *hpi*, tiempo que se correlaciona con la síntesis de los BVs y ODVs respectivamente (*Berreta et al, 2013*). Algo destacable es que es necesario el evento de replicación para la expresión de los genes tardíos. Cuando se inhibe la síntesis de DNA (por ejemplo con afidicolina), también se inhibe la transcripción de estos genes (*Rice y Miller, 1986*). Por lo tanto, los genes involucrados en la replicación también serían necesarios para la transcripción de los genes tardíos, por lo que se conocen como factores de expresión tardía, *late expression factors* (*lefs*). También hay otro factor necesario llamado *vlf-1* (*very late factor - 1*).

Se ha visto que los genes tardíos tienen un promotor con motivo conservado TAAG y son transcritos por la RNA polimerasa viral, compuesta por los *core genes* *lef4*, *lef8*, *lef9* y *p47* (*Passarelli y Guarino, 2007*). Los transcritos más abundantes corresponden a los genes muy tardíos *poliedrina* y *p10*. Esto se debe a la presencia de una secuencia rica en AT presente entre el promotor TAAG y el codón de inicio, a la que se une la proteína VLF-1, potenciando la transcripción (*Yang y Miller, 1999*). Los genes tardíos y muy tardíos codifican proteínas estructurales de los ODVs y OBs, entre las que se encuentran las proteínas PIFs,

todas con la presencia del promotor tardío TAAG y con evidencia de la presencia del transcrito en momentos tardío del ciclo infectivo (*Chen et al, 2013*).

Rango de hospedador

El rango de hospedador está determinado por la capacidad de un virus de ingresar a las células de un determinado organismo, replicar su genoma, ensamblar nuevas partículas virales y liberar progenie infectiva (*Thiem y Cheng, 2009*).

Existen factores tanto del virus como del hospedador que median la susceptibilidad a la infección. De entre ellos podemos destacar la presencia de proteínas específicas en la envoltura de los baculovirus, como así también, los receptores específicos en los hospedadores. Además es necesaria la presencia de proteínas con función antiapoptótica y factores de los hospedadores.

Como se ha mencionado anteriormente, los baculovirus reciben su nombre de acuerdo al organismo desde el cual se aislaron. Esto se debe a que en los inicios se consideraba que el rango de hospedador se limitaba exclusivamente a dicha especie. Sin embargo, esto no es así, resultando ser algunas especies virales más estrictas y otras más promiscuas. A pesar de la existencia de algunos baculovirus con un rango de hospedador más amplio, en líneas generales esta familia viral se caracteriza por ser estricta en este aspecto. Los virus están restringidos a un orden de hospedadores susceptibles, y la mayoría de los virus, a una única familia y muchos, a una única especie o especies relacionadas.

Ya se ha mencionado el mecanismo de ingreso de las partículas virales una vez ocurrida la ingesta de los OBs. Luego de la hidrólisis de la proteína mayoritaria que recubre los ODVs, poliedrina o granulina, y del traspaso de las partículas virales por la membrana peritrófica, se produce la fusión entre la membrana de la envoltura de los ODVs y de las células apicales del intestino medio, tal y como se explicó anteriormente. Dicha interacción ocurre sí y solo sí están presentes las proteínas específicas virales que lo permiten. Dichos polipéptidos se conocen como PIFs, por sus siglas en inglés *Per os Infectivity Factors* y están

codificadas por genes pertenecientes a la familia de los *core genes*. La ausencia de al menos una de estas proteínas en la envoltura de los ODVs deriva en la pérdida de susceptibilidad a la infección por ingesta. Si bien todos los genes que codifican para estas proteínas son parte del grupo de genes compartidos en toda la familia, presentan diferencias de secuencias, lo que se traduce en cambios aminoacídicos responsables de la especificidad por los diferentes hospedadores. Más adelante se retomará este grupo de proteínas.

Se sabe que existen receptores específicos en la membrana de las células intestinales que son los responsables de generar la interacción específica con las proteínas PIFs. No se conoce con exactitud cuáles son, pero se han realizado varios estudios en NPVs, y se concluyó que los ODVs se unen a receptores específicos y que diferentes virus se unen a diferentes receptores (*Horton y Burand, 1993; Haas-Stapleton, 2004, ; Haas-Stapleton, 2005; Ohkawa et al, 2005*). Los ensayos se realizaron con vesículas generadas a partir de microvellosidades epiteliales del intestino de las larvas, conocidas como BBMV (*brush border membrane vesicles*), logrando demostrar la presencia de receptores específicos responsables de dicha interacción (*Horton y Burand, 1993*).

El otro fenotipo viral, BV, responsable de la infección sistémica, también ingresa a las células mediante actividad fusogénica de las proteínas ENV. Los viriones BV pueden ingresar hasta en células de mamíferos, indicando que el mecanismo no estaría involucrado en la definición del rango de hospedador (*Boyce y Bucher, 1996; Condreay y Kost, 2007*). Aunque existen trabajos que demostrarían que la interacción de los BVs con las células sería una limitante (*Rahman y Gopinathan, 2003; Katou et al, 2006*), la mayoría de la evidencia experimental avala que el correcto desarrollo de la infección viral a nivel de cultivo celular estaría determinado por la replicación del genoma y no por el ingreso de las partículas virales. Así, estudiando las interacciones de diferentes baculovirus en líneas celulares, se lograron encontrar seis genes que afectarían el rango de hospedador a nivel celular. Los mecanismos que se verían afectados tienen que ver con el transporte al sitio de replicación, la expresión de genes virales y la generación de progenie viral (*Thiem y Cheng, 2009*). Dentro de estos genes, el más estudiado y con una función bien descrita es *p35*. Cuando esta secuencia es delecionada del genoma de AcMNPV, se reduce mucho la

capacidad de infección en la línea celular Sf21 y de infección en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Clem et al, 1991; Hershberger et al, 1992; Clem y Miller, 1993; Clem et al, 1994). En células Sf21, línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*, se recupera la capacidad infectiva cuando al virus sin p35 se le insertan secuencias codificantes de genes supresores de apoptosis, conocidos como genes inhibidores de apoptosis (*iap*) provenientes de otra especie de baculovirus (Crook et al, 1993). Esto sugiere que la proteína P35 tiene su aporte en el rango de hospedador inhibiendo apoptosis de las células infectadas. En cuanto a la infección en larvas, también se reduce cuando el mismo polipéptido está ausente. Esto se debe por la eliminación mediante apoptosis de las células infectadas del intestino medio antes de poder transmitir la infección a las células siguientes y poder lograr la infección sistémica (Washburn et al, 2003). La proteína P35, o la proteína relacionada P49, están presentes en pocas especies de baculovirus. Pero los genes *iap*, otros factores antiapoptóticos no relacionados, están presentes en la mayoría de los baculovirus como así también en células de mamíferos, en una o más copias (Clem y Duckett, 1997).

En resumen, el rango de hospedador está dado por factores presentes en ambos fenotipos virales, siendo los más restrictivos aquellos relacionados con las proteínas PIFs presentes en la envoltura de los ODVs y sus receptores específicos en las células del epitelio intestinal. Además, existirían otras proteínas virales que facilitan o potencian la infección una vez que se logra la infección primaria, y que en algunos casos, su ausencia restringiría la infección del virus en un hospedador susceptible.

| PROTEÍNAS PIFS

Las proteínas PIFs (*Per os Infectivity Factors*) son aquellas que son parte de la estructura del fenotipo tardío u ODV, y cuya ausencia transforma al patógeno en no infectivo por ingesta. Sin embargo, estas proteínas no intervienen en la infección sistémica producida por el fenotipo temprano o formas brotantes, dejando intacta la infección célula-célula. Por ende, la inyección de viriones en el hemocele produce infección. Todos estos polipéptidos son parte estructural de la membrana del ODV, las cuales pueden ser

separadas de las proteínas de la nucleocápside por solubilización con detergentes tales como el Nonidet P-40 (NP-40) (Pan et al, 2005). Otra característica de este grupo de proteínas es la presencia de ortólogos en todos los miembros de la familia *Baculoviridae*. Además, varios de los siete *pifs* descritos hasta el momento presentan, también, homólogos en otras familias virales relacionadas (Tabla I. 6) (Wang et al, 2011; Jehle et al, 2013; Bezier et al, 2014). Esta información denota la importancia biológica de este grupo de genes, y por eso la amplia distribución en las familias virales relacionadas. Los miembros representados en la tabla de la familia *Nudiviridae* presentan homólogos de los 7 *pifs* y de la proteína VP91/95, mientras que las otras familias presentan sólo algunos. Esto coincide con la relación filogenética indicada previamente (Figura I.6), siendo los nudivirus los más cercanamente relacionados. Además, este alto nivel de conservación en tan diversos genomas de invertebrados sugiere que el proceso mediado por estas proteínas y sus interacciones fueron conservadas durante la evolución.

Cabe mencionar que en la tabla I.6 se ha incorporado a la proteína VP91/95 porque podría considerarse un nuevo miembro de la familia de genes *pifs*. Más adelante se detallará al respecto.

	Baculovirus	Hytrosavirus		Nudivirus			Nimavirus	Bracovirus*	
	AcMNPV	GpSGHV	MdSGHV	OrNV	GbNV	HzNV-1	WSSV	CcBV	CIBV
pif-0/p74	138	1	39	126	45	11	115	Ccp74	Cip74
pif-1	119	102	29	60	52	55	209	-	Cipif-1C
pif-2	22	53	89	17	66	123	35	-	Cipif-2
pif-3	115	76	106	107	3	88	306	Ccpif-3	-
pif-4	96	-	-	33	87	103	-	Ccpif-4	Cipif-4
pif-5	148	-	-	115	5	76	-	Ccpif-5	Cipif-5
pif-6	68	-	-	72	55	74	-	-	-
VP91/95	83	-	-	106	2	46	-	-	Civp91

Tabla I.6. Homólogos de los genes *per os infectivity factors* en otros virus de invertebrados relacionados. EN la tabla se indica el número de ORF correspondiente a cada organismo. Se incorporó la información correspondiente a la proteína VP91/95 ya que podría ser considerada como un nuevo PIF.
(*) Genes presentes en el genoma del hospedador del bracovirus.

La primera proteína viral considerada como esencial para la infección oral de baculovirus fue P74, la cual forma parte del ODV y se encuentra presente en todos los baculovirus de secuencia conocida. Esta particularidad fue determinada mediante el análisis de virus carentes del gen *p74*, los cuales mostraron un fenotipo no infectivo de los OBs por vía oral (Kuzio *et al*, 1989; Faulkner *et al*, 1997). Actualmente también se la reconoce como PIF-0.

Esta proteína es la única con homólogos en todos los virus de invertebrados relacionados citados previamente (Tabla I.6), lo cual sugiere la existencia de la misma antes de la diversificación de estos virus de invertebrados.

La primera evidencia experimental que asocia a P74 con la infectividad *per os* fue en el año 1989, en donde se analizaron virus AcMNPV carentes del gen productor de esta proteína con respecto a la infectividad de los OBs, realizando ensayos de infectividad en larvas de *Trichoplusia ni*. Los resultados demostraron que con las dosis tratadas se perdía la capacidad infectiva por ingesta, no viéndose afectada la producción de partículas virales en cultivo de células de *T. ni* (Kuzio *et al*, 1989). Luego, se realizaron ensayos inyectando ODVs generados a partir de virus *p74knockout* directamente en el hemocele de larvas, obteniendo una infección equivalente a la producida por los virus *wild type* (Faulkner *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2005), demostrando otra característica asociada a los genes *pifs*: no tienen efecto en la infección sistémica.

A partir de allí, se realizaron ensayos en otras especies baculovirales, evaluando la función de P74 con la infección primaria, utilizando virus *knockout* para este gen, demostrando dicha actividad (Hill *et al*, 1993; Rashidan *et al*, 2003; Yao *et al*, 2004).

En cuanto a su localización, se ha demostrado que forma parte de la estructura de los ODVs pero no de los BVs (Faulkner *et al*, 1997; Slack *et al*, 2001; Perera *et al*, 2007; Song *et al*, 2008; Xu *et al*, 2011; Wang *et al*, 2011; Hou *et al*, 2013; Torres Braconi *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2015). Además, ensayos de generación de quimeras con GFP (*Green Fluorescent*

Protein), evidenciaron que la proteína se ancla a la envoltura de los ODVs por su porción carboxilo terminal, quedando expuesta al exterior la porción amino terminal (*Slack et al, 2001*). Por otro lado, se mostró que P74 se une con tejidos del intestino medio, mediante ensayos con vesículas derivadas de las microvellosidades (BBMV) (*Yao et al, 2004, Haas-Stapleton et al, 2004*). Sumado a esta evidencia, ensayos con virus *knockout* para *p74* y marcación por GFP demostraron, mediante microscopía confocal en el tiempo y técnicas de captura de imágenes *in vivo*, que P74 es responsable de la unión de los ODVs a las microvellosidades (*Mu et al, 2014*). Por otro lado, a través de ensayos de *pull-down* con P74 se logró aislar una proteína de 30-35 kDa derivada de las BBMV del hospedador *S. exigua*, probable receptor en las células epiteliales, pero no está presente en las microvellosidades de otros hospedadores (*Zhou et al, 2005*). Además, por su pequeño tamaño, se puede suponer que no es una integrina, factores presentes en los hospedadores que funcionan de receptores para el ingreso de otros virus, como es el caso de los rotavirus y su ingreso en células del intestino humano (*Lopez y Arias, 2004*).

Por otro lado, se demostró que es necesario el clivaje específico de una porción amino terminal de la proteína P74 para que ocurra la infección primaria. Se encontró un sitio de reconocimiento para tripsina conservado en todos los homólogos de *p74* de la familia *Baculoviridae*, indicando el lugar en donde ocurre la proteólisis (*Slack y Lawrence, 2005; Slack et al, 2008*). La activación de proteínas por clivaje fue documentada también en otros entomopatógenos, como ser en *Bacillus thuringiensis* (*Rukmini et al, 2000*). El intestino de lepidópteros es rico en tripsinas (*Johnston et al, 1991; Terra y Ferreira, 1994; Oliveira et al, 2005; Pereira et al, 2005*) y es probable que los virus hayan evolucionado para aprovechar este ambiente. Además, se encontraron serin-proteasas asociadas a los OBs, y, como los OBs producidos por líneas celulares no las contienen, se supone que los virus se asocian con proteasas específicas del hospedador y las toman como parte de la estructura del OB (*Eppsteiny Thoma, 1975; Eppstein et al, 1975; McCarthy y DiCapua, 1979*). Ya sea la proteasa endógena o aquella presente en el lumen del intestino estaría involucrada en la activación de P74. Recientemente, se ha reportado un segundo clivaje en P74, que genera dos dominios que permanecen asociados a la envoltura viral, el carboxilo terminal (Ct) y el

amino terminal (Nt). De hecho, este clivaje ocurre antes que se terminen de liberar los ODVs del OB, por lo que se sugiere que estarían involucradas proteasas endógenas presentes en la estructura del virus. Además, se comprobó que en los OBs derivados de líneas celulares, este clivaje no ocurre (*Peng et al, 2011*). En el trabajo postulan que este clivaje es seguido de una segunda proteólisis (la descrita previamente), indispensable para la activación de P74 y sería mediada por proteasas del hospedador. Esta nueva proteólisis sería en un sitio específico y deja anclada la porción Ct a la membrana, pero la porción Nt quedaría asociada con enlaces no covalentes con la envoltura del ODV (*Peng et al, 2011*). Esto sería coincidente con los experimentos realizados por *Slack et al, 2010*, en los que un fragmento soluble Nt de P74 recupera el fenotipo infeccioso *per os* de virus carentes de dicho gen, cuando se producen OBs a partir de la infección en líneas celulares adecuadas con los virus *knockout* para *p74*, y transfectando plásmidos que contienen la secuencia codificante para las variantes truncadas de P74.

Aún restan muchos ensayos por hacer, sobre todo los que involucran la descripción y caracterización de los factores del hospedador involucrados en el reconocimiento necesario para la fusión de las membranas. P74 sería uno de los componentes más complejos involucrados en dicho reconocimiento, debido a las modificaciones postraduccionales que requiere en el lumen del intestino.

PIF-1

A partir de la caracterización de P74 y habiendo asociado su rol con la infección primaria, se comenzaron a estudiar otras proteínas en relación a esta actividad. Así, se realizaron *knockouts* específicos o la evaluación de mutantes naturales generados en cultivo *in vitro* y se estudió la infectividad por vía oral de aquellos viables, o sea, que no se veía afectada la generación de BVs ni OBs en líneas celulares.

De esta manera se caracterizó en SpliMNPV un segundo gen cuyo producto proteico también resultaba esencial en las mismas circunstancias (*Kikhno et al, 2002*). El mismo es el

ORF 7 del fragmento NotI D, el cual presenta homólogos en todos los baculovirus de secuencia conocida, como el ORF 119 en AcMNPV (Ayres *et al*, 1994). Dadas estas cualidades, el gen fue denominado *pif*, siendo esta denominación el inicio de la nomenclatura para agrupar a los genes cuyos productos proteicos presentaban similares cualidades respecto a la infección vía oral. Actualmente, a la proteína codificada por este gen se la denomina PIF-1.

En los experimentos realizados para caracterizarla, se utilizó un virus mutante SpliMNPV carente del gen en cuestión y, al igual que con *p74*, la inyección en el hemocele de virus producidos en cultivo celular (BVs y ODVs) fueron infectivos; en tanto, los OBs derivados no ocasionaron infección por ingesta (Kikhno *et al*, 2002). Nuevamente ensayos de complementación de los mutantes, co-transfectando plásmidos conteniendo la secuencia codificante para *pif-1* con el genoma del virus mutante, produjo OBs capaces de causar infección *per os*, demostrando que la pérdida de la actividad estaba ocasionada por la ausencia de la proteína PIF-1 (Kikhno *et al*, 2002).

En AcMNPV, *pif-1* corresponde al ORF 119, dando lugar a una proteína de 60 kDa. Estudios bioinformáticos determinaron un dominio transmembrana en la porción amino terminal (Krogh *et al*, 2001), similar a los dominios transmembrana de membrana nuclear interna (*INM motifs*) existentes en las proteínas ODV-E66 y ODV-E25 que se encuentran en la envoltura de los ODVs (Braunagel *et al*, 2004). Luego, se logró localizarla en la envoltura de los ODVs de varias especies virales (Kikhno *et al*, 2002; Perera *et al*, 2007; Song *et al*, 2008; Xu *et al*, 2011; Hou *et al*, 2013; Torres Braconi *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2015). Además se determinó que su ausencia disminuye en un 70% la unión y fusión de los ODVs con las membranas de las microvellosidades (Ohkawa *et al*, 2005). Por otro lado, y como se detallará más adelante, es imprescindible para la formación del complejo PIF (Peng *et al*, 2010). Estudios recientes mostraron que PIF-1 no sería responsable de la unión a la membrana, pero sí es necesaria para que ingresen las nucleocápsides, por lo que se postula que su actividad está relacionada con otro evento necesario para la entrada, pero no la unión (Mu *et al*, 2014). Con esta información experimental, también se puede sugerir que al ser un componente esencial del complejo PIF, que no esté la proteína impide la entrada

de las nucleocápsides, por el simple hecho de no establecerse la estructura adecuada en el contexto de infección primaria, por lo que podría ser, entonces, un componente indispensable estructural o estar involucrado con un mecanismo posterior a la unión con un receptor, función mediada por P74.

PIF-2

Al igual que para el caso anterior, una evaluación de virus mutantes generados por propagación *in vitro*, permitió encontrar un nuevo factor indispensable para la infección *per os* en SeMPNV, al que se llamó PIF-2 (Pijlman *et al*, 2003; Fang *et al*, 2006). Este gen presenta homología con el ORF 22 de AcMPNV y forma parte de los *core genes*, característica de todos los genes *pifs*.

Esta proteína de 44 kDa (en AcMNPV) también presenta un motivo transmembrana en la región amino terminal, conservado en todos los homólogos, al igual que PIF-1 (Krogh *et al*, 2001). Además, se logró identificarla como proteína presente en la envoltura de los ODVs (Fang *et al*, 2006; Perera *et al*, 2007; Song *et al*, 2008; Wang *et al*, 2011; Xu *et al*, 2011; Hou *et al*, 2013; Torres Braconi *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2015).

Como para el caso de PIF-1, se vio que la ausencia de PIF-2 disminuye aproximadamente un 70% la unión y fusión de los ODVs derivados de los mutantes a las microvellosidades (Ohkawa *et al*, 2005). También resulta imprescindible para la generación del complejo PIF (Peng *et al*, 2010; Peng *et al*, 2012) y al igual que para el caso de PIF-1, no estaría involucrado en la unión a las microvellosidades, pero sí es imprescindible para el ingreso de las nucleocápsides (Mu *et al*, 2014).

PIF-3

Siguiendo el mismo tipo de análisis, logró caracterizarse un nuevo miembro en el año 2005, el ORF 115 de AcMNPV como PIF-3 (*Ohkawa et al, 2005*). Esta proteína de 23 kDa también pudo ser asociada con la envoltura de los ODVs (*Perera et al, 2007; Song et al, 2008; Xu et al, 2011; Hou et al, 2013; Torres Braconi et al, 2014; Zhang et al, 2015*) y posee un claro dominio transmembrana en la fracción amino terminal, que funciona de señal de dirección nuclear, como para PIF-1 y PIF-2 (*Song et al, 2007*). Y al igual que las demás proteínas PIFs, virus mutantes carentes del gen codificante producen progenie viral sin cambios morfológicos e infectiva cuando es inyectada en el hemocele (*Ohkawa et al, 2005*). A diferencia de PIF-0, PIF-1 y PIF-2, PIF-3 no está involucrada con la unión y fusión de los ODVs con las membranas de las microvellosidades (*Ohkawa et al, 2005*); sin embargo, junto con PIF-1 y PIF-2, conforman los componentes esenciales para la formación del complejo PIF (*Peng et al, 2010*).

PIF-4/19 k

Con la aparición en el año 1993 de un virus AcMNPV *knockout* para el gen de poliedrina y *knockin* para un origen de replicación en *Escherichia coli* de bajo número de copias (MiniF) y de un casete específico diseñado para la rápida incorporación de secuencias heterólogas al genoma basado en transposición, se facilitó el estudio de sobreexpresiones de diferentes proteínas, ya sea del virus o heterólogas (*Luckow et al, 1993*). Esto permitió, también, poseer al genoma del llamado bácido de AcMNPV (bMON14272) replicándose en *E. coli*, facilitando las metodologías de modificación del mismo. Así, utilizando la actividad de recombinación de la proteína λ Red del fago Lambda y diseñando *primers* adecuados, se logró generar un bácido AcMNPV *knockout* para el ORF Ac96 (*Datsenko y Wanner, 2000; Fang et al, 2009*). Luego de recuperar la actividad poliedrina, incorporándola por transposición al virus modificado, se obtuvieron OBs en líneas celulares carentes de modificaciones morfológicas, pero sin la capacidad infectiva *per os*, al igual que ocurría con los otros PIFs (*Fang et al, 2009*). Tampoco se vio afectada la producción de BVs y, cuando

las partículas virales se inyectaron el hemocele, sí resultó la infección. Sumado a que Ac96 presenta homólogos en todos los miembros de la familia *Baculoviridae*, se lo clasificó como miembro del grupo de genes *pifs*, nombrándolo *pif-4* (Fang et al, 2009). La proteína en AcMNPV tiene un tamaño de aproximadamente 20 kDa y posee un claro dominio conservado transmembrana en la región amino terminal (Fang et al, 2009). Además, logró asociarse con la envoltura del ODV (Xu et al, 2006; Perera et al, 2007; Hou et al, 2013; Zhang et al, 2015). Junto a PIF-1, PIF-2 Y PIF-3, conforma el complejo PIF, pero no sería indispensable para su generación (Peng et al, 2010; Pengo et al, 2012).

PIF-5/ODV-E56

Esta proteína fue inicialmente estudiada por poseer un dominio conservado transmembrana similar a las proteínas ODV-E66 y ODV-E25, involucrado en la direccionalidad de las proteínas al núcleo, ya que las mismas forman parte de la envoltura del ODV, el cual se genera dentro del núcleo (Hong et al, 1997). Así se determinó que la proteína ODV-E56 formaba parte de la envoltura del ODV y que su dominio conservado transmembrana en la región carboxilo terminal estaba involucrado en dicha localización (Braunagel et al, 1996). Posteriormente, nuevos estudios de proteómica aseveraron la localización en la envoltura del ODV y también su presencia en partículas BVs (Braunagel et al, 2003; Deng et al, 2007; Perera et al, 2007; Wang et al, 2011; Xu et al, 2011; Hou et al, 2013; Torres Braconi et al, 2014; Zhang et al, 2015). En AcMNPV, esta proteína posee un tamaño de 56kDa (Braunagel et al, 1996).

Con la realización de un análisis de selección positiva basado en bioinformática, se determinaron varios genes que podrían estar vinculados con la interacción con el hospedador (Harrison y Bonning, 2004; Harrison et al, 2010). Entre ellos se identificó *aodv-e56*, por lo que se realizaron virus AcMNPV mutantes *knockout* para este gen interrumpiendo la secuencia codificante con el gen β -galactosidasa (Sparks et al, 2011[A]). Al igual que con los otros PIFs, la ausencia del mismo no afectó la morfología de los OBs, la

generación de los BVs ni la de los ODVs. En tanto, la inyección de partículas virales en el hemocele logró una infección comparable con el virus *wild type*, demostrando la no afectación de la infección sistémica ([Sparks et al, 2011\[A\]](#)). Además, se comprobó que PIF-5 no está involucrada en la unión y fusión con las microvellosidades del epitelio intestinal, ya que mutantes carentes en PIF-5 lograron adhesión equivalente que partículas ODVs *wild type* ([Sparks et al, 2011\[A\]](#)). También fue identificado como gen *pif* en el virus BmNPV ([Xiang et al, 2011](#)). Por otro lado, se determinó que tampoco formaría parte del complejo PIF, con lo cual se postula que estaría trabajando sinérgicamente con el resto de las proteínas PIFs para lograr la infección primaria ([Peng et al, 2010](#); [Peng et al, 2012](#)).

PIF-6/Pr96

El último gen *pif* identificado hasta el momento corresponde al *pif-6*. El interés en su estudio se fundó en el desconocimiento de su función biológica y en la pertenencia al grupo de *core genes*, denotando la importancia evolutiva del mismo ([Jehle et al, 2006 \[A\]](#); [Miele et al, 2011](#)). Así comenzó el estudio particular de este gen. En principio se encontraron dominios hidrofóbicos conservados, posiblemente transmembrana que podrían evidenciar el anclaje a la envoltura de las partículas virales ([Ayres et al, 1994](#); [Li et al, 2008](#)). Además, se logró encontrar a la proteína en fracciones de la envoltura de ODVs ([Perera et al, 2007](#); [Xu et al, 2008](#); [Xu et al, 2011](#), [Hou et al, 2013](#)). Por ello, se realizaron estudios del gen basados en la generación de virus mutantes carentes de parte del gen en AcMNPV y BmNPV, delecionando parte de la secuencia codificante en la región carboxilo terminal. ([Xu et al, 2008](#); [Li et al, 2008](#); [Li et al, 2011](#)). En los estudios realizados en mutantes de AcMNPV, se caracterizó un posible promotor temprano, pero por ensayos de *western blot*, la proteína se encontraba en momentos tardíos del ciclo. No se vieron afectadas las morfologías de los OBs, BVs ni ODVs, y el único efecto comprobado fue un aumento en el tiempo letal medio, TL₅₀ ([Li et al, 2011](#)). Mientras que los ensayos en BmNPV caracterizaron al homólogo del gen *ac68 (pif-6)*, *bm56*, como tardío y con formación de OBs sin viriones ODVs, afectándose

la infección por ingesta (*Xu et al, 2008*). Sin embargo, ambas construcciones mutantes afectaban secuencias génicas adyacentes, ya que el gen en cuestión se encuentra solapado en sentido contrario al gen *lef-3*. Además, uno de los ensayos también afectó la secuencia promotora de otro gen, *ac69*. Estudios más recientes, que contemplaron el orden génico característico de esta región, en el que se complementó al virus mutante AcMNPV con la secuencia codificante del gen *lef-3* y/o *ac68*, permitieron demostrar que *ac68* no interfiere en la morfogénesis de las partículas virales, ni en la replicación correcta del DNA viral, pero sí se ve afectada la infección primaria. Por ello se lo clasificó como *pif-6*, ya que contiene todas las características de este grupo de genes (*Nie et al, 2012*).

VP91/P95 – ¿PIF-7?

La proteína VP91 o P95 fue caracterizada como una proteína tardía que se asocia a la envoltura de los ODVs y a las nucleocápsides, como así también fue detectada en partículas BVs (*Russell y Rohrmann, 1997*). Estudios posteriores demostraron que la misma se encuentra en la envoltura de los ODVs de varias especies baculovirales (*Braunagel et al, 2003; Perara et al, 2007; Xu et al, 2011; Wang et al, 2011; Hou et al, 2013; Torres Braconi et al, 2014; Zhang et al, 2015*), pero no han logrado localizarla en la envoltura de los BVs (*Braunagel et al, 2003; Wang et al, 2010; Hou et al, 2013*). Además, forma parte de los *core genes* (*Miele et al, 2011; Xiang et al, 2013*). Análisis bioinformáticos demostraron la existencia de un dominio conservado hidrofóbico transmembrana en la región amino terminal y se lograron identificar dos dominios funcionales: VP91_N, en la región amino terminal; y ChtBD2, dominio de unión a quitina presente sólo en los géneros virales *Alpha* y *Gamma* (*Xiang et al, 2013*). Este dominio de unión a quitina tipo II (CBD II), fue encontrado también en otras proteínas presentes en la envoltura del ODV, conocidas como *11K proteins*. En AcMNPV se conocen dos genes que codifican para polipéptidos pertenecientes a este grupo, *ac145* y *ac150*, que potencian la infección por vía oral, dado que mutantes

knockout tuvieron menos potencia infectiva (Lapointe et al, 2004). Por otro lado, la proteína VP91/P95 fue caracterizada como parte del complejo PIF (Peng et al, 2012).

Para dilucidar la función biológica de la proteína VP91/P95 en el ciclo infectivo, se intentaron generar virus *knockout*, no logrando la producción de partículas BVs en cultivo. Por lo tanto, para el estudio de la actividad fue necesario generar los mutantes basados en el sistema de bácmido de BmNPV y recombinación homóloga en *E. coli* (Xiang et al, 2013). Así logró determinarse que la proteína en cuestión no está involucrada en el correcto desempeño de las replicación viral pero es indispensable para el adecuado ensamblaje de las nucleocápsides, y por ende, de la morfogénesis de los viriones BVs y ODVs (Xiang et al, 2013; Zhu et al, 2013). Por otro lado, se realizaron estudios de rescate de mutantes, a los que se les otorgó diferentes versiones truncadas de la proteína deletionada, demostrando en AcMNPV que el dominio II CBD de la proteína VP91/P95 no está involucrado en la correcta morfogénesis de los BVs y ODVs, pero es esencial para la infección por ingesta (Zhu et al, 2013). Dado que esta proteína es parte del complejo PIF y que es la única en poseer un dominio CBD, se supone que asiste en la infección primaria promoviendo la unión de los ODVs a los componentes de quitina asociados a la membrana peritrófica o a las microvellosidades.

A partir de las características mencionadas previamente es que surge el debate sobre la clasificación de la proteína VP91/P95 como miembro del grupo PIF. Si bien se ha demostrado que parte de ella sería esencial para la infección oral, no afectando la generación de partículas virales, la ausencia de toda la proteína no permite la correcta morfogénesis de las mismas. Por ello se deduce que esta proteína está involucrada en al menos dos funciones diferentes del ciclo infectivo. Además, como se mencionó que el dominio II CBD está identificado por predicciones bioinformáticas sólo en los homólogos en *Alpha* y *Gammabaculovirus*, sería necesario el estudio de función de la proteína en algún miembro del género *Beta* y *Delta* para demostrar la actividad de la misma en la infección primaria. Por otro lado, las características específicas de esta proteína no son coincidentes con las demás proteínas PIFs, cuyas ausencias en virus mutantes sólo impide la infección *per os*, sin afectar otras funciones virales.

Por todo lo mencionado, es que continúa el debate sobre la clasificación de VP91/P95 dentro del grupo PIF.

En resumen, las proteínas PIF comprenden un conjunto de factores proteicos esenciales que presentan características comunes, teniendo un papel clave durante el inicio de la infección primaria por vía oral. Es importante recordar la presencia de genes homólogos en todos los miembros de la familia *Baculoviridae* y de otros virus de insectos, denotando la importancia de la función de este grupo de proteínas.

Además, dadas sus particularidades, son un interesante blanco para controlar la dispersión de los baculovirus en el ambiente sin afectar la multiplicación de los mismos en cultivo celular.

| COMPLEJO PIF

El mecanismo de entrada de los baculovirus, al igual que para otros virus envueltos, involucra dos pasos generales: la unión con receptores específicos del hospedador y la posterior fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Para el caso de los virus Herpes Simplex o Vaccinia, estos eventos están mediados por una maquinaria proteica presente en la envoltura viral que actúa conjuntamente y que desencadena una cascada de cambios conformacionales una vez que interacciona con efectores en la célula blanco, los que permiten el inicio de la infección (*Senkevich et al, 2005; Campadelli-Fiume et al, 2007*). En los baculovirus se han identificado y caracterizado los factores virales indispensables para la infección primaria, aquella en la que ocurre el contacto inicial entre el virus y su hospedador. Dichos factores son las proteínas PIF. La presencia de homólogos de los mismos en varios virus de genomas grandes de ccdsDNA que infectan insectos, supone que estas proteínas están asociadas a un mecanismo de entrada ancestral y evolutivamente conservado. A partir de estas consideraciones es que no hace mucho comenzó el estudio

de la distribución de las proteínas PIF en la envoltura del ODV, ya que podría proveer conocimiento del mecanismo específico de entrada.

Ya se ha mencionado el rol fundamental de P74 en la unión del ODV a la membrana de las microvellosidades, la acción en la entrada de PIF-1 y PIF-2 relacionada con un evento posterior a la unión, pero importantes para que ocurra el ingreso de las nucleocápsides, y que PIF-3 no está involucrada en los procesos de unión ni fusión (*Yao et al, 2004, Haas-Stapleton et al, 2004; Ohkawa et al, 2005*). Con todos los conceptos citados previamente y teniendo en cuenta las funciones descritas para los PIFs de manera individual, se realizaron ensayos para evaluar la existencia de un posible complejo que involucre a las proteínas PIFs. Estos estudios realizados por *Peng et al, 2010 y Peng et al, 2012* permitieron determinar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos para cada proteína y utilizando virus *knockout* para cada gen *pif*, la existencia de un complejo PIF. El mismo comprende un *core* de proteínas indispensables para su formación, compuestas por PIF-1, PIF-2 Y PIF-3. La ausencia de alguna de ellas no permite la existencia del complejo. También, como parte estable pero no esencial para su formación, está PIF-4. Ensayos realizados con virus AcMNPV *knockout* para este gen permitió localizar subcomplejos compuestos por PIF-1, PIF-2 y PIF-3. Con una asociación más débil, aparecen en escena P74 y VP91/P95 (*Peng et al, 2012*). Como se mencionó previamente, VP91/P95 tendría efectos en la infección primaria, por lo que no resulta extraña su presencia asociada al complejo. Las pruebas experimentales sugieren la participación de otras proteínas, pero con una interacción aún más débil: PIF-6, AC5 Y AC108. Esta última presenta ortólogos en los géneros *Alpha-*, *Beta-* y *Gamabaculovirus* y estudios realizados en SeMNPV (estudio de un virus deletado en *sf58*, homólogo a *ac108*) sugieren que sería indispensable para la infección *per os* en lepidópteros, no afectándose la morfogénesis de partículas infectivas en cultivo celular y no mostrando cambios en la infección cuando los BVs u ODVs se inyectan en el hemocele, proponiendo la existencia de un nuevo PIF específico de lepidópteros (*Simón et al, 2012*). Ac5, en cambio, está presente en algunas especies de *Alphabaculovirus* del Grupo I y pareciera no ser esencial, ya que estudios de mutantes BmNPV carentes del gen homólogo *bm134*, no mostraron cambios en la infección (*Ono et al, 2012*).

PIF-5 ha sido descartada como parte del complejo; sin embargo su ausencia no permite la infección primaria, sugiriendo una acción sinérgica al complejo de manera distante junto con otros factores como ODV-e66 (*Peng et al, 2012*).

Las interacciones entre las proteínas no son del tipo covalentes, sino una suma de débiles enlaces no covalentes (*Peng et al, 2010*). Además, las proteínas que conforman el *core* estable tienen múltiples caras de interacción, permitiendo dar al complejo PIF una forma muy compacta, que podría evitar la exposición de los dominios funcionales a la acción de clivajes proteolíticos inespecíficos en el ambiente digestivo del intestino de las larvas, protegiendo posibles sitios activos necesarios para el correcto desempeño de la infección primaria.

Todas las proteínas que conforman el complejo PIF (PIF-1, PIF-2, PIF-3, PIF-4, P74 y VP91/P95) son codificadas por genes presentes en toda la familia *Baculoviridae* y en otros virus de invertebrados, lo que sugiere que el mecanismo de entrada en la infección *per os* es altamente conservado y podría haberse generado muy temprano en la evolución.

Anticarsia gemmatalis y AgMNPV

El modelo de trabajo de esta tesis doctoral está basado en el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*, AgMNPV.

ANTICARSIA GEMMATALIS HÜBNER

Anticarsia gemmatalis Hübner es una especie de lepidóptero propia de las zonas tropicales y templadas de América, oligófaga de leguminosas y constituye el defoliador más importante de la soja en el hemisferio occidental. Conocida también como isoca u oruga de las leguminosas, pertenece a la familia *Noctuidae*, dentro del orden *Lepidoptera*.

Los adultos son mariposas de hábito nocturno, de color marrón a azulado oscuro (Figura 1.8.C) y tiene gran capacidad de vuelo, migrando desde las áreas tropicales a las templadas a partir de la primavera. En la región pampeana de la Argentina los ataques ocurren a fines de Febrero, Marzo y Abril, principalmente en lotes de segunda época de siembra. La oruga de las leguminosas llega a medir de 35 a 40 mm de longitud y se presenta en dos formas: una de color verde intenso y las otras de color oscuro a negro, con una serie de líneas blancas longitudinales (Figura 1.8.A), y requieren 3 a 4 semanas para alcanzar su máximo desarrollo. Una larva llega a consumir entre 100 y 110 cm² de hoja de soja. También puede consumir total o parcialmente vainas, que aún no formaron granos.



Figura 1.8. Imágenes de *Anticarsia gemmatalis*. A) Dos larvas de *A. gemmatalis*, una verde y otra oscura (<http://www.programamri.com>). B) *A. gemmatalis* en estadio de pupa (© Machele White/<http://mothphotographersgroup.msstate.edu>). C) Adulto de *A. gemmatalis* (© Embrapa)

A. gemmatalis fue caracterizada por primera vez en el Estado de Florida, Estados Unidos en el año 1903 (Hinds y Osterberger, 1931). Se encuentra dispersa desde Estados Unidos, en Florida y en el resto de los estados cálidos de la zona sur de ese país, hasta Paraguay, norte de Argentina y Uruguay en el Hemisferio Sur, presentando un gran desarrollo en Brasil (Panizzi y Corrêa-Ferreira, 1997). En nuestro país los daños que provoca esta oruga de las leguminosas son en las áreas sojeras del norte del país, NOA y NEA. En el resto de la región pampeana provoca ataques intensos, pero en forma ocasional. En la región pampeana central los ataques ocurren en Marzo y Abril, en lotes de segunda época de siembra (Aragon, 2002).

El ciclo biológico comienza cuando la hembra adulta atrae al macho mediante la emisión de feromona sexual, y luego del acoplamiento desovan en las vainas, tallos y envés de las hojas. Los huevos son esféricos, ligeramente achatados de 1,5 mm de diámetro, la coloración es verde durante el inicio del desarrollo y rosado hacia el final del mismo. El período embrionario dura 3 días, al cabo de los cuales eclosionan las larvas; son muy voraces, defolian hasta plantas desarrolladas. Las larvas son de color verde con líneas longitudinales blancas, pero hay formas oscuras (Figura 1.8.A). Durante los dos primeros estadios presenta solo 3 pares de patas falsas, desplazándose como una “isoca medidora”, y a partir del tercero aparecen los apéndices abdominales restantes. En cultivo presentan el último par de patas falsos muy abiertos. Desarrolla 6 estadios larvales, durante 20 a 30 días, luego empupa en la hojarasca o en el suelo y al cabo de 10 a 12 días emerge el adulto. La pupa mide alrededor de 16-18 mm de longitud, su color es verde al principio y castaño al final, dura entre 7 - 11 días. La fase de pupa transcurre en el suelo, bajo los restos de hojas, o apenas bajo la superficie (Figura 1.8.B). En nuestro país suceden alrededor de 5 generaciones anuales, transcurriendo el invierno en estado de pupa.

En general aparece en los períodos de pocas lluvias, ya que con alta humedad es atacada por el hongo *Nomuraea rileyi*, que las enferma quedando rígidas, de color blanco y adheridas a tallos y hojas (Urretabizkaya et al, 2010). Por estas razones, este organismo tiene una gran importancia en el control de *A.gemmatalis* en tales condiciones climáticas. En tanto, el baculovirus AgMNPV es otro patógeno de importancia. En este caso las orugas afectadas sufren la destrucción de sus tejidos y quedan colgadas de las patas abdominales, presentando un color claro (Aragon, 2002). Además, posee otros enemigos naturales parasitoides como el díptero *Winthemia rufopicta*, himenópteros como *Euplectrus puttleri* y *Meteorus autographae*; por otro lado, predadores como coleópteros y hemípteros (Kathryn, 2000).

De manera usual, la plaga de la oruga de las leguminosas se controla con numerosos insecticidas químicos disponibles en el mercado. Por ejemplo, varios de los formulados a base de piretroides están recomendados en dosis muy reducidas, de pocos gramos/ha, lo cual reduce el impacto en la población de artrópodos benéficos. Por otro lado, las

benzoilfenilureas son los principales representantes de los inhibidores de la síntesis de quitina, los cuales actúan como venenos sobre el desarrollo de las larvas (*Da Silva et al, 2003*). Sin embargo, las estrategias de control biológico están tomando gran relevancia, sobre todo por el amplio uso que se está dando en Brasil del baculovirus AgMNPV para controlar la expansión de la plaga (ver Control Biológico – Los baculovirus y el control biológico de plagas).

VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR MÚLTIPLE DE ANTICARSIA GEMMATALIS - AGMNPV

Como se ha mencionado a lo largo de todo el marco teórico presentado en este trabajo, los baculovirus fueron aislados a partir de insectos muertos. En los inicios, cuando fue descubierta la enfermedad en el gusano de la seda, su aislamiento y caracterización fue con fines de comprender el agente causante que provocaba la pérdida de los insectos productores. Posteriormente, los baculovirus fueron estudiados con la idea de caracterizar enemigos naturales de insectos plagas, utilizándolos para el control de las mismas. Así, en la década del 70 se aisló en Brasil un baculovirus del tipo nucleopoliedrovirus a partir de una larva muerta de *Anticarsia gemmatalis*, al cual conocemos hoy como AgMNPV (*Allen y Knell, 1977; Carner y Turnipseed, 1977*). Ensayos de propagación en células IPLB-SF-21AE permitieron aislar variantes genotípicas, una de ellas, AgMNPV-2D, representante de la especie más estudiada y utilizada (*Maruniak, 1989*). Además, se logró el desarrollo de una línea celular derivada de células ováricas de larvas de *A. gemmatalis* denominada UFL-Ag-286, lo cual contribuyó al mantenimiento y multiplicación del virus en condiciones de cultivo celular y facilitó de este modo su caracterización posterior (*Sieburth y Maruniak, 1988 [A, B]*). En el año 2006 se obtuvo la secuencia completa del genoma de AgMNPV-2D, compuesto por 132.239 pb, conteniendo 152 ORF teóricos (*Oliveira et al, 2006*).

Posterior al aislamiento de AgMNPV y tal y como se ha detallado previamente, se realizaron estudios y desarrollos para el uso de este agente entomopatógeno para el control

biológico de la plaga (ver Control Biológico – Los baculovirus y el control biológico de plagas).

Se han realizado muchos estudios genómicos sobre este baculovirus perteneciente al Grupo I del género *Alphabaculovirus*, denotando la variabilidad existente dentro de la especie. Dada la gran distribución de su hospedador natural, esto no sería un hecho improbable, sino la clara demostración de la acción de los procesos evolutivos que conducen a la generación de nuevos genotipos, e incluso, luego de suficiente tiempo, a la generación de nuevas especies. Así, se ha logrado aislar una variante genotípica en una localidad de nuestro país, Oliveros (provincia de Santa Fe), la cual actualmente es denominada AgMNPV-SF y es el modelo de estudio utilizando en esta tesis doctoral (*Claus et al, 1993*).

SOBRE EL CONOCIMIENTO BÁSICO DE *PIFS*

Los genes *pifs* (*per os infectivity factors*) de *Baculoviridae* codifican polipéptidos estructurales de la envoltura del virión derivado de los cuerpos de oclusión, presentando todos ellos características moleculares compartidas.

SOBRE EL CONOCIMIENTO APLICADO DE *PIFS*

El rango de hospedador de *Baculoviridae* puede ser alterado mediante la modificación del complejo PIF.

GENERALES

Comprender los factores virales necesarios para permitir la infección primaria en los baculovirus.

ESPECÍFICOS

- Estudiar aspectos composicionales sobre los genes *pifs* de *Baculoviridae*.
- Clasificar a los baculovirus en función de los genes *pifs*.
- Estudiar la temporalidad en la expresión de los genes *pifs* de *Baculoviridae*.
- Caracterizar los dominios funcionales de PIF-0.
- Complementar baculovirus defectivos en PIF-0 y evaluar su capacidad infectiva en larvas.

Resultados y Discusiones

II –RESULTADOS Y CONCLUSIONES I

GENES PIF EN VIRUS DE INSECTOS Y SU LOCALIZACIÓN GENÓMICA

Los genes *pif* forman parte de la familia de genes presentes en todos los baculovirus, conocidos como *core genes*. Esto implica que todos los miembros de la familia presentan un gen homólogo a cada uno de los siete *pifs* descritos hasta el momento (MIELE ET AL, 2011).

Como fue mencionado, estos genes codifican para proteínas de función crucial para la infección primaria. También se ha mencionado la importancia de la identidad de las mismas para lograr una infección eficiente, traducida en la especificidad de los baculovirus por un rango determinado de hospedadores. Estas proteínas se convierten, entonces, en la primera interacción específica patógeno-hospedador y, si bien hasta la actualidad no se ha logrado caracterizar en profundidad dicha interacción por desconocimiento del receptor específico en el hospedador, se sabe perfectamente cuales son los factores virales involucrados, como también los efectos de la ausencia de alguno de ellos, que deriva en la pérdida de la infectividad por ingesta (Rohrmann, 2013; Peng et al, 2010, 2012; Mu et al, 2014). Todo esto determina que las proteínas PIF son factores fundamentales para el establecimiento de la especificidad de infección, resultando de vital importancia su caracterización molecular para determinar dicha asociación, y así ampliar el conocimiento de esta etapa del ciclo infectivo.

Filogenia de *pifs*

Como se introdujo previamente, la familia *Baculoviridae* está dividida en cuatro géneros, de acuerdo a estudios biológicos y características estructurales comunes entre sus

miembros: *Alphabaculovirus*, que incluye baculovirus específicos de lepidópteros y está subdividido en Grupo I y Grupo II, en base al tipo de proteína fusogénica y a otras relaciones génicas; *Betabaculovirus*, que comprende a los granulovirus específicos de lepidópteros; *Gammabaculovirus*, que incluye a los baculovirus específicos de himenópteros y, finalmente, *Deltabaculovirus*, que comprende a los baculovirus infectivos para Dípteros, conteniendo hasta la fecha un único representante completamente secuenciado (CuniNPV) (*Jehle et al, 2006 [A] y [B]; Herniou et al, 2001, 2003*)

La comparación entre genomas secuenciados de baculovirus mediante herramientas bioinformáticas ha sido la fuente para identificar los *core genes* de baculovirus, los que comprenden 37 hasta el momento (*Miele et al, 2011; Garavaglia et al, 2012*). Sin embargo, es probable que existan más secuencias ortólogas que no han sido identificadas debido a la acumulación de mutaciones a través de la evolución. Estos *core genes* resultan ser factores clave para las principales funciones biológicas, tales como aquellas necesarias para la replicación, las involucradas en la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos, las que permiten el armado de la estructura del virión, y las necesarias para establecer la infección de las células intestinales de la larva hospedadora (**Tabla I.4**) (*van Oers et al., 2007; Rohrmann, 2008; Hayakawa et al., 2000; McCarthy y Theilmann, 2008*).

Si bien la alta variabilidad en el número de secuencias codificantes es una característica clave de los virus con grandes genomas de DNA que infectan células eucariotas, hay un grupo de *core genes* que son vitales para la presencia de todas las funciones biológicas del virus, entre ellas el grupo de genes involucrados en el correcto desempeño de la infección primaria.

Jehle et al, 2006 [B] realizaron estudios filogenéticos basados en secuencias parciales de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina* o *granulina* (según la especie viral) que permitieron la separación filogenética en los 4 géneros antes mencionados. En análisis posteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se obtuvieron las mismas relaciones evolutivas utilizando para el análisis filogenético un concatémero de secuencias aminoacídicas correspondientes

a todos los *core genes* reportados hasta ese momento (Miele et al, 2011). Para el análisis se utilizaron los genomas con datos de secuencia completa presentes en *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Con cada uno de ellos se realizaron alineamientos múltiples de secuencia aminoacídica y luego se concatenaron los alineamientos para el análisis de filogenia (Figura II.1.A) (Adaptado de Miele et al, 2011). El cladograma obtenido mediante este análisis permitió la discriminación en los 4 géneros y dentro del género *Alphabaculovirus*, la separación en los Grupos I y II. Además, dentro del Grupo I se obtuvieron los 2 linajes, a y b, descriptos previamente (Jehle et al, 2006 [B], Miele et al, 2011).

Como fue mencionado previamente, los *core genes* pueden agruparse según el rol que desempeñan las proteínas que codifican durante el ciclo infectivo: ya sea aquellas que están involucradas en la replicación; en la transcripción; envoltura, ensamblado y liberación; e infectividad oral (Tabla I.4) (Garavaglia et al, 2012). Sólo queda excluido un *core gene*, ac81, de función desconocida. Con el fin de evaluar las relaciones filogenéticas según la función biológica del ciclo, se realizaron cladogramas a partir del concatenado de alineamientos múltiples de los genes involucrados en una determinada actividad. De este modo, se obtuvieron 4 nuevos árboles filogenéticos basados en las funciones de replicación, transcripción, infectividad oral y envoltura/ensamblado (Figura II.1.B-E). El fin de este análisis fue evaluar las relaciones filogenéticas según cada función biológica y ver si existen diferencias respecto de la asociación con todos los *core genes*.

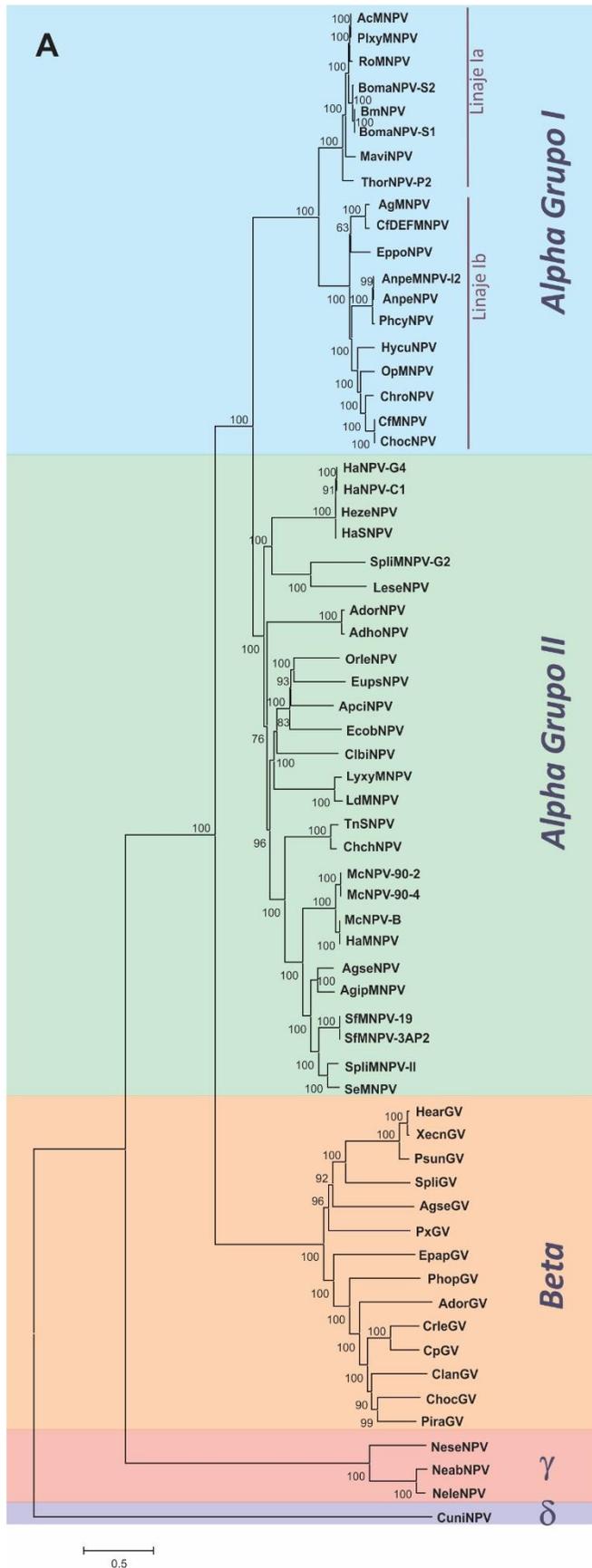


Figura II.1. Filogenia de baculovirus. A. Cladograma basado en la secuencia aminoacídica de los *core genes*. Las *core proteins* identificadas en la familia Baculoviridae fueron alineadas de manera independiente utilizando el programa T-Coffee (Notredame et al, 2000; Poirot et al, 2003). Se generó un concatémero y se infirió la filogenia utilizando el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) con los siguientes parámetros: UPGMA; Bootstrap con 500 Réplicas; GAP/Missing data = Pairwise deletion; model = amino acids –Matriz Dayhoff; patterns among sites = same – Homogeneous-; Rates among sites = different –Gamma distributed-; gamma parameter =0,90. Se indica la distribución aceptada en géneros y grupos. *Gamma* y *Deltabaculovirus* están referenciados con letras griegas. (Adaptado de Miele et al, 2011)

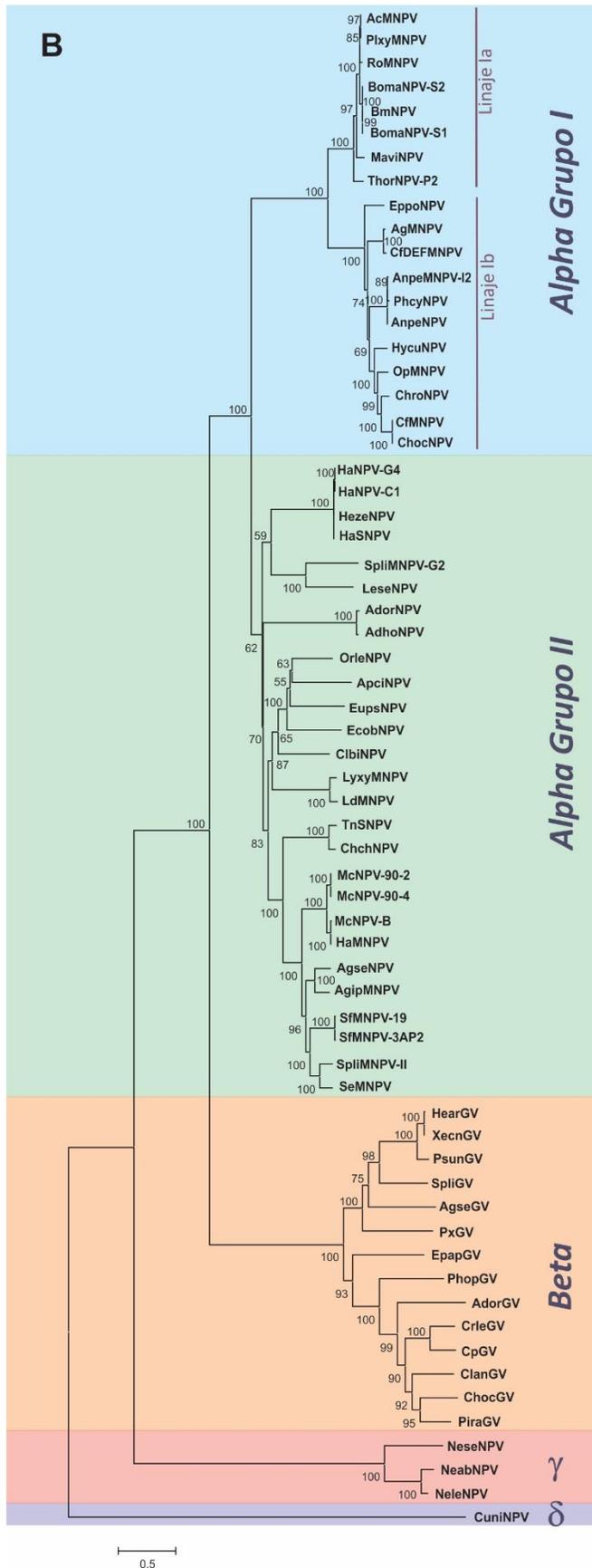
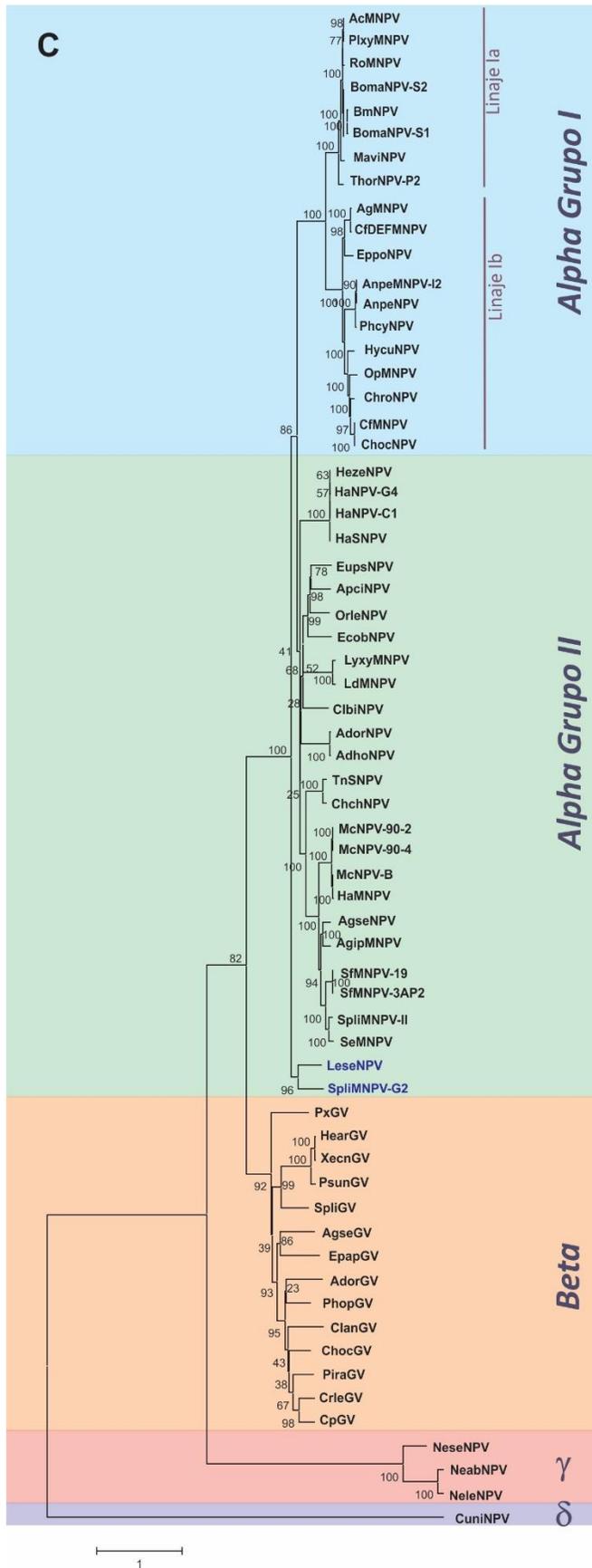


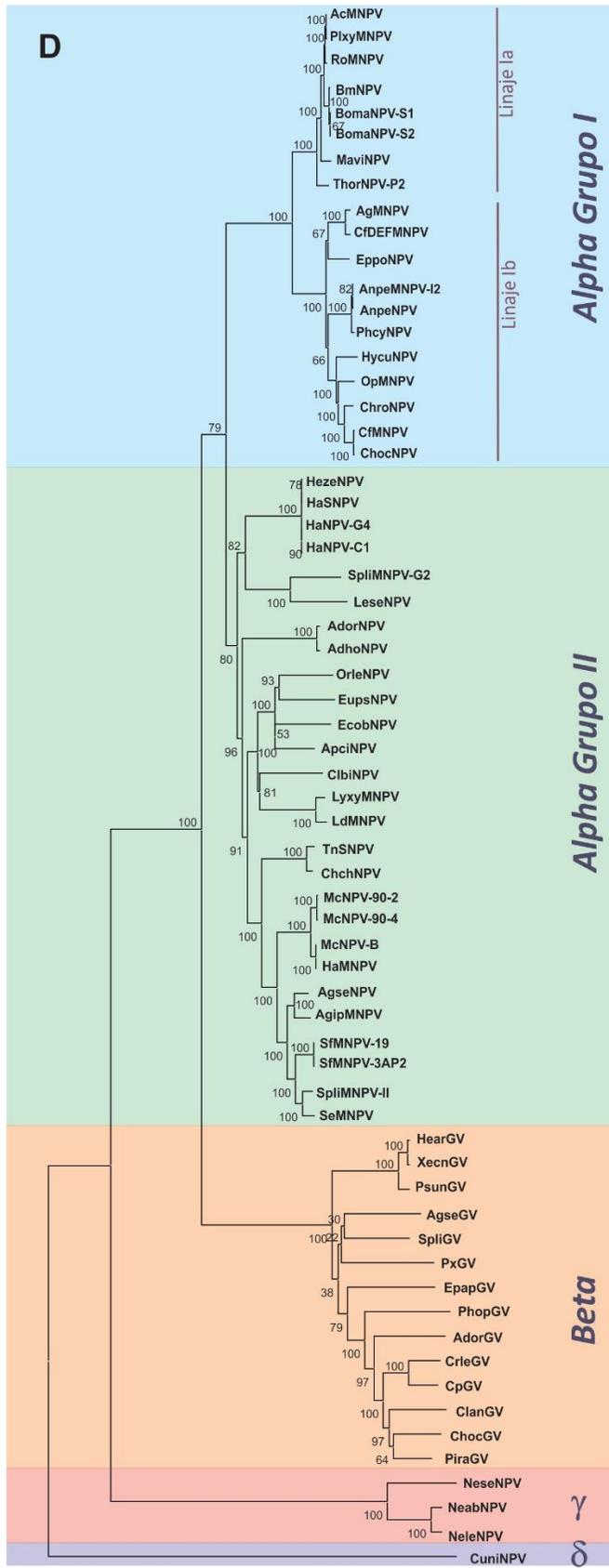
Figura II.1. Filogenia de baculovirus. Cladogramas basados en la secuencia aminoacídica de los *core genes* asociados a la replicación (B), la transcripción (C), la envoltura, ensamblaje y liberación (D), infectividad oral (E) (ver tabla I.4 para el detalle de los genes). Las *core proteins* fueron alineadas de manera independiente con el programa T-Coffee (Notredame et al, 2000; Poirot et al, 2003). Luego Se generó un concatémero conteniendo las proteínas que correspondían en cada caso y se infirió la filogenia utilizando el programa MEGA 6 (Tamura et al, 2013) con los siguientes parámetros: UPGMA; Bootstrap con 500 Réplicas; GAP/Missing data = Pairwise deletion; model = amino acids –Matriz Dayhoff-; patterns among sites = same –Homogeneous-; Rates among sites = different –Gamma distributed-; gamma parameter = 0,88 (B); 0,66 (C); 1,15 (D); 0,89 (E).

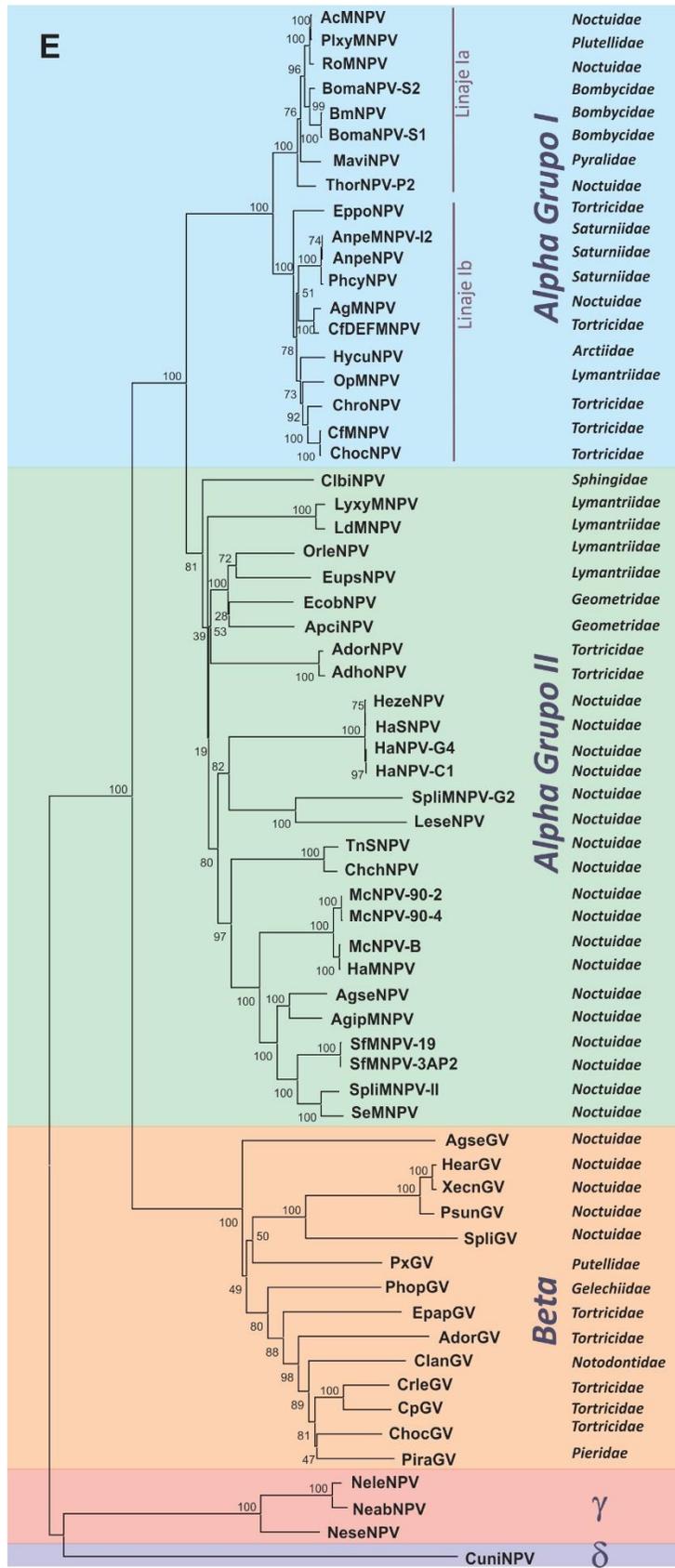
Se indica la distribución aceptada en géneros y grupos. *Gamma* y *Deltabaculovirus* están referenciados con letras griegas.

C. Se indican en azul las especies del género *Alphabaculovirus* que están clasificadas dentro del Grupo II, pero que, en estos cladogramas, conforman un grupo diferente.

E. Se indican a la derecha del cladograma las familias de hospedadores susceptibles a cada especie viral citada.







En los distintos cladogramas se observan las inferencias filogenéticas en base al análisis de secuencia de las proteínas codificadas por los genes compartidos por toda la familia viral, ya sea en su conjunto o separadas de acuerdo a las funciones en el ciclo infectivo. El árbol que incluye a todas las proteínas reproduce la clasificación en los 4 géneros de baculovirus, siendo el evento más ancestral la separación de los *Deltabaculovirus*, continuando por los *Gammabaculovirus*, luego por los *Betabaculovirus* y finalmente, un evento de separación entre los Grupos I y II de los *Alphabaculovirus* (Figura II.1.A). En este árbol, como también en todos los demás, se observa la distinción de los linajes a y b dentro del Grupo I de los *Alphabaculovirus*, denotando una clara diferencia entre ambos linajes.

Cuando se analizan las relaciones entre especies teniendo en cuenta sólo las *core proteins* involucradas en la transcripción, se observa un evento diferencial con respecto al cladograma anterior, resultando en la asociación errónea de dos especies virales de los *Alphabaculovirus* Grupo II, quedando ubicadas en posición divergente respecto de la separación en Grupos (Figura II.1.C). Esto sugiere que la maquinaria transcripcional de los virus LeseNPV y SpliMNPV-G2 presenta secuencias aminoacídicas en las proteínas involucradas en estos mecanismos que habrían evolucionado de manera independiente al resto de los *Alphabaculovirus*, a partir de un ancestro común.

El cladograma obtenido al analizar las proteínas asociadas a la envoltura, ensamblaje y liberación es el más similar al obtenido para todas las *core proteins* (Figura II.1.D). Se observan los eventos que separan en los 4 géneros, los 2 grupos de los *Alphabaculovirus* y los linajes a y b del Grupo I. La similitud en los clados obtenidos puede reflejar la escasa tolerancia a eventos divergentes en este subconjunto de *core proteins*. Del mismo modo ocurrió con el análisis basado en las proteínas involucradas en la replicación (Figura II.1.B).

Por último, se realizó la evaluación filogenética de las especies virales en función de la infectividad oral, teniendo en cuenta a las proteínas PIF (Figura II.1.E). Se incluyó en el esquema la información de la Familia que comprende a las especies de lepidópteros susceptibles a la infección, con el fin de determinar si existe alguna asociación entre los

virus determinada por la especificidad a los hospedadores. Como se ha citado previamente, los géneros *Alpha-* y *Betabaculovirus* comprenden a los baculovirus que infectan lepidópteros, mientras que los *Gammabaculovirus* infectan a himenópteros y los *Deltabaculovirus* a dípteros. En este cladograma, se obtuvo un primer evento de diferenciación que separó a los *Alpha-* y *Beta-*, de los *Gamma-* y *Deltabaculovirus*. Esta es la principal diferencia que contiene este esquema con respecto a los anteriores, en los que el primer evento separaba a los *Deltabaculovirus* de los demás géneros. Esto supone una gran diferencia entre las proteínas asociadas a la infectividad oral de los virus que infectan lepidópteros de los que infectan dípteros e himenópteros. Este análisis filogenético sugiere, entonces, una distancia evolutiva menor en base a estas proteínas entre los géneros *Gamma-* y *Deltabaculovirus*. Esta característica podría estar relacionando los mecanismos a través de los cuales se lleva adelante el contacto e ingreso de los virus al insecto, por un lado, entre los virus de himenópteros y dípteros y, por otro lado, otro mecanismo para los virus que infectan lepidópteros. Esta es una diferencia clara con respecto a los análisis filogenéticos basados en todas las *core proteins*, en el que se evidencia un evento de diferenciación inicial de la especie CuniNPV (*Deltabaculovirus*) del resto de los virus (Figura II.1.A; Miele et al, 2011). No hay que perder de vista que este análisis se centra en un evento puntual del ciclo infectivo, que involucra la primera interacción patógeno-hospedador necesaria para que ocurra la infección. Por ende, los resultados indicarían que los virus que infectan lepidópteros habrían evolucionado diferencialmente su maquinaria de infección primaria. Si bien estudios previos asocian eventos de co-evolución entre los baculovirus y sus hospedadores (Herniou et al, 2004), estudios más recientes mostraron que la diversificación de los insectos ocurrió en eventos previos a la especiación de la familia *Baculoviridae*, sugiriendo que el baculovirus que infectaba al ancestro de los Órdenes *Diptera*, *Hymenoptera* y *Lepidoptera*, se adaptó para infectar a los nuevos organismos, lo que dio lugar a la especiación viral (Thézé et al, 2011). Algún evento evolutivo podría haber ocurrido en los baculovirus que permitió modificar o adaptar la maquinaria de infección por ingesta para el nuevo Orden *Lepidoptera*, lo que podría justificar los nodos no triviales surgidos con este análisis.

En cuanto a los virus que infectan lepidópteros, se reprodujo la clasificación en 2 géneros, *Alpha-* y *Betabaculovirus* y, a su vez, la separación de los Grupos I y II y de los linajes a y b para el Grupo I (Figura II.1.E). La mayoría de las especies virales pertenecientes al Grupo II de los *Alphabaculovirus* infectan a miembros de la Familia *Noctuidae*, y los mismos se agrupan en un clado diferencial. Sin embargo, el resto de las especies no se agrupan según sus hospedadores susceptibles, característica compartida con los miembros del Grupo I. Por otro lado, los *Betabaculovirus* tampoco tienen una clara asociación según las Familias hospedadoras, salvo para el caso de *Noctuidae*, que los agrupa más cercanamente. En este sentido hay que tener en cuenta la distribución geográfica de cada especie viral y el contacto con otras familias autóctonas. Tal vez tiene más peso en la evolución de los mecanismos de infección primaria este contacto cercano antes que la pertenencia a la misma Familia en distintos lugares del mundo, permitiendo adaptar la maquinaria infectiva a una nueva especie cercana.

Localización genómica de *pifs*

En otros sistemas virales se ha encontrado que genes relacionados con una determinada función suelen estar dispuestos en localización física cercana. Dicha asociación se conoce como *cluster* génico e implica la localización adyacente de genes relacionados por su función en el organismo o virus (Boutanaey et al, 2002).

Para evaluar esta particularidad en los baculovirus, se realizó un análisis de la localización genómica de cada uno de los genes *pifs*, hipotetizando una distribución cercana o en forma de *cluster* génico. Se realizaron comparaciones dentro del Grupo I y II de los *Alphabaculovirus* y de los *Betabaculovirus* utilizando la información de secuencia completa de los genomas presentes en *GenBank*. Dada la poca cantidad de miembros representantes de los *Gamma-* y *Deltabaculovirus*, se decidió dejar de lado el estudio de estos dos géneros. Se analizó cada genoma en particular, localizando cada gen *pif*, y se calculó la distancia respecto del ORF que se clasificó como ORF001, *poliedrina* o *granulina* según corresponda

el género. Además, se obtuvo el dato de tamaño de cada ORF (en pb) y la distancia entre cada uno. Esta recopilación de información se realizó para todos los genomas con secuencia completa y se obtuvo un promedio para cada grupo establecido: *Alphabaculovirus* Grupo I, *Alphabaculovirus* Grupo II y *Betabaculovirus* (Figura II.2).

La distribución de los genes *pif* en los genomas del Grupo I de *Alphabaculovirus* se encuentra altamente conservada. Sólo se encuentra una inversión en la polaridad del gen *pif-2* en dos representantes, AgMNPV y CfDefMNPV (Figura II.2.A).

En el Grupo II de los *Alphabaculovirus*, la distribución de los genes *pif* no se encuentra conservada en todos los miembros. Se establecieron dos modelos, I y II, en el que están comprendidos todos los miembros de este grupo. (Figura II.2.B.I y II). La distribución de los genes en el modelo I se encuentra conservada en todos los genomas, no encontrándose inversiones en polaridad en ningún caso. Mientras que el modelo II es altamente variable, y se logró distribuir en dos bloques, uno fijo comprendido por *pif-5*, *pif-0*, *pif-6* y *pif-4*, en el cual no hay cambios en el orden pero sí en la polaridad en algunos casos, y el bloque comprendido por *pif-1*, *pif-2* y *pif-3*, con orden y polaridad variable según la especie.

El género *Betabaculovirus* posee una distribución de genes *pif* relativamente conservada, encontrándose cambios en polaridad en *pif-5* para el genoma de EpaGV y en *pif-0* en los genomas de XecnGV, SpliGV, HearGV y PsunGV. Además, en el genoma de PxGV, el gen *pif-1* se encuentra antes del gen *pif-5* y en polaridad invertida. Por último, en los genomas de ClanGV y ClaGV-L el orden de los genes *pif-3* y *pif-2* se encuentra invertido y *pif-2* con polaridad opuesta.

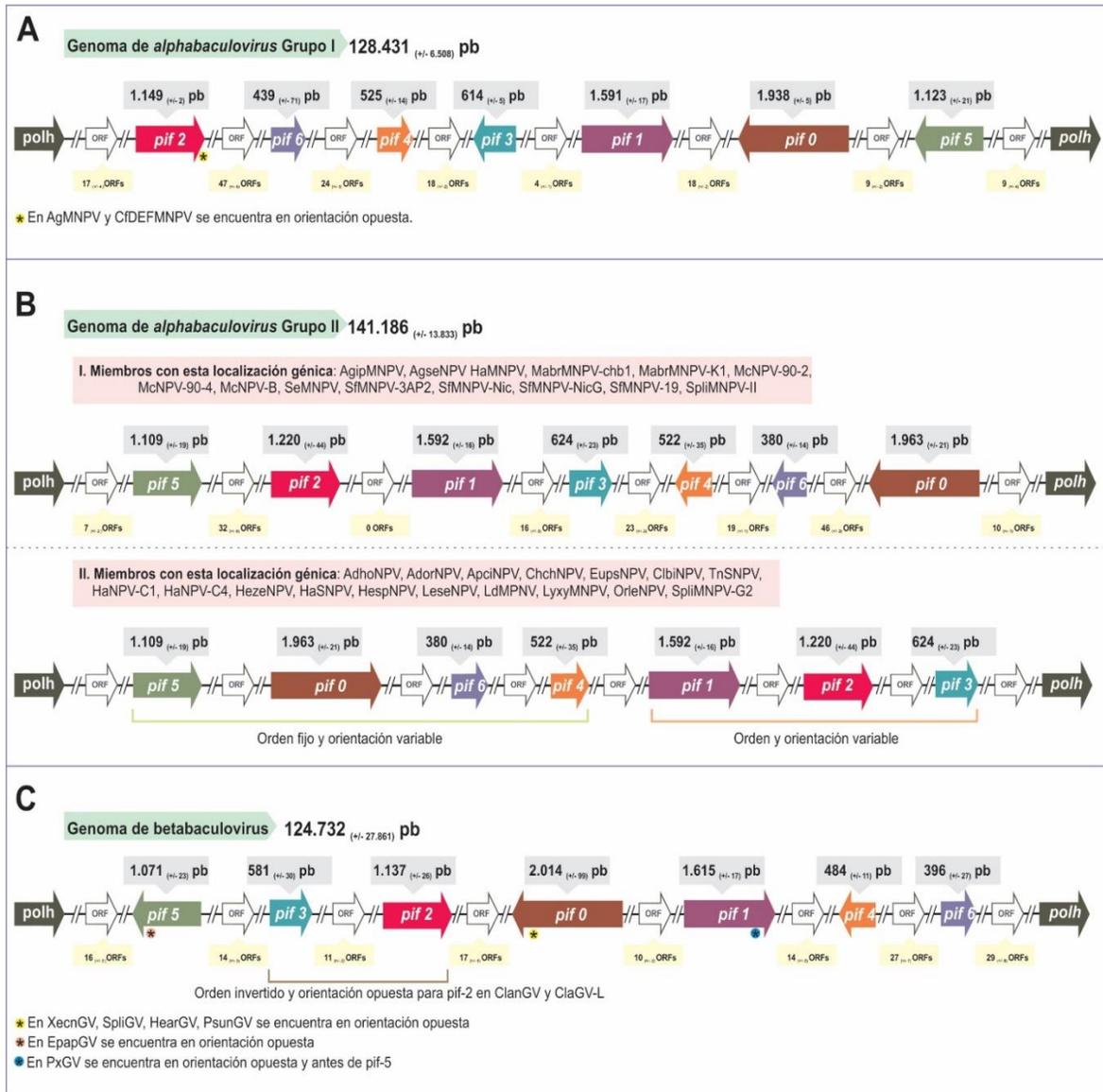


Figura II.2. orden génico de los *pifs*. se realizó a partir de la información reportada de los genomas virales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sobre cada ORF *pif* se indica la longitud promedio en nucleótidos, mientras que entre los ORFs *pif* se indica el número promedio de otros ORFs que están intercalados. para la polaridad génica se utilizó como referencia la polaridad del gen *poliedrina* o *granulina*. **A)** *Alphabaculovirus* del Grupo I. **B. I y II)** *Alphabaculovirus* Grupo II. **C)** *Betabaculovirus*.

Con estos resultados, se determinó que estos genes no se encuentran constituyendo *clusters* génicos. A pesar de ello, de manera destacada en el Grupo I de los *Alphabaculovirus*, se encontró una distribución altamente conservada. Por el contrario, en el Grupo II, se identificaron dos modelos, uno más conservado (Modelo I) (Figura II.2.B.I), en el que se

mantienen el orden y la polaridad de los genes *pif*, y uno más variable (Modelo II) (Figura II.2.B.II), en cual se mantiene el orden de los primeros 4 genes *pif* y el resto es variable según el genoma. Algo destacable en estos dos modelos es que el Modelo I corresponde a un grupo de especies virales del Grupo II que se encuentran agrupadas en un mismo clado en el árbol en base a los genes *pif* (Figura II.1.E). La similitud en organización génica compartida por diferentes especies dentro de cada género -*Alphabaculovirus* y *Betabaculovirus*- probablemente refleje eventos evolutivos próximos y compartidos.

SISTEMA DE DETECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS BACULOVIRUS EN BASE A LOS GENES *PIF*

Diseño de *primers* para amplificación por PCR de los genes *pif*

Luego del análisis filogenético realizado con los miembros de la familia *Baculoviridae* en base a los genes *pif* con registro de secuencia genómica completa, se decidió desarrollar un sistema de genotipificación y clasificación para nuevos aislamientos de baculovirus que infectan lepidópteros, complementario al método desarrollado por *Jehle et al, 2006 [A], [B]*.

Como dato destacable, dado que los productos de los genes *pif* están asociados en función, su aplicación podría revelar asociaciones filogenéticas vinculadas con la infectividad oral. El diseño de los *primers* se realizó, entonces, para cada uno de los tres grupos seleccionados (Alphabaculovirus de Grupo I, Alphabaculovirus de Grupo II, y Betabaculovirus), obteniéndose tres colecciones de *primers pif*, cada uno de ellos conteniendo siete pares de oligonucleótidos generalistas donde cada pareja amplifica un segmento específico de alguno de los 7 genes *pif* (Tabla III.1). El par de *primers* correspondiente a *pif-0 (p74)* que se utilizó en Alphabaculovirus Grupo I fue un juego diseñado previamente en el laboratorio para caracterizar ese gen en la variante genotípica AgMNPV-SF (*Belaich et al, 2006*), debido a que el juego de *primers* con inosinas no funcionó por alguna razón no dilucidada.

Las secuencias de los *primers* diseñados derivaron de alineamientos múltiples realizados en base a las secuencias nucleotídicas de los ORFs correspondientes. En los gráficos que muestran la similitud relativa de los alineamientos, se indican las regiones que fueron seleccionadas para cada uno de los 3 grupos abordados (Fig III.1).

Como se observa en la **tabla III.1**, las secuencias de los *primers* contienen ambigüedades (incluyendo inosinas). Cabe mencionarse que en una primera instancia se diseñaron cebadores con ambigüedades, pero sin inosinas. Cuando se realizaron los ensayos de PCR no se logró obtener amplificación alguna aunque se evaluaron diferentes perfiles de ciclado térmico y varias condiciones de reacción variando la composición de reactivos, así como también el agregado de distintos aditivos. En vistas de ello, se hipotetizó que la gran dimensión poblacional de estos oligonucleótidos fue el principal limitante. Para superar este inconveniente se reemplazaron las posiciones en donde la ambigüedad era “N” por una inosina, disminuyendo en consecuencia cuatro veces la población por cada reemplazo. La evaluación de los *primers* conteniendo ambigüedades se realizó para el grupo de Betabaculovirus y, dada la situación hallada, se decidió modificar el diseño con inosinas para todos los grupos.

Grupo	Región a amplificar	Primer fw	Primer rev
Alphabaculovirus Grupo I	pif-0	CAGGCTCTAGAGAAACTCGCGCGGAAACAT	GCCGCTCGAGCGCGGGTGCGANAGCATG
	pif-1	CGYGARGGRYTRGCCAAYTYCA	CGKCCYISGCCIGGRSARAARCA
	pif-2	GGGGACATGTATCRARTACTRAT	AIGARCCBGGHACYTCRAAIGCRAA
	pif-3	GTGACIRAYCARCARTGYMGVGA	GCCAGYGCMTTRTGIRGAAAYA
	pif-4	ATRAYGTCSAIKATIGWRAAYTGRAT	WATRKIIITCIGCRTTTTCRCTGCT
	pif-5	ACICCIYIGGITTYACHAAYTKMT	CRCCIATIADCMWATIADIGGCAT
	pif-6	ATGTGGGAMICKRTICGHTGGCA	GRRCGGGYCTRRTTITGMCGIGCT
Alphabaculovirus Grupo II	pif-0	TTYAAYSAIGCITAYTYGCGICGITT	RTRYIRTAICCRARIGGRTPCCCAIA
	pif-1	GCGCGARGGIYITIGCMAAYTYCA	TCIAYIGWRCAIGGRAYIAYIACRCA
	pif-2	GACCGMGGITAYTYACIACVA	ATIGGRTTIADIGGRTTIASRAACAT
	pif-3	GCGCTGYITIAGYAYKTAYMGIGA	GCGCTYIGGIAYRCAIACIGGHA
	pif-4	GAGCAIIMGRAAYTCKYKIGGRCA	YTSITCIGTRARRTAYAWRTAYTTCCA
	pif-5	GCACGYMRIRYIGGGYAGYT	CISCMAIIWYRTAIGGYTCIAYRCA
	pif-6	CCSGARRRYIKIRARIAIGCBTGG	GYSALIIARIABISHRCAIATAAAAR
Betabaculovirus	pif-0	SIRTICARTWYAAYCARCCIGCITG	CGTCIARRTAIYYICGIGGAAACAT
	pif-1	TGYAAYCCIMAYACIGGHACITG	GGGSCCARAAIAMYTTIAIRTC
	pif-2	GGSICGITAYGYDCCDYTRCA	GGGTDGGYTCRTSIATDCCRTT
	pif-3	CGGAYVICARTGYVDIGAYAYTG	AAATCDTDDGGIATRCAIACVGG
	pif-4	CTIRCDCCICCYTCRRARTARTAATA	CTTSCGCYTCGTTCAIAYRTAMA
	pif-5	TCBSCKAWATCRTAIGGYTC	GDVVISYIGAYAYATTCCIGA
	pif-6	CATIIITKIARARITAYVAITGMRA	GGIATIGGYTKYTTRWARTCAA

Tabla III.1. Secuencias de *primers*. En la tabla se indican las secuencias de cada uno de los *primers* diseñados para el sistema de caracterización propuesto para *Alphabaculovirus* de Grupo I, *Alphabaculovirus* de Grupo II y *Betabaculovirus*. La nomenclatura utilizada en las secuencias nucleotídicas se expresa según la establecida en IUPAC.

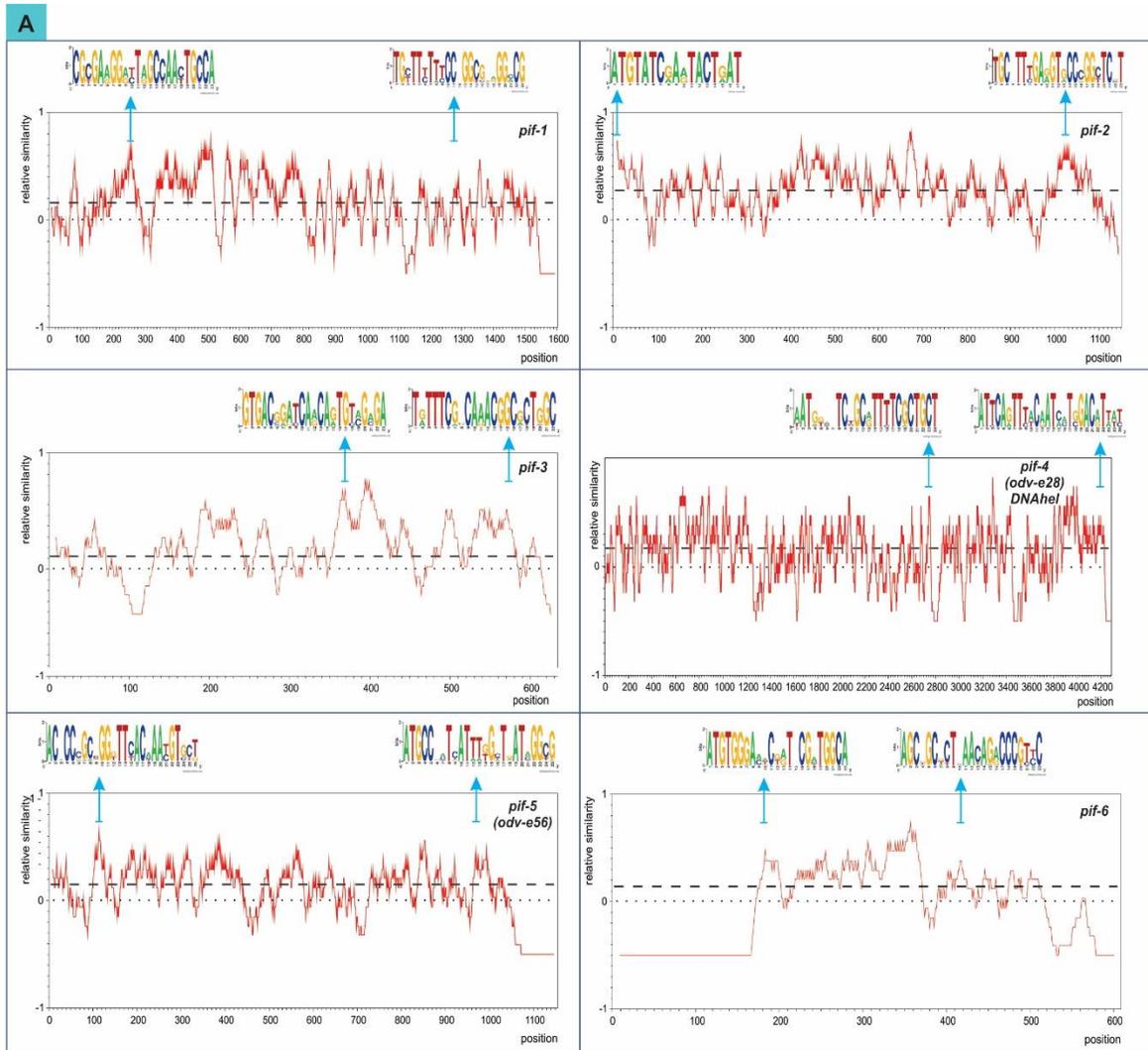


Figura III.1. Diseño de primers. A) *Alphabaculovirus* Grupo I. Ver pie de la figura C

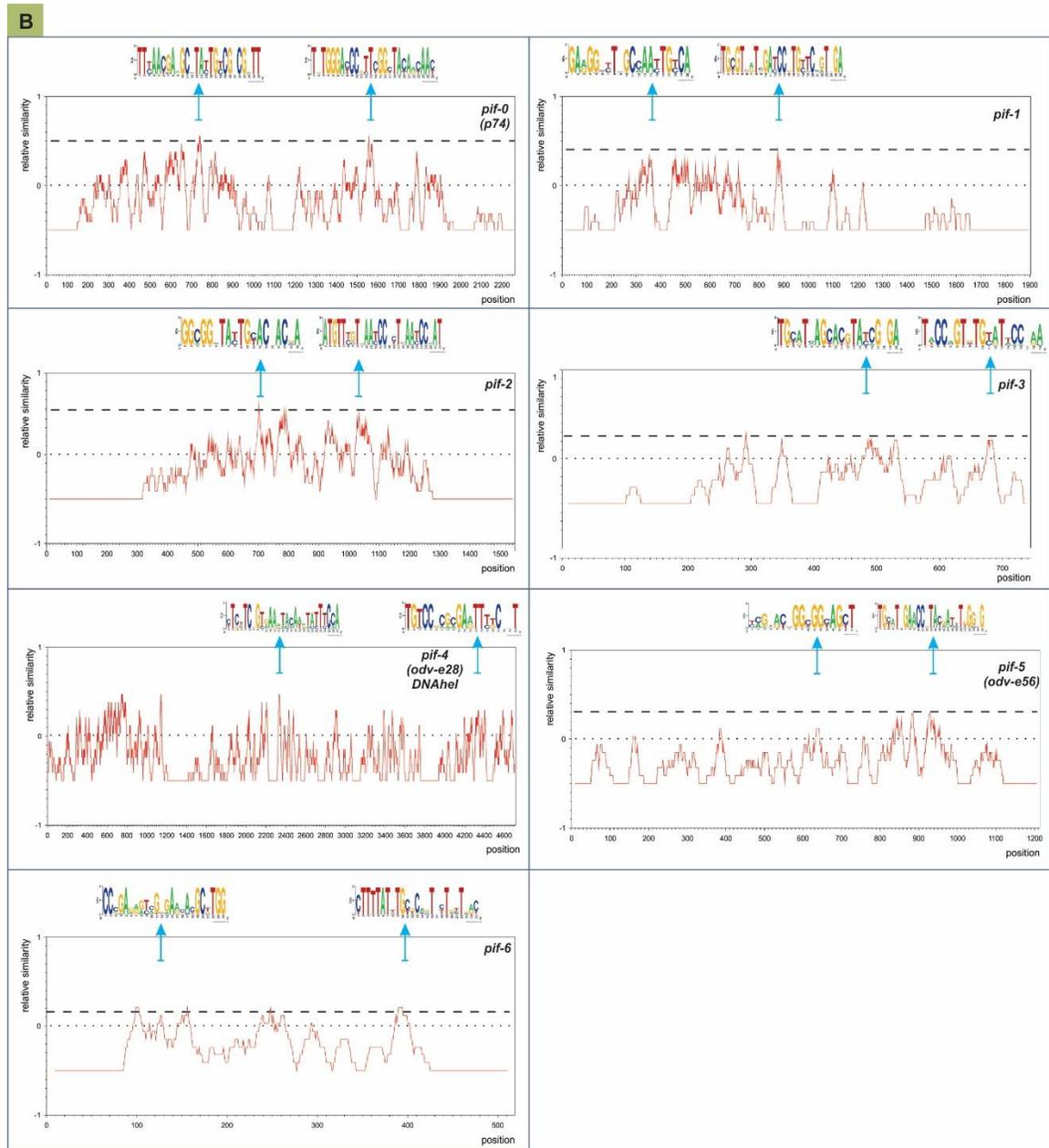


Figura III.1. Diseño de primers. B) *Alphabaculovirus* Grupo II. Ver pie de la figura C

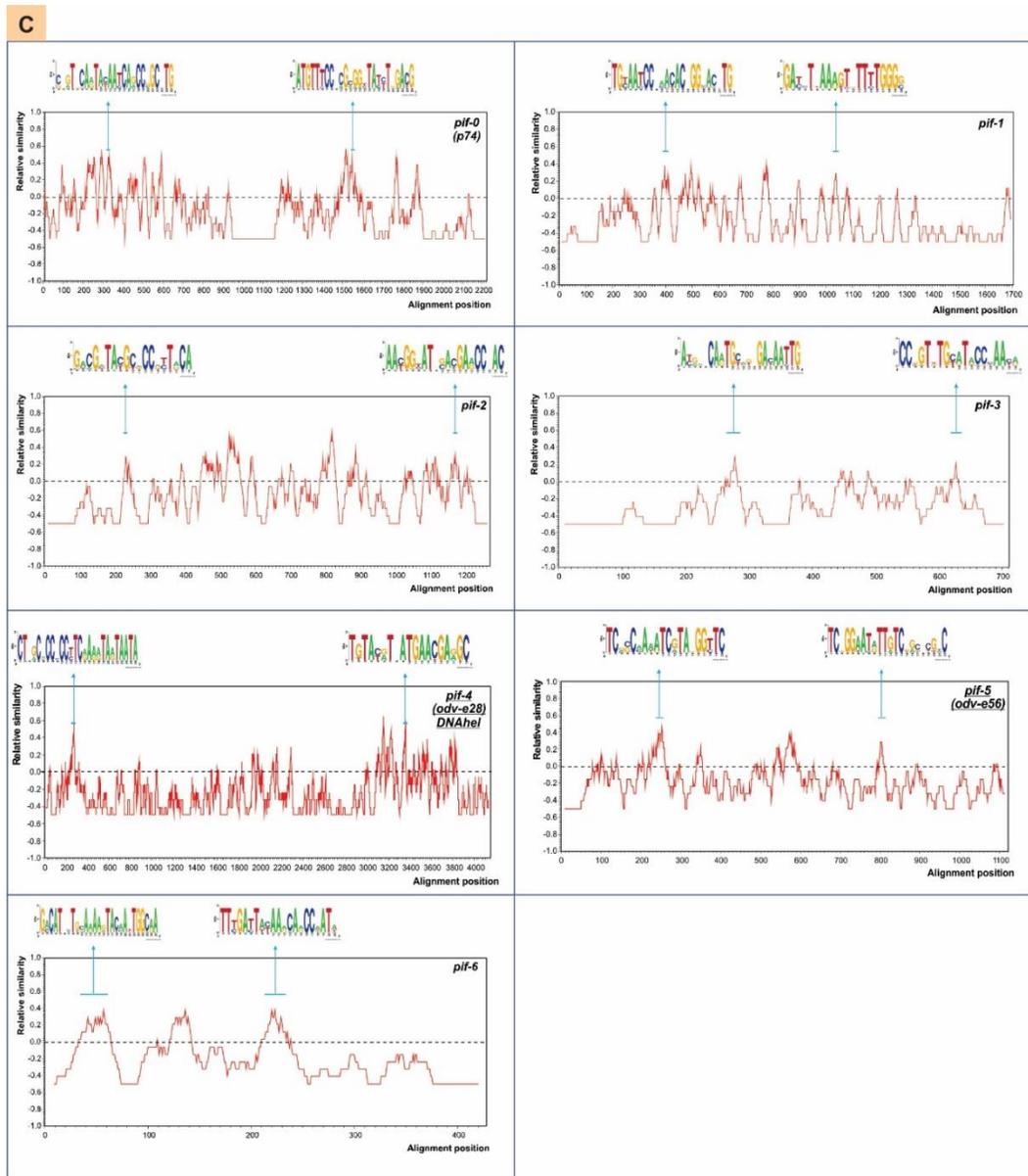


Figura III.1. Diseño de primers. C) Betabaculovirus. Representación gráfica del diseño de primers para los genes *pifs* de cada grupo seleccionado. Cada gráfico muestra la similitud relativa de las secuencias, derivada de un alineamiento múltiple de los ORFs correspondientes a cada *pif* (Clustal X,; Ghiringhelli P.D., no publicado). Las curvas se construyeron a partir de la línea consenso del alineamiento múltiple, empleando una estrategia basada en ventanas de longitud 17 desplazadas de a un residuo por vez. Se asignaron valores arbitrarios de +1 para la identidad y -0,5 para la ausencia de identidad. La sumatoria se normalizó por la longitud de la ventana y el valor resultante se asignó a la posición central de la ventana correspondiente. La línea de guiones corresponde al promedio de similitud global. Para el diseño de los primers se eligieron regiones con valores locales por encima de la media global y con características de secuencia adecuada. Para el alineamiento de *pif-4*, se incluyó una región adyacente no codificante y el gen contiguo codificante para *DNA helicasa*. Las flechas turquesas indican la región del alineamiento utilizada para el diseño de los primers y el *Sequence Logo* muestra la diversidad de secuencia en dicha región (Crooks *et al*, 2004).

Evaluación de los *primers* en virus representativos

Con el fin de validar el sistema en desarrollo, se eligieron representantes de cada uno de los grupos considerados. Dichas muestras fueron utilizadas para la realización de amplificaciones por PCR con el fin de establecer los parámetros óptimos del ciclado y para demostrar la viabilidad del diseño. Como miembros del Grupo I de *Alphabaculovirus* se tomaron por un lado a AgMNPV y AcMNPV, cuyas secuencias completas se encuentran en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y son considerados representantes de los linajes a y b dentro (*Jehle et al, 2006 [A]; Oliveira et al, 2006; Ayres et al*), y por otro a RanuMNPV y AgvaMNPV, virus caracterizados previamente en nuestro laboratorio pero de los que no se cuenta con la información de secuencia del genoma completo (*Rodriguez et al, 2011, 2012*). En tanto, las especies seleccionadas del Grupo II de *Alphabaculovirus* fueron SeMNPV y SfMNPV (*Caballero et al, 1992; Wolff, et al, 2008*), y CpGV y EpaGV para *Betabaculovirus* (*Luque et al, 2001; Ferrelli et al, 2012*), todos ellos con genomas completamente secuenciados.

En todos los casos, se partió de viriones ocluidos, a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de genoma viral. En primera instancia se evaluaron diferentes parámetros de ciclado térmico para la PCR, como parte de la optimización para cada par de *primers* dada la existencia de ambigüedades. Así, se lograron definir cuatro ciclados generales según la temperatura de hibridación de los *primers* necesaria para la obtención de productos. Estos fueron clasificados por colores: naranja, celeste, violeta y amarillo (sección materiales y métodos, página xx y tabla III.2). De esta manera y a partir de la optimización de 21 reacciones independientes, se logró unificar en cuatro ensayos distintos la obtención de todos los productos deseados.

	<i>pif-</i> 0	<i>pif-</i> 1	<i>pif-</i> 2	<i>pi</i> f-3	<i>pif-</i> 4	<i>pi</i> f-5	<i>pi</i> f-6
<i>Alp</i> <i>ha GI</i>	12 09 bp	10 51 bp	10 49 bp	3 62 bp	14 39 bp	8 88 bp	2 57 bp
<i>Alp</i> <i>ha GII</i>	82 2 bp	52 9 bp	35 5 bp	2 05 bp	19 23 bp	3 46 bp	2 65 bp
<i>Bet</i> <i>a</i>	11 45 bp	63 6 bp	93 0 bp	3 70 bp	29 20 bp	6 30 bp	1 83 bp

Tabla III.2. Tamaños promedio de los amplímeros. Se detalla el tamaño promedio en pares de bases esperado luego de la amplificación por PCR utilizando los *primers* correspondientes a cada grupo establecido. El tamaño escrito es el promedio de los calculados a partir de un análisis *in silico* utilizando todos los genomas representantes de cada grupo con genoma completo. Además, las celdas están coloreadas según el perfil de ciclado empleado para la reacción, según sea naranja, violeta, celeste o amarillo (ver apartado **materiales y métodos, página xx para más detalle**).

Los resultados de las amplificaciones se muestran en la **figura III.2**. Allí se pueden visualizar los amplímeros esperados. En algunos casos se obtuvieron también subproductos con longitudes no esperadas, probablemente debido a la degeneración de los *primers*. Tal vez esto podría corregirse ajustando aún más las condiciones de amplificación o con el uso de aditivos en la reacción de PCR, pero dado que los fragmentos de tamaño esperado aparecieron en todos los casos, se decidió proseguir con las condiciones de reacción previamente indicadas.

Una vez obtenidos los productos de PCR, el proceso continuó con su recuperación a partir de los geles, y el posterior clonado molecular para llevar a cabo las reacciones de secuenciación que permitieran verificar la identidad de los fragmentos. El posterior análisis reveló que los productos derivados de AcMNPV, AgMNPV, SeMNPV, SfMNPV, CpGV y EpapGV, contuvieron en sus extremos los *primers* sintetizados y lo polimerizado *in vitro* se correspondió con las secuencias esperadas para cada uno de los genes *pif*, mostrando así la utilidad de la metodología. En tanto, lo mismo ocurrió cuando se utilizaron como molde RanuMNPV y AgvaMNPV, clasificados previamente mediante la aplicación de la metodología propuesta por Jehle y colaboradores, y dónde no se contaba con secuencia previa de *pifs* (salvo para *p74*) (Rodríguez *et al*, 2011, 2012). En tal sentido, y dado la

novedad del resultado, en las **figuras III.3** y **III.4** se detallan las secuencias para cada una de las regiones amplificadas en estos dos baculovirus.

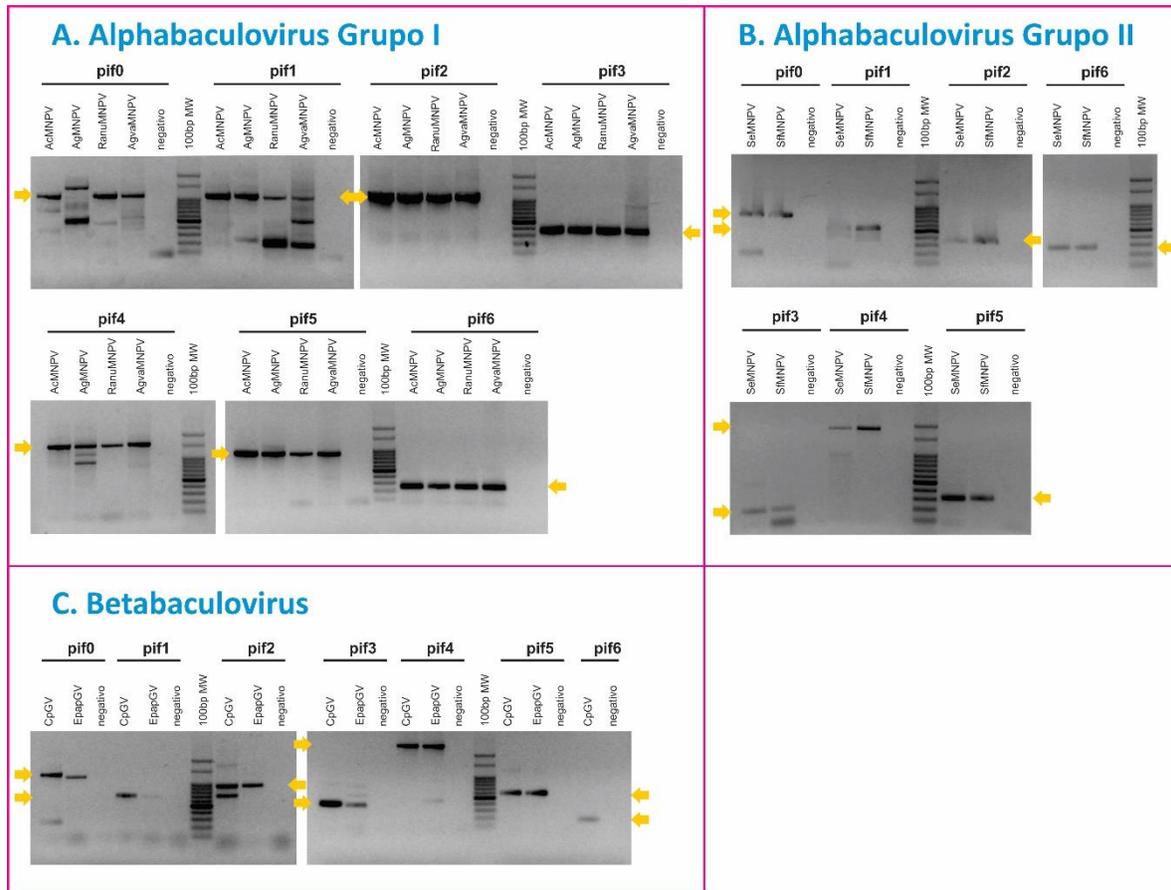


Figura III.2. Amplificaciones con los primers *pif*. Electroforesis en gels de agarosa 1% de los productos de PCR generados utilizando los diferentes pares de *primers* diseñados para cada *pif* y para cada grupo. Se eligieron miembros representantes de cada grupo para probar la especificidad de las reacciones y para obtener los perfiles de ciclado óptimo para cada caso. Las flechas amarillas indican el amplicero esperado en cada caso, según las predicciones realizadas *in silico*.

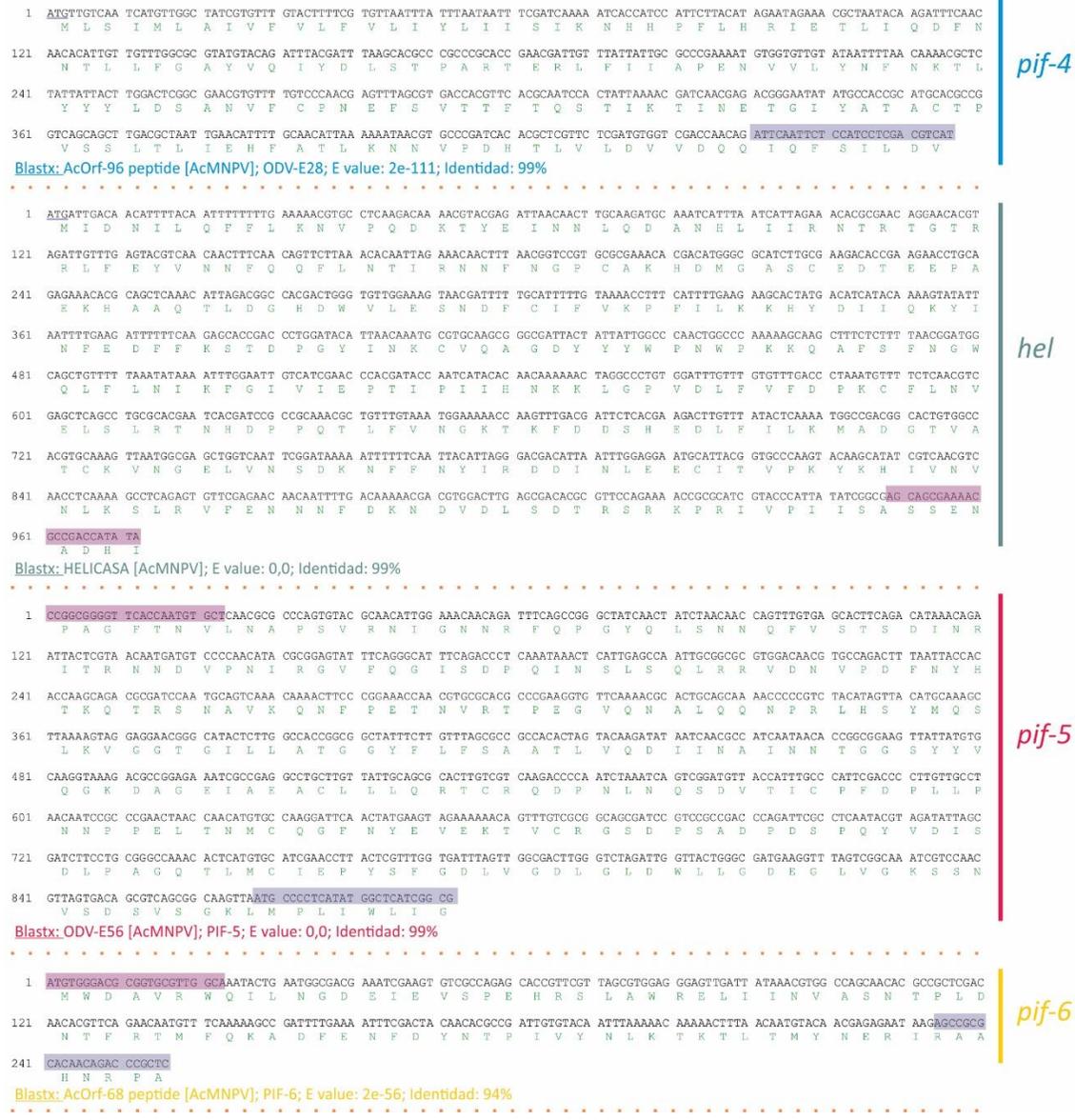


Figura III.3. Secuencias parciales de los genes *pif* de RanuMNPV. La figura resume la información de secuencia nucleotídica obtenida luego de amplificar cada región génica con los *primers* generalistas diseñados para los *Alphabaculovirus* del Grupo I. El producto de PCR fue clonado en el vector *pGem-T Easy* y luego secuenciado por el servicio de la empresa *Macrogen* (<http://www.macrogen.com/>). Como los *primers* diseñados para *pif-4* contenían datos de secuencias de este gen y del gen codificante para la *DNA helicasa*, se incluyó este último en la figura por ser información de secuencia novedosa. Se indica la secuencia del *primer fw* con un recuadro rosado, y del *rev* con un recuadro violeta. A la derecha se indica el nombre del gen parcialmente secuenciado y debajo de cada uno, la identidad obtenida al realizar un BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1 GCGGGTGG AGGCATAGC TGCTACCCGT TTCACGAGAC GGGCGTGGT ACCAACCAAA CTCCTTTGG GTACACGCAA ACTTCGGAAA CCAGGTGGCG GTACGCGCAG CCAGCGCTGT
R V R G M S C Y P F H E T G V V T N Q T P F G Y T Q T S E T S V A Y A Q P A C
121 ACCATTGGA CGCGCGCC GCATGCGCG AGGGCGCCGA AACAAGTG CAATCGCCCG AATTGACGTA CAGCTCAAC AACCGTGGC TGTGGTGA TTCCACGTCC AAAATGTAT
Y H L D R A A A M R E G A E N K V Q S L P E L T Y T L N N Q C V L V D S T S K M Y
241 TCAACGATCC CTATCTACGC ACCGAGGAG ACACCATCAT GGGCGTGGAC GACGTGCCCG GTTCAACGT GCGCCCGAT CCGGACCTT TGTTCOCGA ACGTTCAG GGGGAGTCA
F N S P Y L R T E E H T I M G V D D V P A F N V R P D P D P L F P E R F K G E F
361 ACGAGGGTA TTCCCGCCG TTTGACGCG AACTCGTCAA CCGCGCTGC TCGTTGCGTT GGTGGAGTG GTTGATCGGG TTTGTTGGG GCGACAGAT ATACGTGACG TTTAAATGT
N E A Y C R R F P G R E L V N G G C S L R W W E S L I G F V L G D T I Y V T F K M
481 TGACAAACA CATTTTTCA GAGTGGCGA ATTATGACTA TACGGCGCG TGCGCGTGC TGCCGCGCG ACCCACGTC GACTGGAATG TGTGTTGGC CGAGTGGCG CCGCTGGCGG
L T N N I F S E L R N Y D Y T A P S P L L P P R P T V D S N V V L A E W R A V R
601 ATCGCGCAT AGATTGGAG TTTGAAAAC ATTTTCCGA AACCGCCAG CTGACCAGC TGCGCATGA AACGCAAGC GCGCTTTGA TGCAATGTC GTACACGGCC GAAACGGTT
D R A I D W D F E K H F S E E T P T L H Q L G M E T H D G V L M Q L S Y T A E T G
721 TCGCAAGAG TCCATCGCG TACTGCGCG GAGCGCTGT GCGCTGCTG CGAGCGATC GAGCGATCAA TCGAGTGGC GACGGTGGC ACGATGATT GGAGACAATC GTCTCGATG
F S K S P I A Y S A R G A V R V V R A D R A I N R A G D G G D D D L E T I V S M
841 TCATAGAGA GTACGGCTC GTGTGGTGA TCGCGCGCA CATCGGTTT GATATGATT TGACCGTTT TAAACAATG CTGAAAAAA TCAACACAC GCTGATTCG CCGCTCAAC
F I E Y A L V F G I A A D I G F D M I L T A F K T M L K K I N T T L L A A K
961 GCATGTGTG GAGCAGCTT AACGTTGTA CGGTGCGAAT GCTGGGGAG ACGTACAAG CCGCGTGTG GCACCTCATC AACACGATTG CCGTCAAAAC TGTGAGCAG CCGCCAAAG
R M L V S T S K R V T V R M L G E Y K A A L V H S I N T I A V K T L S T A A K
1081 CAATGACAG CATTGCAATC AAGCCAGTT CCGTGTGGG CTTGGCGCTC ATTTTGTCA CGCTGGCGGA TGTGTGCTG GCGTATGGG ACCCTTCGG CTACACACAC AAGTTTCCG
T M T R I A I K A S S V V G V A L I L F T L A D L V L A L W D P F G Y N N H F P
1201 GCGGTTTC
R E F

pif-0

Blastx: P74 [Agraulis vanillae MNPV]; E value: 0,0; Identidad: 100%

1 GGTGAGGGC TGCCCACTG CCAAGTTGTT GATGAGAAA CGATCTGCA GATCGCGAC GCGGACGCA ACGACAGCC CATCACCATT CCGCGGGCG AGTCGATTTG TTTTGGCGT
R E G L A N C Q L F D E E T I V Q H R D A D G N E Q P I T I R A G E S Y C F A L
121 GACCGGAAC GGGCGCTC GTGCAACCC AACACGGGCG TGTGGTATT GCGCGAGAC GAACGGGGT TTGCGTGTG GTGCGATTG TTGCGACCG GATTGGTAC GCAATGAA
D R E L A R A S C N P N T G V W L L A E T E T G F A L L C S S C L R P G L V T Q T L N
241 ATGTACAAG ACTGCAACT CCGGTGCGG TGTGCGCCG ACGGACGAT CCGCGATTG AACCGGACT TCGTGTGCT GTGCAACAG GGCTACGTA CGGATTAGA TGCCGCCACC
M Y E D C N V P V G C A P H G R I A D L N G D L R C V C N E G Y V S D Y D A A T
361 GAACCGCGT TCIGCGGAC GCACAGGCT GCGGACGTC TGTTCGACA GACTTTTTT CCGCGCGCG CCGTGGCGGA CCGGCGAGT CCGCTGACC ATCCGGECT CAACGATTAC
E T F F C R F H I V R D V L F D E T F F F R A F C A D G Q V R L D H F G L N D Y
481 TATCGTGGT ATTTTGGCT GGACAGGTT TGGTGGVGG ACCCTTGTT GGTAGACCG ATCAGCGGG GAGCGAGTC GGGCGTTTG TTTACACA CCGTGGCAG CCGGGAAGT
Y R R Y F R L D D V C S V D P I S G R R T S G R L F H N T L A N G E V
601 GTGAACGGT GCAACTGCC GCGGTGCGC GGCTTACTG CCGTGTCAA CCGCCACAG CCGGACAAG GCATGGTGG CCGCGGCACA CCGACCGTGG CCAACCGGT TGTGCAACCG
V N G C N C P A V D G L L P V F N R H T A D N G M V R R G T R T V A N A C L Q F
721 TTCACGTCG ACATGCTTCG CTTCAACAT GTGGAATACA AATTTTCTG GCGCGCTCC GACCAACCG AGTGGCGGA CCGGCAATG GTGTTCAAG CCACGTCG CCACTGAGC
F N V H M L A L Q H V D Y K F F W A R E D H A E V A D A D M V F Q A T V A Q L S
841 GACCAAGCT ACCGCAACT GTGTACCGG TTGCTGACC CACACCGCA CAGCGGGGA ACGAGTTGG CCGCGAGCG CCGTGTGAAA ATTTCCGTT CTTACGAC CCGCTCAAA
D Q R Y R T M L Y P L L T P H P D T A G T T L A G S G V L K I S V S Y D T A L K
961 AACATGAGC TGCCCGCTC GCTGTGCTG CTGTCAATG TGAAGAGCG CTCACGTCG CAGCCGTTT GCTTTTCCC CCGCGCAGA CG
N M T L P A S L F V L F K L K E R S T S Q P V C F S P G A G

pif-1

Blastx: CFDNVgORF114 [CFDEFMNPV]; PIF-1; E value: 0,0; Identidad: 85%

1 ATGTATCAAG TACTGATGC GCTTTTGTG TTTGGCTGT TTTATATACT TATGTGGCT TTTTATOGAG CGTTTGCCA CACACAGCAG GCACAACAAA ATTACAACA AACGTGACA
M Y Q V L I A L F V F A L F Y I L M W P F Y R A F V H I Q H G Q Q N Y N E T L T
121 AACAGATGG AGTACATGA GGGGTTATG CCGCGCAGC ACTATGTTCC CATGGAGAG TACCCTCGG TCGTTCGA CACAACCTC GGCAGCTGG CCGCGGAATC TTTCAATGC
N R M E Y I E G V M R R R H Y V P M E T L P S V R F D T N L G T L A G E S F K C
241 ATGCTGTGC CTCTGTACT GAGCGAATT GATTTGCCCG TGTTCGACTG CAGCCAGTT TCGGAGGATC CGAACGAGT GTATTTTTTT GTGGCGAGC GGCACAGTA CGTGTGAAC
M S V P L Y V S E I D L P L F D C S Q V C E D F N A V Y F F V G D G D T Y V V N
361 GGGCAACAAC TGCCACGGG CCGTACTGC ACCACAACA GTGTGGCGG CCGTCAACT CCGGAAACA GCGTGTGCT CATGAACCTG AACCACTGGA CCGTCACTGC CCGGACCGC
G H K L A T G G Y C T T N S V P R D C N R E T S V V L M N L N Q W T C I A E D P
481 CCGTACTTG CCGGCAACA CAACATGAG CAGCTGCGG GCGGCAACA TTTGACCAA ATTATCGCC GCGAGAGGA TCGAAACATC TGTTCGATC GACTGTGGG TCGGAAGTC
R Y F A G T N N M T Q L A G R Q H F D Q I M P G Q S D R N I L F D R L L G R E V
601 AACATTGCA CCAACGTT TCGTGCAT TGGACGAGT TGTGGCGGA CCGTGGCGG CCGTGTGAAA TCGTTCGAA CCGCGCGAC AACACAACA ACCTCATGTT TGTAGTCCG
N I A T H T F R R N W D E L L A D G S R R F E H R C N A R D M N N N L M F V S F
721 CTTAATCCC TCGAGTGTG CCGCAAGTG TGCACCAAG TGAATACGT CCACTCCACT GTTCGGCGG TGTTCGAA CCGCGAGTGC GATTGCGG CAGAGCGGT GACGCGGT
L N P L E C L P N V C T N V N Y V H S T V R P V F E S G E C D C G D E A V T R V
841 CCGCAATG TGCCCGGGA CCGCACCTC ATGTGCGCA GCATTTGGA CCGTTCGAG GTCCGACCG CCGTGGGTA GAGTGCATA ACAGCAGC GTCGATTAC
R H I V P G D P T S M C A S I V D G L D V A T A S H R F R V E C V N T H T S I N
961 AATTTTCCA CCAACAAC CCGTGGCGG CCGCACCTC TGCAGGAA CCGGATGCG CCGTTCGCT TCGAAGTACC AGGTGCT
N F S N K L L C F V D T F D S N T D A A F A F E V P G S

pif-2

Blastx: PIF-2 [Dasychira pudibunda NPV]; PIF-2; E value: 0,0; Identidad: 87%

1 GCGCGGATC AGCAGTGGC AGACAAGTC GTGGTGGCA CCGCGGCCAA CGACCTGAGT TCGCAAGATG GGTTTGTAG GCGCACCAAC CCGTGGCGG CCGGAAAGCC GACTCGGAC
V T D Q Q C R D K C V V A S A A N D L S C D N G F C S A T N A L A A G T P T P D
121 TCGGGAAAG ATTTGATCC GGGCGGGC CTTGTCGCG TGTACAGCG CCGCGCGAT TTTGCGTTT CACAACATG CCGTCAAGC TACAGAGAT TGTGAGAGA TACGGCGCT
S G N D C D P A L G L L R V Y T A A G D F V V S Q T C V S T Y R D L V D D T G A
241 GCGGACCTT ACCTTTCGA CCGTGGCGT TGGCACTCA ACTTGGAC GACGAGTTT TCGCGCACG CCGTGGCGG CCGCGAGGAC TACGAAAAAT TGCATTTCC CCGACACTG
A R P Y L C D G G V L R L N L D T T Q F S A D A C T C A D G Y E K L L F P H T A
361 CTGGC
L

pif-3

Blastx: PIF-3 [Choristoneura rosaceana alphabaculovirus]; E value: 6e-64; Identidad: 80%

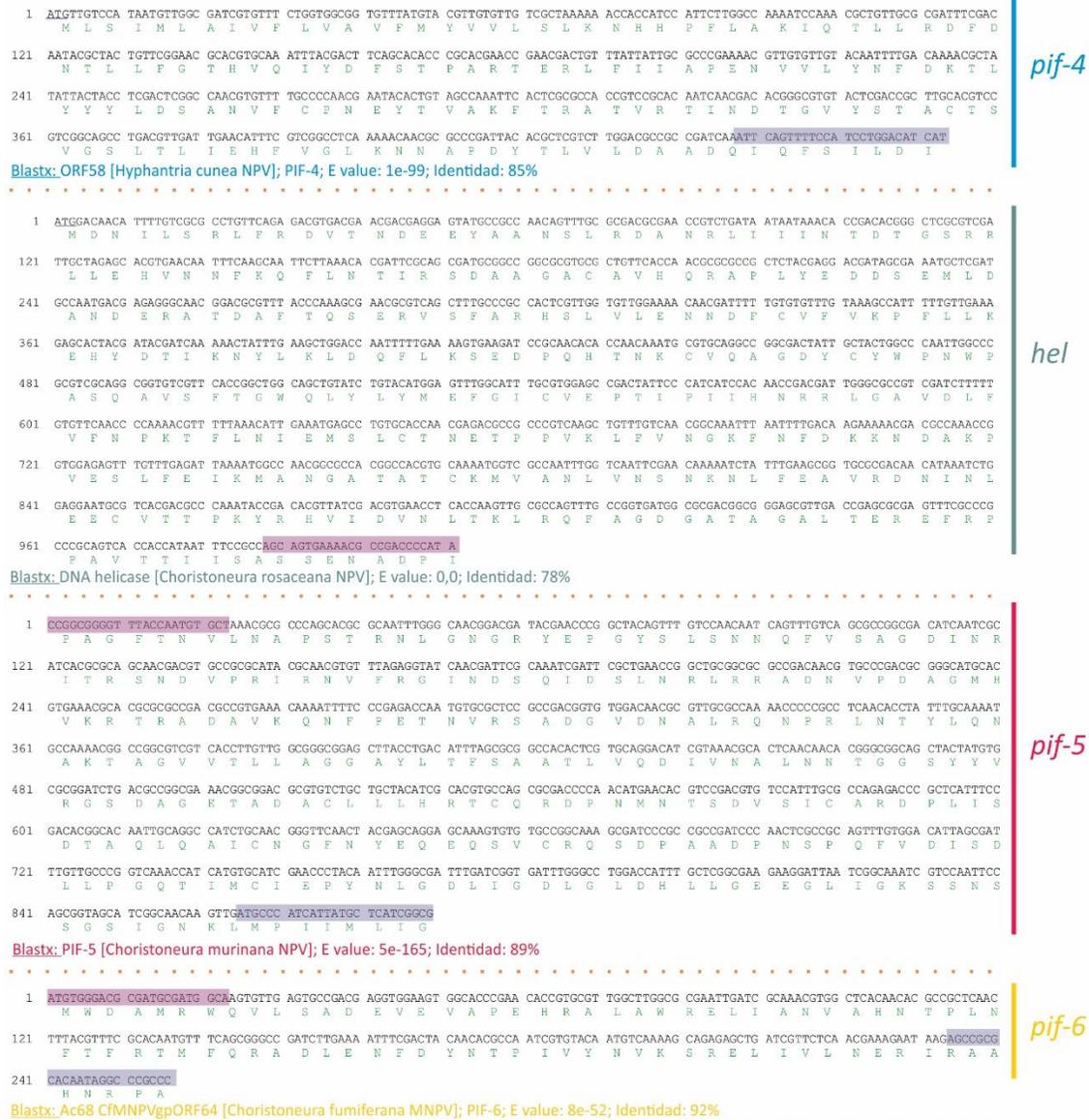


Figura III.4. Secuencias parciales de los genes *pif* de AgvaMNPV. La figura resume la información de secuencia nucleotídica obtenida luego de amplificar cada región génica con los *primers* generalistas diseñados para los *Alphabaculovirus* del Grupo I. El producto de PCR fue clonado en el vector *pGem-T Easy* y luego secuenciado por *MacroGen* (<http://www.macrogen.com/>). Como los *primers* diseñados para *pif-4* contenían datos de secuencias de este gen y del gen codificante para la *DNA helicasa*, se incluyó este último en la figura por ser información de secuencia novedosa. Se indica la secuencia del *primer fw* con un recuadro rosado, y del *rev* con un recuadro violeta. A la derecha se indica el nombre del gen parcialmente secuenciado y debajo de cada uno, la identidad obtenida al realizar un BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Inferencia filogenética obtenida con el sistema desarrollado

Para realizar la validación del sistema en cuanto a la determinación de relaciones filogenéticas y al posible uso como un método de asignación taxonómica para *Baculoviridae*, fue necesario compararlo con el método vigente (Jehle et al, 2006 [B]). Este análisis fue realizado *in silico* utilizando los datos de secuencia genómicas completas presentes en la base de datos *GenBank*. Una vez obtenidas las colecciones de secuencias aminoacídicas parciales derivadas de los hipotéticos productos de PCR (tanto para los 7 genes *pif* como para *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina/granulina*), se realizaron los alineamientos múltiples correspondientes, para luego generar los concatenados de secuencias para cada colección (Figura III.5).

Como puede observarse, las inferencias filogenéticas obtenidas usando los dos grupos de genes fueron equivalentes en los nodos no triviales, validando en consecuencia la utilidad del sistema propuesto para la asignación taxonómica en *Baculoviridae*. Se puede observar, por ejemplo, la correcta separación entre los linajes a y b dentro de los miembros del Grupo I de *Alphabaculovirus*, previamente reportado (Jehle et al, 2006, Miele et al, 2011). A su vez, el resultado fue congruente con la inferencia filogenética hecha con las secuencias aminoacídicas completas de las proteínas PIF (Figura II.1.E). La única diferencia notable se observa en un miembro del género *Betabaculovirus*. En el análisis basado en la secuencia completa, AgseGV aparece distantemente relacionado con los otros miembros de este género (Figura II.1.E), mientras que con el análisis de secuencia parcial de estas proteínas, AgseGV se encuentra vinculado a PxGV (Figura III.5. E). Del mismo modo, el análisis de la secuencia aminoacídica parcial de los genes *lef-8*, *lef-9* y *granulina* (en este caso), asocia de manera más cercana a este virus con los demás (Figura III.5.F).

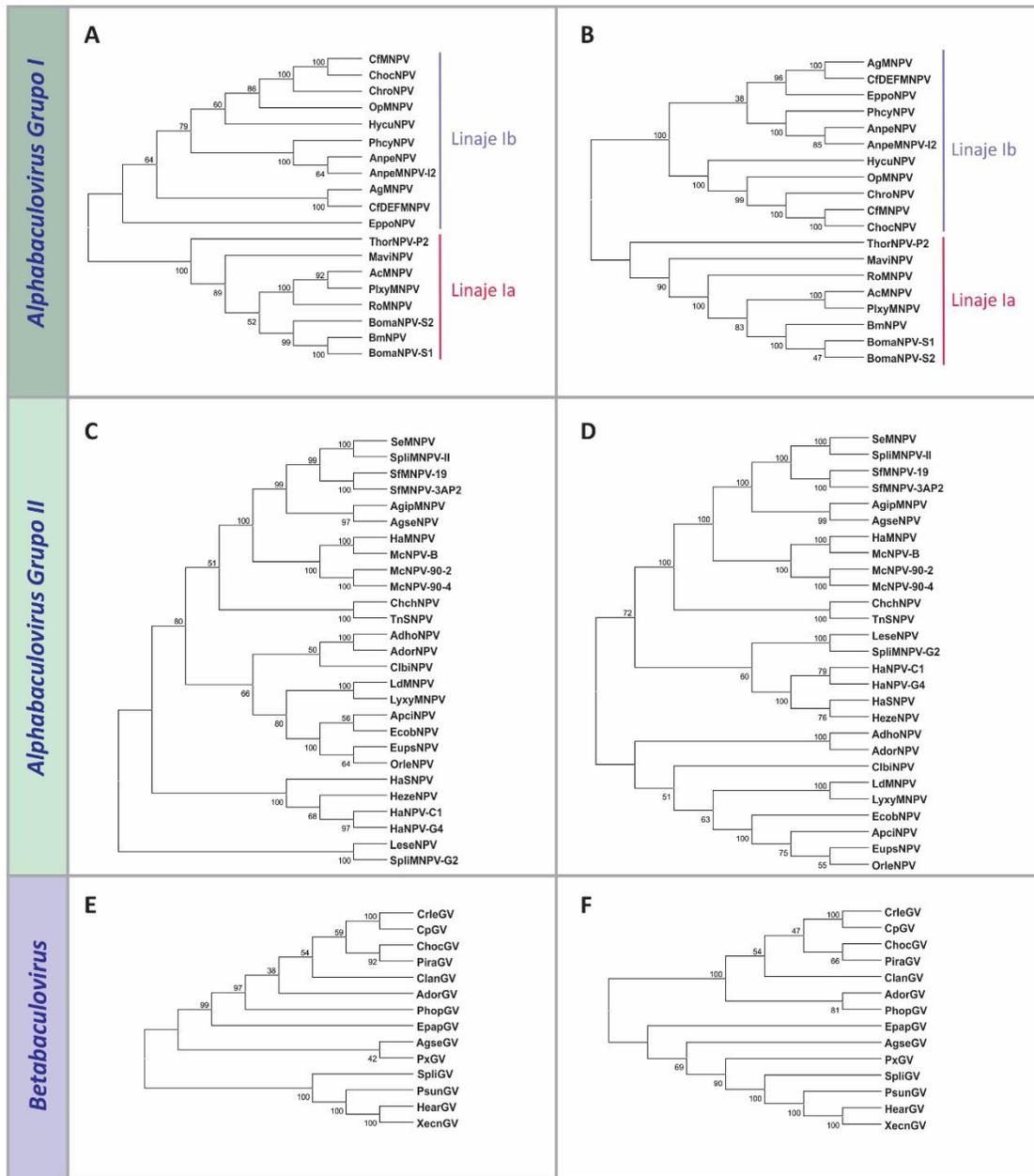


Figura III.5. Validación del sistema de asignación taxonómica basado en concatenados de fragmentos de secuencias PIF. Cladogramas realizados con concatenados aminoacídicos alternativos para los géneros *Alphabaculovirus* (Grupo I y II por separado) y *Betabaculovirus*. Las inferencias filogenéticas se realizaron con el programa Mega-6 (Neighbor Joining tree; Bootstrap = 500; Modelo JTT; Distribución Gamma calculada para cada set de datos; pairwise deletion). **A, C, E-** Árboles correspondientes al concatenado de secuencias de las proteínas PIF. **B, D, F-** Árboles correspondientes al concatenado de secuencias de las proteínas Lef-8, Lef-9 y Poliedrina o Granulina según corresponda (Jehle *et al*, 2006 [B]).

Teniendo presente que se obtuvo la información de secuencia parcial de los genes *pif* para los virus RanuMNPV y AgvaMNPV, se realizó un análisis filogenético incluyendo a estas especies, a fin de obtener las relaciones filogenéticas con los miembros del Grupo I de *Alphabaculovirus* (Figura III.6). Los resultados indican una cercanía entre RanuMNPV y AcMNPV, resultados congruentes con los obtenidos previamente (Rodríguez *et al*, 2012). Tanto las comparaciones de secuencia de los genes evaluados como el comportamiento biológico del virus, lo vinculan muy cercanamente con AcMNPV, ubicándolo en el linaje b del Grupo I de los *Alphabaculovirus*. Por otro lado, AgvaMNPV, también caracterizado previamente, se incluyó en el linaje b del Grupo I de los *Alphabaculovirus*, siendo coincidente con los resultados obtenidos al analizar la secuencia parcial de los genes *pif*.

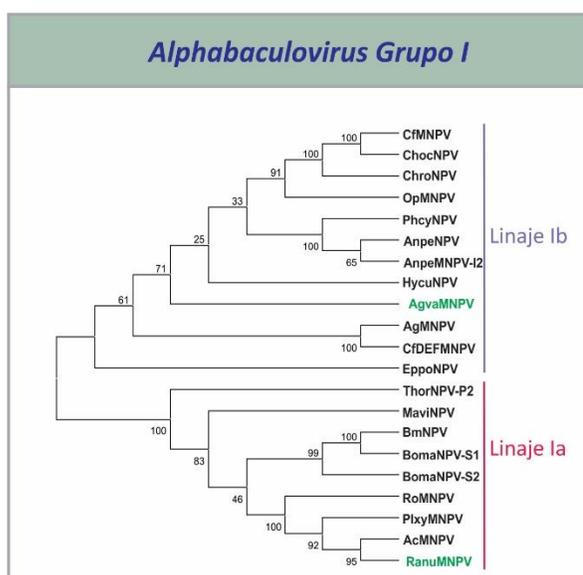


Figura III.6. Inferencia filogenética aislados RanuMNPV y AgvaMNPV. El árbol corresponde al concatenado de secuencias de las proteínas PIF de los virus del Grupo I de los *Alphabaculovirus*. Los parámetros usados fueron equivalentes a los indicados en el pie de figura III.5. Se resaltan en verde los virus RanuMNPV y AgvaMNPV

Estudios previos del aislamiento viral RanuMNPV, permitieron clasificarlo como una variante genotípica del baculovirus AcMNPV. Las secuencias parciales de los genes analizados de *lef-8*, *lef-9*, *catepsina* y *quitinasa*, otorgaron una identidad del 100% con la secuencia de AcMNPV (Rodríguez *et al*, 2011). Sin embargo, los ensayos biológicos en larvas revelaron un rango de hospedador alterado con respecto al de AcMNPV. Dado que la infección primaria es crucial en la definición de la capacidad infectiva y que el complejo PIF es el responsable de dicha función, se realizaron alineamientos con la información de secuencia aminoacídica parcial obtenida en este trabajo de tesis (Figura III.7). Los resultados

muestran una alta conservación de los residuos aminoacídicos de las regiones de las proteínas evaluadas. Se detectaron 10 cambios no conservativos y 11 conservativos en total, la mayoría de los cuales se hallaron en PIF-0 y PIF-6. La región evaluada de PIF-4 resultó ser la más conservada, con solo un cambio conservativo, así como también la región de PIF-2, con solo un cambio no conservativo. Si bien las diferencias fueron mínimas, no es posible predecir si las mismas tienen influencia en la especificidad de la infección. Se sabe que las proteínas PIFs conforman un complejo en la envoltura de los ODVs (*Peng et al, 2010, 2012*), pero no se conoce la forma en que las mismas interactúan, o qué residuos aminoacídicos influyen en la especificidad de la infección. Tampoco se conoce el mecanismo específico por el cual ocurre la interacción entre la maquinaria PIF y el hospedador, por lo que un pequeño cambio podría alterarlo. Tal es así que estudios previos demostraron que la sustitución de sólo 3 aminoácidos en posiciones específicas de la proteína DNA Helicasa de AcMNPV por otros presentes en el gen homólogo de BmNPV, permitió ampliar el rango de hospedador a larvas de *Bombyx mori* (*Croizier et al, 1994*). Por ello, es necesario continuar con estudios moleculares, para así establecer si dichos cambios podrían influir en el rango de hospedador de los virus.

<p>PIF-0</p> <p>ACN RNN RGCVSMSCYPFHEITGVVSNTPFMVMTSETSVGYAQFACYHLDRRAAMREGAETQVQSA RGCVSMSCYPFHEITGVVSNTPFMVMTSETSVGYAQFACYHLDRRAAMREGAETQVQSA *****</p> <p>ACN RNN ERFVTLDNKCLLDVSLKMYFNSPYLRTEHTIMGVDDVFAFVRFPPDPPLFERKGF EERYTLDNKCLLDVSLKMYFNSPYLRTEHTIMGVDDVFAFVRFPPDPPLFERKGF *****</p> <p>ACN RNN NEAYCRRFGRELFGNGCSFRMRSLIGFVLGDTTIVTFKMLANNIFSELRFDFYKAPSSI NEAYCRRFGRELFGNGCSFRMRSLIGFVLGDTTIVTFKMLANNIFSELRFDFYKAPSSI *****</p> <p>ACN RNN LPPRFVDSNALLAQWRSVRDNATDLEFEKLFNKNFPLNDLGMIVNGSFVQIYTAETGF LPPRFVDSNALLAQWRSVRDNATDLEFEKLFNKNFPLNDLGMIVNGSFVQIYTAETGF *****</p> <p>ACN RNN TKTPAIAYNRGNERARVEHEALDRSISDQDLESIIISFLEDYALVGIATDIGDFMLMS TKTPAIAYNRGNERARVEHEALDRSISDQDLESIIISFLEDYALVGIATDIGDFMLMS *****</p> <p>ACN RNN GFKSMLKINFTSLIPMHHMLLSTTRRVVRLGETYKALVHSLNVAIAKTLIVAKAL GFKSMLKINFTSLIPMHHMLLSTTRRVVRLGETYKALVHSLNVAIAKTLIVAKAL *****</p> <p>ACN RNN TRIATQASSIVGIVLILLLTADLVLAALWDFGYNNMPREF TRIATQASSIVGIVLILLLTADLVLAALWDFGYNNMPREF *****</p>	<p>PIF-1</p> <p>ACN RNN EGLANCOQLEDETVVMRGDDGQEHETLRAGEAICLALDRERARSCNFWGVWLLAETE EGLANCOQLEDETVVMRGDDGQEHETLRAGEAICLALDRERARSCNFWGVWLLAETE *****</p> <p>ACN RNN TGFALLCNCLRPLGLVQLNMVEDCNVPGCAPHGRI DNI NSAS IRCVCDGVSVDYNADT TGFALLCNCLRPLGLVQLNMVEDCNVPGCAPHGRI DNI NSAS IRCVCDGVSVDYNADT *****</p> <p>ACN RNN ETPYCRFRTRVDRVMYDESFPRAPCADQGVRLDHPALNDFYRHRFRLEIDICVLDPCSDVP ETPYCRFRTRVDRVMYDESFPRAPCADQGVRLDHPALNDFYRHRFRLEIDICVLDPCSDVP *****</p> <p>ACN RNN ISGQRTSRLFHQPTVNGVINGCNCPADGLLPVFNHRTADTGMVRSQDRVANACLQP ISGQRTSRLFHQPTVNGVINGCNCPADGLLPVFNHRTADTGMVRSQDRVANACLQP *****</p> <p>ACN RNN FNVHMLSLRHVDYKFWGRSDHTEPADAMVFOANVNOLESHERYRALLYSLESHPDVTE FNVHMLSLRHVDYKFWGRSDHTEPADAMVFOANVNOLESHERYRALLYSLESHPDVTE *****</p> <p>ACN RNN IVTVMGVMKISVSYDTLKNILLPSSVFLRFKESGTAQVCFPGG IVTVMGVMKISVSYDTLKNILLPSSVFLRFKESGTAQVCFPGG *****</p>
<p>PIF-2</p> <p>ACN RNN YRVLIVFLFVFLYIVYQFPYQAYLHGHQAQDYNLTDLDRMDYIESVMRRHYVPIEAL YRVLIVFLFVFLYIVYQFPYQAYLHGHQAQDYNLTDLDRMDYIESVMRRHYVPIEAL *****</p> <p>ACN RNN FAIRFDNLGLAGDTIKCMSVPLFVSDIDLPMFDCSQICDNPSAAYFFVNETDVFVVG FAIRFDNLGLAGDTIKCMSVPLFVSDIDLPMFDCSQICDNPSAAYFFVNETDVFVVG *****</p> <p>ACN RNN HRLTVGGYCSNLSLFRNCRNRETSVILMSLNQWTCIABDFRYAGTDNMTQLAGRQHFRI HRLTVGGYCSNLSLFRNCRNRETSVILMSLNQWTCIABDFRYAGTDNMTQLAGRQHFRI *****</p> <p>ACN RNN MPQGSRRVLFDRLLGRENVVTNTRFRSDELLEDGTFRFEMRCNARDNNMLMFVNFPL MPQGSRRVLFDRLLGRENVVTNTRFRSDELLEDGTFRFEMRCNARDNNMLMFVNFPL *****</p> <p>ACN RNN NPLECLPNVCTNVSNVHTSVRPFVETGECCDGEAVRTHIVPGDRISMCASIIDGLDK NPLECLPNVCTNVSNVHTSVRPFVETGECCDGEAVRTHIVPGDRISMCASIIDGLDK *****</p> <p>ACN RNN STASRYRVECVNLVTSILNYSNNKLLCPSDTDFDNTDAFAFEVPG STASRYRVECVNLVTSILNYSNNKLLCPSDTDFDNTDAFAFEVPG *****</p>	<p>PIF-3</p> <p>ACN RNN VTDOOQRDNCVSSAANEELTCQDGFPCNASDALVNAQAFDLECDPALGLVHVSAGGDFV VTDOOQRDNCVSSAANEELTCQDGFPCNASDALVNAQAFDLECDPALGLVHVSAGGDFV *****</p> <p>ACN RNN VSGTCVSTYRDLVDDGTFRPFLCNDGRMLNMLNTVQFSPDACCSSGVEKMLFRHTAL VSGTCVSTYRDLVDDGTFRPFLCNDGRMLNMLNTVQFSPDACCSSGVEKMLFRHTAL *****</p>
<p>PIF-5</p> <p>ACN RNN AGFTNVLNAPSVRNIGNRFQFGYQLSNQFVSTSDINRITRNDVFNIRGVQGISDPO AGFTNVLNAPSVRNIGNRFQFGYQLSNQFVSTSDINRITRNDVFNIRGVQGISDPO *****</p> <p>ACN RNN INSLSLRRVDNVPDFNYHTKQTRSNAVQNFPETNVRTPEGVQNALQQNPRLSYMSQL INSLSLRRVDNVPDFNYHTKQTRSNAVQNFPETNVRTPEGVQNALQQNPRLSYMSQL *****</p> <p>ACN RNN KVGGTGILLATGGYFLFSAATLVQDIINAINTGGSYYQKDAEIAEACLLQRTCRQ KVGGTGILLATGGYFLFSAATLVQDIINAINTGGSYYQKDAEIAEACLLQRTCRQ *****</p> <p>ACN RNN DPNLQSDVTTICFPDPLLPNNPELNNMCQGFNYEVEKTVCRGSDPSADPDSQVYDID DPNLQSDVTTICFPDPLLPNNPELNNMCQGFNYEVEKTVCRGSDPSADPDSQVYDID *****</p> <p>ACN RNN LPAGQTLMEIEPYSFGDLVGLDGLDWLGLDGLVGSNSVSDSVSGKLMPIILIG LPAGQTLMEIEPYSFGDLVGLDGLDWLGLDGLVGSNSVSDSVSGKLMPIILIG *****</p>	<p>PIF-4</p> <p>ACN RNN MLSIMLAIVFVFLVLYLIISIKNHHFPLHRIETLIQDFNNLLFGAVQIYDLSFPART MLSIMLAIVFVFLVLYLIISIKNHHFPLHRIETLIQDFNNLLFGAVQIYDLSFPART *****</p> <p>ACN RNN ERLFIIAPENVVLYNFKTLYYLDSANVFCNPEFSVTTFTOSTIKTINETGIYATACTP ERLFIIAPENVVLYNFKTLYYLDSANVFCNPEFSVTTFTOSTIKTINETGIYATACTP *****</p> <p>ACN RNN VSSLTLEHFATLKNNVPHDTLVLDVDDQIQFSILD VSSLTLEHFATLKNNVPHDTLVLDVDDQIQFSILD *****</p>
<p>PIF-6</p> <p>ACN RNN WESIRWQILNGDEIEVSEHRSIARRELIINVASNTPLDNTFRFMQKADPENFDYNTPI WDVAVRWQILNGDEIEVSEHRSIARRELIINVASNTPLDNTFRFMQKADPENFDYNTPI *****</p> <p>ACN RNN VYMLKTKTITMYNERIRAAANRP VYMLKTKTITMYNERIRAAANRP *****</p>	

Figura III.7. Comparación de secuencias PIFs de AcMNPV y RanuMNPV. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas codificadas por las regiones amplificadas y secuenciadas con los primers generalistas para los *Alphaculovirus* del Grupo I. El alineamiento se realizó con el software T-Coffee (PSI-Coffee; <http://tcoffee.org.cat/>). ACN corresponde a las secuencias de AcMNPV y RNN a RanuMNPV. Los cambios no conservativos se resaltaron en naranja, mientras que los conservativos, en amarillo y verde claro, según fueran menos conservados (.) o más conservados (:), respectivamente.

Por otro lado, a partir de un análisis de variabilidad de secuencia aminoacídica de 31 *core proteins*, se deduce que las proteínas PIFs tiene un grado de conservación de secuencia variable, siendo PIF-2 la más conservada y PIF-6 la más variable (Figura III.8). Mientras que

LEF-8 y LEF-9, presentan un alto grado de conservación (similar al de PIF-2), el resto de las proteínas PIF son más divergentes en la familia *Baculoviridae*, probablemente por su estrecha asociación con la evolución de los hospedadores. Esto hace al sistema propuesto más robusto, ya que incluso podría utilizarse en el estudio evolutivo de genotipos de una misma especie, tal el caso de RanuMNPV. Cabe destacar que el análisis fue llevado a cabo con 31 de las 37 *core proteins* actualmente aceptadas (Miele et al, 2011). Las 6 nuevas *core proteins* fueron descritas al realizar una búsqueda más exhaustiva y resultaron ser las menos conservadas dentro del este grupo dentro de la familia (Garavaglia et al, 2012), por lo que el análisis de variabilidad de las mismas resultaría alto, quedando ubicado a la izquierda del gráfico de la **figura III.8**.

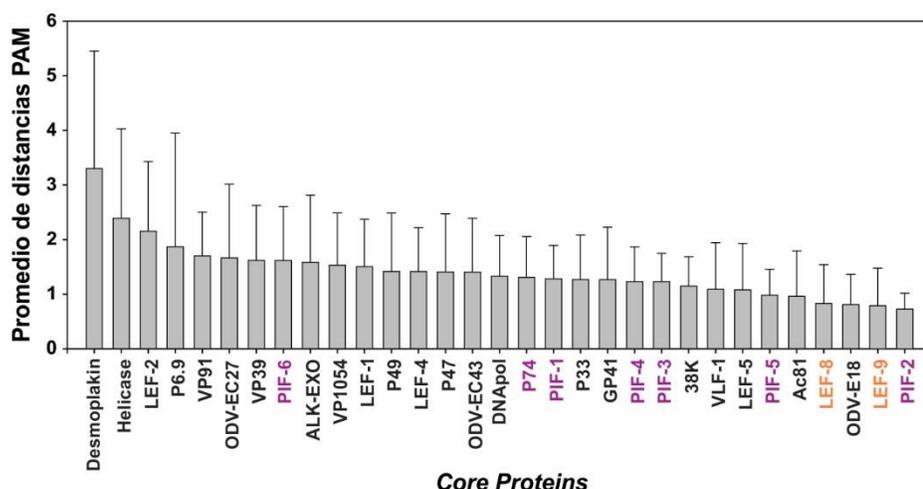


Figura III.8. Variabilidad *core proteins*. El gráfico representa la variabilidad de la secuencia aminoacídica de 31 *core proteins* descritas en la familia *Baculoviridae*. Los histogramas muestran las distancias promedio PAM (*Point Accepted Mutation*) 250 para cada *core gen* con su correspondiente desvío estándar (Adaptado de Miele et al, 2011).

Comparación de matrices de distancias entre el sistema PIF y el vigente

Con el fin de analizar las distancias entre las especies analizadas por el método basado en la secuencia parcial de genes *pif* con el sistema de caracterización vigente,

basado en las secuencias parciales de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina* o *granulina*, se realizaron matrices de distancias a partir de alineamientos de las secuencias nucleotídicas parciales y concatenadas, aplicando el modelo de sustitución Kimura-2P, usando el programa MEGA 6 (*Jehle et al, 2006; Tamura et al, 2013*). Se compararon las distancias

obtenidas con cada método y para cada grupo definido: Grupo I y II de *Alphabaculovirus* y *Betabaculovirus* (Tabla III.3-5).

Cálculo de distancia basado en Kimura 2P para el concatémero de amplicones *lef8*, *lef9* y *polh/gran* (*Alphabaculovirus* Grupo I)

	ACN	AGN	AP2	APN	AVN	BMN	BO1	BO2	CDN	CFN	COR	CRN	EPN	HCN	MVN	OPN	PCN	PXN	RNN	RON	TON
ACN		1,25173	0,63781	0,63442	0,42540	0,12177	0,12048	0,12353	0,54603	0,53313	0,53554	0,54770	0,56931	0,57468	0,19053	0,56019	0,64554	0,00803	0,00000	0,11375	0,30598
AGN	0,58420		0,87866	0,87379	0,96909	1,32975	1,37128	1,33245	0,38803	0,86290	0,83891	0,86016	0,81201	0,82340	1,29809	0,85101	0,86756	1,23194	1,25173	1,25173	1,34170
AP2	0,63371	0,35132		0,00066	0,33461	0,55122	0,57107	0,56715	0,26737	0,29043	0,28730	0,28004	0,34702	0,33428	0,53874	0,23790	0,01358	0,63527	0,63781	0,55497	0,54678
APN	0,63506	0,35348	0,00176		0,33266	0,54825	0,56797	0,56408	0,26573	0,28868	0,28556	0,27921	0,34485	0,33229	0,53585	0,23942	0,01288	0,63189	0,63442	0,55197	0,54383
AVN	0,61539	0,37964	0,33016	0,32936		0,40302	0,40831	0,41456	0,33482	0,27604	0,28009	0,25815	0,39097	0,32353	0,42237	0,21644	0,34009	0,43419	0,42540	0,38708	0,44820
BMN	0,10699	0,69766	0,77143	0,76916	0,72421		0,00804	0,01009	0,47108	0,50615	0,50976	0,51852	0,47445	0,54105	0,12728	0,53585	0,57025	0,12510	0,12177	0,06524	0,22846
BO1	0,06982	0,62398	0,69309	0,69106	0,64347	0,03635		0,00879	0,48923	0,52253	0,52620	0,51976	0,48489	0,59102	0,12378	0,53666	0,57315	0,12049	0,06240	0,23151	
BO2	0,03219	0,60186	0,66289	0,66320	0,63282	0,07440	0,03591		0,48458	0,52879	0,53247	0,53313	0,46768	0,54756	0,13124	0,54530	0,58690	0,12688	0,12353	0,06673	0,23427
CDN	0,55282	0,07213	0,31954	0,32303	0,36491	0,67534	0,60691	0,57521		0,29393	0,28563	0,28868	0,25890	0,26780	0,47403	0,27469	0,27367	0,54090	0,54603	0,47799	0,48186
CFN	0,63791	0,37442	0,31069	0,31203	0,32500	0,78499	0,70636	0,66959	0,35905		0,01073	0,09532	0,34599	0,25492	0,18242	0,52065	0,28832	0,53666	0,53313	0,49431	0,50197
COR	0,63770	0,37529	0,31078	0,31212	0,32063	0,77616	0,69841	0,66888	0,36054	0,00491		0,09347	0,33842	0,25142	0,18986	0,28521	0,53904	0,53554	0,49783	0,51913	
CRN	0,62269	0,35664	0,30981	0,30909	0,31871	0,76093	0,68405	0,64647	0,33209	0,14913	0,15107		0,33879	0,24176	0,53335	0,17399	0,28933	0,54547	0,54770	0,51191	0,49257
EPN	0,66239	0,41277	0,48552	0,48577	0,48480	0,76615	0,68432	0,65219	0,39715	0,48795	0,49113	0,46977		0,34396	0,44984	0,36243	0,35486	0,57315	0,56931	0,46104	0,44900
HCN	0,60971	0,39319	0,34853	0,34836	0,36614	0,72924	0,66110	0,63127	0,38134	0,33162	0,32869	0,32964	0,46189		0,51614	0,22702	0,33578	0,57237	0,57468	0,50918	0,46716
MVN	0,17282	0,68479	0,81760	0,81861	0,73301	0,27251	0,21928	0,20200	0,67135	0,81502	0,80775	0,77564	0,72632	0,70659		0,56329	0,54975	0,19350	0,19053	0,14689	0,24052
OPN	0,59284	0,37114	0,26483	0,26310	0,26738	0,73958	0,66607	0,62530	0,34259	0,23440	0,23129	0,23667	0,47218	0,32061	0,76127		0,24428	0,55196	0,56019	0,56199	0,51791
PCN	0,63455	0,35747	0,01287	0,01329	0,33003	0,76916	0,69460	0,66545	0,32273	0,31491	0,31443	0,31524	0,49368	0,34554	0,80891	0,26391		0,64298	0,64554	0,56797	0,54163
PXN	0,00652	0,58887	0,63557	0,63478	0,61153	0,10641	0,06930	0,03543	0,55537	0,63719	0,63699	0,61777	0,65916	0,61872	0,17435	0,59060	0,63000		0,00803	0,12201	0,29908
RNN	0,01012	0,58321	0,62734	0,62867	0,60565	0,11630	0,08022	0,04123	0,55833	0,64825	0,64915	0,63381	0,66927	0,60412	0,18303	0,59483	0,63028	0,01588			
RON	0,04301	0,60463	0,67562	0,67709	0,63373	0,14753	0,10579	0,07474	0,57073	0,67978	0,67894	0,65889	0,66047	0,64492	0,18801	0,64394	0,66855	0,04344	0,05334		
TON	0,23024	0,59984	0,69773	0,69807	0,64944	0,35204	0,29236	0,26145	0,58937	0,69021	0,68193	0,68447	0,63681	0,66507	0,33055	0,66597	0,68568	0,22876	0,24144	0,24024	

Cálculo de distancia basado en Kimura 2P para el concatémero de amplicones *pifs* (*Alphabaculovirus* Grupo I)

Tabla III.3. Matrices de distancia entre especies virales del Grupo I de *Alphabaculovirus*.

Se muestran los resultados obtenidos al aplicar el modelo de sustitución Kimura 2P a los dos modelos utilizados para realizar las inferencias filogenéticas, el basado en la secuencia parcial de genes *pif* y el basado en las secuencias parciales de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina* o *granulina*. Para ello se alinearon con ClustalW las secuencias parciales obtenidas en este trabajo para los genes *pif* de los miembros del Grupo I de *Alphabaculovirus*. A continuación se concatenaron los alineamientos. Para el cálculo de la distancia de a pares se empleó el programa MEGA 6 (Tamura et al, 2013), utilizando Kimura 2P como modelo de sustitución, un valor Gamma de 0,5, *complete deletion*. Las referencias de colores se citan a la izquierda de la tabla y se remarcan aquellas con baja o mala diferenciación.

- Buena diferenciación entre dos especies, poseen una distancia mayor a 0,05 unidades
- Dudosa diferenciación entre dos especies, poseen una distancia menor a 0,05 pero mayor a 0,015 unidades
- Mala diferenciación entre dos especies, poseen una distancia menor a 0,015 unidades

Cálculo de distancia basado en Kimura 2P para el concatémoro de amplicones *lef8*, *lef9* y *polh/igran* (Alphabaculovirus Grupo II)

	AHN	AIN	AON	APO	ASN	CBN	CCN	CCN	EON	EUN	HA1	HA4	HAN	HAS	HZN	LDN	LSN	LXN	MC4	MCB	MCN	OLN	SEN	SF2	SF9	SL2	SLN	TNN		
AHN	1.21346																													
AIN	0.90079	1.21346																												
AON	0.95767	1.25039	1.16730																											
APO	0.90624	1.24782	1.07346	1.16730																										
ASN	1.27062	0.37190	1.29980	1.16730	1.16730																									
CBN	0.93388	1.09041	0.92614	0.83623	1.20578	1.01694																								
CCN	1.13704	1.01051	1.09017	0.90455	1.04429	1.04787	0.76112																							
EON	0.96266	1.00288	0.95758	0.64485	0.90877	0.88471	0.98445	0.54462																						
EUN	0.98921	0.93528	1.03435	0.80102	1.07430	0.96642	1.00632	0.78249	0.65866																					
HA1	1.05938	1.05724	1.06584	0.90079	0.98843	1.09517	1.03779	0.97065	1.03704	0.00205																				
HA4	1.05626	1.06066	1.05951	0.90079	0.99151	1.09171	1.04413	0.96488	1.04337	0.00154	0.75827																			
HAN	1.07319	0.69754	1.02513	0.97159	0.69519	1.07871	0.96793	0.95782	1.07851	0.01144	0.91979	0.74293																		
HAS	1.06566	1.04512	1.06404	0.88650	0.98680	1.07623	1.04413	0.96776	1.04172	0.01021	0.00940	0.90968	0.00553																	
HZN	1.03842	0.69448	1.03359	0.87207	0.99521	1.08550	1.04491	0.96109	1.03779	0.01103	0.10222	0.91629	0.00702	0.00553																
LDN	1.25495	0.69443	1.33357	1.23843	0.77462	1.26214	1.27633	1.04394	0.83354	1.23152	1.22733	1.04798	1.20523	1.23289	0.59122															
LSN	1.57686	0.82531	1.61342	1.39109	0.97841	1.53161	1.36103	1.38482	1.16138	1.22475	1.28757	1.21821	1.23997	0.82531	0.59122	0.08860														
LXN	1.15260	0.74108	1.22802	1.17286	0.79852	1.25205	1.23537	1.00235	0.82091	1.17679	1.17290	1.07070	1.16752	1.18594	0.05084	0.84242	0.66177													
MC4	1.10927	0.65288	1.10337	1.01028	0.65494	1.20348	0.92598	0.99713	1.06206	0.93894	0.93611	1.01780	0.91122	0.92983	0.93813	1.17907	0.96419	0.09522	0.00205											
MCB	1.07891	0.69483	1.02455	0.96209	0.69888	1.08800	0.94705	0.95427	1.09492	0.90253	0.91075	0.00505	0.89981	0.90732	1.05371	1.28228	1.07657	0.11834	0.09652	0.73078										
MCN	1.11452	0.65091	1.10859	1.01028	0.65298	1.19858	0.92749	0.99106	1.06206	0.93465	0.93184	1.16558	0.90976	0.92559	0.93386	1.17355	0.95978	0.00115	0.09652	0.74361	0.09652									
OLN	0.96497	0.94963	0.92547	0.60051	0.96661	0.87094	0.91953	0.95837	0.65244	0.92853	0.92853	0.96427	0.92853	0.80941	1.09769	0.96288	0.97252	0.88556	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	0.68500	
SEN	1.10609	0.47314	1.07825	1.04661	0.48742	1.07561	1.00632	0.81440	0.94764	0.95036	0.94462	0.70865	0.91667	0.93826	1.16100	0.94777	0.84966	0.69558	0.70848	0.69239	0.83256	0.29067	0.28588	0.29067	0.28588	0.29067	0.28588	0.29067	0.28588	0.29067
SF2	1.09503	0.57568	1.08347	0.98929	0.61252	1.10096	0.98879	0.95472	1.04245	0.99929	0.99630	0.70344	0.99630	0.98861	1.11725	1.13338	1.10238	0.69113	0.70505	0.68798	0.92133	0.44664	0.00343	0.00343	0.44664	0.00343	0.44664	0.00343	0.44664	
SF9	1.09099	0.57874	1.07958	0.99154	0.61394	1.10705	0.99106	0.96861	1.03847	1.00461	1.00160	0.71127	1.00762	1.00996	1.11263	1.13604	1.09846	0.68664	0.71290	0.68351	0.91485	0.44496	0.00309	0.00309	0.44496	0.00309	0.44496	0.00309	0.44496	
SL2	1.50060	0.10183	1.53533	1.21945	1.11383	1.43369	1.41297	1.20958	1.17293	1.13844	1.14198	1.26355	1.12794	1.12711	1.06013	0.81024	1.06637	1.22776	1.27455	1.22398	1.12398	1.00800	1.07831	1.07758	1.00800	1.07831	1.07758	1.00800	1.07831	
SLN	1.14203	0.42475	1.17359	1.11471	0.49967	1.07457	0.97928	0.92266	0.94847	0.97087	0.97793	0.73320	0.96070	0.96722	0.78203	0.88507	0.79926	0.68807	0.73919	0.68861	0.94098	0.20042	0.41557	0.41557	0.20042	0.41557	0.41557	0.20042	0.41557	
TNN	1.14122	1.04062	1.11571	0.91007	1.05466	0.97543	0.15823	1.06794	1.03775	1.06406	1.06728	0.97848	1.06233	1.07127	1.40420	1.32621	0.99131	0.96277	0.98987	0.89993	0.98651	1.00402	1.00633	1.44070	0.96421	1.00633	1.44070	0.96421		

Cálculo de distancia basado en Kimura 2P para el concatémoro de amplicones *pifs* (Alphabaculovirus Grupo II)

Tabla III.4. Matrices de distancia entre especies virales del Grupo II de Alphabaculovirus. Se muestran los resultados obtenidos al aplicar el modelo de sustitución Kimura 2P a los dos modelos utilizados para realizar las inferencias filogenéticas, el basado en la secuencia parcial de genes *pif* y el basado en las secuencias parciales de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina* o *granulina*. Para ello se alinearon con ClustalW las secuencias parciales obtenidas en este trabajo para los genes *pif* de los miembros del **Grupo II de Alphabaculovirus**. A continuación se concatenaron los alineamientos. Para el cálculo de la distancia de a pares se empleó el programa MEGA 6 (Tamura et al, 2013), utilizando Kimura 2P como modelo de sustitución, un valor Gamma de 0,5, *complete deletion*. Las referencias de colores se citan a la izquierda de la tabla y se remarcan aquellas con baja o mala diferenciación, junto con la imagen especular en el otro método de clasificación.

- Buena diferenciación entre dos especies, poseen una distancia mayor a 0,05 unidades
- Dudosa diferenciación entre dos especies, poseen una distancia menor a 0,05 pero mayor a 0,015 unidades
- Mala diferenciación entre dos especies, poseen una distancia menor a 0,015 unidades

Cálculo de distancia basado en Kimura 2P para el concatémoro de amplicones <i>lef8</i> , <i>lef9</i> y <i>polh/gran</i> (<i>Betabaculovirus</i>)														
	AOG	ASG	CAG	CLG	COG	CPG	EAG	HAG	POG	PRG	PUG	PXG	SLG	XCG
AOG	0,92227	0,99294	0,74311	0,68329	0,81951	0,88512	1,01560	0,81471	0,65319	1,03669	0,91772	1,13281	1,02034	
ASG	1,47231	1,13182	0,81211	0,88538	0,88298	0,94014	0,99728	0,88713	0,92044	1,14699	0,99791	0,98625	0,98975	
CAG	1,25126	1,48735	1,02705	0,92033	0,83649	0,98237	1,24252	1,01156	0,96218	1,36443	1,15387	1,26239	1,23899	
CLG	0,93817	1,30587	1,00543	0,54849	0,56177	0,91136	1,03978	0,81046	0,64429	1,09147	0,99181	1,00968	1,00116	
COG	0,93933	1,29805	0,99277	0,66063	0,77372	0,89448	1,00428	0,71723	0,59041	1,12586	1,02576	1,06958	1,04369	
CPG	1,04830	1,55729	0,78528	0,65609	0,81589	0,75762	0,99852	0,65591	0,75662	1,09691	0,99663	1,12701	1,00624	
EAG	1,11564	1,47749	1,06563	1,10777	1,11065	0,88203	1,01634	0,90386	0,77609	1,22700	0,80357	1,08808	1,03507	
HAG	1,77685	1,78415	1,54756	1,51420	1,68862	1,62091	1,73129	0,90017	0,98230	0,22322	1,04708	0,72447	0,01570	
POG	0,98305	1,25694	1,22162	0,93445	0,89795	0,91037	1,16287	1,72450	0,65414	0,98975	1,03669	1,18663	0,93411	
PRG	0,92748	1,43222	0,99560	0,69372	0,56655	0,71353	0,97603	1,46519	0,88976	1,10011	1,03610	1,07848	0,97794	
PUG	1,76217	1,82890	1,69010	1,46093	1,53305	1,60995	1,63104	0,26684	1,65859	1,44261	1,15632	0,77670	0,22422	
PXG	1,38066	1,56010	1,30020	1,37843	1,36606	1,04397	1,05737	1,64542	1,39972	1,24908	1,56286	1,24873	1,07598	
SLG	1,78814	1,82995	1,86728	1,64936	1,55756	1,79989	1,63410	1,74383	1,79769	1,47330	1,58482	1,67679	0,70857	
XCG	1,75564	1,87496	1,58576	1,55684	1,71704	1,56728	1,74123	0,06275	1,83892	1,51783	0,25931	1,63596	1,68625	

Cálculo de distancia basado en Kimura 2P para el concatémoro de amplicones *pifs* (*Betabaculovirus*)

Tabla III.5. Matrices de distancia entre especies virales de *Betabaculovirus*. Se muestran los resultados obtenidos al aplicar el modelo de sustitución Kimura 2P a los dos modelos utilizados para realizar las inferencias filogenéticas, el basado en la secuencia parcial de genes *pif* y el basado en las secuencias parciales de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina* o *granulina*. Para ello se alinearon las secuencias parciales de los genes *pif* de los miembros de *Betabaculovirus* con ClustalW, obtenidos en este trabajo, y luego se concatenaron. Se utilizó el programa MEGA 6 (Tamura et al, 2013) para el cálculo de la distancia de a pares utilizando Kimura 2P como modelo de sustitución, un valor Gamma de 0,5, *complete deletion*. Las referencias de colores se citan a la izquierda de la tabla y se remarcan aquellas con baja o mala diferenciación, junto con la imagen especular en el otro método de clasificación.

- Buena diferenciación entre dos especies, poseen una distancia mayor a 0,05 unidades
- Dudosa diferenciación entre dos especies, poseen una distancia menor a 0,05 pero mayor a 0,015 unidades
- Mala diferenciación entre dos especies, poseen una distancia menor a 0,015 unidades

El análisis de las matrices de distancia entre ambos métodos permitió validar el sistema de clasificación propuesto en base a secuencias parciales de los genes *pif*. Para el caso del Grupo I de los *Alphabaculovirus*, los virus APN y AP2 (2 aislamientos diferentes secuenciados del virus AnpeNPV) no pueden diferenciarse como especies con ninguno de los dos métodos, permitiendo aseverar que corresponden a dos variantes del mismo virus. Lo mismo se observa para el caso de PCN (PhcyNPV)-AP2 y PCN-APN como también entre PXN-ACN (PlxyNPV, AcMNPV), RNN-ACN (RanuMNPV, AcMNPV), COR-CFN (ChocNPV, CfMNPV), no logrando ser diferenciados con ninguna metodología. Para el caso de ACN-BO2 (BomaNPV-S2), el método actual permite diferenciarlos correctamente, mientras que se convierte en distancia dudosa con el método basado en *pifs*. Se pierde también certeza en la diferenciación entre BO2-PXN y BO2-RNN. Sin embargo, se obtuvo una mejor distancia para el caso de BMN-BO2 (BmNPV, BomaNPV-S2), BMN-BO1 (BmNPV, BomaNPV-S1), BO1-BO2, al utilizar el método basado en *pifs* (Tabla III.3).

Para el caso del Grupo II de los *Alphabaculovirus*, los resultados de las dos matrices fueron equivalentes. Solo no lograron diferenciarse como especies a: los virus HA1-HA4 (HearNPV-C1, HearNPV-G4), dos variantes del mismo virus; HAS-HA1 y HAS-HA4 (HearSNPV), siendo que HAS es un virus aislado de *Helicoperpa armigera* SNPV, el mismo hospedador que las variantes HA1 y HA4; HZN-HA1, HAZ-HA4 y HZN-HAS (HezeNPV), virus aislado de la especie *H. zea*, en vez de *H. armigera*, como en los casos previos; HAN-MCB (HearMNPV, MacoNPV-B); MC4-MCN (MacoNPV-90-4, MacoNPV-90-2), también dos aislamientos del mismo virus recuperados de *Mamestra configurata* (Tabla III.4).

Por último, para el caso de los *Betabaculovirus*, se observa una diferenciación certera entre HAG- XCG (HearGV, XecnGV) con el método basado en *pifs*, que fue dudosa con el método actual (Tabla III.5).

Aplicación del sistema en aislamientos virales de Colombia

Dentro del marco de un proyecto de colaboración entre nuestro laboratorio LIGBCM-AVI y el Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), se aplicó el sistema desarrollado en este trabajo de tesis doctoral a la caracterización molecular de 3 aislamientos virales colombianos. .

La papa es un cultivo de alto interés agrícola en Colombia. Por ende, resulta de vital importancia el control de las plagas que lo afectan. Las polillas de la familia *Gelechiidae*, Orden *Lepidoptera*, constituyen una de las plagas de mayor importancia por ocasionar grandes pérdidas a este cultivo. Las especies más importantes como insecto-plaga dentro de esta familia son *Tecia solanivora*, *Tuta absoluta* y *Phthorimaea operculella* (Figura III.9). Con el objetivo de desarrollar estrategias bioinsecticidas, se realizaron misiones en campo dónde se recolectaron larvas afectadas con fenotipo asociado a baculovirus. A partir de ellas, se aislaron cuerpos de oclusión de morfología granular (coincidente con el género *betabaculovirus*). Estos aislamientos virales luego fueron propagados dentro del insectario de CORPOICA mediante la multiplicación en larvas susceptibles, para mantener un *stock* permanente, y fueron denominados: TesoGV (granulovirus que infecta *Tecia solanivora*), TuabGV (granulovirus que infecta *Tuta absoluta*) y PhopGV (granulovirus que infecta *Phthorimaea operculella*).

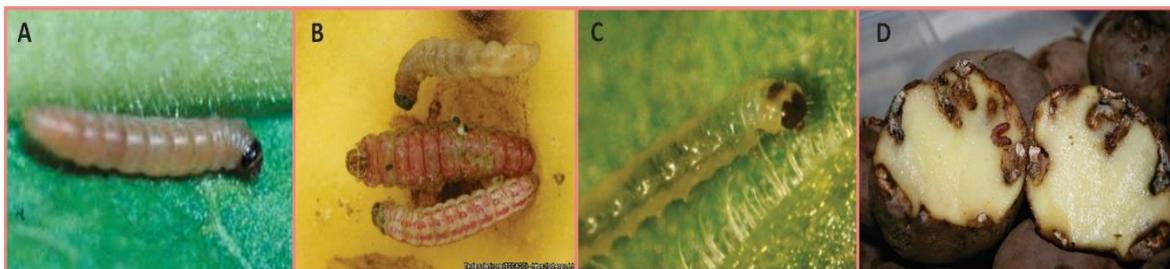


Figura III.9. Larvas de especies de lepidópteros de importancia para el cultivo de papa en Colombia. La imagen muestra las principales especies dentro de la familia *Gelechiidae* que ocasionan pérdidas en cultivos de importancia agronómica en Colombia. **A)** *Phthorimaea operculella* (Fuente: <http://www.chemtica.com>), **B)** *Tecia solanivora* (Fuente: André Pollet), **C)** *Tuta absoluta* (Fuente: <http://www.tutaabsoluta.es>), **D)** Papas almacenadas infestadas con *Tecia solanivora* (Fuente: Georg-August-Universität Göttingen).

A partir de suspensiones de los cuerpos de ocusión de estos tres aislamientos se comenzó con la caracterización molecular basada en los genes *pif* con los *primers* generalistas diseñados para el género *Betabaculovirus*. Teniendo en cuenta las condiciones de reacción y de ciclado térmico establecidas en la optimización previa, se realizaron los ensayos de amplificación y se obtuvieron los amplímeros correspondientes (Figura III.10).

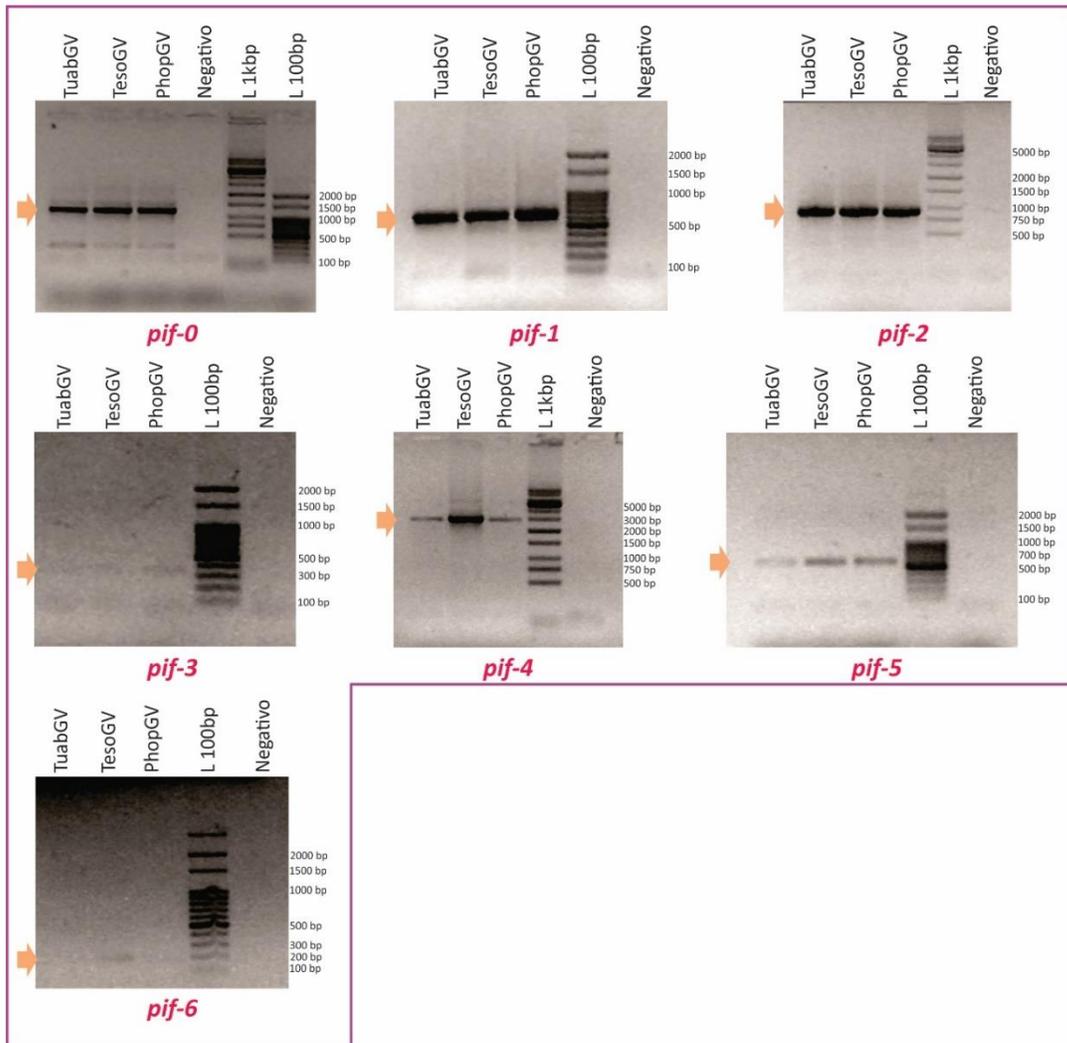


Figura III.10. PCRs de aislamientos virales de Colombia. Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v teñido con bromuro de etidio de los productos de PCRs utilizando los *primers* generalistas para *Betabaculovirus*, diseñados en este trabajo de tesis sobre los genomas purificados de los aislamientos virales colombianos, TuabGV, TesoGV y PhopGV. Se indica con una flecha naranja los productos amplificados y esperados para este grupo y debajo de cada gel, el gen *pif* detectado. A la derecha se indican las pares de bases del marcador molecular utilizado como referencia de tamaño.

De este modo, se obtuvo amplificación para todos los *pifs* en todas las muestras. Con el fin de encontrar similitudes con las especies virales ya secuenciadas, estos productos fueron clonados en el vector comercial *pGem-T Easy* para luego de la transformación y selección de colonias recombinantes, obtener la información de secuencia de varios clones por virus y por fragmento *pif*.

Con esta información, se realizaron alineamientos y análisis filogenéticos. Así, se realizaron cladogramas para cada *pif* en forma individual y para el concatémero de los 7 *pifs*. Para todas las secuencias obtenidas (salvo para *pif-1*), los resultados indicaron una gran similitud con el virus PhopGV previamente descrito (GenBank, NC_004062; *Taha et al, 2000*), lo cual era de esperarse en particular para el aislamiento colombiano de PhopGV (PhopGV_Col). Los otros dos, TuabGV y TesoGV, que infectan especies de la familia *Gelechiidae*, fueron también encontrados relacionados cercanamente con PhopGV (Figura III.11.A). Como se mencionó previamente, se secuenciaron varios plásmidos recombinantes conteniendo el producto de PCR de cada *pif* y de cada virus. En el caso de *pif-1* se hallaron dos secuencias diferentes al analizar varios clones positivos de un mismo virus. Con estos resultados, se decidió ampliar la información para este gen *pif*, secuenciando más clones positivos para los 3 virus. La aparición de dos secuencias claramente diferentes se mantuvo y se denominaron secuencias Tipo I y Tipo II. La secuencia Tipo I (611 bp) presentó una alta similitud con la secuencia de *pif-1* del virus PhopGV (GenBank, NC_004062; *Taha et al, 2000*), mientras que la Tipo II (635 bp) presentó alta similitud con las secuencias de *pif-1* de los virus HearGV, PsunGV y XecnGV (GenBank, NC_010240 [*Harrison y Popham, 2008*], NC_013772 [*Zhang et al., 2009*], NC_002331 [*Hayakawa et al, 1999*], respectivamente;). Para los 3 aislamientos virales colombianos se encontraron las secuencias Tipo I y Tipo II (Figura III.11.B).

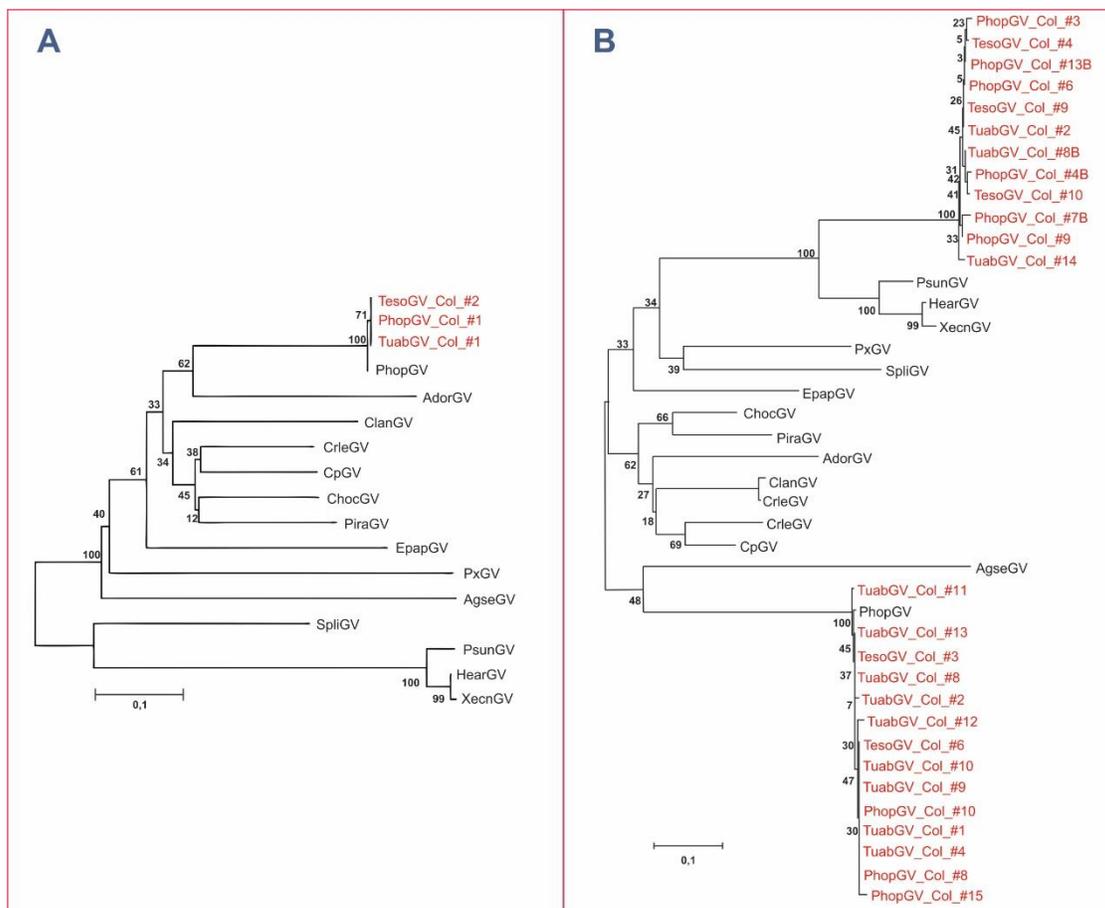


Figura III.11. Cladogramas de *Betabaculovirus* con aislamientos colombianos. A) Cladograma obtenido a partir del alineamiento de la secuencia aminoacídica correspondiente al fragmento amplificado con los *primers* generalistas de *pif-2* utilizando el programa MEGA 6, con el método de Neighbor-Joining y un bootstrap de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas empleando las matrices de Dayhoff, modelando la variación entre sitios con una distribución gamma (parámetro de forma = 2,25). Todas las posiciones conteniendo *gaps* y datos perdidos fueron eliminadas. **B)** Cladograma obtenido a partir de un alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas parciales correspondientes al producto amplificado con los *primers pif-1*, empleando el mismo programa y parámetros ya mencionados

Estos resultados podrían sugerir la existencia de una duplicación génica del gen *pif-1* en el genoma viral o la co-existencia de dos genomas que, a nivel de los *pifs*, diferirían solo en *pif-1* (dentro de las regiones observadas). Por otra parte, tanto la secuencia genómica de TesoGV como la de TuabGV (obtenidas por 454; trabajo en preparación) presentan un solo gen *pif-1*. Globalmente ambas secuencias son muy similares a la de PhopGV. Esto puede deberse a que en los ODVs haya dos genomas distintos en diferente

proporción y el mayoritario sea el similar a PhopGV, obteniendo muy pocos “*readings*” del minoritario, los cuales se filtran por baja calidad durante el ensamblado. Una alternativa es que, si el ensamblado se hizo respecto de una referencia (en este caso PhopGV) se hayan descartado los “*readings*” no coincidentes, aún cuando su calidad fuera buena. Tampoco se puede descartar la duplicación génica de *pif-1* en un solo genoma, soportada por la similitud de secuencias de los fragmentos de los otros 6 genes *pif*.

A partir del análisis de las secuencias parciales de los genes *pif*, surgió un interesante trabajo para intentar discernir entre las dos hipótesis planteadas. Esto me permitió una estancia de trabajo en el Centro CORPOICA dentro de mi doctorado.

| ¿CO-EXISTENCIA DE GENOMAS O DUPLICACIÓN GÉNICA DE PIF-1?

Considerando que las regiones Tipo I y II del gen *pif-1* presentaron una diferencia de tamaño de 24 bp y que existió una secuencia continua diferencial entre ambas, se llevó a cabo un diseño experimental para poder discernir entre las dos situaciones hipotetizadas. Con el fin de obtener un dato cuantitativo de la proporción de secuencias Tipo I y Tipo II presentes en los ODVs de los betabaculovirus recuperados de las larvas de *Tecia solanivora* y de *Tuta absoluta*, se diseñó un análisis basado en *Taqman-Real Time PCR*. Además, se diseñaron *primers* incluyendo la zona en cuestión para analizar el contexto génico de los aislamientos, considerando las regiones presentes en los genomas secuenciados (Figura III.12).

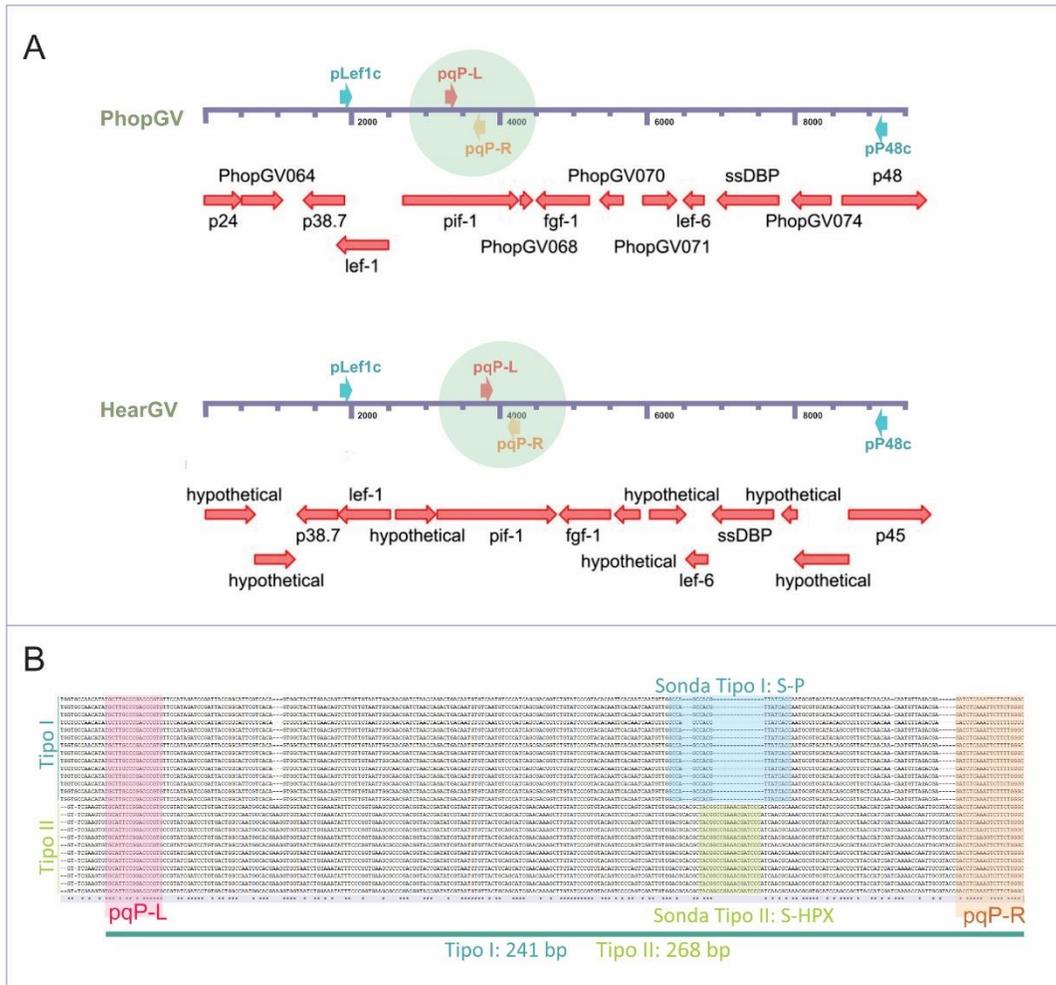


Figura III.12. Diseño de primers RT-PCR y contexto génico *pif-1*. **A)** Esquema representando los genes cercanos a *pif-1* de los genomas de PhopGV y HearGV. Se indican los primers pLef1c y pP48c, ambos generalistas para la amplificación de las regiones indicadas de los genomas PhopGV, HearGV, PsunGV y XecnGV. También se indican los primers generalistas pqP-L y pqP-R para la cuantificación de las secuencias Tipo I y II en un ensayo de *Real Time PCR*. Sombreado en verde, se indican las regiones expandidas en B. **B)** Alineamiento múltiple de secuencias Tipo I y II. En rosa se indica la región utilizada para el diseño del primer pqP-L; en naranja, para el primer pqP-R; en celeste la zona donde se diseñó la sonda específica para secuencia Tipo I y en verde, para secuencia Tipo II. Debajo de la línea turquesa se indican los tamaños esperados de los productos de PCR usando los primers pqP-L y pqP-R.

Para la realización de la *Real Time PCR*, se diseñó un juego de primers generalistas (pqP-L y pqP-R) y dos sondas específicas (sondas tipo *Taqman*: S-P -la letra P indica que corresponde al fenotipo POG- y S-HPX -las letras HPX indican que corresponde al fenotipo

HAG, PUG, XCG-(POG: PhopGV; HAG: HearGV; PUG: PsunGV; XCG: XecnGV). Los *primers* fueron diseñados para que hibriden en ambos tipos de secuencias, flanqueando una región del tercio 3' de *pif-1* que presenta una inserción en las secuencias Tipo II. El amplicón Tipo I tiene 241 pb y debe ser detectado con la Sonda S-P; mientras que el amplicón Tipo II tiene 268 pb y debe ser detectado con la Sonda S-HPX. Como se puede observar en la **figura III.12.B**, las sondas se diseñaron en las regiones específicas donde habría una inserción en las secuencias Tipo II con el fin de aumentar la especificidad del ensayo.

Para el estudio del contexto génico, se diseñaron 2 *primers* generalistas en las regiones que comprenden a los dos *core genes* más próximos flanqueando *pif-1*. Estos *primers*, que deberían hibridar en cualquiera de los 4 genomas, fueron denominados pLef1c y pP48c (**Figura III.12.A**). A partir de allí, se compararían los resultados de un RFLP del fragmento amplificado con lo esperado para los genomas secuenciados.

En la **tabla III.6** se indican las secuencias de los *primers* y sondas antes mencionados.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
pLef1c	CAAASACTTGTYTGTCGAC
pP48c	GTATACCKAGCATAGGTCT
pqP-L	TGCWTKCCSGACCCGTG
pqP-R	SCCCARAAGAMYTTGAGRTC
Nombre de la sonda	Secuencia (5'-3')
S-P- HEX	GCCAGCCACGTTAYCACC
S-HPX- FAM	TACGGCCGAAACGATCCC

Tabla III.6. Primers y sondas. La tabla indica la secuencia nucleotídica de los *primers* y sondas diseñados para la evaluación de las secuencias Tipo I y II del gen *pif-1* halladas en los aislados virales colombianos. En violeta se indica el fluoróforo asociado a cada sonda.

Con el diseño experimental planteado, y luego de purificar el genoma viral a partir de las suspensiones de gránulos, se realizó la puesta a punto de las PCRs. Los ensayos con los *primers* pqP-L/pqP-R resultaron positivos para todas las muestras. Se evaluaron 2

temperaturas de *annealing* (49°C y 51°C), y en ambas, para el caso de PhopGV, se halló una banda inespecífica (Figura III.13.A). Por otro lado, se realizó la PCR con los *primers* pLef1c/pP48c sobre muestras de TesoGV y TuabGV, dando resultados positivos (Figura III.13.B). Luego se realizó también con muestras de PhopGV, siendo también positiva.

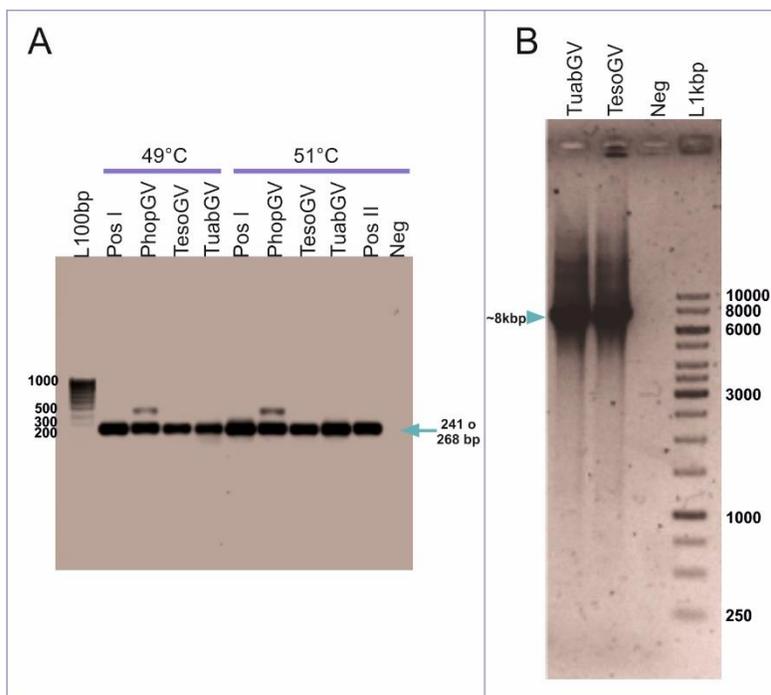


Figura III.13. Amplificaciones con los *primers* diseñados A) Electroforesis en gel de agarosa 0,8% p/v revelada con SYBRsafe de los productos de PCRs realizadas con los pares de *primers* pqP-L/pqP-R. El perfil de ciclado utilizado fue 1 ciclo a 94°C 4 minutos; 35 ciclos a 92°C 10 segundos, (49°C o 51°C) 15 segundos y 72°C 1,5 minutos; 1 ciclo a 72°C 5 minutos. Las muestras Pos I y Pos II corresponden a controles positivos, siendo plásmidos conteniendo las secuencias tipo I y II respectivamente; Neg corresponde al control negativo. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp (L100bp). La flecha verde indica el producto deseado. **B)** Electroforesis en gel de agarosa 0,7% p/v revelada con SYBR safe de la PCR realizada con los *primers* pLef1c/pP48c sobre muestras de TesoGV y TuabGV. El perfil de ciclado utilizado fue 1 ciclo a 94°C 4 minutos; 35 ciclos a 92°C 10 segundos, 52°C 15 segundos y 68°C 13 minutos;

Ensayo de Real Time PCR cuantitativa con sondas Taqman

Con la evaluación positiva de los *primers* diseñados, se procedió con la puesta a punto de las reacciones de *Real Time PCR*. En primer lugar, se realizaron las curvas de calibración usando como patrones a los plásmidos *pGem-T Easy* recombinantes conteniendo como insertos las secuencias Tipo I y II. La cuantificación de referencia de los

plásmidos se realizó por espectrofotometría (Nano-Drop 1000). Además del control negativo clásico de toda reacción con agua en lugar de molde, se incluyó un control negativo que contenía el plásmido *pGem-TEasy* conteniendo el fragmento contrario en cada caso. Por un lado, se corroboraba la no detección del esqueleto del vector y por el otro, la especificidad de la sonda por el Tipo I o II según correspondía. Además de las reacciones mencionadas, también se incluyó la detección con una sonda *Taqman* específica para el gen *granulina* de todos los miembros virales de la familia *Gelechiidae*. Así, se deseaba obtener en cada muestra la cuantificación total de las moléculas de genomas (midiendo copias de *granulina*), y el número de moléculas conteniendo la región *pif-1* de Tipo I (midiendo con la sonda S-P) y de Tipo II (midiendo con la sonda S-HPX). Se realizaron las curvas de calibración con las tres sondas utilizadas y con sus respectivos moldes (Figura III.14). Para las 3 curvas, los coeficientes de correlación fueron mayores a 0,97.

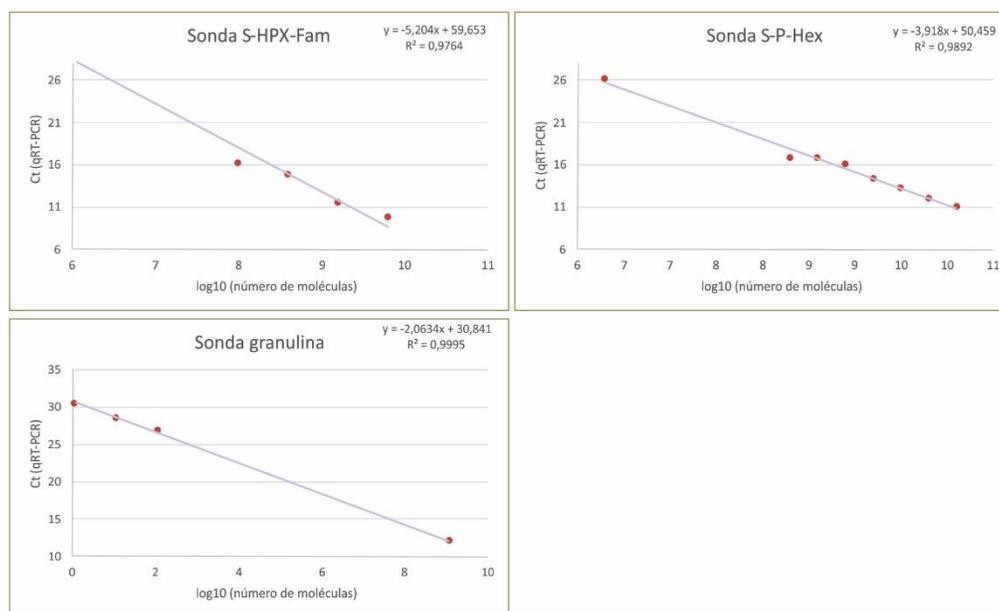


Figura III.14. Rango dinámico qRT-PCRs. Los gráficos de la figura muestran las curvas de calibración realizadas para la detección de muestras con la sonda TaqMan S-HPX, S-P y granulina. Se realizaron triplicados de cada concentración de molde evaluada y el Ct indicado en el eje "Y" es el promedio de las 3 medidas independientes. Se muestran también la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación de la curva patrón. Los moldes utilizados fueron para el caso de las sondas S-HPX y S-P plásmidos linealizados conteniendo la secuencia Tipo I y II, respectivamente y cuantificados por Nano-drop, mientras que en la curva de granulina, se utilizó molde cuantificado por la misma metodología de genoma de PhopGV.

Lo que se esperaba era que para el hipotético caso de la co-existencia de genomas, la sumatoria de la cuantificación de moléculas de Tipo I y de Tipo II debería ser similar a la de *granulina*; mientras que si la situación correspondía a una duplicación génica dentro de un único genoma, la cuantificación por medio de las 3 sondas debería ser equivalente. Además, cabe destacarse que las sondas se sintetizaron asociadas a 2 fluoróforos diferentes en su espectro de absorción/emisión con el fin de realizar el ensayo en simultáneo.

Con las hipótesis planteadas y las curvas de calibración optimizadas para cada sonda, se realizó la cuantificación de las muestras conteniendo los aislamientos PhopGV, TuabGV y TesoGV. Como primer resultado, no se logró la detección en una reacción con mezcla de sondas, ya fuera que se haya utilizado como molde una mezcla equimolar de plásmidos de Tipo I y II o con muestras de genomas. Las lecturas no otorgaban resultado alguno en la lectura FAM. Sin embargo, cuando se realizó por separado, la detección dio positiva demostrando que la co-existencia de las sondas en la misma reacción no permitía la correcta detección. Por ello, se decidió proceder con los ensayos en tubos individuales para cada sonda.

En la **tabla III.7** se muestran los resultados de la cuantificación de las muestras virales resultantes con las 3 sondas utilizadas: *granulina*, S-P, S-HPX. Como se indica, no se obtuvo detección en las muestras TuabGV y TesoGV con la sonda Tipo II S-HPX, pero sí para la muestra de PhopGV. En cambio, para la sonda Tipo I, S-P, se obtuvo detección en todas las muestras.

Tabla III.7. Cuantificación muestras genomas virales mediante *Real Time PCR*. Resultado de la cuantificación del número de moléculas / μl de muestra de DNA de cada especie viral evaluada con cada sonda *Taqman*. No se obtuvo detección con la sonda HPX de las muestras TesoGV y TuabGV. En la última columna de indica la sumatoria de moléculas Tipo I y Tipo II detectadas.

Cuantificación número de moléculas/ μl genoma

Muestra	Sonda granulina	Sonda P Tipo I	Sonda HPX Tipo II	Suma P + HPX
TesoGV	$1,28 \cdot 10^9$	$1,03 \cdot 10^7$	0,00	$1,03 \cdot 10^7$
TuabGV	$4,24 \cdot 10^8$	$2,85 \cdot 10^6$	0,00	$2,85 \cdot 10^6$
PhopGV	$4,24 \cdot 10^7$	$3,63 \cdot 10^6$	$1,39 \cdot 10^6$	$5,02 \cdot 10^6$

En ningún caso la sumatoria del número de moléculas Tipo I más II fue equivalente con la cuantificación obtenida con la sonda granulina. Para el caso de TesoGV y TuabGV, este resultado podría indicar que a pesar de no ser detectada, podría existir secuencia Tipo II. Además, este resultado sería más viable para el caso de la co-existencia de 2 genomas con las secuencias *pif-1* similares, ya que en ninguna de las cuantificaciones con las sondas *pif-1* los resultados obtenidos fueron equivalentes a los arrojados con la detección de granulina.

Dado que los resultados no fueron concluyentes, se decidió aprovechar la diferencia de pares de bases entre los productos de amplificación de Tipo I y de Tipo II con los *primers* utilizados para la *Real Time* PCR. Como fue indicado previamente, la secuencia de Tipo II presenta un mayor tamaño respecto de la de Tipo I, resultando en un producto de 268 bp contra otro de 241 bp, respectivamente (Figura III.12.B). Como la diferencia de longitud no sería resuelta por electroforesis en un gel de agarosa, se procedió a utilizar geles de poliacrilamida. Para ello, se realizó una PCR *end point* con las muestras correspondientes y los *primers* pqP-L/pqP-R y se resolvió en un gel de poliacrilamida 7% p/v revelado con nitrato de plata (Figura III.15). Como se observa, los controles de los plásmidos de Tipo I y de Tipo II dieron sólo el fragmento esperado en cada caso. Por otro lado, se observa la presencia de dos fragmentos en la muestra de TuabGV y PhopGV, siendo para la primera muestra más intenso el correspondiente al Tipo II y para PhopGV, de mayor intensidad el correspondiente al Tipo I. Para el caso de TesoGV, se visualiza un fragmento correspondiente a la secuencia de Tipo I, y uno en muy baja proporción correspondiente a la de Tipo II.

Este ensayo permitió demostrar la presencia de ambos tipos de secuencias en las muestras, a pesar que con las sondas específicas no pudieron detectarse las secuencias de Tipo II en las muestras de TesoGV y TuabGV. La diferencia en intensidad podría justificarse con la diferencia en la cantidad inicial de moléculas de cada tipo, aunque este es el resultado de una PCR *end point* por lo cual debería realizarse una PCR cuantitativa para determinarlo. Sin embargo, la diferencia en cantidad podría suponer la existencia asimétrica de ambas secuencias, coincidente con la mezcla de genomas conteniendo cada tipo de secuencia *pif-1*.

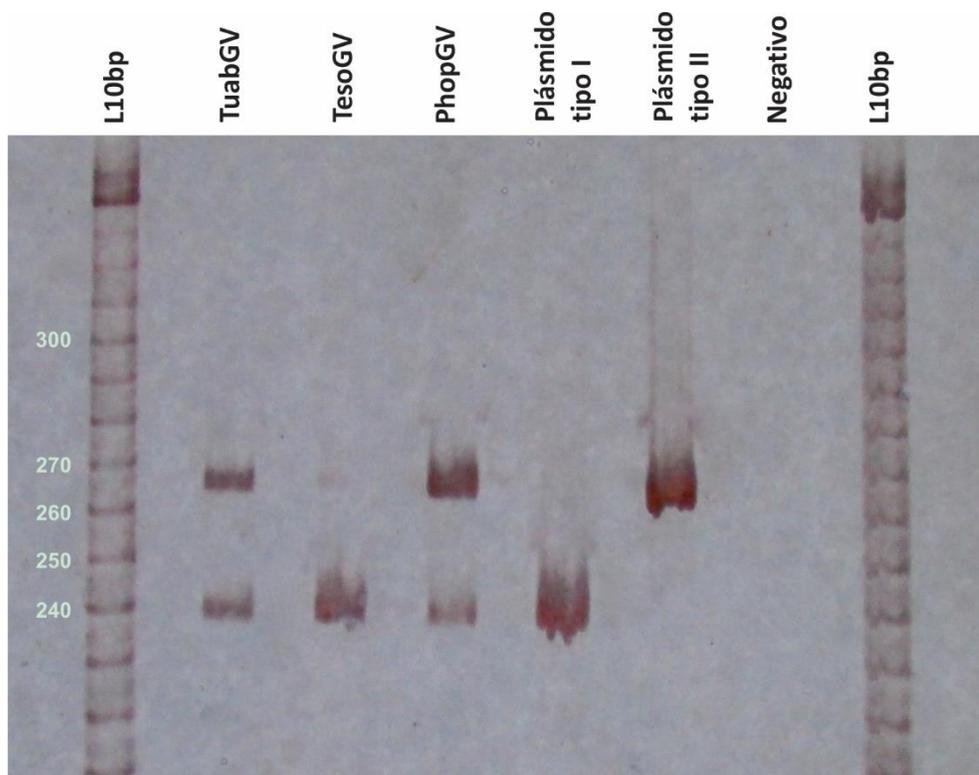


Figura III.15. Diferenciación de fragmentos de Tipo I y II en una muestra amplificada. Electroforesis en gel de poliacrilamida 7% teñido con nitrato de plata de la amplificación de las muestras virales con los *primers* pqP-L/pqP-R. Se utilizaron como controles positivos muestras de los plásmidos *p-GemT-easy* conteniendo la secuencia Tipo I y II. Como marcador molecular se utilizó un

Evaluación del contexto génico de *pif-1*

Con el fin de evaluar el contexto del gen en cuestión, se realizó una PCR con los *primers* pLef1c/pP48c sobre muestras de genomas de TesoGV, TuabGV y PhopGV (Figura III.12). A partir de allí se eligieron dos endonucleasas de restricción (Hinfl y HaeIII), capaces de generar varios fragmentos que permitieran evaluar alguna diferencia entre las muestras.

Para el genoma secuenciado de PhopGV, se esperaban obtener 19 fragmentos con la enzima Hinfl mientras que con HaeIII, 8 fragmentos de restricción. Luego de realizar la digestión y corrida electroforética adecuada, se obtuvo el resultado del RFLP (Figura III.16). La resolución de la electrofresis no fue la óptima, por lo que fue difícil estimar el tamaño de los fragmentos. Sin embargo, se logró detectar una banda diferencial para PhopGV y TuabGV con respecto a TesoGV en el perfil con la enzima HaeIII, mientras que se halló una banda diferencial en PhopGV con respecto a los demás con la enzima Hinfl.

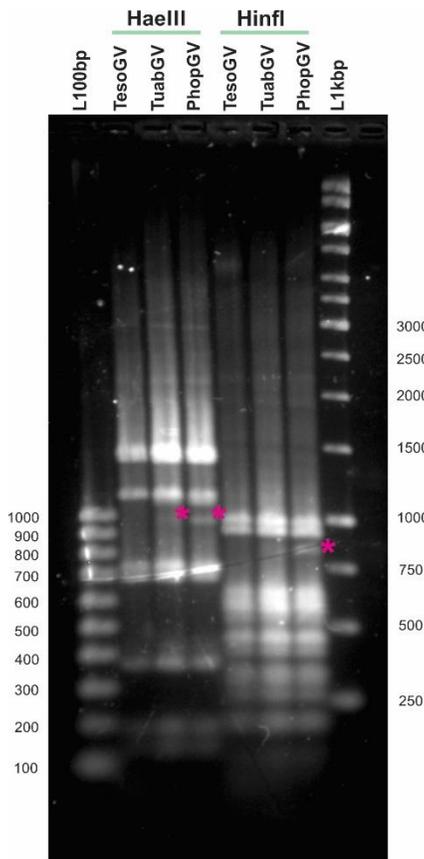


Figura III.16. RFLP fragmentos amplificados. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con *Sybr Gold* de los productos de PCR amplificados con los *primers* pLef1c/pP48c de las muestras de genomas virales y digeridos con las endonucleasas de restricción HaeIII y Hinfl. Se utilizaron marcadores moleculares de 100 bp y 1kbp. Con asteriscos fucsias se indican las bandas diferenciales.

El resultado del RFLP de los fragmentos permitió detectar la presencia de bandas submolares diferenciales en algunos de los aislamientos virales, lo cual, podría relacionarse con la co-existencia de un genoma mayoritario con otro ácido nucleico minoritario. El mismo podría corresponderse con un genoma similar, una versión defectiva, o un fragmento de genoma viral.

Una de las causas que podría explicar estos resultados tiene que ver con la posibilidad de una co-infección viral en las larvas. Si bien las plagas de donde se aislaron los virus son distintas, las 3 pertenecen a la familia *Gelechiidae* del Orden *Lepidoptera*, y si se tiene en cuenta que las 3 están presentes en la misma región geográfica, no sería extraño pensar en la posibilidad de co-infecciones virales. De hecho, estos resultados estarían en concordancia con la publicación de *Espinel-Correal et al, 2010*, en donde se describen mezclas de genomas en aislamientos provenientes de *Tecia solanivora*, así como también de *P. operculella*.

Por otro lado, el mantenimiento de los aislamientos virales en el insectario de CORPOICA se realiza infectando por vía oral larvas susceptibles, contaminando alimentos con suspensiones de gránulos virales. Los 3 virus en cuestión infectan las 3 especies de lepidóteros, por lo cual, se propagaban cuando era necesario, en la especie de larva que se encontraba en el momento. Por ello, otra de las posibles causas podría corresponder a un proceso de selección funcional mediado por el hospedador.

En un futuro, se propone la evaluación de los aislamientos virales correspondientes a distintos eventos de propagación y evaluar si la misma influye o no en la organización génica viral durante el desarrollo en distintos hospedadores.

En resumen, el sistema de clasificación basado en genes *pif* desarrollado en este plan de tesis fue de suma utilidad sobre las muestras virales de granulovirus aisladas en Colombia. Además de lograr la correcta caracterización molecular de los aislamientos, surgió un interrogante acerca de la naturaleza de los mismos, encontrándose diferentes secuencias de un mismo gen en cada uno de los mismos. Luego de plantear dos posibles escenarios, en el cual podrían existir mezcla de genomas o la duplicación del gen *pif-1*, se

diseñaron estrategias para dilucidarlo. Los resultados obtenidos, tanto por la técnica de *Real Time*-PCR y electroforesis en geles de poliacrilamida, como de RFLP, sugieren la co-existencia de 2 genomas, o al menos, la co-existencia de un genoma con otro ácido nucleico en menor proporción.

TEMPORALIDAD EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PIF DURANTE UN CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

Como ha sido introducido, el ciclo de infección de los baculovirus comprende dos etapas generales. La infección primaria en el intestino medio de las larvas, en donde se hidrolizan los cuerpos de oclusión ingeridos, permitiendo la fusión de la envoltura de los ODVs con la membrana de las células apicales, mediada por la interacción de las proteínas PIF con receptores específicos presentes en las células. La entrada de las nucleocápsides y su translocación al núcleo, dan inicio a la producción de nuevas partículas virales dentro de la célula. A partir de este momento, comienza la producción de las partículas virales brotantes, BVs, responsables de la diseminación de la infección por todas las células del hospedador, dando lugar a la infección sistémica.

La producción de nuevas partículas ocluidas, OBs, ocurre en las etapas finales del ciclo de infección dentro de una célula, estrategia que le permite al virus la producción de alta cantidad de BVs en momentos tempranos del ciclo, aumentando la capacidad de dispersión de la infección. Esto es posible gracias a la expresión diferencial de los genes baculovirales durante el ciclo infectivo (*Berreta et al, 2013*).

Dentro del grupo de genes tardíos, se encuentra la expresión de los genes *pif*, cuyos productos forman parte de la envoltura de los ODVs. La estrategia viral que le permite una transcripción diferencial se basa en el uso de la RNA polimerasa II celular para la expresión de los genes virales necesarios al inicio de la infección, y varios de ellos actúan como factores de transcripción para la expresión sucesiva de otros genes (*Bilen et al, 2007*). Por otro lado, existe una RNA polimerasa viral, responsable de la expresión de la mayoría de los genes virales. Dentro de las secuencias reconocidas por esta polimerasa están los genes *pif* (*Chen et al, 2013*).

Estudios de secuencias promotoras

Mediante análisis basados en predicciones bioinformáticas y por estudios transcriptómicos en células infectadas se han establecido los motivos de secuencias promotoras característicos de los baculovirus (*Xing et al, 2005; Rohrmann, 2013; Chen et al, 2013*). Para los genes tempranos, se han identificado dos secuencias principales que conforman el promotor consenso: una secuencia tipo TATA-*box* y un iniciador de la transcripción (INR), aunque alguna o ambas pueden estar ausentes en ciertos promotores tempranos (*Friesen, 1997; Berreta et al, 2013*). Una vez reconocida la región TATA-*box*, la secuencia INR, cuyo motivo conservado es CAGT, determina el sitio de inicio de la transcripción y asegura una correcta iniciación incluso en ausencia de la secuencia consenso TATA.

Para el caso de los promotores tardíos, que son reconocidos por la RNA polimerasa viral, mediante estudios de secuenciación de transcritos se ha encontrado un motivo conservado que funciona como promotor tardío y como secuencia de inicio de la transcripción: (A/T/G)TAAG (*Nobiron, et al, 2003; Xing et al, 2005; Rohrmann, 2013*). Además, se han descrito genes que presentan una combinación de promotor temprano y tardío. Por ejemplo para el caso de ATAAG se ha encontrado la variante TATAAGG, la cual puede ser reconocida tanto por la RNA polimerasa celular como por la viral, estando presente en aquellos genes que se expresan tanto en estadios tempranos como tardíos del ciclo infectivo (*Xing et al, 2005*). De las secuencias conteniendo el motivo TAAG, las variantes más prevalentes son ATAAG y GTAAG, seguida por TTAAG. La secuencia CTAAG, no parece funcionar como INR tardío, y es la menos frecuente en las regiones *upstream* al inicio de los ORFs (*Xing et al, 2005*). Sólo se ha reportado un caso en el que este motivo funcionaría como INR tardío del gen *pif-1* en el virus SfMNNPV (*Simón et al, 2005*).

Con la aplicación de las tecnologías de secuenciación de última generación se han estudiado los transcriptomas de líneas celulares infectadas con algunas especies de baculovirus y, de esta manera, se generó evidencia muy útil para comprender la temporalidad de la expresión génica viral a lo largo de un ciclo de infección (*Chen et al, 2013*). Esto permitió asociar las secuencias consenso características de los genes tempranos y tardíos, demostrando la existencia de los motivos antes mencionados.

Por estudios previos realizados en otras especies y conociendo que la localización de las proteínas PIF es en la envoltura de los ODVs, en esta sección se evalúa la presencia de los INR tardíos característicos asociados al reconocimiento por la RNA polimerasa viral en las regiones *upstream* a las secuencias codificantes de los *pifs* en el virus AgMNPV-2D. Para ello se realizó una búsqueda del motivo consenso TAAAG en los 300 nucleótidos *upstream* al codón de inicio reportado para cada uno de estos ORFs, eligiéndose dicha longitud en vista de análisis predictivos reportados y de estudios transcriptómicos previos realizados en una línea celular infectada con AcMNPV en diferentes momentos del ciclo, a partir de los cuales se dilucidó una distancia promedio de 169 nucleótidos entre el motivo promotor/iniciador de la transcripción (TSS) y el codón de inicio ATG codificante (*Xing et al, 2005; Chen et al, 2013*).

Mediante tal análisis en AgMNPV-2D se logró localizar el motivo TAAAG en todos los *pifs*, incluso repetidas veces, siendo esto coincidente con una potencial expresión gobernada por la RNA polimerasa viral, encontrándose que la distancia respecto al inicio de la traducción fue variable (**Figura IV.1**).

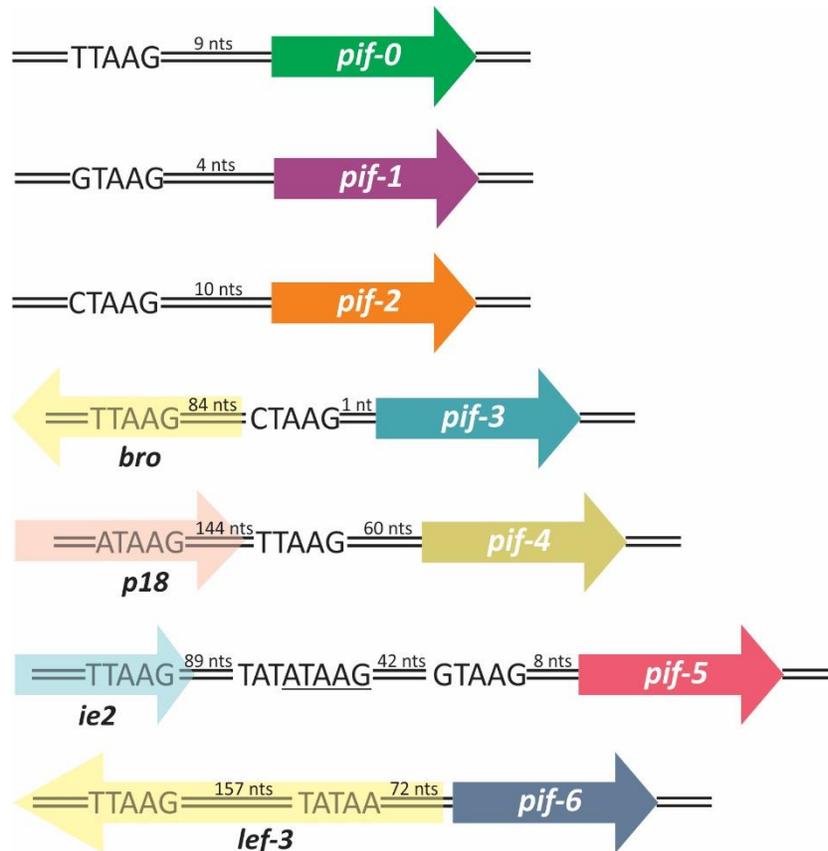


Figura IV.1. Análisis de motivos promotores. En la figura se esquematizan los marcos de lectura abiertos (ORFs) de los 7 genes *pif* junto con los motivos de secuencia promotora consenso TAAG, reconocida por la RNA polimerasa viral. El análisis se realizó a partir del genoma de AgMNPV (NC_008520), localizando los genes en cuestión y buscando el motivo consenso hasta 300 nucleótidos *upstream* del inicio de la traducción. Para cada caso, se indica el nucleótido predecesor al motivo TAAG y la cantidad de nucleótidos entre el motivo y el codón de inicio codificante (nucleótidos). Para el caso de más de un motivo promotor, se incluye la distancia entre ellos. También se muestran los ORFs de genes adyacentes cuando el motivo se encuentra superpuesto. Para el caso de *pif-5*, se subrayó el promotor consenso y se incluyó también la secuencia TATA encontrada. En *pif-6*, se incluyó también el motivo consenso TATAA.

De los 7 genes analizados, se encontraron 4 con motivos TTAAG (*pif-0*, *pif-3*, *pif-4*, *pif-6*), 2 con el motivo GTAAG (*pif-1*, *pif-5*), 2 con el motivo ATAAG (*pif-4*, *pif-5*) y 2 con el motivo CTAAG (*pif-2*, *pif-3*), el cual no ha sido caracterizado como posible promotor (Xing *et al*, 2005). Para *pif-3*, *pif-4* y *pif-5* se localizaron 2 o más motivos conservados de posibles INRs tardíos en la región evaluada. En los 3 casos, se localizó al menos un motivo presente en la región *upstream* no codificante. Sin embargo, el motivo más lejano del inicio de la

traducción de cada gen, está solapado con regiones codificantes de genes vecinos, siendo el gen *bro* para el caso de *pif-3*, *p18* para *pif-4* e *ie-2* para *pif-5* (Figura IV.1). El gen *bro* (*Baculovirus Repeated ORF*), es un gen presente en NPVs y GVs de lepidópteros y en CuniNPV, pero no en NPVs de himenópteros. Se encuentra en múltiples copias según el baculovirus, y estaría involucrado en la producción de poliedros (Bideshi et al, 2003; Rohrmann, 2013). Por otro lado, el gen *ie-2*, presente sólo en los miembros del Grupo I de los *Alphabaculovirus*, resulta tener efecto en la infectividad en larvas, ya que mutantes virales carentes de este gen, provocaron este efecto cuando larvas susceptibles fueron infectadas (Priklad'ko et al, 1999). Ninguno de estos dos genes forma parte de los *core genes*, por lo cual los eventos evolutivos no pueden ser correspondidos con la evolución de los genes *pif*, los cuales si forman parte de los *core genes*. De esta manera, se podría estimar que los INRs encontrados para *pif-3* y *pif-5* que se encuentran solapados en las regiones codificantes de estos genes, no serían las secuencias INR funcionales, existiendo una mayor probabilidad para los INRs presentes en las regiones no codificantes. Lo mismo ocurre para el caso de *lef-3/pif-6*, siendo que *lef-3* tampoco es un *core gene*. Está presente en los baculovirus que infectan lepidópteros y su ausencia es letal, ya que está vinculada con el proceso replicativo (Yu y Carstens, 2010). La razón que justifica la ausencia de este gen en los baculovirus que infectan dípteros e himenópteros, radicaría en la presencia de una *core protein* (ALK-EXO) con funciones similares a las reportadas para LEF-3 (Rohrmann, 2013). En este caso, tampoco podría vincularse la secuencia promotora presente en este gen vecino, aunque fue el único motivo tardío detectado para *pif-6*. Según estudios previos realizados en AcMNPV, se detectó un transcripto de *pif-6* a las 3 hpi (horas post-infección), y se determinó un motivo de promotor temprano 18 nucleótidos *upstream* del inicio de la traducción, coincidente con los estudios de 5' RACE (Li et al, 2008). A pesar de estos hallazgos, la proteína no fue detectada hasta las 16 hpi. Chan et al, 2013 detectaron el motivo TATAA en AcMNPV, cercano al inicio de transcripción, aunque también encontraron el motivo consenso tardío TAAG. Por lo tanto, se evaluó, también, la presencia de este motivo en la secuencia *upstream* del gen *pif-6* de AgMNPV, y se encontró una secuencia consenso TATAA *upstream* del comienzo del ORF, aunque se encuentra solapada con el

gen *lef-3* adyacente (Figura IV.1). En contraposición con todo lo anterior, el gen homólogo en BmNPV, fue caracterizado como un gen tardío, detectándose el transcrito 12 hpi, con un motivo TAAAG 68 nucleótidos *upstream* al inicio del ORF (Xu et al, 2008).

El caso de *pif-4* es diferente, ya que el motivo más alejado está solapado con otro *core gen*, *p18*, el cual está involucrado en la formación del fenotipo BV y, por ello, los eventos evolutivos de dichos genes podrían estar relacionados (Yuan et al, 2011).

Para *pif-5*, además del motivo INR tardío, se encontró un motivo TATA-*box* consenso. Este ha sido caracterizado en los genes que se expresan durante todo el ciclo, tanto por acción de la RNA polimerasa celular como de la viral (Chen et al, 2013). Sin embargo, por estudios previos en AcMNPV, el motivo de promotor temprano localizado no sería activo ya que no se han detectado transcritos antes de las 16 hpi (Braunagel et al, 1996, Rashidan et al, 2005). Por otro lado, estudios transcriptómicos del virus AgMNPV, revelaron que, en líneas generales, los genes tardíos y muy tardíos son detectados mediante técnicas de RT-PCR más temprano que en otros baculovirus cuando se realiza la infección *in vitro* en la línea celular UFL-Ag-286. Los autores consideran como probable explicación que la replicación viral dentro de la célula comienza antes que en otros sistemas (Oliveira et al, 2013).

Con el fin de complementar los hallazgos de los posibles motivos INRs, se decidió evaluar la estabilidad de la doble hélice en la región *upstream* de cada gen *pif*. Con la hipótesis de que la región promotora es rica en A-T y, por ende, de menor estabilidad, y que la zona del inicio de la traducción corresponde a una región más estable, se evaluó la estabilidad de 250 nucleótidos *upstream* del inicio de la traducción y 50 nucleótidos *downstream*. El cálculo de la estabilidad se evaluó mediante el ΔG , en ventanas de 5 residuos (SantaLucia, 1998; Figura IV.2).

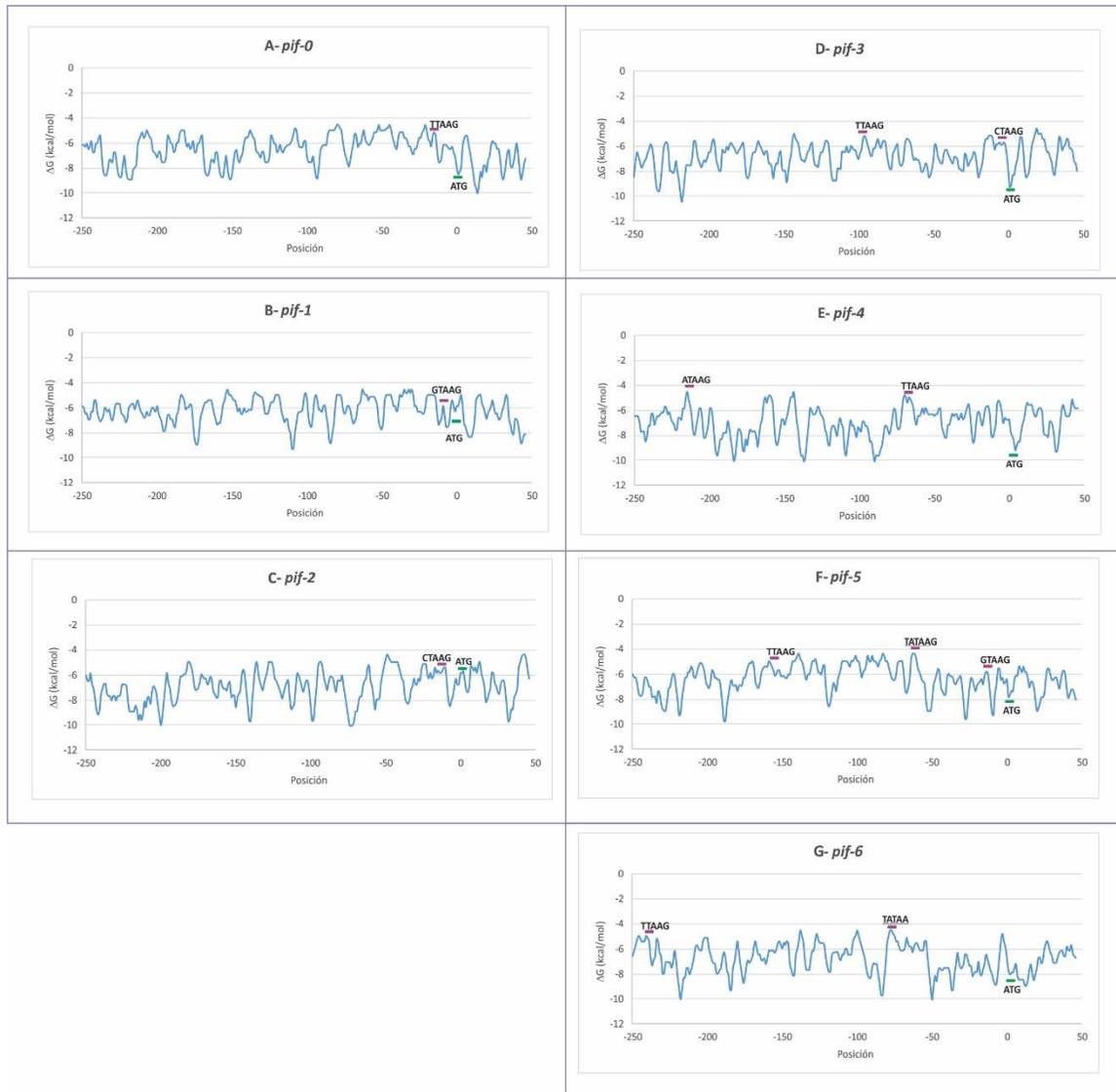


Figura IV.2. Estabilidad de la doble hélice en el entorno *upstream* de los genes *pif* de AgMNPV. Los gráficos indican la estabilidad relativa calculada por ventana de 5 residuos. Los valores se expresaron en ΔG (kcal/mol). Los picos de los gráficos indican las regiones de menor estabilidad y los valles, las más estables. Se indica con línea verde el inicio de la traducción de cada *pif* y con rosa, los motivos tardíos o tempranos hallados. **A)** *pif-0*, **B)** *pif-1*, **C)** *pif-2*, **D)** *pif-3*, **E)** *pif-4*, **F)** *pif-5*, **G)** *pif-6*.

Para los genes *pif-0*, *pif-3*, *pif-4*, *pif-5* y *pif-6* se detectaron zonas más estables coincidentes con el ATG que determina el inicio de la traducción, correspondientes a regiones con valores de ΔG bajos, mientras que los motivos promotores, se correspondieron con regiones menos estables, con valores de ΔG más elevados (Figura IV.2. A, D-G). Esto aporta más solvencia a las predicciones antes realizadas. Sin embargo, esta

situación no fue la hallada para el caso de *pif-1* y *pif-2*, en los que las zonas donde se localizaron el inicio de la traducción y los motivos INR propuestos no presentaron diferencias evidentes en cuanto a los valores de ΔG . En particular, el ATG no fue equivalente en cuanto a la estabilidad respecto de los otros genes *pif*, dando en estos casos valores menos estables (Figura IV.2.B y C).

A pesar de los resultados de estabilidad descritos, es necesario realizar ensayos transcriptómicos que posibiliten reconocer el impacto real de estas secuencias en la expresión de los genes *pif* y así comprobar la funcionalidad de los motivos hallados.

Diseño de *Reverse Transcription quantitative PCR* para genes *pif* de AgMNPV

Continuando con la caracterización de este grupo de genes tardíos, se decidió analizar el perfil de expresión de estas secuencias durante un ciclo de multiplicación viral, para así visualizar si la temporalidad de aparición de los transcritos se encontraba asociada con la esperada para los genes tardíos baculovirales. En tal sentido, se eligió un procedimiento molecular cuantitativo basado en PCR en tiempo real, para lo cual se procedió con el diseño de pares de *primers* específicos destinados a la detección de cada uno de los transcritos *pif* del virus AgMNPV-2D. Cabe mencionar que, en este caso, la caracterización se realizó sobre seis de los *pifs*, *pif-0* a *pif-5*, ya que al momento de realizarse el ensayo eran los únicos descritos.

Gen	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Longitud (pb)	% GC	Amplificación (pb)
pif -0	p74-fw	TTGATTACACGTTGCCG ACC	19	7	211
	p74-rev	GGTTGCGCATAAGCTA CG	18	5	
pif -1	pif-1-fw	GTTTCGCTTGATTGATG TGCACC	22	0	247
	pif-1-rev	GCTCGTTACCGTTTGC ATCG	20	5	
pif -2	pif-2-fw	TCATGCGCCGACAGGCA TTAC	20	0	218
	pif-2-rev	CCCGTTGACTACGTAA GTGTCAC	23	2	
pif -3	pif-3-fw	GCATACGCGCCTCCTA TGG	19	3	240
	pif-3-rev	CGCGTAGATGCGCAAC AG	18	1	
pif -4	pif-4-fw	CGCTCTATTACTACCT GGACTCG	23	2	209
	pif-4-rev	TTCCCGCCCTCCGAG AC	18	6	
pif -5	pif-5-fw	GGCGACATCAACCGCA TTAC	19	5	199
	pif-5-rev	CGGCCGAACGCACATT AG	18	1	
Actina	fw-act	ACGGAACCTCTCGTTA CCGATGG	23	6	120
	rev-act	TGCTATGTTGCCCTGG ACTTCG	22	4	

Tabla IV.1. Primers pifs para real time PCR. Se indican las secuencias de los primers diseñados para llevar a cabo las amplificaciones de los seis genes *pif*, así como sus características. La búsqueda se llevó a cabo con la secuencia del virus AgMNPV-2D, presente en *GenBank* (NC_0008520). También se incluye la secuencia de los primers utilizados para el control interno del gen de actina celular de UFL-Ag-286.

Para el diseño se tuvieron en cuenta las consideraciones necesarias para el uso de primers en *Real Time PCR*, en cuanto a la longitud de los oligonucleótidos y al producto de amplificación esperado. En la **tabla IV.1** se citan los primers diseñados para llevar adelante el ensayo.

GENERACIÓN DE PATRONES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

En primera instancia se realizaron PCRs de punto final utilizando cada par de primers y DNA del genoma de AgMNPV-2D como molde de reacción. El fin era controlar el correcto funcionamiento de los primers y obtener el producto de la PCR para luego clonarlo en un

vector comercial, secuenciarlo para certificar la identidad y utilizarlo como molde para los controles positivos y curvas de calibración en los ensayos mediante *Reverse Transcription-Quantitative PCR (RT-qPCR)*.

En todos los casos, la PCR de punto final resultó positiva con el perfil de ciclado evaluado, no presentando fragmentos de amplificación inespecífica, lo cual es fundamental para el uso de las mismas en una *RT-qPCR* (Figura IV.3). Los amplicones obtenidos fueron recuperados y clonados en el vector comercial *PGemT-Easy* (Promega) y secuenciados para verificar la identidad. En todos los casos, se obtuvo el fragmento esperado.

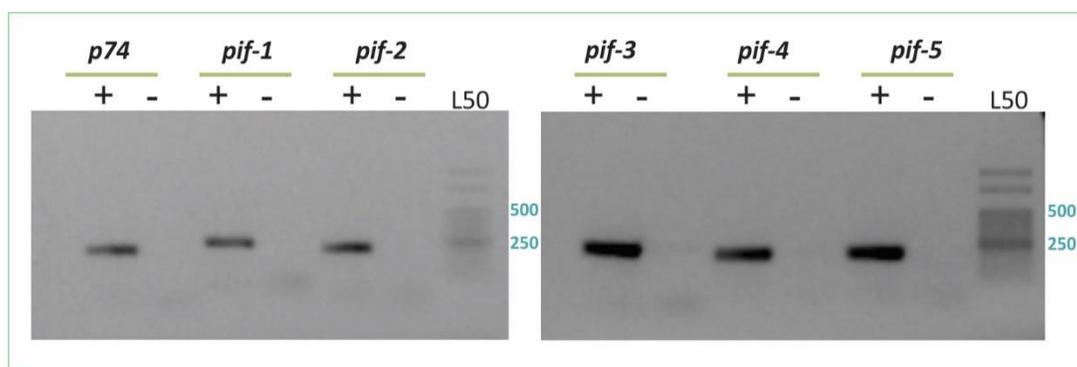


Figura IV.3. PCR de punto final con los *primerspifs* diseñados. Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR realizados con genoma de AgMNPV-2D como DNA molde y con los *primerspifs* diseñados en este trabajo de tesis. EL perfil de ciclado utilizado fue 2 min a 94°C; 35 ciclos de: 10 seg a 92°C, 15 seg a 57°C y 30 seg a 72°C; 3 min a 72°C. Se observa la presencia de banda única en todos los casos. El gel contiene un marcador de peso molecular 50 bp (PB-L).

Para utilizarlos como calibradores, los plásmidos conteniendo los insertos anteriores fueron linealizados mediante una digestión con la endonucleasa de restricción PstI y cuantificados utilizando *Nanodrop-1000* y *Qubit (ThermoFisher)*. A partir de allí, y realizando diluciones seriadas, se establecieron las curvas de calibración para la posterior cuantificación de transcritos *pifs*. La puesta a punto de cada curva se realizó en un rango de masa de plásmido patrón entre 0,001 pg y 10 pg, lo que corresponde a un rango dinámico de 300-3000000 moléculas. Por otro lado, se realizaron triplicados para cada punto de

concentración, siendo cada valor establecido el promedio de las mediciones individuales de Ct (Figura IV.4).

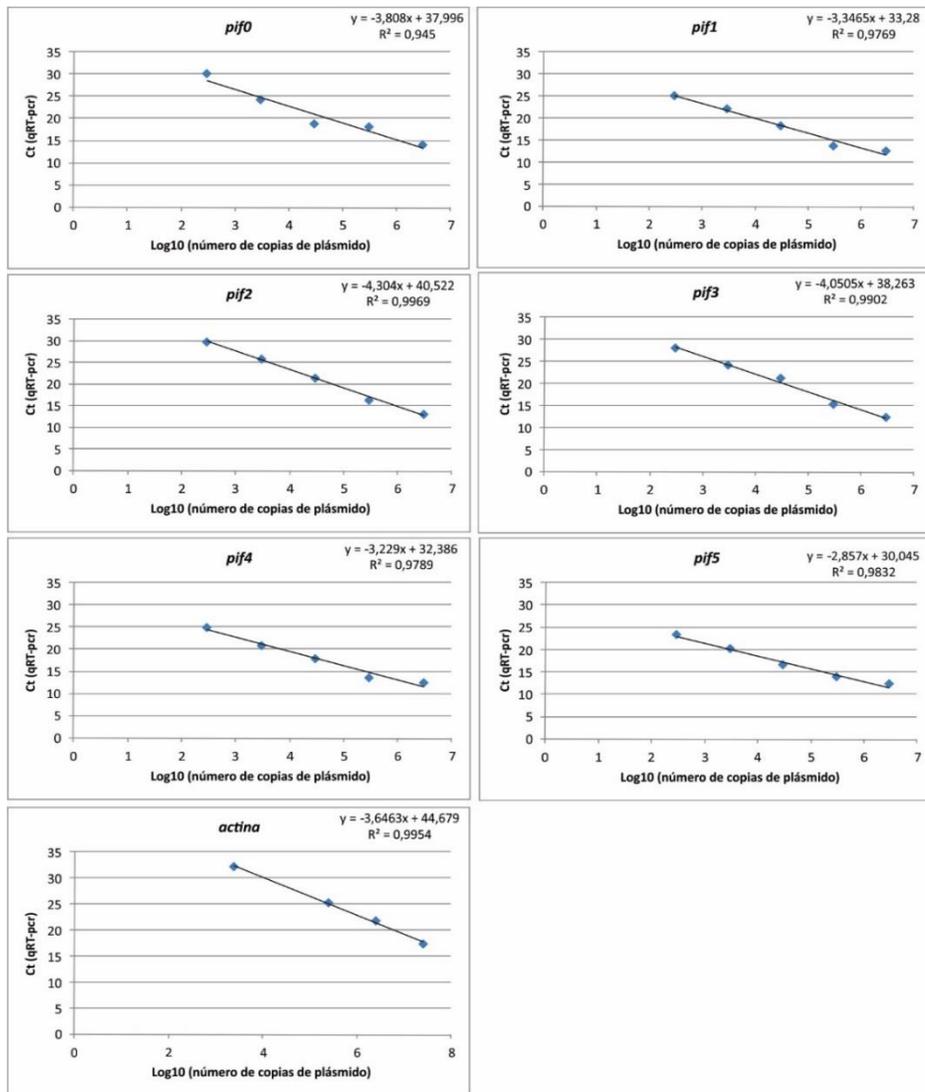


Figura IV.4. Curvas de calibración Real Time PCR. Curvas de calibración obtenidas para las *qRT-PCR*s correspondientes a cada gen *pif* y *actina*. Las mismas se realizaron con los *primers* específicos a cada *pif* y el plásmido linealizado conteniendo cada fragmento específico. Los valores de Ct indicados corresponden al promedio de 3 mediciones independientes por cada concentración. Se indican también la ecuación derivada de la regresión lineal y el coeficiente de

Se procedió del mismo modo con el fragmento de actina correspondiente al genoma de la línea celular UFL-Ag-286. El objetivo de su determinación fue la normalización de las muestras de RNA total derivado de células infectadas que se utilizarían para determinar la

cantidad de mRNAs *pifs*, siendo así el estándar interno de los ensayos que se describen a continuación.

CINÉTICA DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES PIF EN AGMNPV

Una vez optimizada la reacción de *qRT-PCR* para cada gen *pif* y *actina* celular, se realizó una cinética de infección. Para ello, se expusieron con viriones brotantes (BVs) de AgMNPV-2D (multiplicidad de infección o MOI= 10) a células UFL-Ag-286 creciendo en monocapa. A distintos tiempos post-infección (entre 0-36 hs con intervalos de 3 hs) se descartó el medio condicionado y se cosecharon las células. En el tiempo analizado, se lograron obtener 13 muestras, comenzando con t_0 , correspondiente a la muestra sin infectar, y finalizando con t_{13} , la muestra correspondiente a las 36 hs post-infección. A partir de estas muestras se realizó la extracción de RNA total (Figura IV.5.A). En este momento fue imprescindible controlar la ausencia de DNA viral y celular contaminantes, ya que sería detectado con el sistema de *RT-PCR*, dando así una sobreestimación de la cantidad de transcripto. Para verificar esto, se realizó una PCR convencional utilizando como molde de reacción cada una de las extracciones de RNA total con los *primers pif* (Figura IV.5.B). Como se obtuvo amplificación, se realizó un tratamiento extensivo con *DNAasa I (RNAasa free)*. Para verificar el correcto desempeño de la hidrólisis, se repitieron las PCRs con cada par de *primers* y utilizando la muestra tratada como molde de la reacción, no obteniéndose amplímeros detectables mediante electroforesis (Figura IV.5.C). Una vez realizado este control, se volvió a sembrar en un gel de agarosa un pequeño volumen de cada muestra tratada, con el fin de verificar la integridad de las muestras de RNA después del tratamiento efectuado mediante electroforesis, cuyo resultado fue coincidente con el encontrado en la primera extracción. Así, con la información de integridad de RNA y ausencia de DNA viral y celular, se continuó con la transcripción reversa (RT) de las 13 muestras, utilizando oligonucleótidos poli-T para la síntesis de *cDNA* de los RNAs mensajeros presentes en el extracto. Se realizó un control por PCR *endpoint* utilizando uno de los pares de *primers pif* para demostrar la presencia de *cDNA* en las muestras (Figura IV.5.D). En este control ya es

posible visualizar la presencia diferencial de molde inicial, traducida en la intensidad de bandas de producto de PCR reveladas, siendo más intensa en los tiempos finales del ciclo viral.

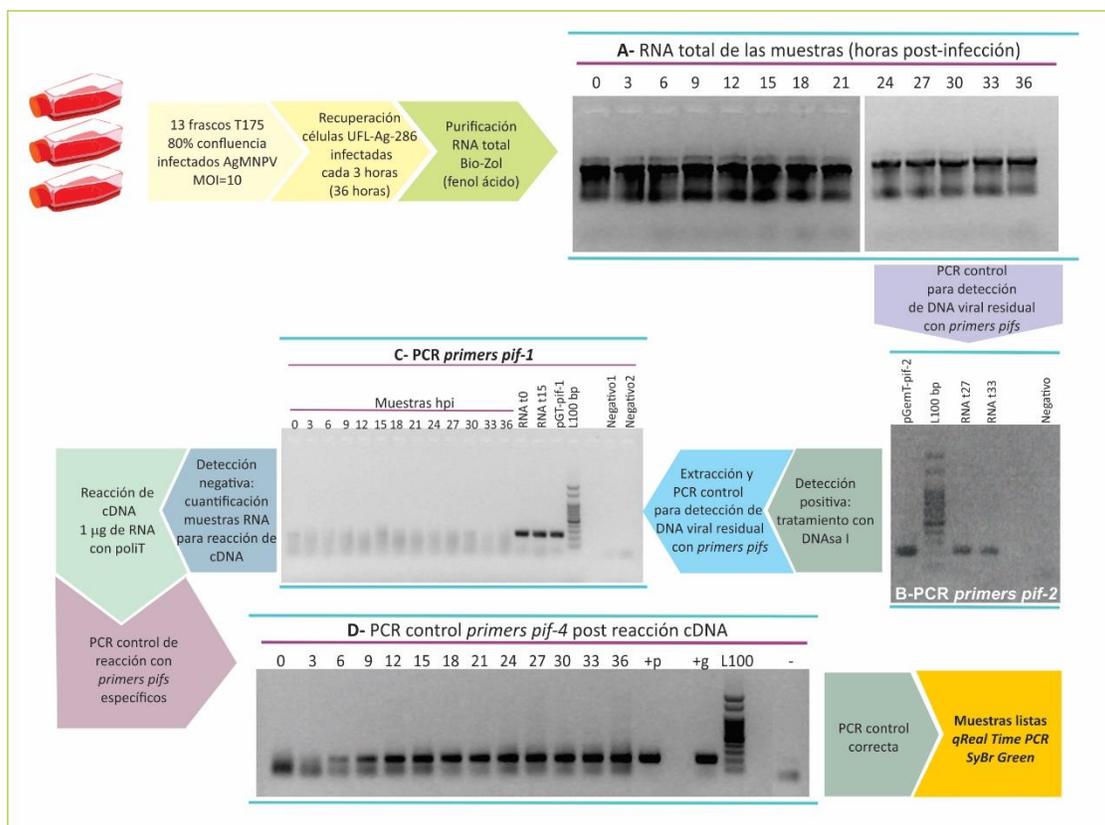


Figura IV.5. Purificación y preparación muestras RNA. Se esquematizan los pasos en la extracción del RNA desde la recuperación de la monocapa de células infectadas en los distintos tiempos. Las imágenes muestran electroforesis en gel de agarosa 1% p/v teñido con bromuro de etidio de: purificación de RNA total de las células infectadas con Ag-MNPV en distintos tiempos (A); PCR utilizando *primers* específicos *pif-2* con muestras diluidas de la extracción de RNA (B); PCR con *primers pif-1* de las muestras luego del tratamiento con DNAsa I (C); PCR con *primers pif-4* sobre las muestras de cDNA obtenidas de cada tiempo de reacción.

Finalmente, con el cDNA y con las muestras de DNA obtenidas en una segunda etapa de purificación de las muestras de la cinética de infección, se realizaron las reacciones de qRT-PCR para cada uno de los *pifs* y para *actina*. Así, los resultados se normalizaron con el estándar interno, y si bien se sabe que existen varias copias del gen codificante para actina

en el genoma celular, como en todos los casos se utilizó la misma línea y el mismo repique, el dato sirvió para realizar la comparación entre las muestras. A partir de ello se construyó el gráfico de la **figura IV.6**. Se detectó la presencia de RNA mensajero de todos los *pif* a lo largo del ciclo infeccioso. En todos los casos se visualizó la presencia mayoritaria después de las 18 horas de infección, confirmando su clasificación como genes tardíos. También se detectó una diferencia en cuanto a la cantidad de transcritos y pico máximo de presencia de cada uno, siendo *pif-1* el de mayor cantidad detectada y *pif-2* el menor. Si se toma en cuenta la cantidad de RNA total en la célula y sabiendo que entre las 24 y 48 horas post-infección los niveles de mRNA de los genes *poliedrina* y *p10* representan el 24% y el 7,5% del total del transcriptoma celular (*Chen et al, 2013*), los resultados obtenidos en niveles de transcritos de genes *pif* por célula resultaron ser muy bajos. Sin embargo, la función de estas proteínas en el ciclo infeccioso está asociada a una actividad de reconocimiento específica, mientras que la proteína Poliedrina representa un componente estructural abundante del fenotipo viral, no resultando extraños los altos niveles de este transcrito para la biosíntesis de un gran número de moléculas de péptido. Las proteínas PIF están presentes conformando un complejo en la envoltura de los ODVs, y son las responsables del contacto entre el virus y su hospedador, con lo cual es probable pensar que no son necesarias grandes cantidades de estos polipéptidos. Estos resultados son compatibles con otros ensayos de transcritos *pif* ya estudiados, en los que se ha demostrado que son de bajo nivel de expresión (*Kuzio y Faulkner, 1989; Braunagel et al, 1996; Gutierrez et al, 2004; Belaich et al, 2006*).

Para el caso de *pif-5*, si bien se encontraron 2 motivos secuenciales, TATA-box (temprano) y TAAG (tardío) (**Figura IV.1**), no se logró detectar la presencia temprana del transcrito correspondiente. Nuevamente, este resultado es coincidente con estudios previos realizados en AcMNPV, en el cual se detectó, mediante otras técnicas moleculares, el transcrito de este gen *pif* a las 18 hs post-infección (*Braunagel et al, 1996*).

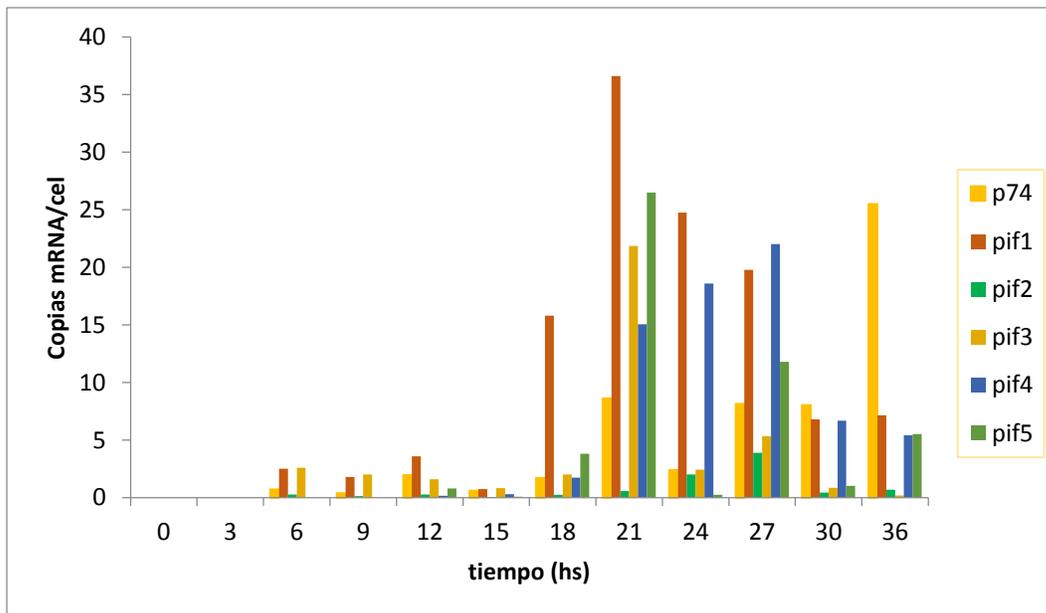


Figura IV.6. Cinética de transcripción de genes *pif*. Resultados obtenidos al realizar la cuantificación de los transcritos *pif* en las muestras obtenidas durante el ciclo viral. Los ensayos de *qRT-PCR* fueron realizados en el equipo *Cepheid Smart Cycler*. las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la *Maxima Syber Green qPCR master mix* (Fermentas) y con cada par de *primers pif* o *actina*. Los resultados fueron normalizados según la detección del transcripto de *actina* en cada muestra. Los valores representan el promedio de duplicados o triplicados de las muestras.

Con estos resultados, y sumando la información del gen *pif-6*, se podría realizar un ensayo de RACE 5' con el fin de caracterizar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y comparar los resultados con las predicciones bioinformáticas llevadas a cabo.

Se han realizado estudios transcripcionales de los genes *pif* en diferentes baculovirus. La **tabla IV.2** resumen la información disponible en bibliografía, incluyendo los resultados obtenidos en este trabajo.

Especie	Inicio transcripción (hpi)	Máximo transcripción (hpi)	Referencia
<i>pif-0</i>			
AcMNPV	12	16-20	<i>Kuzio et al, 1989</i>
CfGV	24	48	<i>Rashidan et al, 2005</i>
AgMNPV	19-21	21	<i>Belaich et al, 2006</i>
AgMNPV	9	48	<i>Oliveira et al, 2013</i>
NeabNPV	6	24	<i>Duffy et al, 2007</i>
AgMNPV	12	36	<i>Este trabajo</i>
<i>pif-1</i>			
SpliMNPV	12	24	<i>Gutierrez et al, 2004</i>
SfMNPV	48	72	<i>Simón et al, 2005</i>
AgMNPV	3	9	<i>Oliveira et al, 2013</i>
AgMNPV	12/18	21	<i>Este trabajo</i>
<i>pif-2</i>			
HaMNPV	24	72	<i>Fang et al, 2006</i>
AgMNPV	5	9/13	<i>Oliveira et al, 2013</i>
AgMNPV	24	27	<i>Este trabajo</i>
<i>pif-3</i>			
AcMNPV	12	72	<i>Li et al, 2007</i>
AgMNPV	3	9	<i>Oliveira et al, 2013</i>
AgMNPV	6/18	21	<i>Este trabajo</i>
<i>pif-4</i>			
BmNPV	12	72	<i>Xu et al, 2006</i>
AgMNPV	3	5	<i>Oliveira et al, 2013</i>
AgMNPV	18	27	<i>Este trabajo</i>
<i>pif-5</i>			
CfGV	24	96	<i>Rashidan et al, 2005</i>
AcMNPV	16	36	<i>Braunagel et al, 1996</i>
AgMNPV	3	13	<i>Oliveira et al, 2013</i>
AgMNPV	18	21	<i>Este trabajo</i>
<i>pif-6</i>			
AcMNPV	3	48	<i>Li et al, 2008</i>
BmNPV	12	24	<i>Xu et al, 2008</i>
AgMNPV	5	9	<i>Oliveira et al, 2013</i>

Tabla IV.2. Transcripción de genes *pif*. La tabla indica las hpi donde comienza la transcripción, así como su detección máxima. Se citan los trabajos de los cuales se obtuvo la información.

Se observa una gran variabilidad en cuanto a los resultados obtenidos para cada *pif* en los diferentes virus. *Olivera et al, 2013* detectaron la presencia de los transcritos en momentos más tempranos del ciclo infectivo, siendo 3 hpi el menor tiempo detectado. Estos resultados son los más disímiles respecto de lo descrito en la bibliografía para otras especies virales, aunque argumentan que la pronta aparición de transcripto se podría deber al rápido inicio de la replicación detectado cuando se propaga en la línea celular UFL-Ag-286, 2 hpi, valor previo al descrito en otras especies virales (*Castro et al, 1997; Habib y Hasnain, 2000*).

En este trabajo se detectó la presencia de transcritos de *pif-1* y de *pif-3* en baja cantidad a las 6 hpi. Si bien estos resultados no son coincidentes con los esperados para la expresión de genes tardíos y muy tardíos, la cantidad relativa por célula detectada fue mínima. Por otro lado, estos resultados están relacionados con los hallados previamente en el mismo sistema virus-hospedador (*Olivera et al, 2013*). Si bien no se ha reportado la presencia en las partículas virales de proteínas virales relacionadas con los eventos de transcripción, sí se ha detectado la expresión temprana de genes. Aun cuando no está claro cuál sería el mecanismo, estos eventos podrían sugerir que las partículas virales llevan en su estructura proteínas que permiten tales eventos (*Rohrmann et al, 2013; Chan et al, 2013*).

CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS PIF. ESTUDIOS GENERALES PREDICTIVOS Y PARTICULARES SOBRE PIF-0

Siguiendo con el estudio del grupo de genes *pif* y con el fin de comprender como funcionan sinérgicamente para lograr la infección *per os*, se continuó con la caracterización de las proteínas codificadas por ellos. A lo largo de este capítulo se llevó a cabo un estudio bioinformático predictivo de similitud relativa, dominios de direccionamiento y de anclaje a membrana. Por otro lado, se analizó en mayor detalle a la proteína PIF-0 con el fin de diseñar un modelo viral genéticamente modificado con utilidad mejorada bioinsecticida.

Estudios composicionales de las proteínas PIF

A partir de la información de secuencia de los baculovirus presente en la base de datos *GenBank*, se obtuvieron las secuencias codificantes de las proteínas PIF del Grupo I de los *Alphabaculovirus*, grupo que contiene el baculovirus modelo de esta tesis AgMNPV, para realizar los análisis bioinformáticos.

Así se logró determinar el grado de homología, presencia de posibles dominios transmembrana, señales de exportación nuclear, el Peso Molecular (PM) y el Punto Isoeléctrico (PI) para las proteínas PIF (Figura V.1).

En primera instancia se realizó un análisis de similitud relativa (Figura V.1). Los resultados muestran que la proteína PIF-2 es la más conservada, con un promedio de 0,74, mientras que la de menor similitud corresponde a PIF-3, con un valor de 0,57. Sin embargo

en todos los casos se evidencian subregiones de alta conservación y otras muy divergentes, representadas como picos y valles en el gráfico.

Como se sabe por estudios previos, todas las proteínas PIF descritas están presentes en la envoltura de los ODVs (*Faulkner et al, 1997; Slack et al, 2001; Perera et al, 2007; Song et al, 2008; Hou et al, 2013; Torres Braconi et al, 2014; Xu et al, 2011; Wang et al, 2011; Zhang et al, 2015*). Además, y particularmente para PIF-0 de AcMNPV, se sabe que la región carboxilo terminal (Ct) es la responsable del anclaje a la membrana, mientras que la región amino terminal (Nt) queda expuesta al exterior del ODV siendo la responsable de la actividad biológica (*Slack y Lawrence, 2005; Slack et al, 2008; Peng et al, 2011*). Viendo la importancia que tendría la asociación a la membrana, se realizaron estudios predictivos sobre las posibles regiones transmembrana contenidas en las proteínas PIF de AgMNPV, representadas en la **figura V.1** (TMHMM, <http://www.expasy.org/proteomics>). En tal sentido, para todas se logró predecir la presencia de probables dominios que atravesarían la envoltura lipídica. Por ejemplo, para PIF-0 se localizaron 3 regiones entre los aminoácidos 435-457, 590-609 y 613-630, estimando una región comprendida entre los aminoácidos 1-434 como ectodominio, coincidente con los estudios previos mencionados. Para el caso de PIF-1, se predijo un dominio transmembrana entre los aminoácidos 2-24 y un ectodominio entre los residuos 25 a 531. Del mismo modo resultó para PIF-2 y PIF-3, con un ectodominio entre los aminoácidos 23-382 y uno transmembrana entre 5-22 para PIF-2 y dominio extracelular entre 30-203 y transmembrana entre 7-29 para PIF-3. Para PIF-4, se predijo también un dominio transmembrana en la región Nt (aminoácidos 4-22), aunque la región comprendida entre los residuos 23-174 sería un endodominio. Se ha localizado la proteína PIF-4 tanto en la envoltura de ODVs como de BVs, demostrando la presencia de un dominio transmembrana (*Xu et al, 2006; Fang et al, 2009*). Sin embargo, la orientación del dominio Ct no fue analizada. Sí se sabe que se asocia con el complejo PIF mediante interacciones no covalente débiles (*Peng et al, 2012*). Para PIF-5, se predijo un dominio transmembrana en la región Ct (residuos 320-342), dejando un ectodominio Nt entre los aminoácidos 1-319 y una pequeña región interna, entre 343-370. Finalmente, la predicción para PIF-6 de

AgMNPV corresponde a un dominio transmembrana entre los residuos 94-116, sugiriendo un dominio interno entre los residuos 1-93 y una pequeña región externa, entre 117-132.

Dada la localización de las proteínas PIF en la envoltura de los ODVs, es lógico asumir la presencia de señales que localicen las proteínas en el núcleo, lugar en donde se genera el fenotipo viral mencionado. En ningún caso pudo predecirse la existencia de una señal de localización típica nuclear (o NLS del inglés *Nuclear Localization Signal*), caracterizada por ser secuencias ricas en aminoácidos básicos mono o bipartitas. Sin embargo, sí pudieron predecirse la presencia de señales de exportación nuclear o NES (*Nuclear Export Signals*), la cual se asocia al transporte desde el núcleo hacia el citoplasma, mediante procesos dependientes de energía (ExpASy, NetNES, <http://www.expasy.org/proteomics>; *Elfgang et al, 1999*). En la **figura V.1**, se indican las señales NES. Se lograron predecir para PIF-0 (residuos 448-455), PIF-1 (6-15), PIF-2 (10-13), PIF-3 (10-16) y PIF-6 (103-109), pero no para PIF-4 y PIF-5.

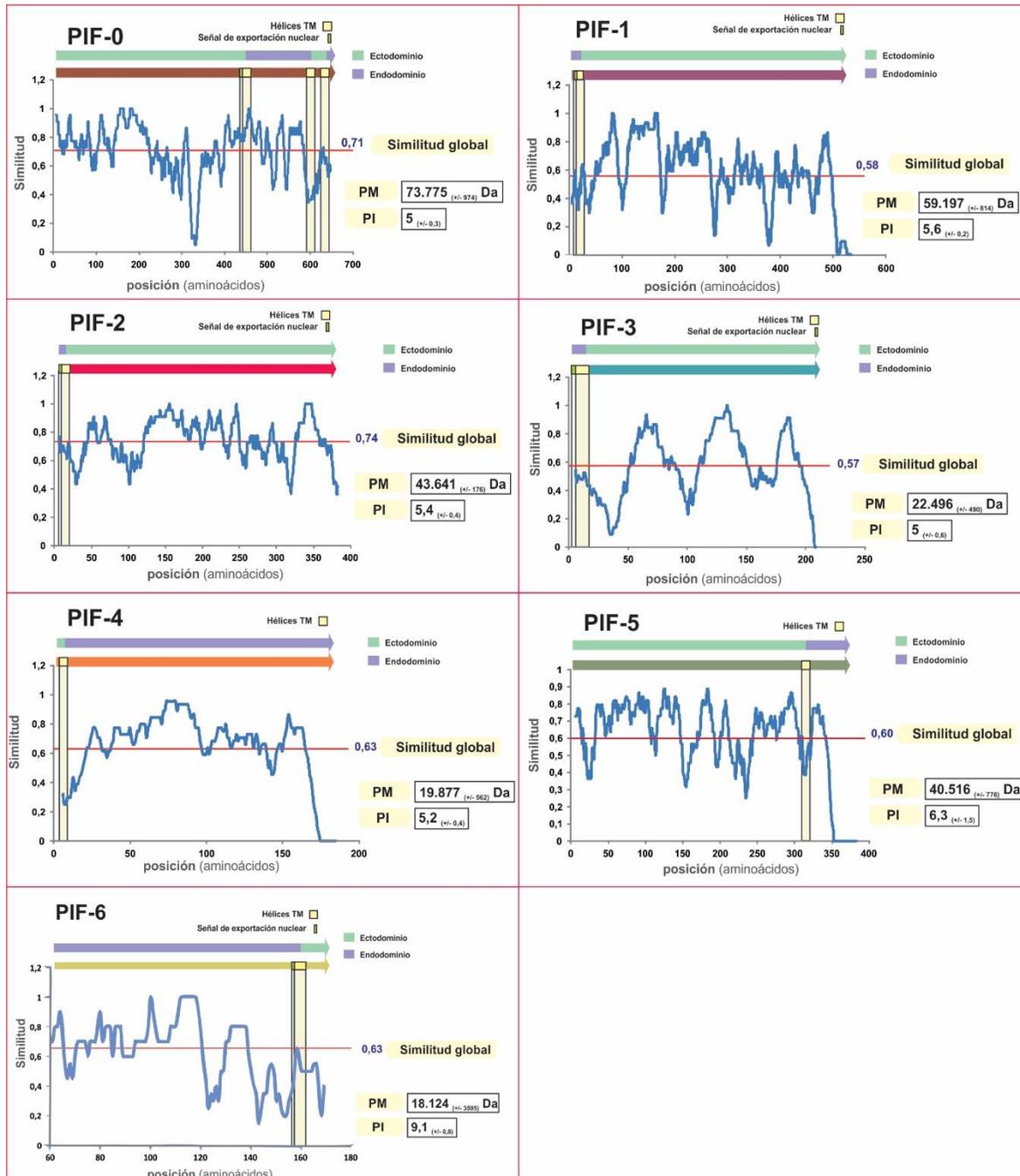


Figura V.1. Predicciones bioinformáticas para proteínas PIF de AgMNPV. Se realizaron el análisis de similitud relativa, cálculo de PM y PI de las 7 proteínas PIF de los *Alphabaculovirus* del Grupo I. Para ello se realizaron alineamientos múltiples en ClustalX y posterior análisis de homología relativa asignando valores arbitrarios (1 para indentidad; 0,5 y 0,25 para diferentes grados de conservación; 0 para no identidad). Para el cálculo de PM y PI se utilizó el software *Compute PI/MW*, www.expasy.org/tools). Además, se realizaron predicciones de dominios transmembrana y señales de exportación nuclear para las proteínas de AgMNPV. Para la señal de exportación nuclear, Netnes 1.1 server (<http://www.expasy.org/proteomics>) y dominios transmembrana, TMHMM (<http://www.expasy.org/proteomics>).

Con el objetivo de completar el análisis de localización de las proteínas PIF, se realizó un ensayo de *Western Blot* de fracciones de ODVs. Para ello se utilizaron suspensiones de poliedros de AgMNPV, a partir de las cuales se aislaron los viriones infectivos del fenotipo tardío, los ODVs. Para obtener una información más específica, se realizó un tratamiento con NP-40 para separar, después de una ultracentrifugación en colchón de sacarosa, fracciones conteniendo por un lado la envoltura de los ODVs y por el otro, las nucleocápsides (Yin *et al*, 2003). Dado que no se disponía de anticuerpos específicos para la detección de cada una de las proteínas PIF, se utilizó un suero policlonal anti ODV de AgMNPV, obtenido luego de inocular un conejo con dichas partículas (Mengual Gómez, 2013). Como las proteínas PIF se encuentran en la envoltura del ODV, se esperaba que el suero recuperado sea reactivo contra las mismas (Figura V.2).

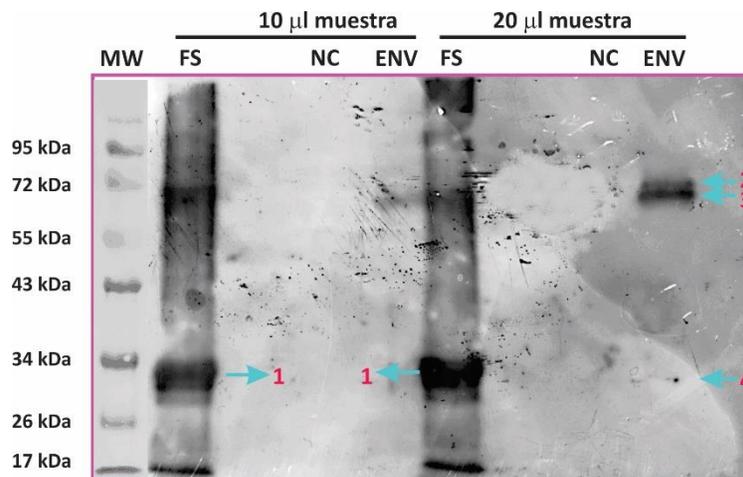


Figura V.2. Localización de proteínas en ODVs de AgMNPV. Placa radiográfica revelada con biolumina (PB-L) de un ensayo de *Western blot*, utilizando anticuerpos anti-ODVs de AgMNPV-2D como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-conejo-HRP como secundario. La membrana fue expuesta 3 minutos a la placa radiográfica. Se agregó a la imagen las bandas correspondientes al peso molecular (MW, *Page Ruler*, Fermentas). Las muestras corresponden a la fracción soluble de la suspensión de ODVs (FS), la fracción correspondiente a nucleocápsides (NC) y a envoltura de ODVs (ENV). Se sembraron 10 y 20 µl de muestra en los 3 casos. **1)** Coincide con el PM de Poliedrina (29 KDa). **2)** Coincide con el PM de PIF-0 (74 kDa). **3)** No coincide con ninguna proteína PIF, pero sí con ODV-66 (66 kDa), proteína presente en la envoltura de ODV. **4)** Coincide con el PM de Poliedrina (29kDa)

La fracción soluble representa el sobrenadante que se obtuvo luego de la precipitación de los ODVs. Los resultados de *western blot* indicaron una alta carga proteica reactiva al suero policlonal correspondiente a los ODVs y, en particular, se destacó la presencia de una banda coincidente con el PM de la proteína mayoritaria de los cuerpos de oclusión, Poliedrina. Las fracciones correspondientes a nucleocápsides (NC) y envoltura de ODVs (ENV), en cambio, fueron muy poco reactivas. Hay que tener en cuenta que, con la ultracentrifugación, la muestra sufrió una dilución importante. Sin embargo, se verificó la presencia de proteína en los extractos obtenidos. Aunque las nucleocápsides están asociadas a una alta carga proteica, en especial a VP39, no se obtuvo marca. El suero anti-ODV primario podría no contener anticuerpos que reconozcan los epítopes asociados a esta proteína. Por otro lado, en la fracción ENV sí se obtuvo marca cuando se inocularon 20 μ l de muestra (Figura V.2). En particular se logró asociar una de ellas con el PM de PIF-0, 74 kDa. Se obtuvo otra clara marcación, pero su PM no coincidió con los esperados para las proteínas PIF. Sin embargo, coincide con la proteína ODV-E66, de 66 kDa, presente en la envoltura de los ODVs (Hong et al, 1994; 1997). Si bien esta proteína no es parte de las *core proteins*, ha resultado ser esencial para el establecimiento de la infección primaria en AcMNPV, por lo que su presencia es crucial en la envoltura de los ODVs, al igual que las PIFs (Xiang et al, 2011 [B]). A pesar de haber realizado una exhaustiva purificación, también se detectó una banda coincidente con el PM de Poliedrina, resultado probable de una traza presente en la muestra.

A excepción de PIF-0, no se obtuvieron marcas correspondientes a las otras proteínas PIF. Este resultado podría correlacionar con la poca cantidad de proteínas PIF presentes en la envoltura. De hecho, ensayos de inmunodetección con partículas de oro detectaron unas pocas señales por ODV de AcMNPV (Peng et al, 2010).

Con toda la información predictiva y experimental, sumada a la obtenida de bibliografía, se propuso un modelo de distribución y orientación de las proteínas PIF en la envoltura de los ODVs (Figura V.3). Se consideró un *core* compuesto por PIF-1, PIF-2 y PIF-3, que interactúan junto con PIF-0 y PIF-4 para conformar el Complejo PIF (Peng et al, 2010; 2012). Todas con excepción de PIF-0 tendrían un dominio transmembrana, que delimitaría el ectodominio y el endodominio. PIF-0 contendría 3 dominios transmembrana, exponiendo un gran ectodominio Nt. PIF-4, presentaría según las predicciones un endodominio mayor, correspondiente con el funcional, al igual que PIF-6, proteína que interactuaría más débil con el complejo. PIF-5, estaría sin interacción con el complejo, posiblemente llevando a cabo funciones sinérgicas con el mismo.

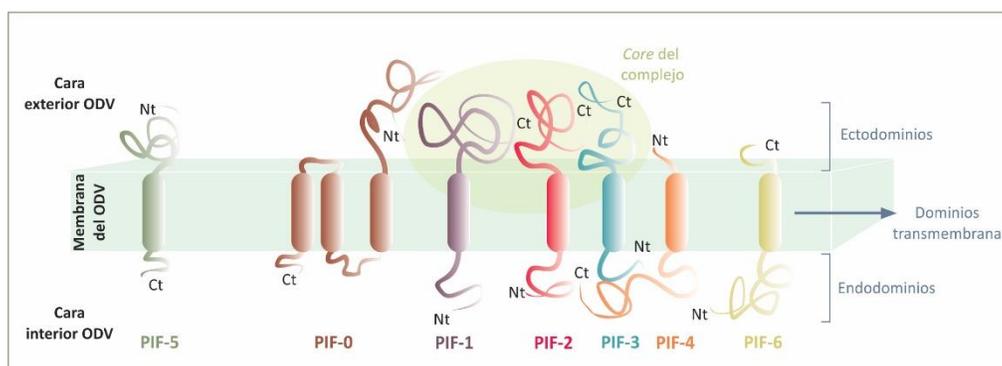


Figura V.3. Topología probable para las proteínas en la membrana del ODV. Esquema que representa la posible distribución de las proteínas PIF en la membrana del ODV: Se tuvo en consideración las predicciones bioinformáticas y la información experimental obtenida y recuperada de bibliografía.

PIF-0 en *Alphabaculovirus*

Una de las proteínas PIF mejor descrita en su asociación con el rango de hospedador y, por ende, con la infectividad oral específica es P74 o PIF-0. Se decidió como parte de un estudio funcional de esta proteína y, con el objetivo de utilizar regiones o dominios particulares de la misma para realizar modificaciones que amplíen o restrinjan el rango de hospedador, analizarla más en profundidad en los *Alphabaculovirus*. En primera

instancia, se determinó la similitud relativa, tal y como se describió previamente (Figura V.1). Luego se evaluó la presencia de dominios transmembrana y señales de localización nuclear NES, para los representantes de este género. Con ello se logró generar un modelo de PIF-0 consenso para los *Alphabaculovirus* (Figura V.4). En todos los casos analizados se encontraron 3 dominios transmembrana, como también señales NES, aunque las mismas variaron en la cantidad de aminoácidos involucrados entre especies. De todos modos, se localizaron cerca del dominio transmembrana más cercano a la región Nt de la proteína. Por otro lado, se encontró próximo a esta señal una triada aminoacídica conservada, WDP, que, al analizarse en función de su secuencia nucleotídica, resultó ser una región conservada y con la presencia de un sitio de restricción BamHI en casi todos los genomas (Figura V.4). La única variación encontrada del sitio GGATCC, fue en la posición “T”, en la que en algunos genomas se encontraba una “C”, fácilmente sustituible mediante una mutación puntual. Este sitio conservado fue el seleccionado para establecer dos grandes regiones de PIF-0 y

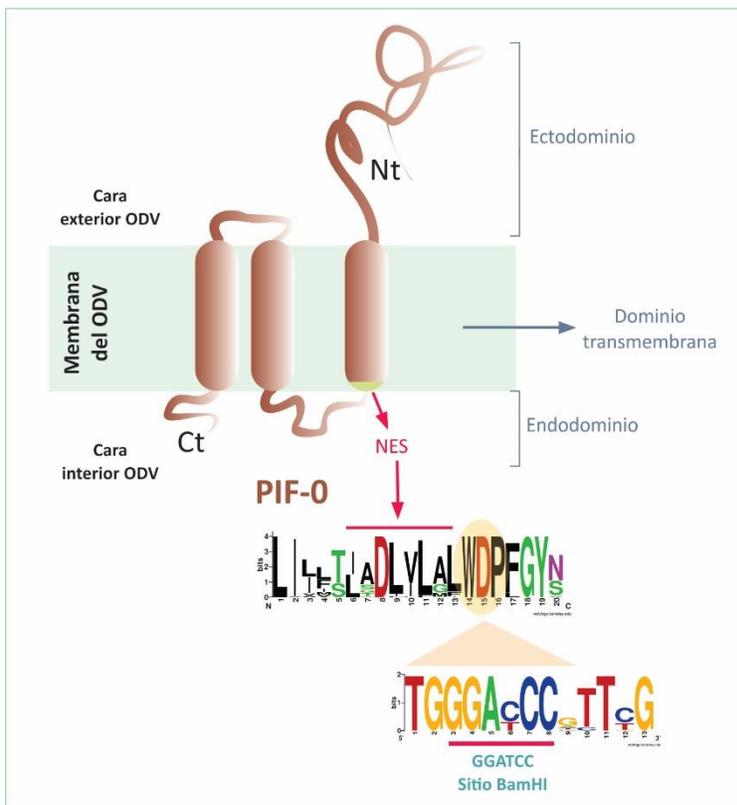


Figura V.4. Topología probable PIF-0. Esquema que representa la posible distribución de PIF-0 en la membrana del ODV. Fue realizado al evaluar las proteínas PIF-0 de las especies virales de *Alphabaculovirus*. Se representan los dominios transmembrana, como el ectodominio y endodominio, además de la señal NES. Se esquematizó mediante Sequence Logo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) la región aminoacídica cercana a la señal NES, como también la secuencia nucleotídica representante de la triada aminoacídica WDP conservada.

así evaluar la funcionalidad de la proteína.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de las regiones amino y carboxilo terminal de PIF-0, se utilizó el sitio BamHI (presente en la triada WDP) para la generación de quimeras entre genes de distintas especies virales sin afectarse el marco de lectura. Así, a través de este sitio puede fácilmente separarse el Ectodominio más la primer Región transmembrana (denominado a partir de aquí como DOM-Nt), de los Endodominios A y B más las otras Regiones transmembrana (denominado a partir de aquí como DOM-Ct).

Con el diseño propuesto y en base a las predicciones realizadas y a los estudios previos, se puede inferir que el dominio amino terminal de la proteína PIF-0 es el responsable de la especificidad de interacción con el hospedador y el carboxilo terminal, del anclaje a la membrana, pudiéndose, entonces, intercambiar el dominio activo Nt, que estaría involucrado en la definición del rango de hospedador, por otro dominio equivalente de otro baculovirus, con el fin de modificar el rango de hospedador. Para la evaluación de estas funciones, se plantearon dos grandes objetivos experimentales. Por un lado, la selección de especies virales representantes de los Grupos I y II de *Alphabaculovirus* para la generación de las quimeras de PIF-0 y, por el otro, la modificación genética de un genoma viral para eliminar el gen PIF-0 *wild type* y poder incluir las versiones modificadas para evaluar el rango de hospedador.

Para esto se propuso una estrategia basada en la generación de un báculo AcMNPV *knock-out* para el gen *pif-0* (basado en el báculo del sistema *Bac to Bac*, Invitrogen), el cual sería complementado por variantes quiméricas de dicha proteína. Los candidatos para el estudio fueron los genes *pif-0* de AcMNPV y AgMNPV (*Alphabaculovirus* del Grupo I), y SeMNPV y HearMNPV (*Alphabaculovirus* del Grupo II).

Las quimeras se obtuvieron mediante la amplificación de los ORFs de los 4 genomas, y posteriores rondas de clonado. Se generaron construcciones en el vector PFastBAC-dual (*Life Technologies, 2015*), que contiene dos promotores del baculovirus AcMNPV, *p10* y *poliedrina*, ambos tardíos y fuertes (Figura V.5.A y B). Bajo el primero se insertó el ORF de

gfp (*Green Fluorescence Protein*), con el fin de seguir la infección a través de fluorescencia. En tanto, bajo el promotor *poliedrina* se insertaron las variantes de *pif-0*, ya sea en su versión íntegra, quimérica o sólo la región Nt de los virus utilizados (Figura V.5.B). Por otro lado, se construyeron plásmidos basados en el vector PFastBAC HTB (*Life Technologies, 2015*) con la región Nt o Ct del gen *pif-0* de AcMNPV fusionada a la proteína fluorescente DSRED2, con el fin de localizarla en el interior de la célula en el entorno de una infección sobre una monocapa celular susceptible. (Figura V.5.A).

Para los genes *pif-0* de AgMNPV, SeMNPV y HearMNPV, el sitio BamHI se encontraba naturalmente, mientras que en AcMNPV el mismo se introdujo mediante una mutación puntual de C por T sobre el ORF clonado previamente en un vector adecuado.

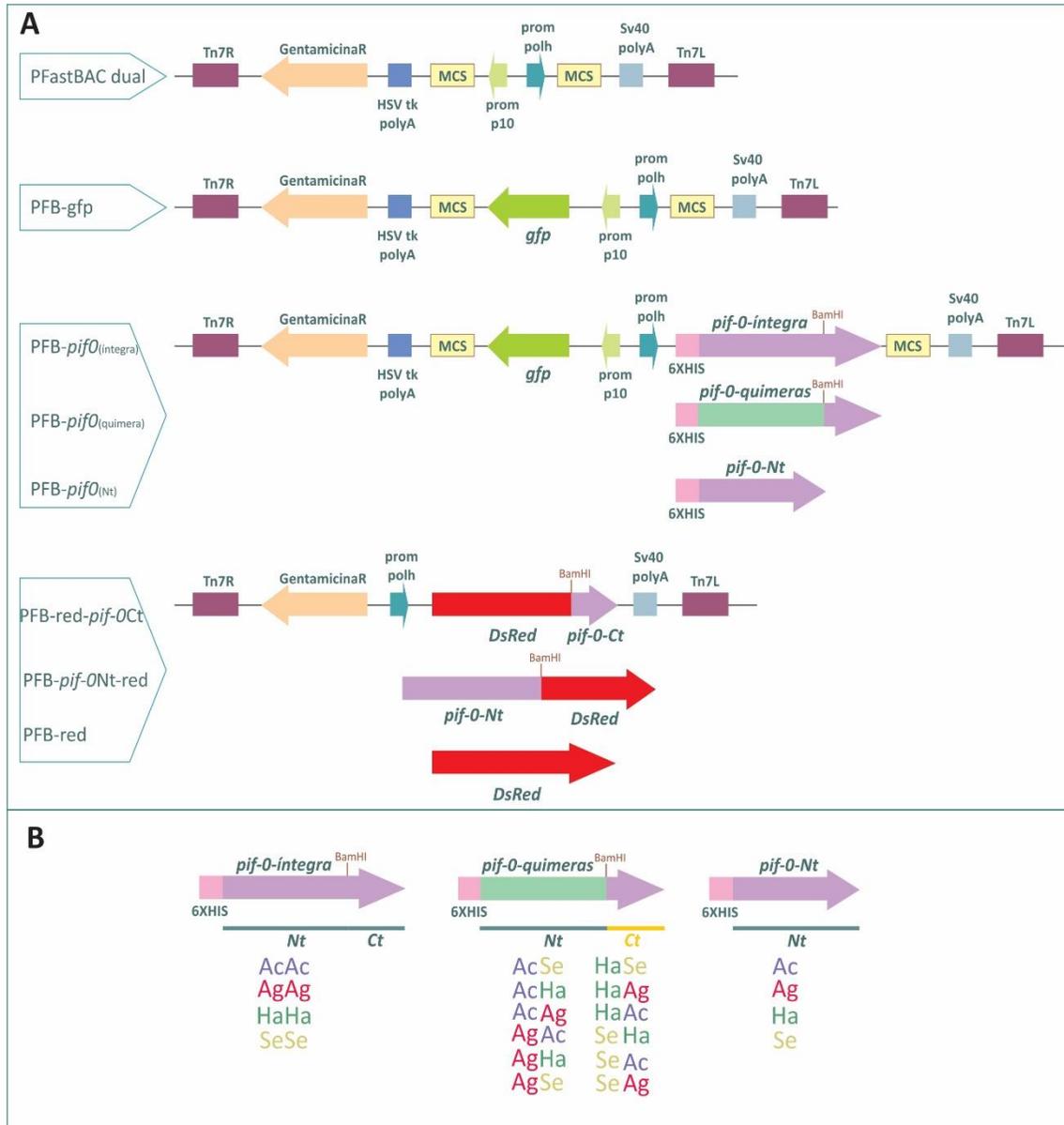


Figura V.5. Construcciones de las variantes de *pif-0*. **A)** Esquema representativo de los plásmidos obtenidos con las variantes del gen *pif-0*, en sus versiones íntegra, quimérica o Nt. También se muestran las fusiones con la proteína DsRED. **B)** Detalle de las versiones de *pif-0* íntegra, quimérica y Nt con los virus representantes del género *Alphabaculovirus*: AcMNPV (Ac), AgMNPV (Ag), SeMNPV (Se), HearMNPV (Ha). La nomenclatura “AcAc” indica la versión íntegra de *pif-0* de AcMNPV; “AcSe” indica la versión quimérica de *pif-0* con región Nt de AcMNPV y Ct de SeMNPV; “Ac” indica la versión Nt de *pif-0* sólo con la región Nt de AcMNPV y así sucesivamente.

Con las construcciones generadas en el vector pFastBAC HTB conteniendo las quimeras de las regiones de PIF-0 junto a la proteína fluorescente DsRED2, se procedió a generar los AcMNPV recombinantes mediante los eventos de transposición en bacterias y posterior transfección de los bácmidos en células de insecto Sf9 (*Life Technologies, 2015; Sf9-ATCC® CRL-1711™*).

Para ello, se partió de un baculovirus modificado con capacidad de replicar en bacterias al contener un origen de replicación reconocido por la maquinaria bacteriana, ampliamente utilizado para la fácil generación de virus recombinantes y con un diseño particular que permite la expresión de proteínas heterólogas, el bácmido bMON14272 basado en el *Alphabaculovirus* AcMNPV cuyo desarrollo derivó en la comercialización del sistema *Bac to Bac* (*Luckow et al, 1993; Life Technologies*). Con este sistema se generaron las variantes recombinantes del virus, que contenían alguna de las versiones de *pif-0* fusionadas con DsRed previamente mencionadas (**Figura V.5.A**).

Así se obtuvieron los virus recombinantes AcMNPV_pif0Nt-DsRed, AcMNPV_DsRed-pif0Ct, AcMNPV_DsRed. Con ellos se infectó una monocapa de células Sf9 y luego de 48 horas se visualizaron en microscopio de fluorescencia (**Figura V.6.A-B**). Los resultados demostraron la presencia de la proteína DsRed, y su localización diferencial cuando está fusionada a la porción Nt o Ct de la proteína PIF-0 de AcMNPV. En el caso de la fusión con el dominio Nt se observó una distribución citoplasmática. De hecho, en las imágenes obtenidas luego de fijar las células, se apreció la distribución de la fluorescencia alrededor del núcleo (localizado por su tinción con DAPI), mientras que cuando estaba fusionada con el dominio Ct, la fluorescencia se localizó mayoritariamente en el núcleo, co-localizando con la marca del DAPI (**Figura V.6.A**). Estos resultados concuerdan con las hipótesis planteadas, ya que la ausencia de dos de los dominios transmembrana en la fusión Nt dificultó la localización nuclear característica de PIF-0, dando lugar a una distribución de fluorescencia por toda la célula. Faltaría realizar un ensayo de microscopía confocal para evaluar si la

distribución de la fusión DsRed-PIFOct se da inespecíficamente dentro del núcleo o se localiza en la membrana nuclear.

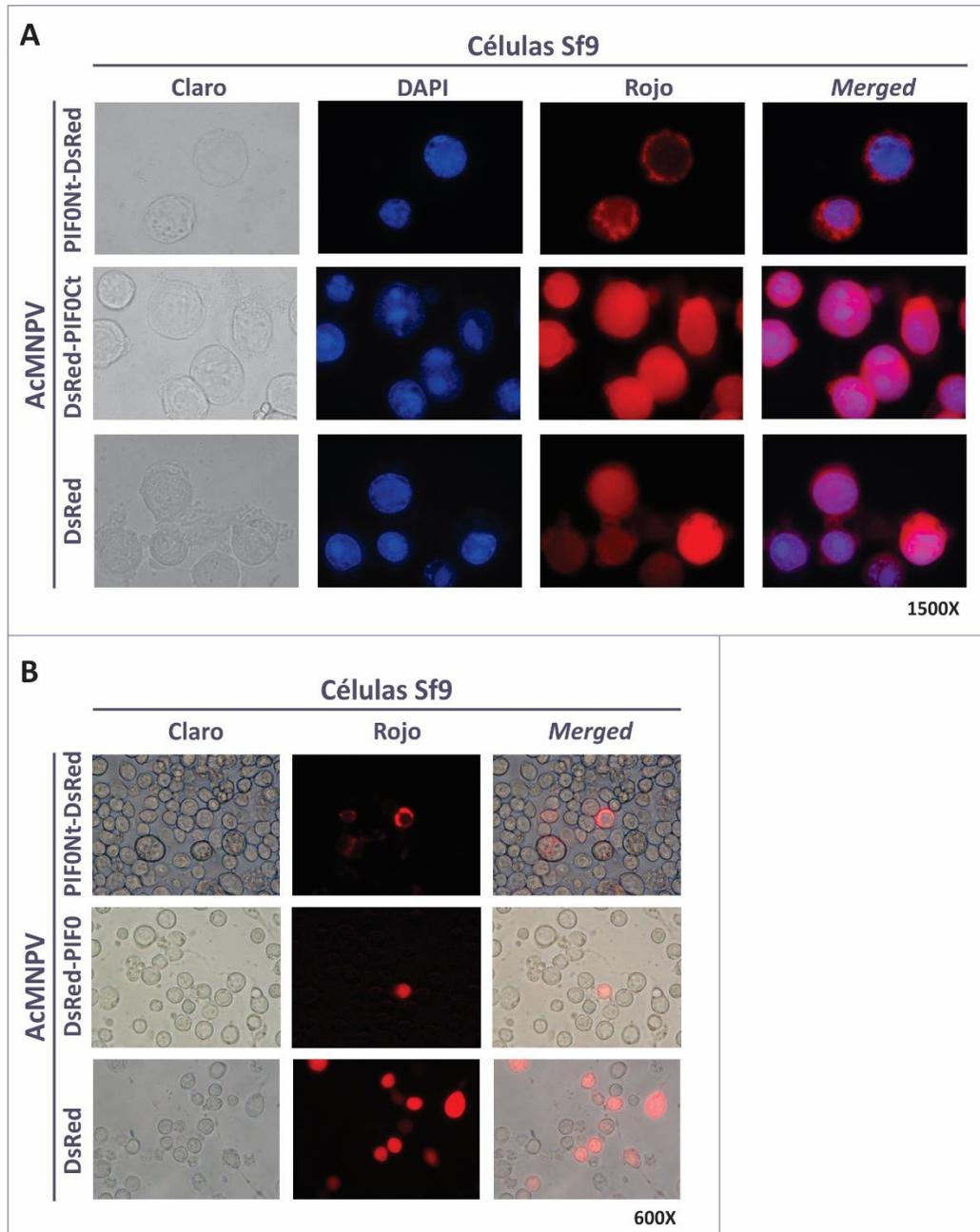


Figura V.6. Microscopía de fluorescencia AcMNPV quimeras PIF0/DsRed. Resultados de las microscopías de fluorescencia obtenidos sobre monocapas de células Sf21 infectadas con los AcMNPV recombinantes que expresan las fusiones entre los dominios de la proteína PIF-0 y DsRed. **A)** Monocapa infectada y fijada con glutaraldehído, visualizada en campo claro, filtro DAPI y rojo; la última columna corresponde al solapamiento de la imagen en DAPI y rojo. Aumento 1500X. **B)** Monocapa infectada y visualizada en campo claro y filtro rojo con un aumento de 600X. La última columna corresponde al solapamiento de las imágenes previas.

Para la evaluación de las quimeras de PIF-0 construidas, fue necesario contar con una variante viral que carezca de la proteína PIF-0 *wild type*. Para ello, se propuso interrumpir al gen *pif-0* del bácmido AcMNPV, con el fin de establecer un sistema rápido de incorporación de los genes quiméricos *pif-0*, ya que la inserción se llevaría a cabo del mismo modo que el clonado del sistema *Bac to Bac*. Para ello se diseñó una estrategia basada en recombinación homóloga de doble punto, co-transfectando un plásmido donador y el bácmido de AcMNPV en una línea celular susceptible (Sf9 o Sf21). El plásmido donador contenía parte de la secuencia del gen de *pif-0* del virus AcMNPV interrumpido con la secuencia codificante para la proteína Poliedrina de AcMNPV y el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Figura V.7). Luego de realizar la co-transfección y de recuperar el sobrenadante conteniendo los virus BVs mutantes y *wild type*, se realizó una purificación del DNA genómico contenido en las mismas, tal y como se detalla en materiales y métodos. Luego, se transformaron bacterias DH10B electrocompetentes con el DNA viral purificado y se realizaron selecciones en placas conteniendo los antibióticos kanamicina y cloranfenicol, además de IPTG y el compuesto X-gal, para encontrar aquellas variantes virales con su sistema de selección *Bac to Bac* intacto y que contengan las resistencias a los dos antibióticos. De esta manera, se buscaba encontrar las variantes del bácmido que hayan incorporado las secuencias del plásmido donador. Finalmente, se realizó un diagnóstico genotípico, con el fin de corroborar la recombinación esperada. La figura V.7 esquematiza todo el diseño de trabajo.

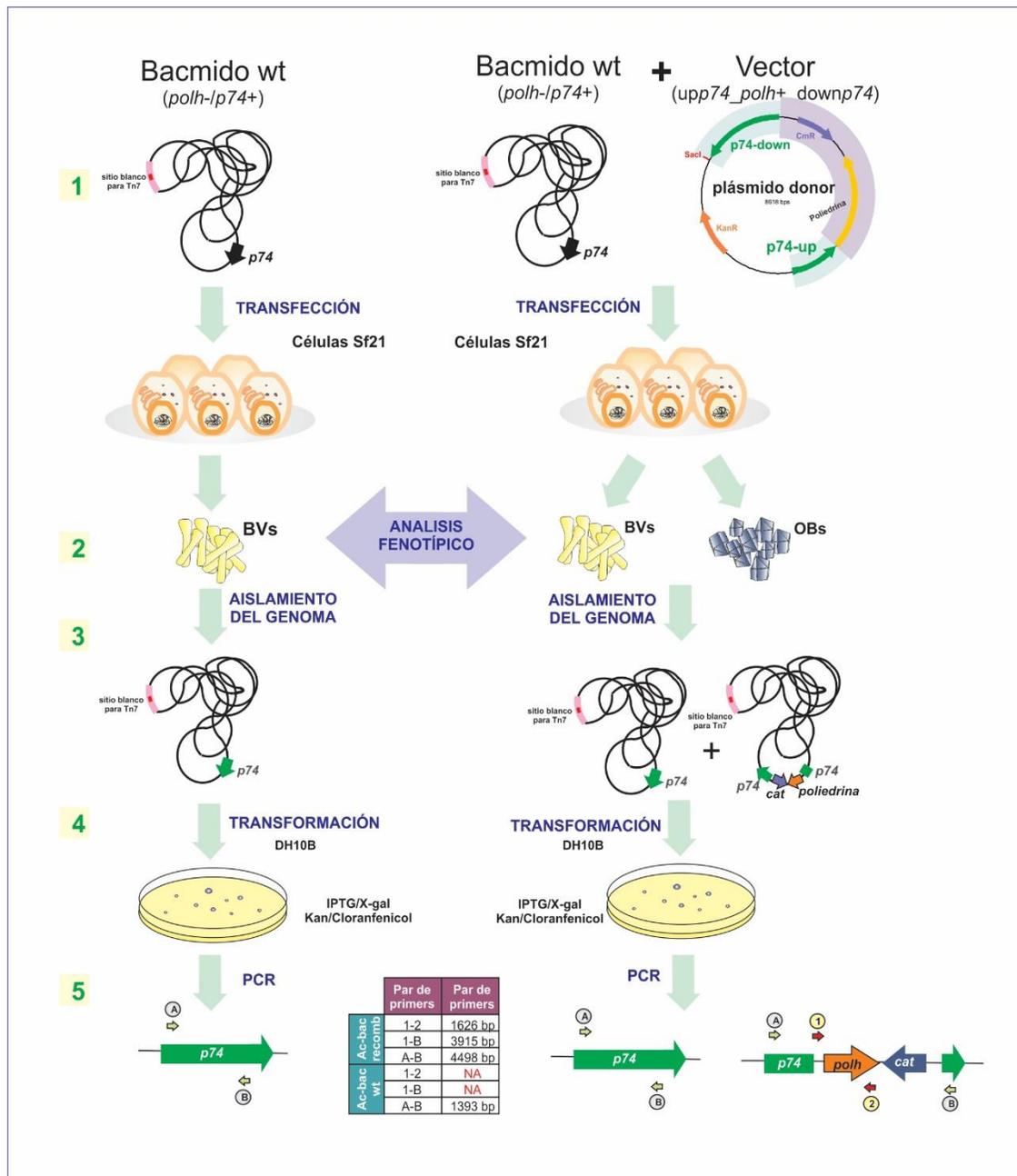


Figura V.7. Diseño experimental para la generación del b́acmido AcMNPV *knockout* para *pif-0*. Esquema de trabajo que representa los pasos necesarios para la obtenci3n del sistema basado en el b́acmido AcMNPV_{*polh+/p74-*}. El primer paso consisti3 en la co-transfecci3n de genoma purificado del b́acmido AcMNPV con el plásmido donador a células Sf21, conteniendo la secuencia para lograr la interrupci3n del gen *pif-0* con el gen *poliedrina* y resistencia a cloranfenicol (1). Luego, análisis fenotípico, presencia de poliedros en las monocapas infectadas (2). Posteriormente, aislamiento del genoma de las partículas BVs recuperadas por ultracentrifugaci3n en colch3n de sacarosa (3) y trasformaci3n del DNA a bacterias *E.coli* DH10B (4). Finalmente, b́squeda de colonias en placas de LB suplementado con kanamicina, cloranfenicol, IPTG y X-Gal y control por PCR de las colonias azules (5).

Luego de la co-transfección en las células Sf9 y transcurridos 10 días, se visualizaron las células al microscopio óptico y se observaron células conteniendo cuerpos refringentes, coincidentes con las imágenes esperadas con la presencia de poliedros (Figura V.8). A partir de allí se continuó con la purificación del genoma contenido en las partículas virales BVs, concentradas mediante ultracentrifugación en un colchón de sacarosa 30% p/v, para luego transformar a las bacterias electrocompetentes DH10B. Así se aislaron más de 100 colonias de las placas de LB suplementadas con kanamicina, cloranfenicol, IPTG y X-gal, de las cuales sólo algunas contenían una construcción con las características genotípicas esperadas. El clon #20 fue uno de ellos, y con las PCRs realizadas se obtuvieron los resultados esperados para el evento de recombinación de doble punto en la región esperada (Figura V.8).

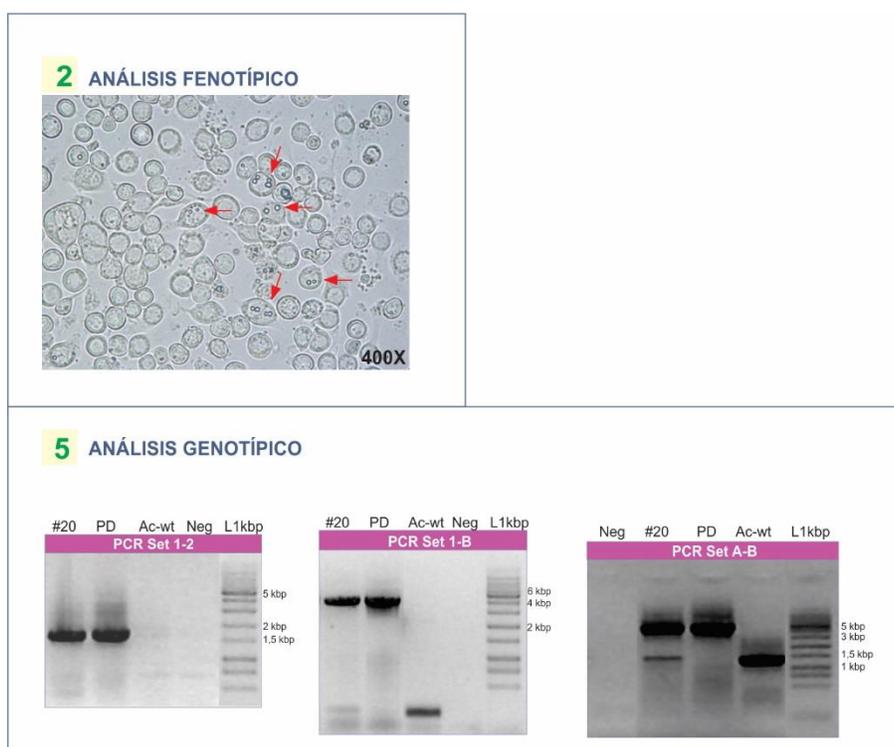


Figura V.8. Análisis fenotípico y genotípico de la búsqueda del bácmido AcMNPV recombinante. Se respetaron los números utilizados en la Figura V.7 para referenciar el paso evaluado. **2)** Microscopía en campo claro de una monocapa de células Sf21 10 días después de ser co-transfectadas con el DNA del bácmido de AcMNPV y el plásmido donador para obtener el bácmido AcMNPV_{p74-/poliedrina+}. Aumento 400X. **5)** PCR con los sets de primers indicados en la Figura V.7, en donde se indican los tamaños de producto esperado en cada caso. Las muestras utilizadas como molde de reacción: #20 (clon número 20 aislado de la placa de LB); PD (plásmido donador); Ac-wt (bácmido AcMNPV); Neg (control negativo); L1kbp (ladder 1 kbp, PB-L).

Con varios candidatos seleccionados, se transfectó el DNA purificado de las bacterias DH10B en monocapas de células Sf9 con el fin de obtener virus BVs y OBs funcionales. Sin embargo, con ninguno de los clones analizados se logró observar mediante microscopía invertida en campo claro cuerpos refringentes dentro del núcleo de las células, como tampoco se observaron las características de citopatología típicas esperadas de la infección con baculovirus.

Si bien los resultados fenotípicos iniciales y los genotípicos realizados sobre ciertos clones candidatos fueron los esperados, no se logró obtener un *stock* viral a partir del DNA purificado de los mismos con ninguno de los candidatos.

Para poder completar los estudios funcionales con las quimeras de PIF-0 es necesario obtener el bácmido modificado, con el gen *pif-0* ausente y así evaluar mediante ensayos biológicos en diferentes larvas si se modifica el rango de hospedador al cambiar los dominios de PIF-0 por otros de diferentes especies.

Si se comprueba la factibilidad de la modulación del rango de hospedador con la modificación del dominio Nt de PIF-0, se podría generar una plataforma viral fácilmente modificable que permita seleccionar el rango de hospedador para una aplicación bioinsecticida. Ante el surgimiento de una nueva plaga de lepidóptero por cruce de barreras fitosanitarias, o por la aparición de poblaciones nativas resistentes a plaguicidas químicos y/o a plantas transgénicas Bt, se contaría con un sistema eficiente basado en control biológico y que podría ser especialmente dirigido al insecto problema. Esta estrategia posee ventajas respecto a los pesticidas químicos en cuestiones de impacto ambiental y especificidad al hospedador, y a los largos tiempos que insume la producción de un vegetal transgénico, por lo que es importante continuar investigaciones y desarrollos en el área del control biológico de plagas agrícolas.

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA CELULAR PARA COMPLEMENTAR VIRUS DEFECTIVOS EN PIF-0

Como ya se ha mencionado, una de las principales aplicaciones de los baculovirus es su utilidad como bioinsecticidas. Por ello, existen productos comerciales basados en la capacidad de estos virus para el control de insectos plagas que producen importantes pérdidas en cultivos de interés en la agricultura. La principal ventaja que poseen es la inocuidad, ya que se ha demostrado que no afectan otras especies, incluido el ser humano. Sin embargo, la especificidad estrecha de hospedadores hace que los productores no los elijan como alternativa al control químico, ya que un único químico tiene la capacidad de controlar varias plagas al mismo tiempo, resultando no ser competitivos en estas condiciones. Aquí es donde surge el Manejo Integrado de Plagas como la alternativa más adecuada para implementar el uso del biocontrol. Otra de las limitaciones que poseen los baculovirus está vinculada con los tiempos de letalidad. El ciclo infectivo en las larvas puede demorar hasta 7-10 días en producir la muerte de la misma, y durante ese tiempo el insecto continúa desfoliando los cultivos, no resultando la metodología útil para la erradicación rápida de las plagas. Una alternativa encontrada, fue la incorporación a los genomas baculovirales de genes codificantes de toxinas. Esto se realizó mediante procedimientos de ingeniería genética buscando disminuir los tiempos de letalidad media (TL_{50}). Entre algunas de las evaluadas, figuran las bien conocidas toxinas de *Bacillus thuringiensis* (toxinas BT), que han sido utilizadas también en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos (*Wong et al, 1992; El-Menofy et al, 2014*). También se han incorporado neurotoxinas, resultando en una considerable reducción de TL_{50} (*Mccutchen et al, 1991; Regendra et al, 2006*), como también diversas proteasas (*Ishimwe et al, 2015*) o hasta incluso, genes de otros baculovirus que potencien el efecto insecticida (*Gramkow et al, 2010*).

Con estas mejoras ha surgido el interrogante acerca del uso de virus manipulados genéticamente por el ser humano para el control de pestes ya que, si bien los sistemas de control están perfectamente regulados, cabe la posibilidad de que existan intercambios génicos no deseados que otorguen estos genes a otras especies. Por ende, una opción para el uso de estos baculovirus es desarrollar un sistema controlado de dispersión, evitando que los virus modificados perduren en la naturaleza por más de un ciclo infectivo. Una de las alternativas para lograrlo es interrumpir la expresión de alguno de los genes *pif* ya que, sin ellos, la infección primaria no ocurre. En consecuencia, al generarse virus defectivos en la infección *per os* por carencia del sistema PIF completo, se torna necesario generar un sistema de empaquetamiento que le provea el polipéptido necesario. De esta manera, se podrán producir virus infectivos por ingesta (complementados en el sistema empaquetador), pero al no codificar para la proteína interrumpida, la progenie viral surgida de la misma en la naturaleza no tendrá la capacidad de infectar nuevos insectos. Así, este sistema permitiría el control de la dispersión de variantes virales más tóxicas, inexistentes en la naturaleza, pero que serían útiles para el uso bioinsecticida al resultar en un mayor grado de virulencia.

En este capítulo se describirán los resultados correspondientes al desarrollo del sistema de dispersión controlado propuesto en este trabajo.

Elección de línea celular y gen de selección

El modelo de estudio de este trabajo es el nucleopoliedrovirus múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), el cual puede ser multiplicado *in vitro*. La línea UFL-Ag-286, desarrollada a partir de embriones de *Anticarsia gemmatalis* (huevos de dos o tres días) es la línea celular más adecuada para su producción (Sieburth and Maruniak, 1988 [A]; Castro et al., 1996). Otra línea celular utilizada es la High Five™ (BTI-TN-5B1-4), derivada de células ováricas de larvas de *Trichoplusia ni*. Debido a que ambas proveen un alto rendimiento de

partículas virales, se decidió utilizarlas para el desarrollo de las líneas celulares productoras de la proteína PIF a interrumpir para empaquetar virus defectivos.

La estrategia implicó la construcción de un plásmido que contenía los elementos necesarios para expresar el gen *pif* elegido más un gen que permitiera la selección de las células que lo produzcan. Se esperaba la recombinación ilegítima de dicho plásmido de manera tal de generar una línea celular transgénica de producción continua de la proteína heteróloga elegida.

Dada la disponibilidad de células al momento de empezar los ensayos, se decidió empezar a trabajar con *High Five*TM.

Por estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio, se decidió descartar el uso de neomicina como antibiótico selector, ya que varias líneas celulares de insectos presentan resistencia al antibiótico G418. En vistas de ello, la presión de selección elegida fue puromicina. Para evaluar la susceptibilidad de las células elegidas se realizó una curva de DL₅₀ (Figura VI.1). Con los datos obtenidos se realizó un gráfico de viabilidad celular en función de la concentración de puromicina (Figura VI.1.B). En base a este análisis se determinó que para la línea celular *High Five*TM, la DL₅₀ era de 1,13 µg/mL de puromicina. Para asegurar una correcta selección de las células transfectadas con la construcción que contendría el gen de resistencia para este antibiótico, se decidió utilizar en los siguientes ensayos una concentración de 6 µg/mL de antibiótico.

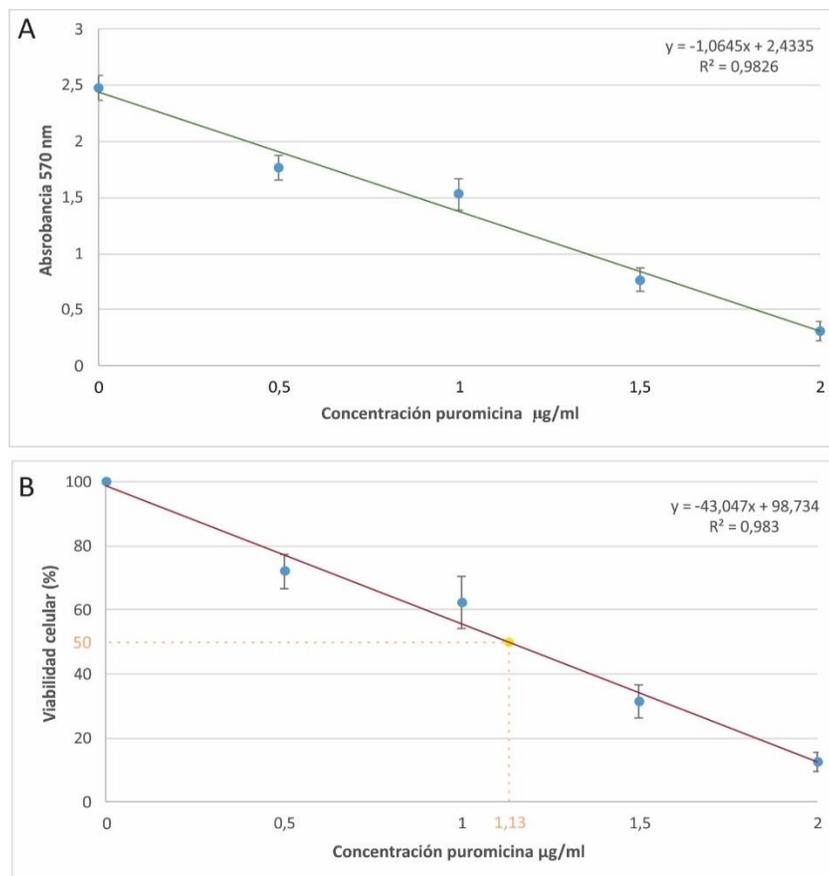


Figura VI.1. Toxicidad de puromicina para High Five™ . A) El gráfico indica los valores de absorbancia obtenidos luego de la medición a 570 nm de monocapas expuestas a diferentes concentraciones de puromicina: 0- 0,5- 1- 1,5- 2 µg/mL. Una placa de 96 *wells* sembrada con células High Five™ se expuso a cada condición (8 réplicas). 6 días post-inoculación se fijaron y tiñeron las células, para luego disolver el cristal violeta en una solución adecuada para medir absorbancia a 570 nm. **B)** Teniendo en cuenta que los valores de absorbancia obtenidos sin el agregado de puromicina correspondieron al 100% de viabilidad, se relativizaron los valores con a estos. Así se determinó el valor de DL₅₀.

Elección de los componentes sintácticos del gen empaquetador

Para la construcción del plásmido recombinante a utilizar en la obtención de la línea celular transgénica se consideraron dos factores: la forma de seleccionar a las células recombinantes y la proteína PIF de AgMNPV que se expresaría. El gen selector ya estaba determinado por la buena curva de toxicidad obtenida por el antibiótico puromicina, sumado a la disponibilidad de bibliografía que informaba su uso como gen de selección en

líneas de insecto (*McLachlin y Miller, 1997; Fatyolet al, 1998; Iwaki et al, 2003; Volohonskyet al, 2015*). Por ello, se decidió trabajar con el gen *puromycin acetyltransferase (pac)*, quien confiere resistencia a este antibiótico.

En cuanto al gen *pif* a expresar, continuando con la línea de investigación de este trabajo de tesis, se eligió a *pif-0* o *p74*.

Por otro lado, se realizó la elección de la secuencia promotora bajo la cual se expresarían las proteínas, tanto PIF-0 como la del ORF PAC. Los promotores de los genes tempranos de los baculovirus son reconocidos por la RNA polimerasa celular, lo cual, permitiría la elección de alguno de los mismos como reguladores de la expresión de los genes en cuestión. Sin embargo, cuando se utilice la línea celular transgénica derivada para la propagación de los virus recombinantes, y el DNA del virus ingrese y transloque al núcleo, se podría generar algún tipo de recombinación, ya que las secuencias de los promotores también se encuentran en el genoma viral. Esto podría llevar a que el genoma del virus adquiriera secuencias no deseadas. Por ello, se consideró al promotor *hsp70* de *Drosophila melanogaster* como candidato para ser utilizado. El gen *hsp70*, por sus siglas en inglés *heat shock protein*, forma parte de un grupo de genes que responden principalmente ante estrés térmico, codificando chaperonas que facilitan la maduración de las proteínas, mediante unión y estabilización de las mismas (*Beckmann et al, 1992; Wimmer, 2003, Gross et al, 2009*). Se ha comprobado que a 37°C este promotor ya es activo, por lo que ha sido utilizado en la expresión heteróloga de proteínas en mamíferos, ya que la temperatura óptima de crecimiento de éstas células permite su activación, mientras que las *Heat Shock Proteins* propias requieren temperaturas superiores a los 42°C (*Kust et al, 2014*). Además, se ha comprobado su funcionalidad tanto en líneas celulares de insecto (*Lan y Riddiford, 1997; Sah et al, 1999; Kimura et al, 1999*) como en larvas de lepidópteros (*Uhlírová et al, 2002; Wimmer, 2003; Soares y Ribeiro, 2005*).

Con el fin de probar la actividad del promotor *hsp70* elegido, se realizó una construcción plásmídica adecuada. Para ello se partió de un vector basado en el plásmido pcDNA3, al cual se le había eliminado la secuencia promotora característica del gen

temprano de citomegalovirus (CMV) y en su reemplazo se introdujo el promotor *hsp70*. Luego de una serie de clonados moleculares a partir de este vector y pEGFP-N3 (Clontech), se obtuvo un plásmido conteniendo la secuencia del ORF de eGFP bajo el promotor a evaluar (Figura VI.2.A). Posteriormente, se realizó una transfección con el lípido Cellfectin® (Termofisher) sobre monocapas celulares de High Five™ y UFL-Ag-286. Transcurridas 24 hs, se realizó microscopía de fluorescencia para verificar la funcionalidad del promotor *hsp70*. Para ello, se realizó la visualización sin estímulo térmico y sometiendo a las células a 37°C o 42°C durante 30 minutos. Para ambas líneas celulares, se obtuvo señal de fluorescencia intracelular luego del estímulo a 42°C (Figura VI.2.A). Sin embargo, la cantidad de células fluorescentes fue baja. Una de las posibles explicaciones tiene origen en la baja tasa de células transfectadas, limitante común en estas células. A pesar de ello, se logró evidenciar actividad del promotor *hsp70* y cabe aclararse que tanto para las células sin estímulo como las sometidas al *shock* térmico a 37°C, no se logró visualizar fluorescencia.

También, y con el fin de verificar la actividad de este promotor en células en estado de infección, se decidió introducir el gen indicador en estudio en un baculovirus. Así se construyó un AcMNPV recombinante empleando el sistema *Bac to Bac* (AcMNPV/polh⁻/hspGFP⁺) y las células Sf9, el cual fue evaluado mediante microscopía de fluorescencia (Figura VI.2.B). Como se observa en la figura, se comprobó la expresión de GFP, y por lo tanto, la actividad positiva del promotor *hsp70* durante una infección.

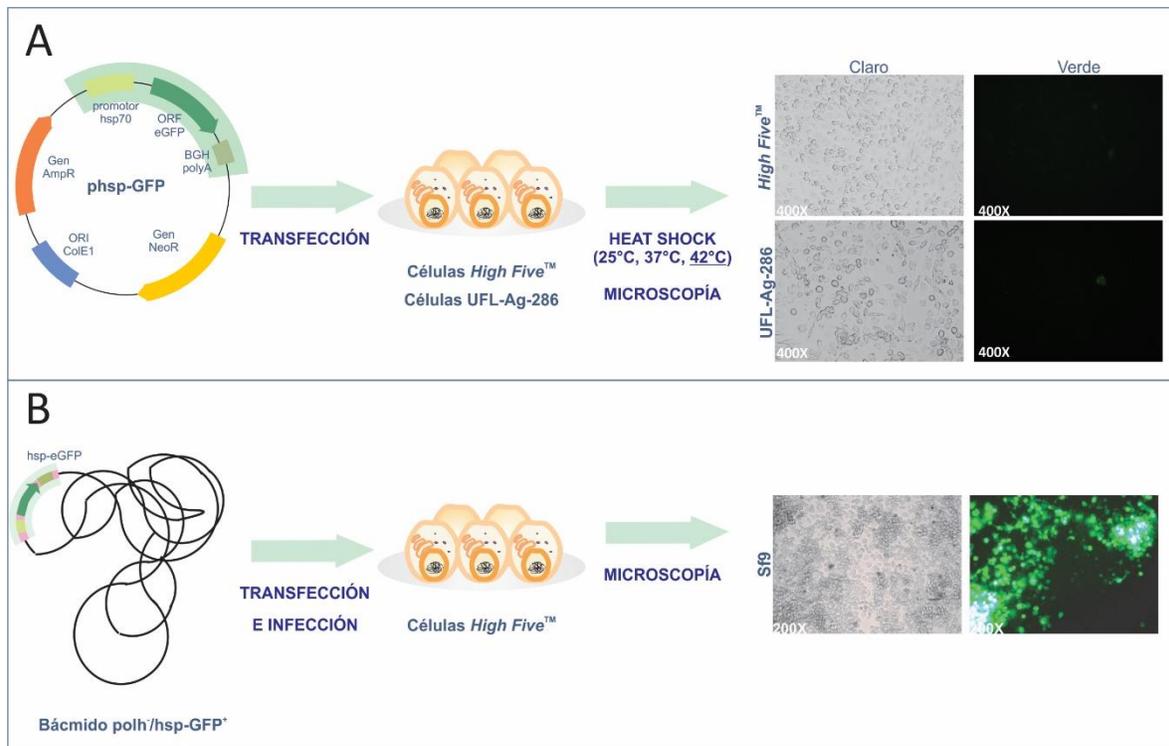


Figura VI.2. Evaluación de la actividad del promotor *hsp70* en las líneas celulares High FiveTM, UFL-Ag-286 y Sf9. A) Se indica el plásmido construido para la evaluación de la actividad del promotor *hsp70*, con el gen indicador GFP. El plásmido fue transfectado en una monocapa celular de High FiveTM y UFL-Ag-286. Se evaluó la fluorescencia después de 24 hpt (horas post-transfección) y luego de un estímulo térmico (37° o 42°C). Las microcopías se realizaron con un microscopio invertido de fluorescencia; se muestran las obtenidas con el shock térmico a 42°C (aumento: 400X). **B)** Evaluación de la actividad del promotor a través de un virus recombinante Ac-MNPV_polh-/hspGFP+ que fue transfectado para la obtención de un stock viral y luego infectado en una monocapa de células Sf9. Las imágenes demuestran la actividad del gen indicador (aumento: 200X).

Una vez elegido y evaluado el promotor *hsp 70*, se realizaron las construcciones de los plásmidos necesarios para la obtención de líneas celulares que expresen la proteína PIF-0: p(hsp)-p74-puro (Figura VI.3). El mismo promotor fue utilizado para la expresión de la resistencia a puomicina, codificado en el gen *pac*.

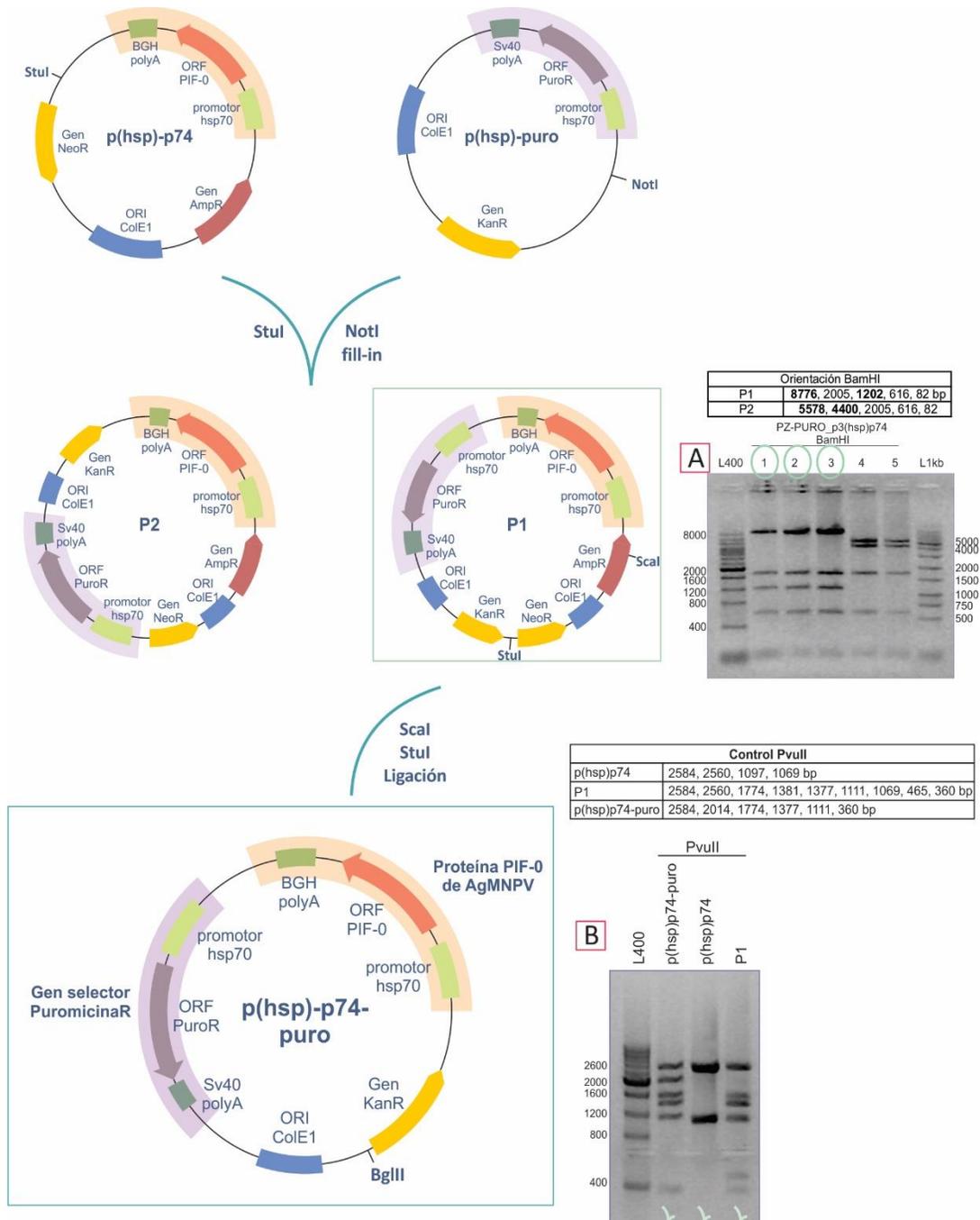


Figura VI.3. Diseño de la construcción del plásmido de transferencia. El esquema representa los pasos de clonado molecular necesarios para la construcción del vector p(hsp)-p74-puro, conteniendo el gen selector a puromicina y el gen para la expresión de P74. Se indican en los plásmidos la posición de los sitios de restricción utilizados para el clonado molecular. En p(hsp)-p74-puro se indica el sitio de restricción *BglIII*, utilizado para linealizar el plásmido previo a la transfección. **A)** Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v de las digestiones con *BamHI* de clones obtenidos para la búsqueda de la orientación de clonado necesaria, o P1. Se utilizaron dos marcadores de peso molecular: L1kbp y L400 (PB-L). La tabla superior muestra los tamaños en pares de bases esperados según la orientación obtenida. **B)** Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v de las digestiones con *PvuII* de los productos obtenidos luego de la digestión y ligación indicada. La tabla superior indica los tamaños en pares de bases esperados para cada plásmido digerido.

Generación de la línea transgénica

Con el plásmido de transferencia generado, se procedió a la transfección en la línea celular High Five™. Para ello se utilizó el reactivo Cellfectin® (ThermoFisher) y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se realizó la transferencia horizontal de p(hsp)-p74-puro (previamente linealizado con la enzima de restricción BglII) sobre una monocapa al 70% de confluencia. Las células se dejaron en reposo por 48 horas, para luego comenzar con la presión de selección. Para ello, a partir de ese momento y hasta la obtención de células con crecimiento normal, se realizó el cambio de medio suplementado con puromicina (6 µg/mL) cada 4 días. Con el fin de potenciar la expresión de la resistencia al antibiótico activando el promotor *hsp70*, 4 horas antes del cambio de medio, se sometieron a las células a un *shock* térmico a 42°C por 30 minutos. Después de 3 meses, y de evidenciar gran mortalidad de las células, se comenzaron a visualizar clones celulares creciendo activamente (Figura VI.4.A y B). Como el objetivo era la obtención de una línea celular clonal, todas las células viables se recuperaron y sembraron en una placa de 48 pocillos y, mediante dilución terminal, se lograron obtener varias líneas de células High Five™ resistentes a la presión de selección.

Finalmente, se procedió con la caracterización molecular de uno de los clones celulares (Hi5-C4_{1/625}), elegido porque poseía el fenotipo más similar a la línea *wild type* en cuanto a morfología al microscopio óptico y tiempos de duplicación celular (Figura VI.4.C). Previamente, se realizaron 5 repiques del clon con el fin de eliminar vestigios de plásmidos que hayan quedado episomales.

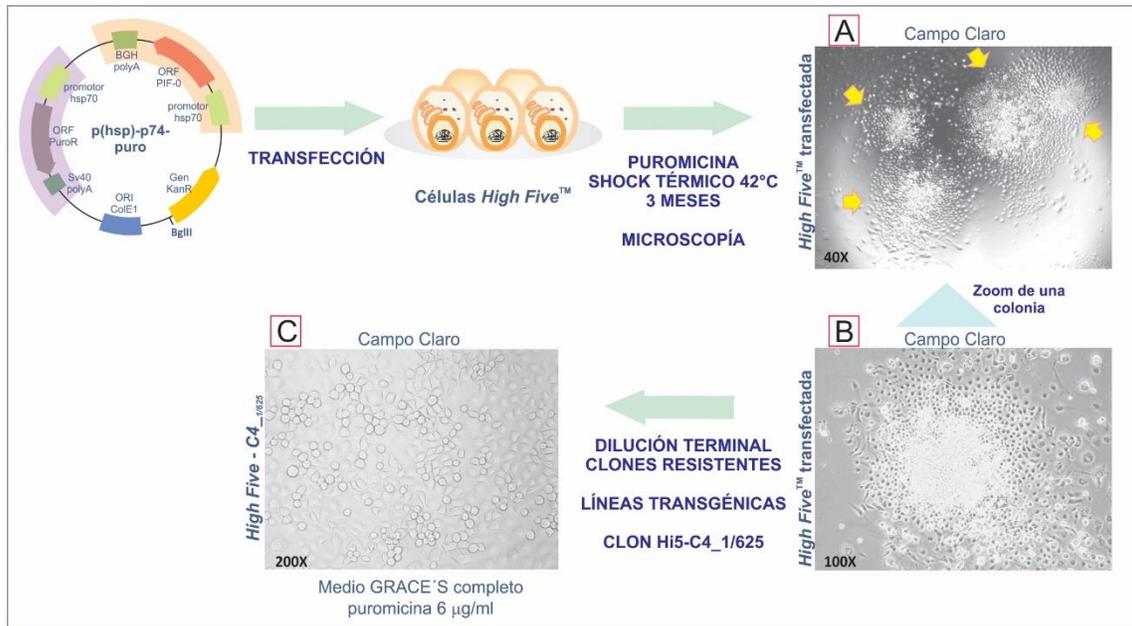


Figura VI.4. Líneas celulares transgénicas. La figura muestra las imágenes de microscopía invertida en campo claro de los clones obtenidos luego de transfectar una línea celular *High Five*TM con el plásmido de transferencia (A). Las flechas amarillas señalan la población clonal obtenida luego de 3 meses de mantener las células con la presión de selección puromicina (6 µg/mL). B) Aumento a 100X de una de las poblaciones clonales. Luego se realizaron diluciones terminales con el fin de separar las poblaciones. Se trabajó especialmente con el clon Hi5-C4_1/625 (C).

Esta caracterización involucró varios estudios. En primer lugar, se realizaron PCRs sobre aislamientos de DNA celular utilizando dos parejas de *primers*, una para detectar la secuencia de *pif-0* y la otra para el gen *actina* (Figura VI.5.A). Cabe aclarar que como en este caso se trata de una línea celular derivada de *Trichoplusia ni*, no se utilizaron los *primers* de *actina* generados para las células UFL-Ag-286, sino un par de oligonucleótidos diseñados a partir un alineamiento múltiple de secuencias disponibles del gen *actina* de lepidópteros, denominados *InsAct5* e *InsAct3* (Miele, 2014). De este modo y utilizando la información de *actina* de *Trichoplusia ni* (GenBank: JF303662.1), se predijo un tamaño de amplicón de 691 bp.

Los resultados de los ensayos de PCR mostraron amplificación con los *primers* *p74* cuando los moldes utilizados fueron el gDNA derivado del clon Hi5-C4_1/625 y el vector de transferencia p(hsp)-p74-puro; y en cambio no evidenciaron amplicómeros cuando el molde fue gDNA derivado de células *High Five*. En tanto, para el caso de los *primers* de *actina*, se

obtuvo amplificación cuando el DNA molde derivó de alguna de las líneas celulares, pero no así cuando se utilizó al vector de transferencia.

Por otro lado, se realizaron ensayos de *Southern blot* sobre el gDNA de las células *wild type* y transgénica (previamente digeridas con BstEII y resueltas en una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v) utilizando como sonda un fragmento de *pif-0* (Figura VI.5.B). El resultado mostró la detección positiva de *pif-0* en el genoma del clon Hi5-C4_1/625, pero no en *High Five*. La enzima de restricción BstEII permitía la generación de gran cantidad de fragmentos de restricción, motivo por el cual fue seleccionada.

Por último, se realizó un ensayo de *Western blot* utilizando un suero policlonal anti-ODV de AgMNPV (Mengual Gómez, 2013) (Figura VI.5.C). De este modo, se logró detectar en el clon transgénico una señal positiva que se corresponde con el peso molecular de la proteína P74, resultado no detectado en el proteoma de la línea *wild type*. Así, este conjunto de estudios experimentales mostró que las células transgénicas contienen el gen *p74* y lo expresan correctamente en forma constitutiva.

Se han realizado pasajes sucesivos del clon Hi5-C4_1/625 hasta el número 50 (en presencia de puromicina), para evaluar a futuro la estabilidad de la expresión de la proteína viral.

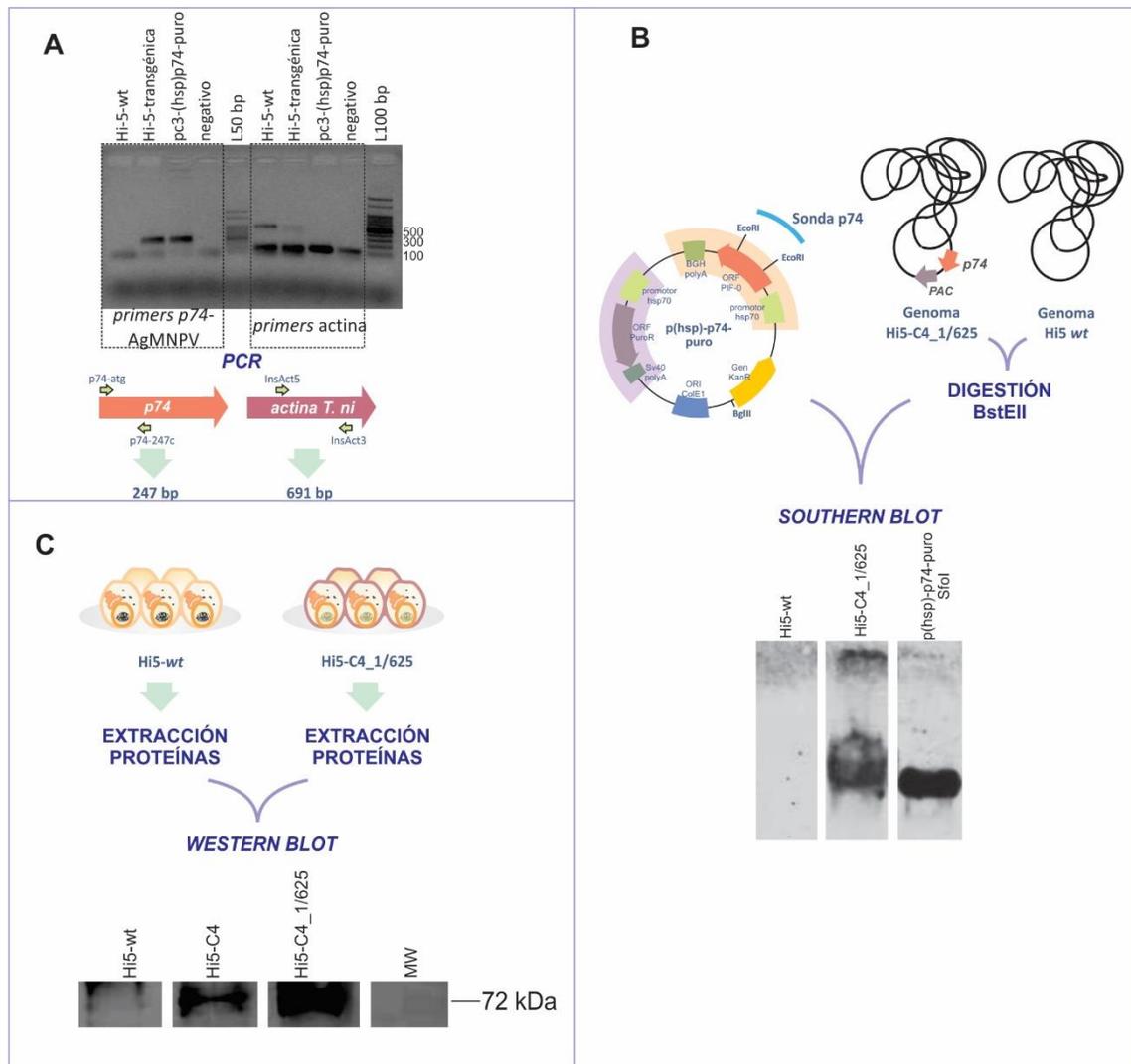


Figura VI.5. Caracterización molecular de la línea empaquetadora para P74. **A)** Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v dónde se sembraron productos de PCR realizados sobre el genoma del clon transgénico HI5-C4_1/625 con los primers *p74* (p74-atg, p74-247c) y los primers de *actina* (InsAct5, InsAct3). Como control se incluyó DNA de la línea *wild type* y el vector de transferencia p(hsp)p74-puro. Se utilizaron *ladders* 50 bp y 100 bp (PB-L). **B)** Ensayo de *Southern blot* sobre el genoma de las células digeridas con BstEII, utilizando como sonda un fragmento del gen *p74* de AgMNPV. **C)** Ensayo de *Western blot* sobre extractos proteicos de las líneas celulares con anticuerpos policlonales anti-ODVs de AgMNPV (dil 1/7500-desarrollados en nuestro laboratorio) como anticuerpo primario y goat anti-rabbit IGG HRP (dil 1/10000-Santa Cruz Biotechnology) como secundario, utilizando biolumina como revelador (PB-L).

Generación de un AgMNPV defectivo en *pif-0*

El diseño para la obtención del virus AgMNPV defectivo en *pif-0* se basó en un procedimiento de recombinación homóloga de doble punto. Para ello, es necesario desarrollar un vector de transferencia adecuado que contenga un gen selector de recombinantes flanqueado por secuencias específicas del gen a ser interrumpido (*Hou et al, 2002; Wang et al, 2003; Yao et al, 2007*).

Durante el trabajo, se evaluaron 3 versiones como vector de transferencia, dos basadas en orígenes de replicación procariotas para la selección de los virus recombinantes y una basada en la expresión de la proteína β -Galactosidasa (Figura VI.6).

El primer diseño evaluado consistió en el desarrollo de un plásmido que contenía la secuencia codificante para *pif-0* interrumpido con las secuencias correspondientes al origen de replicación plasmídico p15A y al gen de resistencia a cloranfenicol, derivadas del plásmido pX21 (*GenBank: KF155405.1*). La figura VI.6.A muestra la construcción generada, que luego de ser linealizada con la enzima de restricción HindIII, se co-transfectó con genoma de AgMNPV en una monocapa de células UFL-Ag-286. Con ello se esperaba favorecer la recombinación de doble punto, ya que, al ocurrir un único evento, el genoma viral resultaría en una topología lineal que lo convertiría en inviable. De este modo, transcurridos 6 días de la transferencia horizontal y visualizando por microscopía óptica la sintomatología citopática concordante con una infección por baculovirus, se recuperó el medio condicionado conteniendo las partículas virales BVs. Se esperaba que las mismas contuvieran genoma *wild type*, mientras que algunas, genoma recombinante producto de la doble recombinación. Para realizar esta selección se aisló el genoma viral y se transformó en bacterias *E. coli* DH10B, las que luego fueron sembradas en placas de LB sólido suplementado con cloranfenicol, dado que se esperaba que el genoma recombinante de AgMNPV funcionara como bácmido (Figura VI.7- 1 y 2). De las colonias bacterianas obtenidas se aisló el DNA utilizando procedimientos tradicionales para la obtención de bácmidos, y se realizó una caracterización molecular con el fin de determinar la integridad

del genoma y la presencia de la interrupción de *pif-0*. Para ello se realizaron ensayos de PCR utilizando *primers* específicos para diferentes regiones de AgMNPV, las cuales se encuentran equidistantes entre sí, permitiendo evaluar 4 polos del genoma viral. La **figura VI.8.A** muestra los genes virales estudiados y los *primers* asociados, así como los resultados obtenidos para 4 clones. Al comparar estos resultados con los arrojados cuando el molde de PCR fue DNA del AgMNPV *wild type*, se dedujo que el DNA de los clones recombinantes

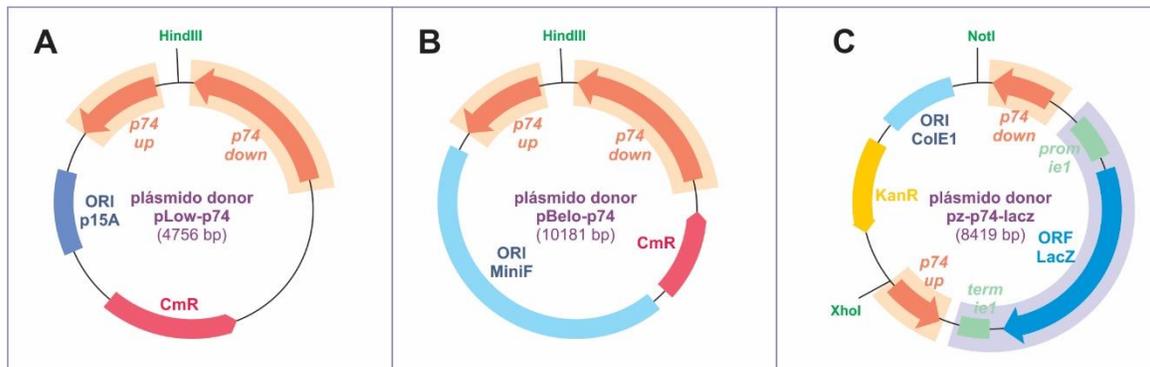


Figura VI.6. Plásmidos donores para la generación del AgMNPV_p74def. **A)** Plásmido donador a base del origen de replicación p15A y resistencia a cloranfenicol, flanqueado por las secuencias de *p74 up* y *down*. Se indica el sitio de restricción HindIII utilizado para la linealización del plásmido. **B)** Plásmido donador que incluye las regiones *up* y *down* de *p74* interrumpidas por el vector pBeloBAC11. Se indica el sitio de restricción HindIII utilizado para la linealización del plásmido. **C)** Plásmido donador que incluye las secuencias *up* y *down* de *p74* interrumpidas por el gen selector *ie1prom/LacZORF/ie1term*. Se indican los sitios de restricción NotI y XhoI utilizados para la linealización del plásmido.

no estaría íntegro. Para los *primers* odv-e66 no se obtuvo amplificación, mientras que con los *primers* *egt* solo el clon #4 dio el resultado esperado.

La caracterización molecular también incluyó un análisis por PCR de la región *p74*, para evaluar las modificaciones nucleotídicas incorporadas (**Figura VI.8.B**). Los clones #1 y #4 resultaron con un producto del tamaño esperado para los virus que sufrieron la recombinación homóloga. Además, no se detectó en estos clones el producto esperado para los virus *wild type*, sugiriendo la ausencia del gen *p74* continuo.

A pesar de los resultados desfavorables obtenidos con la caracterización molecular de los polos de AgMNPV, se transfectó DNA de los clones #1 y #4 sobre una monocapa de UFL-Ag-286. Lamentablemente, no se observaron las características fenotípicas

características de una infección por el baculovirus AgMNPV. Se realizaron varias rondas de infección a partir de los medios condicionados obtenidos, partiendo de la hipótesis de una baja carga viral en el medio condicionado. Sin embargo, no se obtuvieron resultados de presencia viral (Figura VI.7 -1 y 2-).

En base a estos resultados se consideró que el origen de replicación plasmídico p15A presente en el vector de transferencia no sería el adecuado para una correcta estabilidad del genoma viral en *E. coli*. El mismo posibilita un número de copias de entre 15-25 moléculas por célula, lo cual puede considerarse alto para la estabilidad genotípica de un megaplásmido. Por estas razones, se procedió a probar como alternativa el origen MiniF (1-2 copias) presente en el vector pBeloBAC (*GenBank: U51113*), ya que es el más reportado en bibliografía para la generación de baculovirus recombinantes (*Luckow et al, 1993; Zhao et al, 2003; Wang et al, 2003; Motohashi et al, 2005*).

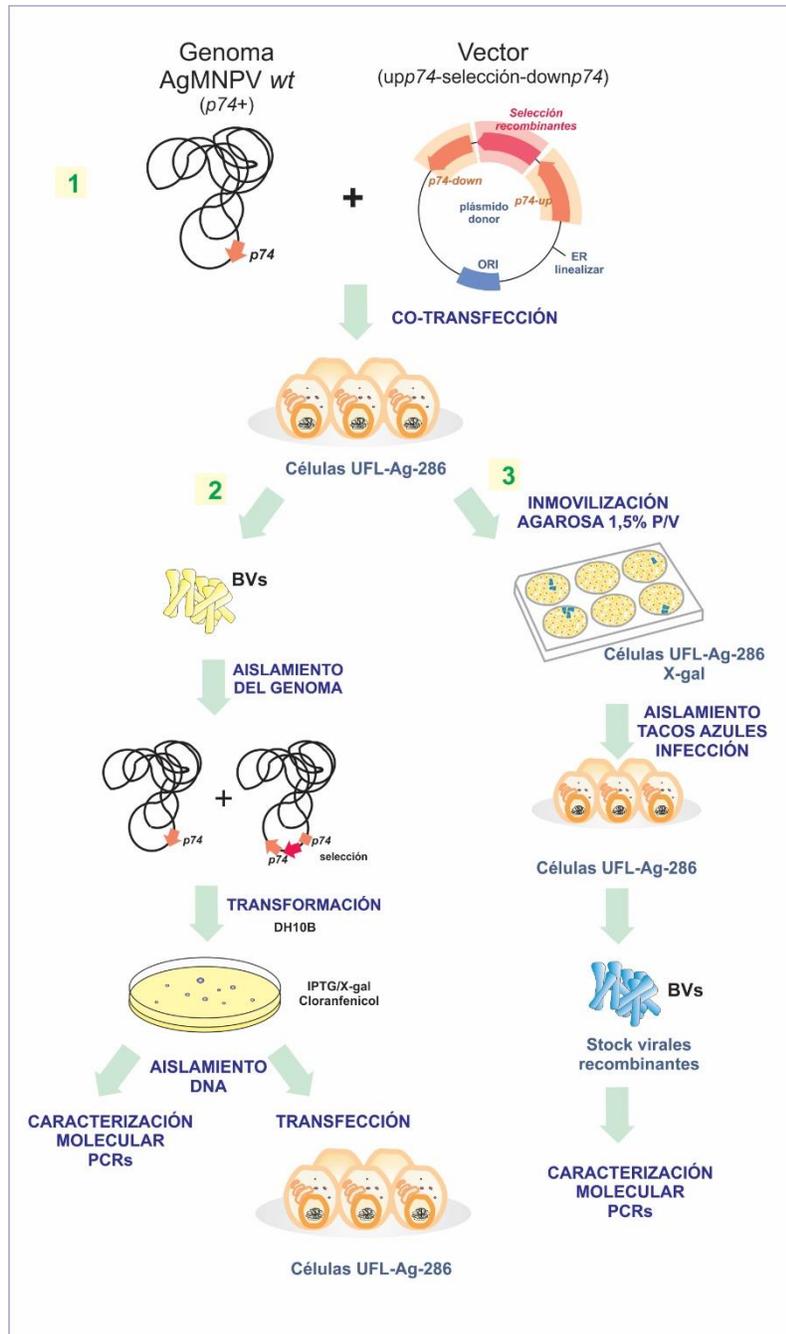


Figura VI.7. Diseño para la generación de AgMNPV_{p74def}. El diseño consistió en la co-transfección de genoma de AgMNPV *wild type* y el vector donador en una monocapa de UFL-Ag-286 (1). Para el caso de los plásmidos A y B de la Figura VI.6, se recuperaron los BVs, purificaron DNA para transformar bacterias E.coli DH10B. A las colonias crecidas en la placa de LB suplementada con IPTG/x-gal y cloranfenicol se les realizó una extracción de los megaplásmidos y fueron caracterizadas molecularmente y/o transfectadas en células UFL-Ag-286 (2). Para el caso del plásmido C de la Figura VI.6, a los *wells* en donde se realizó la transfección se les agregó agarosa 1,5% p/v y medio completo suplementado con X-gal, para seleccionar las células infectadas con los virus capaces de precipitar el reactivo por presentar actividad galactosidasa. Se recuperaron los tacos de agarosa azules, en una solución de medio GRACE's sin suero y fueron propagados en nuevas monocapas celulares (3).

Para ello se procedió del mismo modo que antes, generando una construcción que contenía parte de la secuencia codificante para *pif-0* interrumpida con el origen MiniFy la resistencia al antibiótico cloranfenicol (Figura VI.6.B). El esquema de trabajo fue igual al citado previamente para el plásmido pLow-p74 y al diseño experimental presente en la figura VI.7 (1 y 2). Se lograron clones bacterianos, pero los megaplásmidos purificados (bácmidos de AgMNPV) no lograron generar sintomatología de infección al ser transfectados en células UFL-Ag-286. Del mismo modo, la caracterización molecular no arrojó resultados concluyentes, sembrando dudas de la elección del diseño de interrupción de *p74* basado en la generación de un bácmido bacteriano.

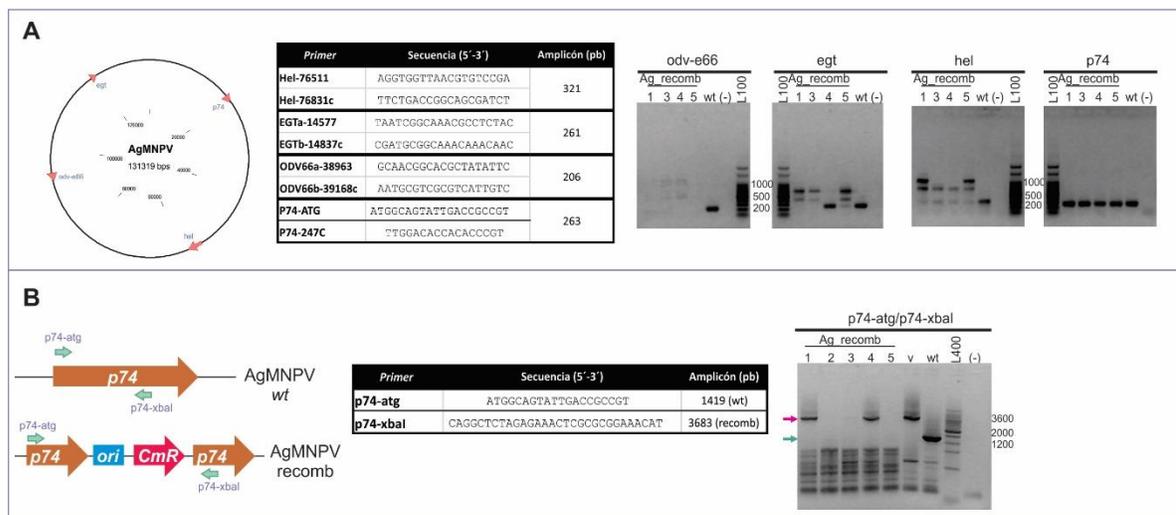


Figura VI.8. Caracterización molecular virus AgMNPV-*p74def* obtenidos a partir del plásmido donador pLow-p74. A) PCRs diseñadas para la detección de regiones del genoma AgMNPV y verificar su integridad. Se utilizaron *primers* que amplificaban zonas de los genes *p74*, *egt*, *odv-e66* y *DNA helicasa*. La tabla indica la secuencia de los pares de *primers* y el tamaño del producto esperado en cada caso. A la derecha se muestran electroforesis en geles de agarosa 1% p/v del análisis de diferentes clones obtenidos con los conjuntos de *primers* mencionados. Se incluyó como control positivo DNA de AgMNPV *wild type*. **B)** PCR diseñada para la caracterización de la región modificada. Se indican en la tabla los *primers* elegidos, con su secuencia y el tamaño del producto esperado para el virus recombinante y *wild type*. A la derecha, electroforesis en gel de agarosa 1% p/v con PCRs sobre clones obtenidos y controles positivos de AgMNPVwt (wt) y plásmido donador (v).

En función de ello, se planteó como opción interrumpir el gen viral con algún sistema que posibilitara la selección de los recombinantes directamente en las células de insecto. De esta forma, se construyó el plásmido pz-p74-lacZ (Figura VI.6.C), el cual posibilitaría la

expresión de β -galactocidasa bajo la acción del promotor del gen *ie-1* de AgMNPV (Bilen *et al*, 2007), facilitando en consecuencia la selección de los recombinantes en las células UFL-Ag-286 mediante el uso del reactivo X-gal. En esta oportunidad para la co-transfección con el genoma viral, el plásmido donador fue digerido con las enzimas de restricción NotI y XhoI. A diferencia de las aproximaciones antes descritas, en esta oportunidad luego de llevarse a cabo la transfección se les agregó a las células una capa de agarosa 1,5% p/v con el fin de disminuir la movilidad de los BVs, y medio de cultivo suplementado con el sustrato de la enzima (Figura VI.9).

Cumplido el tiempo de incubación, los focos de infección mostrando color azul producto de la modificación del X-gal por la acción de la β -galactocidasa fueron recuperados utilizando un sacabocados, y posteriormente almacenados con medio de cultivo sin suero, con el fin de liberar las partículas BVs. A partir de allí, se intentó aislar de forma clonal al virus recombinante, realizando infecciones en nuevas monocapas de UFL-Ag-286 repitiendo el procedimiento de la agarosa. Sin embargo, luego de sucesivas rondas nunca se logró obtener una monocapa celular con todos los focos de infección de color azul en presencia de X-gal. A pesar de haber realizado múltiples estrategias de concentración de los virus recombinantes, no fue posible aislarlo de manera clonal para realizar los ensayos siguientes.

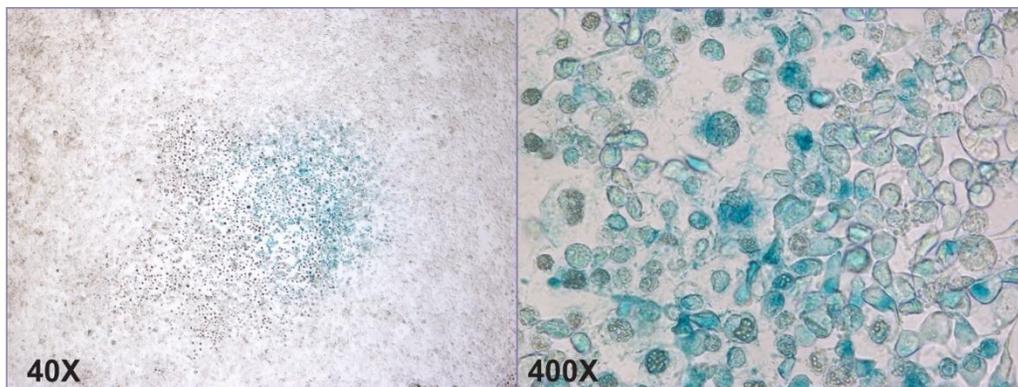


Figura VI.9. UFL-Ag-286 transfectada con genoma de AgMNPV y plásmido donorpz-p74-lacZ. Microscopía invertida en campo claro de la monocapa de UFL-Ag-286 co-transfectada con el genoma de AgMNPV y el plásmido donador pz-p74-LacZ linealizado con los sitios de restricción NotI y XhoI, suplementada con X-gal. La imagen muestra la formación del precipitado azul en aumento 40X y 400X. En la imagen 400X se visualizan también los cuerpos refringentes dentro de las células, característicos de los poliedros.

Como se ha descrito, se han evaluado diferentes estrategias basadas en la recombinación homóloga en la célula hospedadora para la generación del virus AgMNPV_ *p74def*. Sin embargo, ninguna nos permitió aislar el virus con el genotipo pretendido.

Complementación de variantes virales defectivas en *pif-0*

Si bien el objetivo establecido era complementar un virus AgMNPV defectivo en *p74*, dado que no fue posible obtenerlo de manera aislada, se procedió a caracterizar la funcionalidad del clon celular transgénico Hi5-C4_1/625 empleando un virus AcMNPV defectivo en *p74* (Zhou et al, 2005).

En función de lo anterior, se produjeron Obs de AcMNPV y AcMNPV*defp74* mediante ensayos de infección tanto en células *High Five* como en Hi5-C4_1/625. Luego, se cuantificaron al microscopio con el uso de una cámara de Neubauer y se prepararon soluciones conteniendo cantidades específicas de OBs junto con sacarosa y *Coomassie brilliant blue* para realizar bioensayos en larvas (Hughes et al, 1986; Jones et al, 1993, 2000). De este modo, se buscaba analizar si los virus AcMNPV_ *defp74* recuperaban el fenotipo infectivo *per os* al ser propagados en la línea celular empaquetadora. Para ello se emplearon larvas de *Rachiplusia nu*, hospedador susceptible a la infección de AcMNPV, y larvas de *Anticarsia gemmatalis*, especie de la que se aisló el baculovirus AgMNPV.

En la **figura VI.10** se representa un esquema del experimento realizado con larvas del segundo estadio de ambas especies de lepidópteros.

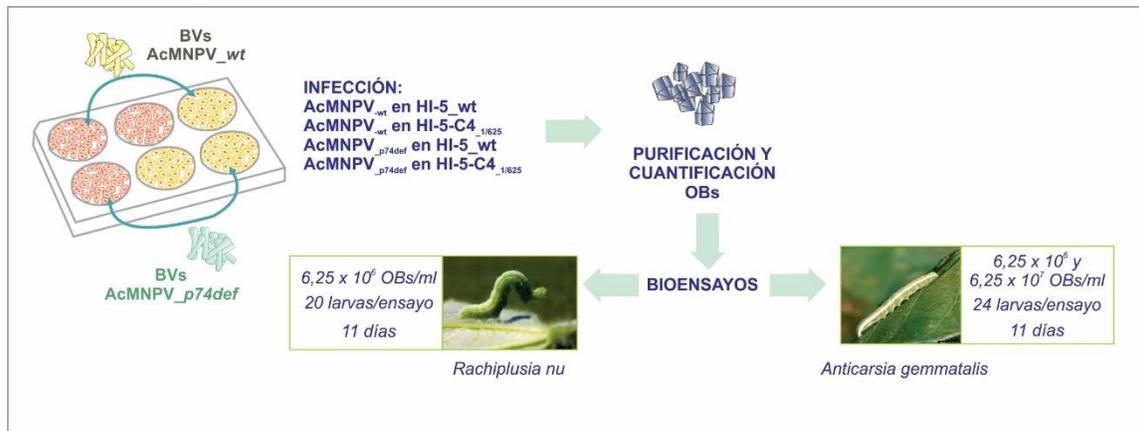


Figura VI.10. Diseño experimental de los bioensayos. Esquema que muestra el flujo de trabajo realizado para la obtención de los cuerpos de inclusión de los virus AcMNPV_{wt} y AcMNPV_{p74def} propagados en las líneas celulares *High Five wild type* (Hi5_{wt}) y Hi5-C4_{1/625} (p74+). Luego de la infección, se recuperaron los OBs y fueron cuantificados. Los bioensayos se realizaron alimentando larvas del segundo estadio de *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*, por contaminación con OBs en una solución con sacarosa 1%, empleándose 20 y 24 larvas por ensayo, respectivamente. A los 11 días, se evidenció supervivencia o mortalidad de las mismas.

Para las larvas de *Rachiplusia nu*, se encontró que aquellas inoculadas con la solución vehículo arrojaron un valor de 85,7% de supervivencia, mostrando su inocuidad. En cambio, los virus AcMNPV_{p74def} propagados en las células transgénicas (Hi5-C4_{1/625}) fueron infectivos por ingesta, logrando una sobrevida del 5,6% de la población tratada, mientras que el mismo virus propagado en las células no modificadas produjo una sobrevida del 80%, similar a las del control sin virus. Para el caso del grupo de larvas alimentadas con los OBs derivados de AcMNPV_{wt} propagado en la línea *High five*, la supervivencia fue del 0% (Figura VI.11.A). En consecuencia, estos resultados mostraron la reversión del fenotipo no infectivo por vía oral que caracteriza al virus AcMNPV_{p74def}, cuando el mismo fue multiplicado en células transgénicas que expresan constitutivamente a la proteína P74 de AgMNPV. Lo interesante del resultado no sólo es que las células Hi5-C4_{1/625} actúan adecuadamente, sino que también fue posible recuperar la infectividad de un virus utilizando una proteína PIF de otra especie.

Por otro lado, en los bioensayos realizados en larvas de *Anticarsia gemmatalis* los resultados no fueron concluyentes. No se detectaron diferencias aparentes de sobrevida en

los diferentes ensayos realizados. En este caso, se probaron 2 dosis, una igual a la utilizada para los ensayos en *Rachiplusia nu*, $6,25 \times 10^6$ OBs/mL, y otra mayor, $6,25 \times 10^7$ OBs/mL, que correspondieron a una ingesta de 1000 y 10000 OBs/larva, respectivamente. En ningún caso se detectaron diferencias en la sobrevivencia de las larvas, salvo para el grupo control alimentado con poliedros de AgMNPV producidos en células UFL-Ag-286. Por el contrario, en todas las condiciones donde se utilizaron AcMNPV y AcMNPV $defp74$ se hallaron mayoritariamente larvas y pupas transcurridos los 11 días del análisis (Figura VI.11.B). Sin embargo, como aparecieron algunos cadáveres, se procedió a su disección para visualizar si presentaban una poliedrosis. En tal sentido, se encontró que una de las larvas muertas tratadas con AcMNPV $_p74def$ propagado en Hi5-C4 $_{1/625}$ presentaba cuerpos refringentes concordantes con las imágenes esperadas de una suspensión con poliedros (Figura VI.11.C). Esto podría suponer una reversión del fenotipo viral defectivo. Sin embargo, debe considerarse que la DL_{50} de AcMNPV *wild type* en larvas de *Anticarsia gemmatalises* mayor a $5,5 \times 10^5$ OBs (Chikhalya et al, 2009), mientras que en este trabajo se utilizaron dosis de 1×10^3 y 1×10^4 OBs.

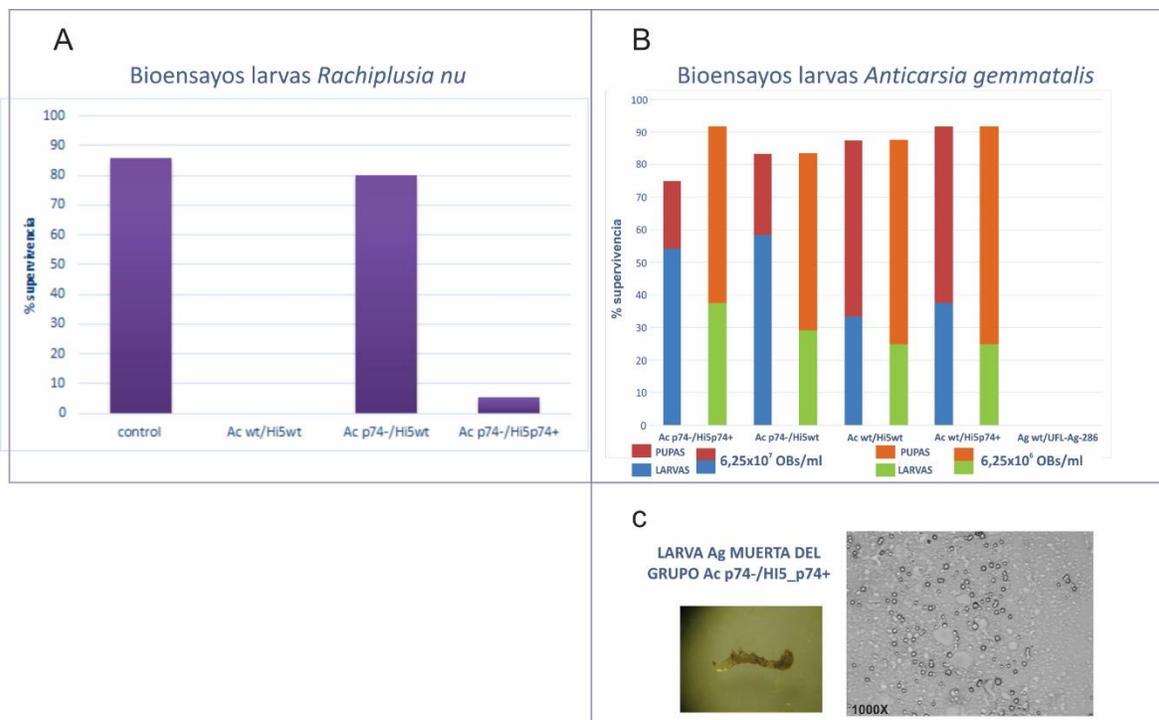


Figura V.11. Resultados bioensayos en larvas. **A)** El gráfico corresponde a los resultados obtenidos en los bioensayos en larvas de *Rachiplusia nu*. Los grupos indicados fueron: control de solución vehículo (control), virus AcMNPV_wt propagado en Hi5_wt (Ac wt/Hi5wt), virus AcMNPV_p74- propagado en Hi5_wt (Ac p74-/Hi5wt) y virus AcMNPV_p74- propagado en Hi5_p74+ (Ac p74-/Hi5p74+). Se indica el porcentaje de supervivencia de cada grupo. **B)** Gráfico resultante de los bioensayos en larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Se evaluaron 2 dosis, 6,25x10⁶y 6,25x10⁷OBs/mL. Los grupos evaluados fueron: Ac p74-/Hi5p74+; Ac p74-/Hi5wt; Ac p74-/Hi5wt; virus AcMNPV_wt propagado en Hi5_p74+ (Ac wt/Hi5p74+); virus AgMNPV propagado en UFL-Ag-286 (Agwt/UFL-Ag-286). Los porcentajes de supervivencia se indican como la suma de larvas vivas más pupas. **C)** Larva muerta del grupo Ac p74-/Hi5p74+ y microscopía óptica de un extendido del interior de la larva diseccionada (aumento 1000X).

En resumen, se logró revertir el fenotipo del virus AcMNPV_p74def, cuando este fue propagado en células *High Five* transgénicas que expresan constitutivamente el gen p74 de AgMNPV. A pesar de ser especies diferentes, se obtuvieron porcentajes de mortalidad similares a los obtenidos con el virus AcMNPV wild type. De este modo, y a pesar de no haberse logrado aislar un AgMNPVdefp74, las células modificadas genéticamente para empaquetar virus defectivos han mostrado ser exitosas.

Conclusiones y persepectivas

VII- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en el marco del trabajo de la presente tesis doctoral permitieron desarrollar una nueva metodología para identificar y clasificar aislamientos pertenecientes a los géneros *Alpha-* y *Betabaculovirus*, basada en PCR y en la secuencia aminoacídica parcial de los genes *pif*, así como también, obtener inferencias filogenéticas equivalentes a las que se logran utilizando las metodologías clasificatorias vigentes. Por otro lado, se profundizó en el conocimiento sobre estos genes en el virus AgMNPV: a nivel génico, evaluando su distribución en la familia *Baculoviridae* y determinando las posibles regiones promotoras; a nivel transcripcional, determinando su cinética de expresión durante el ciclo infectivo; y, a nivel proteico, a través de la predicción de estructuras secundarias y probable localización de las proteínas en la estructura viral. Por último, se realizó un análisis en particular de la proteína PIF-0 (P74), iniciando la evaluación sobre la funcionalidad de los dominios amino y carboxilo terminal, logrando asociar la región carboxilo terminal con la localización nuclear de la proteína.

En cuanto a los objetivos planteados asociados a investigación aplicada, se desarrolló un clon celular transgénico basado en *High Five* que expresa la proteína PIF-0 de AgMNPV, con el fin de funcionar como línea empaquetadora de variantes virales defectivas en este gen. Además, se obtuvieron virus AgMNPV mutantes para *pif 0*, pero no se logró el aislamiento clonal de los mismos. Sin embargo, se realizaron ensayos biológicos en larvas con virus AcMNPV defectivos en *pif-0* propagados en el clon celular transgénico, los cuales demostraron el correcto funcionamiento de las células empaquetadoras.

En este apartado se discutirán los resultados obtenidos, como así también las perspectivas a futuro.

Con el fin de determinar si las asociaciones filogenéticas basadas en la secuencia aminoacídica de los genes *pif* se correspondía con las obtenidas a partir del análisis de todas las *core proteins*, se realizaron cladogramas utilizando la secuencia de las proteínas agrupadas según su función biológica. Así, se determinó que los polipéptidos PIF clasificaban a los baculovirus en los cuatro géneros actualmente aceptados (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* y *Deltabaculovirus*), otorgando también la subclasificación en Grupo I y II para los alphabaculovirus, incluidos los linajes a y b del primero, del mismo modo que sucede cuando el análisis se realiza con todas las *core proteins* (Miele et al, 2011). Sin embargo, se detectó una diferencia en la relación entre los distintos géneros en el cladograma, observándose que en todos los análisis realizados en base a las proteínas asociadas a la replicación, transcripción y ensamblaje (como así también el de las *core proteins*) generan una primera división que separa al género *Deltabaculovirus* del resto, mientras que cuando el estudio se hace con las proteínas PIF, la primera separación divide a los *Alpha-* y *Betabaculovirus* por un lado, y a los *Gamma-* y *Deltabaculovirus* por el otro. Este cambio supone claras diferencias entre las proteínas asociadas a la infectividad oral de los baculovirus que infectan lepidópteros de los que infectan himenópteros y dípteros, pudiendo expresar eventos evolutivos diferentes entre estos grupos en cuanto a la maquinaria asociada a la infectividad *per os*.

Los estudios filogenéticos que asocian la evolución de los baculovirus y de los insectos ha permitido inferir que un virus ancestral de las familias *Baculoviridae* y *Nudiviridae* era capaz de infectar *Holometabola*, ancestro de los Órdenes *Diptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera* e *Himenoptera*, el cual ya presentaba un estadio larval y metamorfosis completa, evidenciando un virus con capacidad infectiva por vía oral de las larvas. Eventos posteriores de diferenciación viral surgieron posiblemente como una adaptación a la diversificación de los hospedadores (Thézé et al, 2011). Esto eventos de diversificación pudieron incluir eventos de co-evolución entre los patógenos y sus hospedadores; aunque, en realidad, podría también establecerse que la evolución de los

insectos forzó la adaptación de los virus ancestrales, favoreciendo la diversificación en las diferentes familias. Para estas adaptaciones resulta fundamental que los virus fijen variantes alélicas adecuadas para los genes que codifican a las proteínas involucradas en la interacción específica inicial con las células del hospedador. Los análisis realizados en este trabajo de tesis podrían indicar la evolución diferencial de las maquinarias de infección primaria, dónde una población ancestral acumuló cambios para adaptarse a la infección *per os* de los Ordenes *Lepidoptera*, *Himenoptera* y *Diptera*, mientras que otros eventos posteriores permitieron la diversificación entre los géneros *Alpha-* y *Beta-*.

En cuanto a la localización de los genes *pif* dentro del genoma viral, no se halló una distribución característica en forma de *cluster* génico a pesar de que sus productos cumplen su rol en conjunto. Sin embargo, la distribución fue muy conservada en los miembros del Grupo I de *Alphabaculovirus*, y en menor medida en el género *Betabaculovirus*. En tanto, el Grupo II de *Alphabaculovirus* presentó la menor conservación, encontrándose dos escenarios de organización. Estos resultados suponen que estas secuencias no requerirían encontrarse físicamente cercanas para generar sus productos, mostrando la independencia de sus regiones regulatorias del contexto genómico.

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS BACULOVIRUS EN BASE A LOS GENES *PIF*

En virtud que la filogenia basada en los *pifs* muestra un agrupamiento de la familia *Baculoviridae* equivalente a la generada por el uso de todos los *core genes*, se desarrolló un sistema de identificación y clasificación de baculovirus basado en la secuencia aminoacídica parcial de estos genes. Para ello, se diseñaron *primers* para la amplificación parcial de *pifs* mediante PCR en los miembros de tres agrupamientos: *Alphabaculovirus* de Grupo I; *Alphabaculovirus* de Grupo II; y *Betabaculovirus*. Los mismos funcionaron con éxito cuando se utilizaron algunas especies representativas de cada grupo con genoma secuenciado, siendo AgMNPV y AcMNPV, representantes del Grupo I de *Alphabaculovirus*, SeMNPV y

SfMNPV representantes del Grupo II y CpGV y EpapGV como representantes de *Betabaculovirus*. Por otro lado, la comparación de los cladogramas obtenidos a partir de los amplicones *pifs* respecto a los generados en base a la secuencia parcial de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina* o *granulina* (Jehle et al, 2006 [B]), que hoy en día constituye la técnica *gold standard* para dar una primera identidad a los baculovirus, no evidenciaron diferencias notorias.

De acuerdo a la definición propuesta por el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (ICTV), una especiación viral debe ser considerada como un proceso continuo en el tiempo, por ende, una única secuencia divergente no permite definir a dos virus de distintas especies (van Regenmoertel, 2000; Jehle et al, 2006 [B]). Para el caso particular de los baculovirus, los parámetros que definen especies no están bien determinados. Sin embargo, su distinción se basa en el rango y especificidad a los hospedadores, perfiles de restricción de DNA, secuencia de varias regiones del genoma y considerando las similitudes en predicciones de secuencia aminoacídica (Herniou et al, 2012). Con estas consideraciones, Jehle et al, 2006 [B] determinaron que la evaluación de la distancia genética entre concatenados de secuencias nucleotídicas parciales de los genes *lef-8*, *lef-9* y *poliedrina/granulina*, permitían asignar como especie o no a un nuevo aislamiento viral. De esta manera, al evaluar el parámetro Kimura-2P, si el valor entre dos virus es menor a 0,015, se consideran variantes de una misma especie; si el mismo es mayor a 0,05, se consideran dos especies; en tanto, los valores intermedios requieren de otras pruebas para determinar la especiación. Basado en este concepto, se evaluaron las distancias entre los concatenados de secuencia parcial de genes *pif* de los virus considerados en la filogenia. En general, los resultados obtenidos por ambos métodos clasificatorios fueron equivalentes. Sólo se perdió especiación entre AcMNPV y BomaNPV-S2, ya que el método basado en *pifs* dio una distancia 0,03, valor dudoso según lo considerado previamente. Lo mismo ocurrió para los pares BomaNPV-S2/PlxyNPV y BomaNPV-S2/RanuMNPV. Sin embargo, se obtuvo diferenciación de especies en BmNPV/BomaNPV-S2, BmNPV/BomaNPV-S1 y HearGV/XecnGV, virus no diferenciados según las distancias obtenidas con la metodología anterior.

Para comprobar la utilidad del método, se emplearon los virus RanuMNPV y AgvaMNPV, ambos caracterizados previamente en nuestro laboratorio, pero sin información de secuencia genómica completa. Así, pudieron realizarse análisis filogenéticos para estos aislamientos en base a los *pifs*, los cuales fueron congruentes con los obtenidos previamente (*Rodriguez et al, 2011, 2012*). Para el caso de AgvaMNPV, cuyo hospedador es *Agraulis vanillae*, mariposa diurna perteneciente a la familia *Nymphalidae*, se encontró una gran distancia evolutiva con los virus más cercanos del Linaje b dentro del Grupo I de *Alphabaculovirus*, así como también, el análisis de distancias determinó la identidad de especie para este virus. Esto mismo se observó al analizar la distancia obtenida por el concatémero *lef-8, lef-9 poliedrina/granulina*. Sin embargo, para el caso de RanuMNPV, los estudios previos determinaron que RanuMNPV era una variante genotípica del virus AcMNPV, ya que los valores de las distancias obtenidas fueron bajos (*Rodriguez et al, 2012*). Sin embargo, se ha determinado un rango de hospedador diferente entre ambos aislamientos. Por ello, se esperaba que el análisis basado en la secuencia parcial de *pifs* permita diferenciarlos. Sin embargo, el estudio de las distancias no lo determinó de esta manera. Al analizar en detalle la secuencia nucleotídica de las regiones evaluadas, se vio que existieron pocos cambios puntuales entre ambas secuencias. Esa diferencia no sería suficiente para clasificar a RanuMNPV como una especie, aunque esta variante presenta un rango de hospedador levemente alterado con respecto a AcMNPV (*Rodriguez et al, 2012*). Para PIF-0, PIF-1 y PIF-3, los cambios aminoacídicos puntuales estuvieron localizados en la región del ectodominio predicho para esas proteínas. Estos cambios podrían influir en la interacción específica del complejo PIF con su receptor, y así, modificar el rango o especificidad de hospedadores. Esta consideración debería ser comprobada con estudios de mutaciones puntuales en el virus AcMNPV y posteriores ensayos de infección en larvas. Por otro lado, los cambios hallados en PIF-2 y PIF-5 coinciden con las regiones transmembrana predichas, no evidenciando, en principio, efecto alguno en la infección. Por último, tanto PIF-4 como PIF-6 presentaron cambios puntuales en el endodominio predicho, los cuales podrían influir en la cascada de interacciones intracelulares generadas luego de

la adsorción primaria, influyendo en la especificidad. Estos cambios también deberían ser analizados con un ensayo apropiado.

Por otro lado, el método aquí propuesto también se evaluó entre aislamientos virales de Colombia (PhopGV, TesoGV y TuabGV) denominados en función de los lepidópteros a partir de los cuales se los aisló. En estos casos también el método permitió agrupar los virus dentro del género *Betabaculovirus*. Llamativamente, se hallaron en los tres aislamientos dos secuencias diferentes para el gen *pif-1*, lo que permitió establecer un trabajo de colaboración con el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, Colombia, para dilucidar entre dos hipótesis: la co-existencia de dos genomas; o la existencia de genes parálogos para *pif-1*. Estas hipótesis están basadas en situaciones similares ya descritas en la familia *Baculoviridae*. Para el caso de co-infecciones, se describió en aislamientos virales de *Choristoneura fumiferana*, en los que se demostró la existencia de 2 genomas virales, CfMNPV y CfDEFMNPV. Este último virus requiere de la presencia de CfMNPV para lograr la infección *per os* en *Choristoneura fumiferana*, resultando en una relación similar a la parasitaria (Arif *et al*, 1984; Lauzon *et al*, 2005). En *Betabaculovirus*, también se hallaron eventos de co-infección en aislamientos de campo; tal fue el caso de aislamientos de GVs a partir de larvas de *Tecia solanivora*, en los que se detectó la presencia de cantidades submolares de otro genoma viral (Espinell-Correal *et al*, 2010), así como también evidencia de transferencia génica interespecies (SfMNPV-CoIA y SpltNPV), resultado de eventos de co-infecciones naturales (Barrera *et al*, 2015). Con respecto a la existencia de genes parálogos, existe una familia multigénica presente en varias familias de virus de invertebrados y en bacteriófagos, los genes *bro* (*Baculovirus repeated open reading frame*), presentes en múltiples copias en el genoma. En *Baculovirus* se hallaron en varias especies de NPVs y GVs de lepidópteros, y estarían involucrados en la producción de poliedros. Los análisis filogenéticos realizados sugieren que la duplicación génica se debe a eventos de recombinación de genomas virales, así como también de la adquisición de genes por transferencia horizontal a través de la evolución (Bideshi *et al*, 2003). De este modo, los dos escenarios planteados fueron previamente descritos en la familia *Baculoviridae*.

Si bien los resultados obtenidos no fueron concluyentes, fueron más coincidentes con la hipótesis de la co-existencia de 2 moléculas de DNA viral, quizás un genoma funcional (portando todos los *pifs*) y otro ácido nucleico defectivo portador de la variante para *pif-1*. Esto resulta coincidente con estudios previos realizados sobre aislamientos de larvas de *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella*, en los cuales se hallaron mezclas de genomas virales en diferentes proporciones a partir de 5 aislamientos obtenidos en campo de larvas de *Tecia solanivora*. Los diferentes aislamientos virales, presentaban diferencias al comparar el RFLP obtenido con las muestras y con el genoma del virus PhopGV, además de presentar bandas submolares que, finalmente comprobaron que correspondían a otro genotipo viral ([Espinel-Correal et al, 2010](#)). Una cuestión que se está evaluando es la posibilidad de que los insectos criados en el insectario dónde se propagaron PhopGV, TesoGV y TuabGV posean virus crípticos que incrementen su replicación ante la presencia de otro baculovirus. Por ejemplo, se ha descrito que secuencias de *Rhopalosiphum padi virus* poseen actividad promotora críptica en células Sf21 infectadas con baculovirus, potenciando la expresión de ciertos genes, que en ausencia de baculovirus, no estarían activos ([Wu et al, 2008](#)).

Cabe destacar que actualmente se está analizando la información derivada de la secuenciación genómica de los tres aislamientos, resultado que permitirá aportar nuevas evidencias más concluyentes para alguna de las dos hipótesis planteadas.

TEMPORALIDAD EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *PIF* DURANTE UN CICLO DE INFECCIÓN

Como antes se discutió, los genes *pifs* serían independientes de la situación de contexto, y por ende, sus regiones regulatorias serían compactas asegurando así estabilidad ante los recurrentes cambios estructurales que padecen los genomas de los baculovirus ([Miele et al, 2011](#)). Por otro lado, dado que las proteínas del complejo forman parte del fenotipo ODV, su transcripción debería ser posterior a la producción de la maquinaria

transcripcional del virus, presentando en consecuencia motivos de secuencia típicos para genes tardíos (Xing et al, 2005; Simón et al, 2005; Chen et al, 2013; Wang et al, 2011; Hou et al, 2013; Torres Braconi et al, 2014; Zhang et al, 2015). En tal sentido, la búsqueda de secuencias INR tardías en las regiones *upstream* de los ORF de los genes *pif* permitió detectar al menos un motivo característico. Con el fin de dar más sustento a las predicciones, se evaluó la estabilidad de la doble hélice del dsDNA en las regiones adyacentes al inicio de traducción, bajo el supuesto que las regiones promotoras son menos estables para facilitar el trabajo de la RNA polimerasa (Rangannan y Bansal, 2009). Se hallaron motivos tardíos para los 7 *pifs*, dentro de la región *upstream* hasta 250 nucleótidos. Para los casos de *pif-3*, *pif-4* y *pif-5* se localizaron 2 o más motivos conservados de posibles INRs tardíos en la región evaluada. En los 3 casos, se localizó al menos un motivo presente en la región *upstream* no codificante, coincidentes también con zonas de mayor estabilidad con respecto al inicio de la traducción. Para *pif-0*, se encontró solo un motivo, pero también coincidente con el criterio de menor estabilidad. Sin embargo, en *pif-1* y *pif-2*, si bien se hallaron motivos tardíos presentes en regiones *upstream* no codificantes, la predicción de estabilidad no arrojó diferencias entre la región promotora y la de inicio de la traducción. Esta situación debe ser comprobada con ensayos *in vivo* que determinen la actividad promotora de las secuencias predichas. Por último, en *pif-6* se localizaron 1 motivo tardío lejano (más de 200 pb del ATG) y 1 motivo temprano más cercano, ambos de menor estabilidad, pero dentro de la región codificante del gen adyacente *lef-3*, gen no perteneciente a los *core gene*, pero esencial para los baculovirus que infectan lepidópteros, sugiriendo la hipótesis de herencia conjunta de los genes *lef-3/pif-6* en este grupo de baculovirus.

Todos los resultados de predicciones bioinformáticas deben ser corroborados mediante ensayos apropiados de evaluación de la actividad promotora de las regiones propuestas (Bilen et al, 2007).

Por otro lado, se realizó una cinética transcripcional de los genes *pif* durante un ciclo de AgMNPV en células UFL-Ag-286, para determinar el momento donde comienzan su transcripción y establecer el punto de expresión máxima. Los resultados fueron

comparados con los hallados en bibliografía para otras especies baculovirales, resultando bastante variable. Suele establecerse que la expresión de los genes tardíos comienza casi en simultáneo con la replicación viral, aproximadamente a las 6-10 hpi dependiendo de la especie, mientras que la expresión de los genes muy tardíos ocurre después de las 18 hpi (*Berreta et al, 2013*). En particular y en nuestros ensayos, para *pif-0*, *pif-2*, *pif-4* y *pif-5* la expresión coincidió con la correspondiente a los genes tardíos/muy tardíos, comenzando después de las 12 hpi, y con picos máximos a las 21, 27 o 36 hpi. Sin embargo, los transcritos de *pif-1* y *pif-3* fueron detectados en una pequeña cantidad a las 6 hpi, momento temprano para lo esperable en este grupo de genes. Sin embargo, la expresión continua fue a partir de las 18 hpi, con picos máximos a las 21 hpi, en un modo similar a los anteriores. Estos resultados fueron consecuentes con los reportados por *Oliveira et al, 2013*, en el mismo sistema virus-hospedador. Dado que se ha visto que los baculovirus pueden transportar en sus partículas a algunas de sus factores esenciales para la transcripción y replicación, sería posible explicar la pronta expresión de algunos genes tardíos. Sin embargo, aún no existe evidencia contundente de que algún baculovirus porte a la RNA polimerasa viral conformada con todas sus subunidades, y por tanto, continúa siendo una incógnita el rol que cumplirían dichas proteínas en las etapas tempranas de la infección (*Rohrmann et al, 2013; Chan et al, 2013; Hou et al, 2016*).

Hou D, Chen X, Zhang LK. Proteomic Analysis of Mamestra Brassicae Nucleopolyhedrovirus Progeny Virions from Two Different Hosts. PLoS One. 2016 Apr 8;11(4):e0153365. doi: 10.1371/journal.pone.0153365.

En síntesis, los resultados obtenidos aportaron evidencia experimental que los genes *pif* de AgMNPV, propagado en la línea celular UFL-Ag-286, presentan un patrón de expresión mayoritariamente muy tardío (*Berreta et al, 2013; Rohrman et al, 2013*).

CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS PIF. ESTUDIOS GENERALES PREDICTIVOS Y PARTICULARES SOBRE PIF-0

Los genes *pifs*, dispersos en todos los genomas baculovirales y de expresión tardía, generan proteínas estructurales del virión ocluido. Los estudios predictivos realizados en este trabajo en base a las secuencias aminoacídicas permitieron localizar regiones transmembrana en los 7 PIFs, como así también, señales de exportación nuclear (NES) para PIF-0, PIF-1, PIF-2, PIF-3 y PIF-6, resultados congruentes con la localización previamente determinada ([Song et al, 2008](#); [Xu et al, 2011](#); [Hou et al, 2013](#); [Torres Braconi et al, 2014](#); [Zhang et al, 2015](#)). Si bien estas señales no fueron halladas para PIF-4 y PIF-5, no se descarta la existencia de alguna señal del tipo NLS (*Nuclear Localization Signal*), que no pueda ser predicha para esta familia viral con las bases de datos existentes. Por ello, en el laboratorio, se está evaluando la obtención de un modelo *in silico* que pueda predecir estas señales para los baculovirus ([Cerrudo, no publicado](#)).

Para el caso particular de PIF-0 de AgMNPV se realizaron estudios de localización subcelular utilizando virus AcMNPV recombinantes, los cuales expresaban quimeras entre la fracción amino terminal fusionada a la proteína indicadora Dsred (p74Nt-Dsred), o Dsred unida a la región carboxilo terminal de P74 (Dsred-p74Ct). Los ensayos detectaron la presencia en el núcleo de Dsred-p74Ct, región predicha como la responsable del anclaje a membrana dado que contiene los dominios transmembrana predichos. En tanto, la quimera p74Nt-Dsred presentó una localización citoplasmática, no logrando co-localizar la señal fluorescente con la fracción nuclear. Estos resultados son coincidentes con los estudios previos realizados para esta proteína, los cuales demostraron que la región de anclaje es Ct y la Nt presenta la actividad responsable de infectividad oral ([Slack et al, 2001](#); [Slack et al, 2010](#)). Particularmente en el trabajo realizado por [Slack et al, 2010](#), se evaluó la complementación de virus AcMNPV defectivos en *p74*, en los que un fragmento Nt y soluble del producto de dicho gen recuperó el fenotipo infeccioso *per os*, cuando se produjeron los OBs en líneas celulares adecuadas sumando la transfección de plásmidos que expresaban

variantes truncadas de la proteína. A futuro, sería apropiado realizar ensayos de microscopía confocal, para determinar si la fluorescencia detectada para la quimera Dsred-p74Ct está distribuida por todo el núcleo o sólo en la membrana nuclear, siendo esta última opción la esperada.

En el contexto anterior, quedan por concluirse los ensayos asociados a las versiones recombinantes de AcMNPV portando quimeras del gen *p74*, derivadas de la fusión entre dominios de especies diferentes. Estos estudios permitirán arrojar más luz sobre el rol funcional de esta proteína, lo cual quizás posibilitará a futuro proponer versiones de virus modificados en el rango de hospedador.

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA CELULAR PARA COMPLEMENTAR VIRUS DEFECTIVOS EN PIF-0

Dado que la proteína P74 es una de las más importantes del complejo PIF (*Faulkner et al, 1997; Zhou et al, 2005; Slack et al, 2001; Peng et al, 2011*), y en vistas de que su presencia es vital en el éxito de la infección primaria, se decidió generar un sistema celular empaquetador para complementar variantes virales defectivas en este gen. En tal sentido, se obtuvo un clon celular transgénico derivado de la línea comercial *High Five*TM, el cual expresa la proteína P74 (PIF-0) del virus AgMNPV de manera constitutiva incluso durante una infección baculoviral. Ello se logró al introducir como región promotora a la secuencia que controla la expresión de una proteína de *shock* térmico de *Drosophila melanogaster*. Como ya fue mencionado, la elección de este promotor se basó en el funcionamiento del mismo en células de insecto, y su potencial activación térmica, resultando funcional aun en el contexto infectivo (*Lan y Riddiford, 1997; Sah et al, 1999; Kimura et al, 1999; Kust et al, 2014*).

Para evaluar la actividad de la proteína P74 producida por las células transgénicas, se realizaron ensayos biológicos de complementación de virus AcMNPV *wt* y defectivos en *p74* (*Faulkner et al, 1997*). Así, se obtuvo reversión del fenotipo cuando se infectaron larvas

de *Rachiplusia nu* con virus defectivos propagados en las células empaquetadoras. Es necesario repetir los ensayos con grupos de larvas dentro de cada condición para obtener los análisis estadísticos respaldatorios. De todas maneras, estos resultados resultan de gran

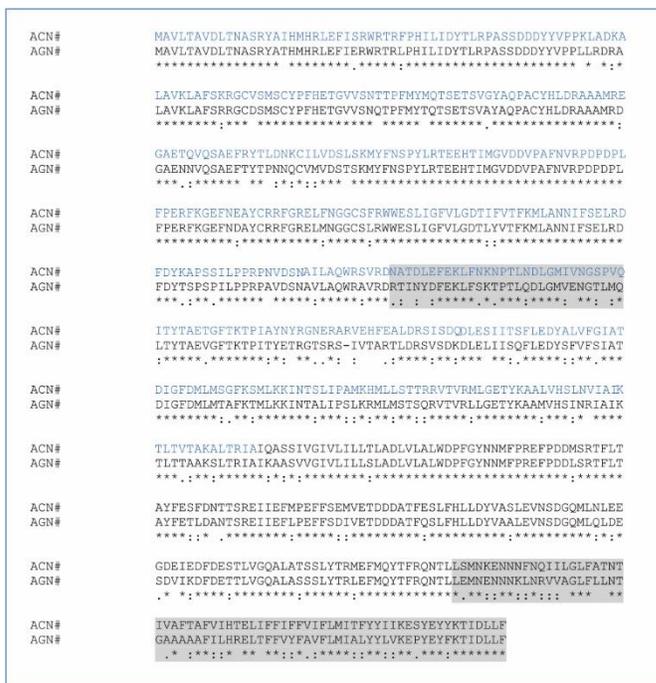


Figura VII.1. Alineamiento PIF-0 de AcMNPV y AgMNPV. La figura muestra los resultados del alineamiento múltiple de PIF-0 de los virus AcMNPV y AgMNPV realizados con ClustalW2. Los aminoácidos celestes corresponden a la región amino terminal de la proteína. Las dos zonas resaltadas en gris, fueron las de mayor variabilidad de las secuencias.

interés, ya que se logró revertir la actividad infectiva con una proteína derivada de otra especie. Al evaluar la conservación aminoacídica de las secuencias de PIF-0 de ambos virus, se localizaron dos regiones de mayor variabilidad (Figura VII.1). La primera, corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos 241 y 301, correspondientes a la región amino terminal. Por ende, esta región podría estar involucrada en la especificidad a hospedadores, ya que la región amino terminal de PIF-0 comprende dicha actividad. La otra región variable comprende parte de la zona carboxilo terminal, cuya función descrita es de anclaje. Nuestros estudios mostraron que la proteína PIF-0 de AgMNPV fue capaz de revertir el fenotipo deficiente de infección per os del virus AcMNPV_*defp74*, ello nos lleva a suponer que esos cambios presentes en la secuencia no impedirían la correcta interacción de PIF-0 con el complejo PIF y, en consecuencia, la infección per os en larvas de *Rachiplusia nu*.

Por otro lado, se realizaron los ensayos en larvas de *Anticarsia gemmatalis*, hospedador poco susceptible a la infección de AcMNPV (Chikhalya et al, 2009). Las dosis

evaluadas no permitieron establecer mortalidad en los controles positivos, por lo que habría que repetir el ensayo con mayores dosis. Sin embargo, un punto de conflicto es la preparación de las suspensiones de la solución con OBs, ya que dosis muy altas de OBs/mL generan una solución muy densa y difícil de manipular. Tal vez se podrían realizar ensayos con otro tipo de protocolos de alimentación, como por ejemplo la contaminación de la dieta artificial, lo cual nos independizaría de la preparación de soluciones muy densas ([Jones, 2000](#)).

Dado que las células empaquetadoras para P74 se diseñaron con el fin de complementar a una variante de AgMNPV defectivo en el gen que produce a dicha proteína, se llevaron a cabo ensayos de mutagénesis genómica los cuales mostraron un éxito dispar. Para ello, las construcciones genéticas construidas para interrumpir el gen *pif-0* se generaron conteniendo sistemas selectores de mutantes de fácil visualización (replicón procariota o β -galactosidasa). Uno de los plásmidos utilizados, pLow-p74, presentó el origen de replicación de bajo número de copias procariota p15A ([GenBank: KF155405.1](#)). Luego de los ensayos de recombinación y dado que no fue posible aislar el genoma modificado, se intentó con el pBelo-p74, conteniendo el origen de replicación de simple copia MiniF ([GenBank: U51113](#)), aunque tampoco fue posible aislar el virus mutante. Con respecto al primero, la causa podría asociarse a la inestabilidad del megaplásmido formado (genoma viral replicativo en *E.coli* DH10B) dado que esta secuencia produciría entre 15 a 25 copias, lo cual puede ser perjudicial para moléculas de dsDNA grandes ([Preston, 2003](#)). En tanto, el uso del miniF fue *a priori* más alentador, ya que había sido utilizado previamente para la generación de bácmidos en otras especies de baculovirus ([Luckow et al, 1993](#); [Zhao et al, 2003](#); [Wang et al, 2003](#); [Motohashi et al, 2005](#)). Sin embargo, tampoco pudieron seleccionarse los mutantes. Por ello surgió la inquietud acerca de la tolerancia de secuencias del virus AgMNPV en *E.coli*, ya que ha sido reportado que algunas secuencias son muy difíciles de replicar y sostener en bacterias ([Razin et al 2001](#); [Godiska et al, 2010](#); [Kimelman et al, 2012](#); [Sagy et al, 2014](#)). Atendiendo a esta posibilidad se empleó un tercer sistema selector (β -galactosidasa) que no implicaba el pasaje del genoma baculoviral en bacterias. Su empleo resultó exitoso dado que se observaron focos de infección en células UFL-Ag-286

con actividad β -galactosidasa en presencia del reactivo X-gal. Sin embargo, esta vez el problema resultó en el aislamiento de los virus recombinantes dado que no se pudo disponer a los mismos puros libres del virus silvestre. Para facilitar esto, sería conveniente realizar la doble recombinación homóloga en células entre el genoma viral y la construcción genética que otorgará la interrupción a *p74*, pero previamente linealizando al genoma en la región involucrada en la mutación para disminuir la posibilidad de replicación del silvestre. Valiéndose de esta opción se mejora fuertemente la tasa de éxito en la selección y aislamiento de mutantes, como lo prueban experiencias previas (*Kitts et al, 1990; Kitta y Possee, 1993; Zhao et al, 2003*). El problema en nuestro caso está en la ausencia de un sitio de restricción único en el gen *p74* de AgMNPV. Como alternativa, se podrán evaluar nuevas tecnologías como el sistema CRISPR/Cas9, que ya se ha utilizado en la edición de genomas grandes de dsDNA (*Suenaga et al, 2014; Dong et al, 2016*) como también en genomas de células de insectos (*Wei et al, 2014*).

Dada la importancia de la agricultura en la Argentina, el desarrollo de tecnologías para el mejoramiento de los cultivos resulta de gran importancia. En este punto, uno de los principales desafíos es el control de las plagas que atacan a los cultivos y, en particular, por la gran siembra que se da en nuestro país, de la soja. Dadas las desventajas previamente introducidas acerca del uso del control químico, surge como alternativa importante dentro de los programas de manejo integrado de plagas la aplicación del control biológico. Por ello, el desarrollo de tecnologías que permitan mejorar enemigos naturales de las plagas en cuanto a las limitaciones que poseen en rango de hospedador, tiempos de letalidad y permanencia en campo, resultan prometedoras. Es por ello, que este trabajo se centró en el estudio del virus AgMNPV, naturalmente infectivo para la plaga *Anticarsia gemmatalis*, una de los principales causantes de pérdidas en cultivos de soja en nuestro país (*Aragon, 2002; Massaro et al, 2008*). Dentro de las mejoras como elemento de control biológico, es importante el estudio de los genes responsables en la infección primaria, puerta de entrada indispensable para el desarrollo de la infección.

Esta tesis contribuyó en la clasificación de nuevos aislamientos baculovirales basados en las secuencias de estos genes. Además, se amplió el conocimiento de los genes

pif del virus AgMNPV en cuanto a sus niveles de expresión. Pero lo más interesante es que se dejaron planteados dos escenarios para el diseño de productos biológicos destinados al uso bioinsecticida. Uno de ellos está basado en el virus AcMNPV, resultando prometedora la fácil manipulación del genoma viral para producir variantes mutantes capaces de ingresar mediante infección *per os* en larvas de un lepidóptero no permisivo. De este modo, si el virus que logró transducir es capaz de replicar y generar formas brotantes, se habrá logrado alterar el rango de hospedador y así contribuir en la reducción del uso indiscriminado de agentes químicos con naturaleza insecticida. Por otro lado, se sentaron las bases para el desarrollo de una plataforma de generación de virus AgMNPV incapaces de dispersarse naturalmente, pero que al ser empaquetados en una línea celular adecuada, resultan funcionales para completar un ciclo de infección. Estos virus controlados, podrán modificarse genéticamente incorporándoles genes que disminuyan los tiempos de letalidad o que alteren el rango de hospedador, no resultando en un riesgo ambiental al presentar un sistema de control de la dispersión. Con los avances en la tecnología, sobre todo en base a los nuevos desarrollos de edición genómica, estos objetivos podrán convertirse en realidad en un corto plazo.

Materiales y métodos

En este Capítulo se detallan las metodologías y materiales utilizados para el trabajo expuesto. En primer lugar, un apartado con la descripción de los materiales y métodos generales y a continuación uno con particularidades diseñadas y utilizadas para este trabajo.

GENERALES

Plásmidos, cepas bacterianas, líneas celulares y enzimas utilizadas

En todas las etapas que involucraron la construcción de plásmidos por clonado molecular se utilizaron como base los plásmidos comerciales pZErO-2 (Invitrogen), pBlueScript-SK (Stratagene), pCDNA3 (Thermo Fisher Scientific), pBeloBac11 (New EnglandBiolabs), pGEM-T Easy (Promega), pET22b(+) (Novagen), pQE30 (QuiaGen), pFastBac™ Dual, pFastBacHT A, B y C (Thermo Fisher Scientific).

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en las etapas de clonado fueron Top10 (Invitrogen), DH10B (Invitrogen) y DH10-Bac (Invitrogen) (Tabla VII.1). Los eventos de transformación se realizaron mediante electroporación (BioRad) o shock térmico. Los cultivos bacterianos se realizaron en medio LB (Luria-Bertani: Triptona 10 g, NaCl 10 g, Extracto de levadura 5 g, agar-agar 1,5 % para medios sólidos; Britannia) en presencia de los antibióticos ampicilina, kanamicina y cloranfenicol (Sigma) (Tabla VII.2). Todas las purificaciones de DNA plasmídico se realizaron mediante la técnica de miniprep por lisis alcalina (Green y Sambrook, 2012).

Nombre	Genotipo	Características
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galUgalKrpSL (StrR) endA1 nupG	Utilizadas para el clonado y preparación de plásmidos. Tienen alta eficiencia de transformación. Se le eliminaron los genes RecA (una recombinasa) y endA (una DNAsa que puede disminuir el rendimiento) (Invitrogen)
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galUgalKrpSLnupG λ-	Diseñada para la propagación de clones con grandes insertos de DNA (<i>Durfee et al, 2008</i>) (Invitrogen)
DH10 Bac	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galUgalKrpSLnupG λ- /pMON14272 / pMON 7124	Utilizadas para producir baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas eucariotas. Los baculovirus pueden también ser aislados y transfectados en células de insecto para producir partículas virales infectivas. Estas bacterias contienen el bácido parental bMON14272 y el plásmido <i>helper</i> pMON 7124

Tabla VII.1. Cepas bacterianas usadas en el presente trabajo. La tabla cita las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. Se indica el nombre de la cepa en la primera columna, el genotipo correspondiente en la segunda y las características generales en la última.

Las etapas de clonado molecular se llevaron a cabo mediante protocolos estándar (*Green y Sambrook, 2012*). En líneas generales, se realizaron digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (New England Biolabs, Promega, Fermentas) y para desfosforilación de extremos de DNA, la fosfatasa alcalina (Fermentas). Para la ligación de extremos de DNA compatibles se utilizó la enzima del fago T4 (Fermentas), mientras que para modificaciones de extremos de DNA lineales se usó utilizando el fragmento de Klenow (Invitrogen) o la enzima *PFU* polimerasa (PB-L).

Antibiótico	Concentración solución <i>stock</i>	Concentración final de <i>uso</i>
Ampicilina	100 mg/mL	100 µg/mL
Kanamicina	50 mg/mL	50 µg/mL
Cloranfenicol	34 mg/mL (etanol)	34 µg/mL
Tetraciclina	12 mg/mL (etanol)	12 µg/mL
Puromicina	1mg/mL	Según experimento

Tabla VII.2. Antibióticos utilizados y sus concentraciones de stock y trabajo

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como *primers* en las reacciones de PCR fueron diseñados *ad hoc* y tercerizados en su síntesis (Invitrogen, Macrogen), los cuales pueden observarse en la [Tabla VII.3](#). En los casos donde se introdujeron secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción, se incorporaron los nucleótidos sugeridos para optimizar la digestión enzimática (New England Biolabs). A lo largo de este trabajo de tesis se realizaron múltiples reacciones de PCR, por lo cual, se indican en detalle los nombres tal como aparecen en los resultados.

Nombre del primer	Secuencia 5' - 3'	Molde
P74-ATG	ATGGCAGTATTGACCGCCGT	AgMNPV
P74- XbaI	CAGGCTCTAGAGAAACTCGCGCGGAAACAT	<i>Alpha- y Betabaculovirus</i>
P74-XhoI	GCCGCTCGAGCGCGGGTGCGANAGCATG	<i>Alpha- y Betabaculovirus</i>
Phn-BamHI	CGCGGATCCTATGCCAGATTATAC	AgMNPV
Phn- HindIII	CCCAAGCTTATACGCGGGGCCGGT	AgMNPV

Phn- HindIII stop	CCCAAGCTTTTAAATACGCGGGGCCGGT	AgMNPV
ie1- fw(PromH)	CCCCAAGCTTGATTGTGCGGTGAGCGTTGCGCGT	AgMNPV
ie1-rev	CATAGAGATTCGCCCA	AgMNPV
OrfIE1-5'	CGGGATCCATATGAAACGAATTGACAATTACCG	AgMNPV
Pzf3nocod	GTGGCGGAATCTCTATG	AgMNPV
P74-STOPc	AGCCGCAAGTAAAGTYA	AgMNPV
P74-247c	TTGGACACCACACCCGT	AgMNPV
P74650	GTTGGGTGACACGCTTTATGT	AgMNPV
Fw- ACT_336-358	ACGGAACCTCTCGTTACCGATGG	UFL-Ag- 286
REV- ACT_434-455	TGCTATGTTGCCCTGGACTTCG	UFL-Ag- 286
pSeFw	ATCAGATCTGCTATGCTCACTTTTGTAGAC	SeMNPV
pSeRev	ATCAAGCTTATTCCGAATAGAGATTGTCGTAC	SeMNPV
pHaFw	ATCAGATCTTTCATGTGCGAATATCATTATATAC	HaMNPV
pHaRev	ATCAAGCTTATGTGTATAAAATTGTGGTACC	HaMNPV
pFwp74Ac	GAAGATCTATGGCGTTTTAACAG	AcMNPV
pRevBamAc	TAACCGAACGGATCCCATAGCGC	AcMNPV
pFwBamAc	GCGCTATGGGATCCGTTCCGGTTA	AcMNPV
pRevp74Ac	CCCAAGCTTAAAATAACAAATCAATTG	AcMNPV
pAC_upXhoI	GACGGCTCGAGTATAGTACCGCTGCGCATAG	AcMNPV
pAC- downXbaI	GACGGTCTAGACACTAACGACAGTGATG	AcMNPV
InsAct5	GAAGATGACACAGATCATGT	High Five, UFL-Ag-286
InsAct3	GGCGAGGATCGATCCACCGAT	High Five, UFL-Ag-286
polyT	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGC (T) ₁₇ V	mRNA eucariota
Hel-76511	AGGTGGTTAACGTGTCCGA	AgMNPV
Hel-76831c	TTCTGACCGGCAGCGATCT	AgMNPV
EGTa-14577	TAATCGGCAAACGCCTCTAC	AgMNPV

EGTb- 14837c	CGATGCGGCAAACAAACAAC	AgMNPV
ODV66a- 38963	GCAACGGCACGCTATATTC	AgMNPV
ODV66b- 39168c	AATGCGTCGCGTCATTGTC	AgMNPV

Tabla VII.3. Primers utilizados en el trabajo de tesis. En la tabla se detalla la secuencia nucleotídica de los *primers* utilizados.

Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se realizaron utilizando la DNA polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus*, en un ciclador térmico para tubos (Eppendorf) y en un volumen final de 10 μ L salvo que se indique lo contrario. Las concentraciones finales de reactivos en las que se llevaron a cabo los ensayos de PCR fueron las siguientes: $MgCl_2$ (PB-L) 1,5mM; dNTPS's (PB-L) 0,2mM; *Primers* 1 μ M c/u; Taq (PB-L) 0,05 U.

Las polimerasas utilizadas fueron *Taq Pegasus*, *PFU* (PB-L) y *High Fidelity Platinum Taq* (Invitrogen), según consideraciones de los fabricantes. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico para tubos (Eppendorf). Para la generación de cDNA se utilizó una Transcriptasa Reversa *SuperScript III* (Invitrogen).

Los ensayos de PCR en tiempo real que se realizaron con *Master Mix SyBrGreen* (Fermentas) en un ciclador *SmartCycler* (Cepheid), mientras que las PCRs en tiempo real con sondas Taqman se realizaron con DNA polimerasa *GoTaq* (Promega) en el ciclador BioRadIQ5 (BioRad). En ambos casos la concentración de *primers* usada fue de 0,25 μ M.

Mantenimiento de células de insecto y virus

Se utilizó la línea celular de insectos UFL-Ag-286 (*Sieburth & Maruniak, 1988*) como hospedador para multiplicar los viriones de AgMNPV-2D y AgMNPV-SF (*Maruniak, 1989; Claus et al, 1993*), aislamientos brasileño y argentino, respectivamente. En tanto, se utilizaron las líneas celulares Sf9 (*ATCC® CRL-1711™*), Sf21 y *High Five™* (Invitrogen; *BTI-TN-5B1-4*) para la multiplicación de los virus AcMNPV y sus derivados. En ciertos experimentos se utilizó también la línea *High Five™* para la multiplicación de virus AgMNPV. En todos los casos, las células se mantuvieron a 27°C (estufa MIR 5531, SANYO) en monocapa con medio GRACE's completo (Invitrogen), suero fetal bovino 10% (Bioser). También se agregó gentamicina (80 µg/mL), y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Invitrogen) a partir de un *stock* 100X. Así, la multiplicación de los virus en su fenotipo de formas brotantes (BV) se realizó mediante infección de cultivos de células adecuadas, creciendo en monocapa. Para este propósito, se utilizó una multiplicidad de infección (MOI, de *Multiplicity of Infection*) de 0,1. A las 72 horas se recolectó el medio de cultivo condicionado y se clarificó en una centrífuga clínica (Universal 3C, Hettich Zentrifugen) a 1000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes clarificados fueron conservados en heladera a 4°C y su título se determinó mediante infección y recuento de placas en monocapas de células adecuadas. Para tal fin, células creciendo en policubetas de 6 pocillos (Sarstedt) a una confluencia del 60% fueron infectadas con 400 µL de BVs en medio de cultivo sin suero (diluciones 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷), e incubadas durante 1 hora a 27°C. Luego, se retiró el inóculo viral, se agregaron 2mL de medio de cultivo completo con agarosa 1,5 % p/v (SeaPlaque Agarose, Cambrex), y una vez solidificado lo anterior, se introdujeron otros 2 mL de medio completo. Las placas se incubaron durante 9 días a 27°C y luego fueron tratadas con solución de fijación (Formaldehído 4% en PBS 1X: NaCl 8 g, K₂HPO₄ 0,2 g, KCl 0,2 g, pH 7,5) durante 1 hora. Finalmente, se retiraron los tacos de agarosa y se tiñeron las monocapas con solución de tinción (azul de metileno 0,8%, Etanol 48%,KOH 0,005%). El título resultante se determinó mediante la utilización de la siguiente fórmula: UFP/mL = Nº placas x (Volumen del inóculo)⁻¹ x (Factor de dilución), donde UFP indica las Unidades Formadores de Placa.

En tanto, los fenotipos BVs de todos los cultivos de células infectados *in vitro* con baculovirus, se concentraron a partir de los sobrenadantes clarificados mediante ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa (30% p/v) a 24000 rpm (4°C) durante 75 minutos (ultracentrífuga Beckman L80, rotor SW28).

Electroforesis

Las verificaciones de las distintas reacciones que involucraron moléculas de DNA se realizaron mediante electroforesis (EC-Apparatus) en geles de agarosa (0,5-2%; PB-L), en presencia de *Buffer* TAE 1 X (*stock* 50X: Tris 2 M; ácido acético 57,1 mL; EDTA 0,05 M), tinción con Bromuro de Etidio (Sigma, *stock* 20000X: 10 mg/mL) y utilizando marcadores de tamaño comerciales como patrones de referencia (*Ladder* 50 pb, *Ladder* 100 pb, *Ladder* 400 pb, *Ladder* 1kbp, genoma de λ /HindIII, genoma de λ /EcoRI-HindIII; PB-L). El revelado se realizó mediante exposición del gel con una lámpara de luz UV y las imágenes de cada electroforesis se digitalizaron mediante el programa Kodak Digital Images (Kodak). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo entre 80-120V por el tiempo necesario (30 minutos-2 horas).

El análisis de perfiles proteicos se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante entre 10-12%, SDS-PAGE (minivertical gel system, EC-Apparatus; Miniprotean III, BioRad), con el sistema buffer Tris-Glicina (*Green y Sambrook, 2012*). Las muestras se prepararon en *Sample Buffer* (2X: bromophenol blue 0,2 %, glicerol 20 %, SDS 4 %, DTT 200 mM, Tris 100 mM pH 6,8). Las electroforesis se resolvieron aplicando 20 mA durante 30 minutos y luego 40 mA durante 1,5 horas por gel. La visualización del resultado se realizó mediante tinción con *Coomasie Brilliant Blue R250* (Sigma). Se utilizó el marcador de peso molecular *Page Ruler* (Fermentas).

Purificación de DNA

A continuación se detallan las estrategias utilizadas para aislar DNA a partir de distintas fuentes. Una vez finalizado el protocolo, la cuantificación de ácidos nucleicos se realizó por medio de un espectrofotómetro (Nanodrop-1000; ThermoScientific).

PURIFICACIÓN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Las purificaciones de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa resueltos mediante electroforesis se realizaron utilizando el sistema *Concert Nucleic Acid Purification system* (Thermo Fisher Scientific) según especificaciones del fabricante.

PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO VIRAL A PARTIR DE VIRUS BROTANTES

Los BVs recuperados de ultracentrifugaciones en colchones de sacarosa 30% v/v, se resuspendieron en *buffer* de lisis [Tris 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,25%, Proteinasa K (Fermentas) 500 µg/mL] y se incubaron a 37°C durante toda una noche. Posteriormente, se realizaron extracciones con fenol, cloroformo y una precipitación alcohólica estándar (*Green y Sambrook, 2012*). Los precipitados de DNA genómico se disolvieron en *Buffer TE* (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) o agua bidestilada estéril y se conservaron a 4°C. La integridad se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,6% p/v y tinción con Bromuro de Etidio (Sigma).

PURIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO VIRAL A PARTIR DE LOS CUERPOS DE OCLUSIÓN (OBS)

Se realizaron extracciones de DNA presente en suspensiones de cuerpos de oclusión, ya sea de los derivados de los NPVs (poliedros), o de los GVs (gránulos). Para ello se mezclaron 100 µL de la suspensión purificada con 100 µL de Na₂CO₃ 0,5M, 50 µL de SDS 10% y 250 µL de agua bidestilada. Se incubó en un baño térmico a 60°C por 10 minutos, o

hasta observar pérdida de turbidez en el tubo. Luego se adicionaron 50 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) e incubaron 15 minutos más. A partir de allí se prosiguió con extracciones de fenol, cloroformo y una precipitación alcohólica estándar (*Green y Sambrook, 2012*). Los precipitados de DNA genómico se disolvieron en *Buffer* TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) o agua bidestilada estéril y se conservaron a 4°C. La integridad se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,6% y tinción con Bromuro de Etidio.

PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES Y SOBRENADANTE DE CULTIVO

Para la purificación del DNA genómico a partir de líneas celulares se cosecharon mecánicamente células confluentes cultivadas en condiciones estándar (Frascos de 75 cm²) utilizando un rastrillo plástico (*Cell Scraper Orange Scientific*), las cuales después fueron concentradas en una centrifuga clínica (Universal 3C, Hettich Zentrifugen) a 1100 xg durante 1 minuto. Los precipitados celulares obtenidos se lavaron luego con PBS 1X y, en forma posterior a repetir la centrifugación, se resuspendieron en 300 µL de *Buffer* de Lisis L (Tris-HCl pH 7,5 0,4 M; EDTA 0,1 M; SDS 0,1 %; Proteinasa K 200µg/mL). Luego de incubar toda una noche a 37°C, se realizaron extracciones con fenol y cloroformo, y una precipitación alcohólica estándar (*Green y Sambrook, 2012*).

PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Todas las minipreparaciones se realizaron utilizando la técnica estándar de lisis alcalina (*Green y Sambrook, 2012*). Este procedimiento se empleó para aislar plásmidos a partir de células bacterianas.

Cuando fue necesario preparar grandes cantidades de plásmidos, se incubaron 50 mL de medio LB en *erlenmeyers* de 100 mL con el antibiótico adecuado, inoculados con un

cultivo en fase exponencial conservado en 20 % v/v de glicerol a -80 °C, a 200 rpm y a 37°C durante toda la noche. Luego se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se agregaron 10 mL de solución isotónica de lavado (solución I de *miniprep*, [Green y Sambrook, 2012](#)). Se resuspendió por agitación suave, y se agregaron 10 mL de solución de ruptura celular (solución II de *miniprep*), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 10 mL de Solución III de *miniprep* y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 0,5 volúmenes de cloroformo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa, se agregó 1 volumen de isopropanol y se incubó 5 minutos a -80 °C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos en el rotor JA-14 (Beckman J2-MCCentrifuge) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 16000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado. El mismo se disolvió en 200 µL de agua desionizada estéril (incubando 5 minutos a 50 °C), se agregaron 10 µL de RNAsa A (50 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Purificación de RNA total a partir de cultivos celulares infectados

Monocapas de células UFL-Ag-286 creciendo en frascos de 75 cm² (Sarstedt) e infectadas con AgMNPV (MOI correspondiente al ensayo), fueron cosechadas al tiempo de incubación requerido por el objetivo planteado mediante rastrillaje mecánico (Cell Scraper Orange Scientific). Las células así obtenidas se concentraron luego mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en 100 µL de Bio-Zol (PB-L) y se continuó con la extracción según consideraciones del prestador. Se resuspendió el RNA purificado en *buffer* TE y se verificó la calidad por electroforesis en geles de agarosa 1% v/v y cuantificación por espectrofotometría (Nanodrop-1000; Thermo Scientific).

Purificación de proteínas a partir de monocapa celular

Se realizaron 2 lavados con PBS 1X, 2 con PBS 0,5X y 2 con PBS 0,1X a la monocapa celular a partir de la cual se realizó la purificación de proteínas. Se agregaron 2 mL de un *buffer* de lisis (Urea 9M, tritón X-100 1% v/v), agitando suavemente hasta resuspensión de toda la monocapa. Se realizó una centrifugación a 10000 xg por 20 minutos con el fin de precipitar DNA y lípidos. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bradford (Ernst y Zor, 2010). En el caso que fue necesario, las muestras proteicas fueron precipitadas con acetona fría a razón de 1:5 (muestra:acetona), incubadas *onvernight* a -20°C y centrifugadas a 10000 xg en frío.

Southern Blots

Los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos (*Southern blot*), se realizaron utilizando membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) mientras que las sondas se obtuvieron mediante marcación enzimática con la enzima fosfatasa alcalina. Tanto el marcado de la misma, como los procesos de pre-hibridación, hibridación, lavado y revelado, se realizaron utilizando el sistema AlkPhosdirect, Genes Images (Amersham Pharmacia) y placas de radiografía (Kodak Medical X-ray Film, Green-MXG plus). Las transferencias del material desde los geles resueltos por electroforesis a las membranas se realizaron por el método de capilaridad (Green y Sambrook, 2012) o la aplicación de presión positiva (Posiblot Pressure Blotter & Pressure Control Station, Stratagene), con tratamiento previo del gel empleando soluciones estándar (Green y Sambrook, 2012). En todos los casos, las hibridaciones se realizaron a 55°C mediante calefacción seca y agitación constante (Autoblot minihybridization oven, BELLCO Glass INC) durante 16 horas.

Reacciones de secuenciación

Todas las reacciones de secuencia se realizaron mediante el procedimiento automático de Sanger en la empresa MacroGen Company (MacroGen). En cada caso particular se utilizaron los *primers* adecuados, pero en general se emplearon los oligonucleótidos universales correspondientes a Sp6, T7 y T3.

Observaciones microscópicas

Las observaciones por microscopía óptica se realizaron en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100), y en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000 equipado con una cámara CCD). En todos los casos donde fue requerido, se utilizó aceite de inmersión (Sigma).

Ensayos de transfección

Los ensayos de transfección se realizaron siempre sobre monocapas de células al 60-80% de confluencia, utilizando el reactivo basado en lípidos Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific), según las recomendaciones del fabricante. Para las transfecciones de DNA plasmídico, el mismo se purificó previamente mediante protocolos estándar más un paso final de precipitación con PEG₈₀₀₀ (Green y Sambrook, 2012).

Western blots

Los perfiles proteicos resueltos mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida (SDS-PAGE), en general con una trama de 12% para la región separadora, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech)

mediante transferencia semi-seca a partir de la aplicación de 50 mA durante 1 hora (Biorad). Luego, las membranas se lavaron con PBST (*Buffer* salino de fosfato con Tween 20 0,1% v/v) para posteriormente ser bloqueadas con PBST 5% p/v de *Blocking* (Amersham Pharmacia), en agitación constante a 4°C durante toda una noche. Finalmente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente y luego el anticuerpo secundario adecuado, realizando lavados intermedios con solución PBST. El revelado se realizó mediante la utilización de Bio-Lumina, según consideraciones del fabricante (PB-L).

Programas bioinformáticos utilizados

La búsqueda y adquisición de secuencias similares se realizó mediante la utilización de los programas BlastN, BlastP y tBlastN, a través del servidor gratuito del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los alineamientos múltiples se realizaron, en forma local, con el programa Clustal X, utilizando los parámetros Gap opening 10 y Gap extension 0,1, para el alineamiento de a pares, y Gap opening 10 y Gap extension 0,05, para el alineamiento múltiple (*Thompson et al, 1994; 1997*) o con el servidor T-Coffee y parámetros estándar (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:psicoffee>). Las similitudes relativas fueron calculadas usando los símbolos del Clustal X (*, : y .) como la secuencia de ingreso, en una estrategia basada en ventanas solapadas. La suma de los valores para cada residuo en cada ventana (11 aminoácidos) fue dividida por la longitud de la misma y el valor resultante se asignó a la posición central para generar los plots (*Ghiringhelli, no publicado*). Se establecieron arbitrariamente valores de +1 para la identidad (*), +0,5 y +0,25 para diferentes grados de conservación de residuos (: y ., basado en PAM 350) y -1 para residuos no idénticos (*Eldridge et al, 1992*). Los estudios filogenéticos se realizaron utilizando el programa MEGA 6 (*Tamura et al, 2013*) con los siguientes parámetros: *UPGMA; bootstrap con 500 réplicas; gap/missing data=pairwise deletion; model=aminoácidos -matriz dayhoff-; patterns among sites=same -homogeneous-; rates among sites=different -gamma distributed-; gamma parameter= calculado en casa caso.*

Para el estudio de distancias filogenéticas, se calcularon matrices a partir de los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas, determinándose en cada caso el parámetro Gamma (*Neighbor-joining tree; Substitution model: Tamura-Nei model; complete deletion*). La distancia entre pares de secuencias finalmente se estimó utilizando el MEGA6 y Kimura 2P como modelo de sustitución (*Substitution model:Kimura 2-parameter; substitution to include: d: transitions + tranversions; gamma distributed: valor calculado; complete deletion*).

Para realizar la búsqueda de patrones y motivos en secuencias aminoacídicas se utilizó el servidor InterProScan de la suite <http://www.expasy.org>. Los análisis de estructura secundaria fueron realizados utilizando el servidor JPred2 (<http://www.ebi.barton.ac.uk/JPred2>). En tanto, los perfiles de homología relativa fueron calculados utilizando un conjunto de programas diseñados y escritos por P. D. Ghiringhelli (no publicados) y graficados utilizando el programa Sigmaplot 4.0 (JandelScientific).

El cálculo de la estabilidad de la doble hélice de DNA se realizó a través del cálculo de ΔG (kcal/mol) según cálculos descriptos (*Santa Lucia, 1998*) y con ventanas de 5 nucleótidos.

ESPECÍFICOS

En este apartado se detallan las metodologías específicas utilizadas para el cumplimiento de los objetivos de este plan de tesis de doctorado.

Estudios bioinformáticos de pifs

| FILOGENIA DE GENES PIFS

Para realizar los análisis bioinformáticos, se utilizó la información de secuencia completa de los genomas de los baculovirus presentes en la base de datos *GenBank*(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y citados en la **tabla VII.4**. La misma contiene las abreviaciones empleadas de las especies virales, tanto en su forma extendida, como el código de 3 letras.

Para la generación de los dendogramas basados en secuencias codificantes, se realizaron alineamientos tal y como se detalla en la metodología general para luego generar archivos conteniendo las secuencias antes alineadas en forma de concatémoros (*Jehle et al, 2006 [A]*). Esta metodología se aplicó para los casos en los que se realizaron inferencias filogenéticas basadas en dos o más secuencias codificantes. Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA 6 (*Tamura et el, 2013*), con los parámetros detallados previamente. En tanto, el parámetro *gamma* fue calculado para cada conjunto de datos y es mencionado en cada árbol filogenético mostrado en esta tesis.

Nº	Nombre	Sigla	GenBank	Siglas
<i>AlphabaculovirusGrupo I</i>				
1	<i>Antheraea-pernyi_MNPV_IsolateL2</i>	AnpeMNPV	EF207986	AP2
2	<i>Antheraea-pernyi_NPV_IsolateZ</i>	AnpeNPV	NC_008035	APN
3	<i>Anticarsia-gemmatalis_MNPV</i>	AgMNPV	NC_008520	AGN
4	<i>Autographa-californica_MNPV_CloneC6</i>	AcMNPV	NC_001623	ACN
5	<i>Bombyx-mandarina_NPV-S1</i>	BomaNPV-S1	NC_012672	BO1
6	<i>Bombyx-mandarina_NPV-S2</i>	BomaNPV-S2	JQ071499	BO2
7	<i>Bombyx-mori_NPV_IsolateT3</i>	BmNPV	NC_001962	BMN
8	<i>Choristoneura-fumiferana_MNPV</i>	CfMNPV	NC_004778	CFN
9	<i>Choristoneura-fumiferana-Def_MNPV</i>	CfDEFMNPV	NC_005137	CDN
10	<i>Choristoneura-occidentalis_NPV_IsolateBC1</i>	ChocNPV	KC961303	COR
11	<i>Choristoneura-rosaceana_NPV_IsolateNB1</i>	ChroNPV	KC961304	CRN
12	<i>Epiphyas-postvittana_NPV</i>	EppoNPV	NC_003083	EPN
13	<i>Hyphantria-cunea_NPV</i>	HycuNPV	NC_007767	HCN
14	<i>Maruca-vitrata_NPV</i>	MaviNPV	NC_008725	MVN
15	<i>Orgyia-pseudotsugata_MNPV</i>	OpMNPV	NC_001875	OPN
16	<i>Philosamia-cynthia-riciniNPV</i>	PhcyNPV	JX404026	PCN
17	<i>Plutella-xylostella_MNPV_IsolateCL3</i>	PixyMNPV	NC_008349	PXN
18	<i>Rachiplusia-ou_MNPV</i>	RoMNPV	NC_004323	RON
19	<i>Thysanoplusia-orichalceaNPV_P2</i>	ThorNPV-P2	NC_019945	TON
<i>AlphabaculovirusGrupo II</i>				
1	<i>Adoxophyes-honmai_NPV</i>	AdhoNPV	NC_004690	AHN
2	<i>Adoxophyes-orana_NPV</i>	AdorNPV	NC_011423	AON
3	<i>Agrotis-ipsilon_MNPV</i>	AgipMNPV	NC_011345	AIN
4	<i>Agrotis-segetum_NPV</i>	AgseNPV	NC_007921	ASN
5	<i>Apocheima-cinerarium_NPV</i>	ApciNPV	FJ914221	APO

6	Chrysodeixis-chalcites_NPV	ChchNPV	NC_007151	CCN
7	Clanis-bilineata_NPV_IsolateDZ1	ClbiNPV	NC_008293	CBN
8	Ectropis-obliqua_NPV_StrainA1	EcobNPV	NC_008586	EON
9	Euproctis-pseudoconspersa_NPV_Strain Hangzhou	EupsNPV	NC_012639	EUN
10	Helicoverpa-armigera_MNPV	HaMNPV	NC_011615	HAN
11	Helicoverpa-armigera_NPV_StrainC1	HaNPV-C1	NC_003094	HA1
12	Helicoverpa-armigera_NPV_StrainG4	HaNPV-G4	NC_002654	HA4
13	Helicoverpa-armigera_SNPV_StrainNNg1	HaSNPV	NC_011354	HAS
14	Helicoverpa-zea_NPV	HezeNPV	NC_003349	HZN
15	Leucania-separata_NPV_StrainAH1	LeseNPV	NC_008348	LSN
16	Lymantria-dispar_MNPV	LdMNPV	NC_001973	LDN
17	Lymantria-xylina_MNPV	LyxyMNPV	NC_013953	LXN
18	Mamestra-configurata_NPV_Strain90-2	MacocNPV-90-2	NC_003529	MCN
19	Mamestra-configurata_NPV_StrainA90-4	McNPV-90-4	AF539999	MC4
20	Mamestra-configurata_NPV_StrainB	McNPV-B	NC_004117	MCB
21	Orgyia-leucostigma_NPV_IsolateCFS77	OrleNPV	NC_010276	OLN
22	Spodoptera-exigua_MNPV	SeMNPV	NC_002169	SEN
23	Spodoptera-frugiperda_MNPV_Isolate3AP2	SfMNPV-3AP2	NC_009011	SF2
24	Spodoptera-frugiperda_MNPV_Strain19	SfMNPV-19	EU258200	SF9
25	Spodoptera-litura_II_MNPV	SpliMNPV-II	NC_011616	SLN
26	Spodoptera-litura_MNPV_StrainG2	SpliMNPV-G2	NC_003102	SL2
27	Trichoplusia-ni_SNPV	TrnSNPV	NC_007383	TNN
Betabaculovirus				
1	Adoxophyes-orana_GV	AdorGV	NC_005038	AOG
2	Agrotis-segetum_GV	AgseGV	NC_005839	ASG
3	Choristoneura-occidentalis_GV	ChocGV	NC_008168	COG
4	Clostera-anachoreta_GV	ClanGV	NC_015398	CAG
5	Cryptophlebia-leucotreta_GV	CrleGV	NC_005068	CLG
6	Cydia-pomonella_GV	CpGV	NC_002816	CPG
7	Epinotia-aporema_GV	EpapGV	NC_018875	EAG
8	Helicoverpa-armigera_GV	HearGV	NC_010240	HAG
9	Phthorimaea-operculella_GV	PhopGV	NC_004062	POG
10	Pieris-rapae_GV	PiraGV	GQ884143	PRG
11	Plutella-xylostella_GV	PxGV	NC_002593	PXG
12	Pseudaletia-unipuncta_GV_StrainHawaii	PsunGV	EU678671	PUG
13	Spodoptera-litura_GV_StrainK1	SpliGV	NC_009503	SLG
14	Xestia-c-nigrum_GV	XecnGV	NC_002331	XCG
Gammabaculovirus				
1	Neodiprionabietis NPV	NeabNPV	NC_008252	NAN
2	Neodiprionlecontei NPV	NeleNPV	NC_005906	NLN
3	Neodiprionsertifer NPV	NeseNPV	NC_005905	NSN
Deltabaculovirus				
1	Culex nigripalpus NPV	CuniNPV	NC_003084	CNN

Tabla VII.4. Genomas baculovirus de secuencia completa. En la tabla se indican el nombre, abreviatura y el número de acceso en *GenBank* de los baculovirus utilizados para los ensayos bioinformáticos

Con el fin de establecer un sistema de detección y caracterización basado en los genes *pifs*, se diseñaron *primers* generalistas para cada uno de los 7 *pifs*, definiendo tres conjuntos de oligonucleótidos: uno para la detección de especies pertenecientes al Grupo I de los *Alphabaculovirus*; otro para las especies del Grupo II del mismo género; y el tercero para la detección de *Betabaculovirus*. Para ello, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias codificantes de cada gen empleando *ClustalX* con los parámetros estándar (en el caso de *pif-4* se incluyó una región adyacente no codificante y el gen contiguo *DNA helicasa*), separados en los 3 grupos mencionados y utilizando la información reportada en cada genoma (tabla VII.4). Posteriormente se construyeron perfiles de similitud relativa empleando una estrategia basada en ventanas de longitud 17 desplazadas de a un residuo por vez. Se asignaron valores arbitrarios de +1 para la identidad, y -0,5 para la ausencia de identidad. La sumatoria se normalizó por la longitud de la ventana y el valor resultante se asignó a la posición central. Las regiones elegidas para el diseño de los oligonucleótidos fueron aquellas con valores de similitud mayores a la media global, y fueron analizadas con el software *Sequence logos* (Crooks et al, 2004). Para un mejor comportamiento de los *primers* (tabla III.1, de la sección de resultados página xx) se introdujeron ambigüedades, las cuales incluyeron variantes de oligonucleótidos con diferentes residuos (según variabilidad) en iguales proporciones relativas, más la introducción de inosinas en las posiciones de mayor variabilidad.

La puesta a punto de los ensayos de PCR se llevó a cabo utilizando como moldes de reacción los genomas extraídos de viriones de AgMNPV (preparado en nuestro laboratorio) y AcMNPV (provisto por el Dr. Herrero-Sendra, Laboratorio Genética Bioquímica y Biotecnología, Universitat de Valencia, España), ambos del Grupo I de *Alphabaculovirus*; de SeMNPV, provisto por el Dr. Herrero-Sendra y SfMNPV, provisto por la Dra. Gloria Barrera, Laboratorio de Control Biológico, CORPOICA, Colombia (Grupo II de *Alphabaculovirus*); y de CpGV y EpapGV, provistos por la Dra. Sciocco-Cap, IMyZA-CCVyA, INTA, Argentina (*Betabaculovirus*). Como enzima de síntesis, se utilizó *Taq* DNA polimerasa más los reactivos

estándar (PB-L). Los perfiles de amplificación térmica para cada par de *primers* son indicados utilizando un código de colores (respetado en la [figura III.2](#)). El estudio de PCR para los genes *pifs* baculovirales también se realizó para los genomas de RanuMNPV y AgvaMNPV, provistos por la Dra. Sciocco-Cap (*Rodriguez et al, 2011; 2012*), y para TesoGV, TuabGV y PhopGV, provistos por la Dra. Gloria Barrera. En estos casos y dado que no se contaba con información de secuencia previa, los productos de PCR se clonaron en el vector comercial *p-GemT-easy* (Promega) y luego se secuenciaron utilizando los *primers* T7 y Sp6 (Macrogen).

ciclado naranja			x 35 ciclos
94°C	min	2	
92°C	0 seg	1	
55°C	0 seg	2	
72°C	min	2	
72°C	min	5	
72°C	min	5	

ciclado celeste			x 35 ciclos
94°C	min	2	
92°C	0 seg	1	
52°C	0 seg	2	
72°C	min	2	
72°C	min	5	
72°C	min	5	

ciclado violeta			x 35 ciclos
94°C	min	2	
92°C	0 seg	1	
50°C	0 seg	2	
72°C	min	2	
72°C	min	5	
72°C	min	5	

ciclado amarillo			x 35 ciclos
94°C	min	2	
92°C	0 seg	1	
45°C	0 seg	2	
72°C	min	1	
72°C	min	5	
72°C	min	5	

Tabla VII.5 Perfiles de ciclado para los ensayos de PCR con los *primers* generalistas. Se indican las temperaturas y tiempos de cada reacción. Se respetó el código de colores empleado en la [figura III.2](#).

FILOGENIA A PARTIR DE LA SECUENCIA PARCIAL DE GENES PIF Y LEF-8/LEF-9/ POLIEDRINA-GRANULINA

Los cladogramas basados en las secuencias aminoacídicas correspondientes a los fragmentos amplificables por PCR utilizando *primers* generalistas para los *pif* (*esta tesis*) o

para *lef-8/lef-9/poliedrina-granulina* (Jehle, et al, 2006[B]), se realizaron de manera equivalente a lo previamente descrito para los genes enteros, empleando el programa MEGA 6 (Tamura et el, 2013). Cabe señalarse que como los amplímeros de los diferentes grupos experimentales establecidos (*Alphabaculovirus* Grupo I, *Alphabaculovirus* Grupo II y *Betabaculovirus*) para el estudio de los genes *pif* mediante PCR no son equivalentes en posición génica y longitud, cada análisis filogenético se realizó por separado. La distancia entre pares de secuencias se estimó utilizando Kimura 2P como modelo de sustitución y criterios definidos en Jehle, et al, 2006[B].

Caracterización molecular de aislamientos de granulovirus colombianos

DISEÑO DE REAL TIME PCR CON SONDAS

En base a la coexistencia de dos amplímeros con secuencia diferente para el gen *pif-1* de TesoGV, TuabGV y PhopGV (resultado revelado por los ensayos de PCR utilizando los *primers* generalistas antes descritos, y la posterior secuenciación de los productos), se diseñó una *Real Time* PCR con 2 sondas *Taqman* (Roche) específicas y un mismo par de *primers* (tabla III.6 de la sección resultados, en página xx). Los ensayos se llevaron a cabo en el termociclador “*Multicolor Real Time PCR*” (BIORAD IQ5), en un volumen final de 25 μ L conteniendo los *primers* pqP-L y pqP-R (0,5 μ M), 1,5mM de MgCl₂, *GoTaq polimerasa* 1 U (Promega), 200 μ M dNTP's y molde. El perfil de ciclado fue: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 52°C por 45 segundos y finalmente 72°C por 30 segundos. Los parámetros de calidad del ensayo se establecieron utilizando plásmidos con los amplímeros insertados (en pGemT-Easy). La concentración de sonda FAM y HEX fue de 0,1 μ M.

GELES POLIACRILAMIDA DE DNA

Para resolver los dos amplímeros derivados del uso de los *primers* generalistas para *pif-1* cuando se usaron como moldes de reacción los genomas de TesoGV, TuabGV y PhopGV, se utilizaron geles de poliacrilamida 7% p/v. Para ello, se realizaron PCRs *end point* utilizando los *primers* pqp-L y pqp-R y DNA de cada aislado viral en un termociclador Biorad. En este caso al perfil de ciclado citado previamente se le adicionó una extensión final de 2 minutos a 72°C. La electroforesis se realizó en una cuba Sequi-Gen GT (BioRad) por 60 minutos a 45 W. La tinción se realizó con *kit* comercial de nitrato de plata (Promega).

RFLPS FRAGMENTOS PLEF1C/PP48C

Para evaluar el contexto del gen *pif-1* en TesoGV, TuabGV y PhopGV, se realizó una PCR con los *primers* pLef1c/pP48c, que amplifican la región conteniendo el gen *pif-1* (graficado en la [figura III.12.A](#), sección resultados, página [xx](#)). Al ser un fragmento de 8 kpb, se utilizó la polimerasa *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen) y las condiciones de reacción indicadas por el proveedor. El perfil de ciclado térmico utilizado fue: 1 ciclo a 94°C por 4 minutos; 3 ciclos a 92°C por 10 segundos, a 54°C por 15 minutos, a 68°C por 13 minutos; y 1 ciclo a 68°C por 10 minutos.

Una vez comprobada la presencia de un único producto mediante electroforesis analítica en gel de agarosa 0,7% p/v, se precipitó la muestra por metodología estándar y se realizaron las digestiones con las enzimas de restricción *HinfI* y *HaeIII* (Invitrogen). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ L y según las consideraciones del proveedor. Los tubos se incubaron *overnight* a 37°C. Luego se sembraron las muestras en un gel de agarosa 1,5% p/v y se realizó una electroforesis a 23V por 15 horas. El revelado se realizó con *Sybr Gold* (Life Technologies).

Promotores de los genes *PIFS*

ESTABILIDAD DE LA DOBLE HÉLICE DEL DNA

Para el análisis de la estabilidad de la doble hélice del dsDNA, se tomaron 250 nucleótidos *upstream* y 50 *downstream* del ATG inicial correspondiente a cada gen *pif* de AgMNPV. Con estas secuencias, se realizó el cálculo del ΔG por ventanas de 5 nucleótidos, desplazados de a uno, calculado a 298K y 50 mM Na⁺ (Santa Lucia, 1998).

REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE PCR PARA GENES PIF DE AGMNPV

Con el fin de evaluar la temporalidad de la expresión de los genes *pif* en el ciclo infectivo, se diseñó un sistema basado en transcripción reversa y *Real Time* PCR cuantitativa (*qRT-PCR*).

PLÁSMIDOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

En primera instancia se diseñaron los *primers* para detectar 6 de los genes *pif* (*pif-0* a *pif-5*), que fueron los reportados en el momento de realizar el ensayo, y los *primers* para la detección del gen *actina* propio de las células UFL-Ag-286 (Tabla IV.1). Se realizó una PCR convencional en un ciclador térmico (Eppendorf) en concentraciones estándar de reactivos (citadas previamente) y con el siguiente perfil de ciclado: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos a 92°C por 10 segundos, 57°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos; 1 ciclo a 72°C por 3 minutos. Los productos fueron visualizados y purificados a partir de una electroforesis preparativa de agarosa 1% p/v, se recuperaron los tacos de agarosa y se aisló el DNA mediante sistemas basados en cromatografías (BioAmerica). Posteriormente, los productos de amplificación se clonaron en el vector comercial *pGemT-easy* (Promega) y la cepa de *E. coli* TOP10, confirmándose su identidad mediante reacciones de secuenciación con los *primers* Sp6 y T7 (Macrogen).

CURVA DE CALIBRACIÓN REAL TIME PCR

Los plásmidos calibradores fueron aislados de las bacterias mediante *miniprep* por lisis alcalina (Green y Sambrook, 2012). Luego, fueron linealizados con la enzima de restricción PstI, mezcla que fue después sometida a una extracción con cloroformo y a una precipitación alcohólica, para disolverse en agua estéril. La cuantificación fue realizada con Nano-Drop 1000 y Qubit (Thermo Fisher Scientific). Se estimaron el número de moléculas en cada caso, y posteriormente se realizaron diluciones seriadas entre 0,001 pg/ μ L y 10 pg/ μ L (300-3000000 moléculas; por triplicado) para estudiar el rango dinámico, la eficiencia y la sensibilidad de la qPCR. Las reacciones se realizaron en un *Smart Cycler* (Cepheid), utilizando *Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)* (Fermentas) en un volumen final de 25 μ L, conteniendo *primer forward* y *reverse* 0,3 μ M y el siguiente perfil de ciclado: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 92°C por 10 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos.

TEMPORALIDAD EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PIF DE AGMNPV

Se utilizaron 13 frascos de 175 cm² con una monocapa de células UFL-Ag-286 al 80% de confluencia, crecidas en las condiciones antes descritas. Se expusieron con un *stock* viral de AgMNPV-2D a una multiplicidad de infección (MOI) de 10, con el fin de sincronizar la infección, luego se comenzó con la colecta de las células cada 3 horas y durante 36 horas. Esta toma de muestra consistió en seleccionar al azar uno de los frascos infectados, descartar el medio de cultivo, lavar la monocapa con PBS 1X, y resuspender las células en 3 mL de Bio-zol (PB-L). Luego, se incubó la suspensión por un minuto a temperatura ambiente para agregarse después 200 μ L de cloroformo. Se mezcló vigorosamente (sin vórtex) por 15 segundos y se incubó otros 2 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12000 xg por 15 minutos y a 4°C, para repetir el procedimiento de extracción sobre la fase acuosa una vez más. Finalmente, se agregaron 500 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, y luego se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. El precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 75 % v/v para después disolver el *pellet* en 25 μ L de agua estéril *RNAse free*. Las muestras fueron conservadas a -20°C. Se

cuantificaron mediante espectrofotometría (Nano-Drop-1000) y se controló su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v. Las contaminaciones con DNA se verificaron mediante ensayos de PCR con el par de *primers pif-1_fw* y *pif-1_rev* (tabla IV.1, sección resultados, página xx) y utilizando como molde 1 μ L de muestra, mientras que su reducción se logró mediante tratamiento con DNasa I-RNasa *free-* (Fermentas), según consideraciones del proveedor.

La reacción de síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando la Transcriptasa reversa *SuperScript III* (Invitrogen) y un oligonucleótidos poliT (tabla VII.3). Se mezclaron 1 μ g de RNA con 1 μ g de poliT en un volumen de 10 μ L. Se calentó a 65°C por 5 minutos, y rápidamente en hielo por 2 minutos. Se realizó una segunda mezcla de 10 μ L con *Buffer 1X*, DTT 10 μ M, *SuperScript III* 1 U, dNTP's 1 mM. Se agregó esta nueva mezcla a la que se dejó en hielo y se incubó por 1 hora a 50°C en un termociclador (Eppendorf), dejando la temperatura de la tapa a 60°C. Como control de síntesis, se realizaron ensayos de PCR con el par de *primers pif-4_fw* y *pif-4_rev*(tabla IV.1, sección resultados, página xx).

Además de recuperar el RNA total de cada frasco de la cinética, se recuperó también el DNA total. Luego de la extracción con cloroformo, se procedió trabajando con la fase acuosa para la obtención del RNA como antes se mencionó. La fase orgánica y la interfase, se utilizaron para recuperar las muestras de DNA. Para esto, se adicionaron 300 μ L de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 2000 xg por 5 minutos a 4°C. Al *pellet* recuperado se le realizó un lavado con citrato de sodio 0,1M en etanol 10% v/v. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, mezclando periódicamente. Luego, se centrifugó a 2000 xg por 5 minutos a 4°C, se resuspendió el *pellet* en 1,5 ml de etanol 75% v/v y se incubó nuevamente 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una centrifugación a 2000 xg por 5 minutos a 4°C, se secó el *pellet* para disolver el DNA con 400 μ L de NaOH 8mM. Estas muestras fueron utilizadas para normalizar el número de células utilizando el gen *actina* de UFL-Ag-286.

Así, con las muestras de cDNA y las de gDNA celular se realizaron las reacciones de *Real Time PCR*, con los *primers pifs* y *actina*, respectivamente. Se realizaron triplicados en las mismas condiciones de reacción citadas para la curva de calibración.

Localización PIFS en viriones ODVS

Para la localización de las proteínas PIF en los cuerpos de oclusión se realizó el fraccionamiento de los viriones ODV de AgMNPV para luego realizar un ensayo de *Western blot*. Para ello, se partió de una monocapa de células UFL-Ag-286 infectada con AgMNPV (MOI:10) en un frasco de 25 cm². Transcurridos 7 días, se descartó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X, para luego resuspender y levantar la monocapa celular con 1 mL de PBS 1X. Se realizó una centrifugación a 3000 xg por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de células fue resuspendido en 500 µL de Tritón X-100 0,2% v/v, con ayuda de vórtex. Luego, se centrifugó a 2500 xg por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 250 µL de SDS 0,5% y 200 µL de agua estéril. Se sometió la muestra a vórtex por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 300 µL de agua estéril. Los OBs obtenidos se resuspendieron en 100 µL de CO₃Na₂ 0,1M/NaCl 0,5M (pH 11). Se realizó una incubación a 37°C por 2 horas, para luego centrifugar la muestra a 16000 xg por 30 minutos. Los ODVs recuperados se resuspendieron en 250 µL de NP-40 1% / Tris 10 mM (pH 8,5) y se incubó a temperatura ambiente y en agitación suave por 30 minutos. Las nucleocápsides fueron sedimentadas por centrifugación a 150000 xg por una hora mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa y resuspendidas en 50 µL de *buffer* TE 0,1X. El sobrenadante de la centrifugación, que contenía la fracción de envoltura, fue precipitada con acetona fría (1 volumen de muestra y 4 volúmenes de acetona), incubación a -20°C y posterior centrifugación a 10000 xg por 20 minutos. El *pellet* se resuspendió en 50 µL TE 0,1X (Adaptado de *Yin et al, 2003*).

Las muestras fueron utilizadas para el *western blot* con los anticuerpos primarios anti-ODV (Dilución 1/7500) y secundario anti-conejo (Dilución 1/10000), tal y como fue detallado previamente en metodologías generales.

Construcciones plasmídicas para las quimeras PIF-0

Se detallan los pasos para la construcción de los plásmidos para evaluar la funcionalidad de los dominios amino y carboxilo terminal de PIF-0, que dieron lugar a las construcciones indicadas en la **figura V.5**.

| PQ-30 CON REGIONES NT Y CT DE PIF-0

Se partió de las construcciones pQ-30_ORF PIF-0 de cada virus (*Belaich, 2008*). En resumen, se diseñaron *primers* para la amplificación de los ORFs correspondientes, que fueron clonados en el vector pQ-30 (Quiagen) por digestión de los productos amplificados y del vector con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. Para el caso de AcMNPV, que no contenía un sitio BamHI en la posición 119699 para la separación de las regiones Nt y Ct, el mismo fue incorporado mediante PCR. Para ello, el dominio Nt fue amplificado utilizando los *primers* *pFwp74Ac* y *pRevBamAc* y el dominio Ct fue amplificado con los *primers* *pFwBamAc* y *pRev74Ac* (**Tabla VII.3**). En ambos casos, las condiciones de reacción fueron las estándar y el perfil de ciclado fue: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos a 92°C por 10 segundos, a 55°C por 15 segundos, a 72°C por 2 minutos; 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. El producto amplificado Nt fue clonado en el vector pGemT-easy (Promega), mientras que el producto Ct fue clonado en el vector p-ZErO-2 (Invitrogen), mediante digestión del inserto y vector con las enzimas BamHI y HindIII. Luego, la región Nt fue liberada del vector pGemT-Easy por digestión enzimática con PstI y BamHI, y clonada en el vector pZ_p74Ct, abierto con las mismas enzimas. De esta forma se obtuvo el plásmido *pZ-p74Acmut*. El ORF completo fue clonado en el vector pQ-30 por digestión con BglII, dando el plásmido pQ-30_AcAc. Para el caso de AgMNPV, se realizó el clonado directamente al vector pFastBacHTB (Invitrogen).

Para las versiones pQ-30_Ntp74, se partió de los plásmidos pQ-30_SeSe, pQ-30_HaHa y pQ-30_AcAc (aquellos que contenían el ORF P74 completo) y se realizó una digestión con las enzimas EcoRI y BamHI, cuyo producto fue ligado al vector pQ-30, previamente digerido del mismo modo, para así generar las construcciones pQ-30_SeNt, pQ-30_HaNt y pQ-30_AcNt, respectivamente.

| PFB-GFP_ÍNTEGRAS, AMINO TERMINAL P74 Y QUIMERAS P74

Para la generación de las construcciones en el vector pFastBac Dual, conteniendo el gen indicador eGFP, previamente clonado bajo el promotor p10 (*Belaich, 2008*), se siguieron los siguientes pasos:

pFB-PIF0_íntegra: para SeMNPV, HaMNPV y AcMNPV, se partió de las construcciones pQ-30-PIF0 correspondientes, las que fueron digeridas con las enzimas EcoRI y HindIII y clonadas en el vector *pFastBac dual* (Invitrogen) - eGFP(pFB-GFP), digerido del mismo modo, para dar las construcciones pFB-SeSe, pFB-HaHa y pFB-AcAc, respectivamente.

Para el caso de AgMNPV, primero se generó la versión pFB-AgNt. Se partió de un vector pCDNA3, el cual no contenía el promotor CMV y que se le había incorporado un promotor *hsp70* (pCDNA3*), que tenía clonado el ORF de P74 de AgMNPV, previamente amplificado con los *primers* P74-ATG y P74-STOPc (Tabla VII.3), dando el plásmido pCDNA*p74Ag (*Belaich, 2008*). El plásmido pCDNA*p74Ag fue sometido a digestión con BamHI y EcoRV y el fragmento conteniendo el extremo 5' del marco de lectura p74 fue ligado al vector pZErO-2, previamente tratado del mismo modo, generándose así la construcción pZ-p74Nt. Posteriormente, se trató al plásmido anterior con EcoRV y KpnI, de modo tal de recuperar el inserto y ligarlo al vector pFastBACHTb (Invitrogen), previamente digerido con StuI y KpnI para así generar la construcción pFB-Ag. Luego, tomando nuevamente el plásmido pCDNA*p74Ag, se realizó una digestión con las enzimas EcoRV y KpnI con el fin de liberar el ORF PIF-0 completo. Paso seguido, se clonó el fragmento recuperado en el vector pZErO-2, previamente tratado del mismo modo, generándose así la construcción pZ-p74Ag. Posteriormente, este plásmido fue sometido a digestión con Pst

I y Kpn I, para así recuperar el fragmento conteniendo el extremo correspondiente al carboxilo terminal de la proteína, y luego ligarlo al plásmido pFB-Ag, previamente digerido del mismo modo, para así generar la construcción pFB-AgAg.

pFB-PIF0_Nt: en este caso, se partió de las construcciones pQ-30Ntp74, pQ-30_SeNt, pQ-30_HaNt y pQ-30_AcNt, las cuales fueron digeridas con las enzimas EcoRI y HindIII, y el inserto conteniendo el extremo 5' del marco de lectura p74 fue ligado al vector pFB-GFP, previamente digerido del mismo modo, para así generar las construcciones pFB-Se, pFB-Ha y pFB-Ac, respectivamente. El caso de pFB-Ag fue citado previamente.

pFB-PIF0-quimeras:

- **pFB-SeAg:** el plásmido pZ-p74Ag fue digerido con HindIII y BamHI, y el fragmento conteniendo el extremo 3' del marco de lectura p74 fue ligado al fragmento mayor del producto de la digestión del plásmido pQ-SeSe con las mismas endonucleasas, para así generar la construcción pQE-p74SeAg (*Belaich, 2008*). Este plásmido se sometió a digestión posterior con EcoRI y HindIII, y el inserto conteniendo el extremo 5' del marco de lectura p74 fue ligado al vector pFB-gfp, previamente digerido del mismo modo, para así generar la construcción pFB-SeAg.
- **pFB-SeHa:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-SeAg pero partiendo del plásmido pQE-HaHa para liberar el extremo Ct de p74 de HaMNPV.
- **pFB-SeAc:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-SeAg pero partiendo del plásmido pQE-AcAc para liberar el extremo Ct de p74 de AcMNPV.
- **pFB-HaSe:** el plásmido pQE-SeSe fue digerido con HindIII y BamHI, y el fragmento conteniendo el extremo 3' del marco de lectura p74 fue ligado al fragmento mayor del producto de la digestión del plásmido pQE-HaHa con las mismas endonucleasas, para así generar la construcción pQE-HaSe (*Belaich, 2008*). Este plásmido se sometió a digestión posterior con EcoRI y

HindIII, y el inserto conteniendo el extremo 5' del marco de lectura p74 fue ligado al vector pFB-gfp, previamente digerido del mismo modo, para así generar la construcción pFB-HaSe.

- **pFB-HaAg:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-HaSe pero partiendo del plásmido pZ-p74Ag para liberar el extremo Ct de p74 de AgMNPV.
- **pFB-HaAc:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-HaSe pero partiendo del plásmido pQE-AcAc para liberar el extremo Ct de p74 de AcMNPV.
- **pFB-AgSe:** el plásmido pQE-SeSe fue digerido con HindIII y BamHI, y el fragmento conteniendo el extremo 3' del marco de lectura p74 fue ligado al fragmento mayor del producto de la digestión del plásmido pFB-AgAg con las mismas endonucleasas, para así generar la construcción pFB-AgSe.
- **pFB-AgHa:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-AgSe pero partiendo del plásmido pQE-HaHa para liberar el extremo Ct de p74 de HaMNPV.
- **pFB-AgAc:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-AgSe pero partiendo del plásmido pQE-AcAc para liberar el extremo Ct de p74 de AcMNPV.
- **pFB-AcSe:** el plásmido pQE-SeSe fue digerido con HindIII y BamHI, y el fragmento conteniendo el extremo 3' del marco de lectura p74 fue ligado al fragmento mayor del producto de la digestión del plásmido pQE-AcAc con las mismas endonucleasas, para así generar la construcción pQE-AcSe. Este plásmido se sometió a digestión posterior con EcoRI y HindIII, y el inserto conteniendo el extremo 5' del marco de lectura p74 fue ligado al vector pFB-gfp, previamente digerido del mismo modo, para así generar la construcción pFB-HaSe.

- **pFB-AcHa:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-AcSe pero partiendo del plásmido pQE-HaHa para liberar el extremo Ct de p74 de HaMNPV.
- **pFB-AcAg:** pasos correlativos a los citados previamente para pFB-AcSe pero partiendo del plásmido pz-p74Ag para liberar el extremo Ct de p74 de AgMNPV.

| PFB CON DSRED2 Y NT O CT P74 DE ACMNPV

pFB-dsred: se digirió el plásmido pDsred2-N1 (Clontech) con las enzimas BamHI y NotI, para liberar el ORF *dsred2* y clonarlo en el vector PFasBacHTB (Invitrogen), previamente digerido con las mismas enzimas, para dar lugar al plásmido pFB-dsred.

pFB-dsredp_74Ct: se digirió el plásmido pFB-AcAc con las enzimas BamHI y HindIII para liberar el fragmento correspondiente a la región carboxilo terminal de p74. El fragmento fue clonado en el vector pZErO-2, previamente digerido con las mismas enzimas, para generar el plásmido pZ-p74Ct. Luego, este plásmido fue sometido a digestión enzimática con EcoRI y HindIII y luego de recuperar el fragmento Ct de p74 fue tratado con el fragmento Klenow (Invitrogen) para llevar los extremos a romo, según consideraciones del proveedor. Por otro lado, el vector pFB-dsred fue digerido con XhoI también tratado con el fragmento Klenow, para luego ligar la región p74 Ct. Después de realizar el control por RFLP de la orientación requerida, se obtuvo el plásmido pFB-dsred_p74Ct.

pFB-p74Nt_dsred2: a partir del vector *pZ-p74Acmut*, que contiene el ORF de p74 de AcMNPV con la incorporación del sitio BamHI, se realizó una digestión con las enzimas ApaI y BamHI, se recuperó la fracción 5' correspondiente a la región amino terminal del gen p74 y se clonó en el vector pDsred-N1, previamente digerido con las mismas enzimas. Así se obtuvo el vector pP74-Dsred. Este plásmido fue digerido con la enzima NotI, para liberar la secuencia codificante para la proteína de fusión p74Nt-dsred2 y ser clonado en el plásmido pZErO-2, previamente digerido con la misma enzima. Luego se seleccionó la orientación que se requería, para tener en el extremo 5' el sitio de restricción XbaI y en el 3' el sitio HindIII.

Así, este plásmido fue digerido con estas enzimas y clonado en pFastBacHTB, también digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pFB-p74Nt_dsred2.

Localización subcelular de PIF-0

Para el estudio de localización subcelular se utilizaron los plásmidos con las regiones amino y carboxilo terminal de p74 de AcMNPV fusionadas al ORF de Dsred2, previamente descritas. Para ello, se generaron los bácmidos recombinantes de AcMNPV de acuerdo al sistema *Bac to Bac* (Invitrogen) y consideraciones del proveedor. Se obtuvieron los virus recombinantes derivados: Ac_dsred2, Ac_dsredp_74Ct y Ac_p74Nt_dsred2. Cabe aclarar, que como control negativo de las microscopías, se utilizó el stock viral del bácmido AcMNPV *wild type*. Con los virus generados se realizaron transfecciones con el reactivo Cellfectin II (Invitrogen) en una monocapa celular Sf9, sembrada en una placa de 6 *wells*. Transcurridos 6 días de la transfección, se recuperaron los medios condicionados, los cuales fueron utilizados para realizar una ronda de infección en un frasco de 75 cm² de células Sf9, para obtener un *stock* viral y titularlo. A partir del mismo se realizaron las infecciones para las visualizaciones por microscopía de fluorescencia.

Para el caso de la observación directa de la monocapa infectada, un frasco de Sf9 de 25 cm² se infectó con cada virus recombinante a una MOI=10 y transcurridos 5 días, se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000. Para el caso de la visualización de células fijadas, se procedió preparando una placa de 6 *wells* con un cubreobjetos de vidrio estéril en cada pocillo. Se sembraron las células Sf9 y se dejaron crecer hasta una confluencia del 80%. Luego se realizó la infección a una MOI=10. Transcurridos 5 días, se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con PBS 1X. A partir de un *stock* de glutaraldehído 25% v/v en PBS 1X, se preparó una solución al 2,5% (dilución 1/10) y se cubrió la monocapa. Se incubó 1 hora al resguardo de la luz, se retiró la solución y se realizó un lavado con PBS 1X. Los vidrios con las células fijadas se montaron en un portaobjetos, fijándolos al mismo, previo agregado del reactivo de tinción de núcleos DAPI (Sigma). A partir de allí se realizó la microscopía de fluorescencia antes descrita.

PLÁSMIDO DONOR PZ-P74UP_PHN-CAT_P74DOWN

Para la construcción del plásmido de transferencia para la generación de un bécrido AcMNPV *knockout* para *p74*, se partió del plásmido comercial *pGemT-easy*, el genoma de AcMNPV y el plásmido *pz-p74Acmut*. En primer lugar, se realizó una PCR con los *primers* *pAc_upXhoI* y *pAc_downXbaI* (Tabla VII.3) sobre el genoma de AcMNPV con el fin de amplificar la región que contiene el gen *poliedrina* completo. Las condiciones de reacción fueron estándar y el perfil de ciclado fue: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos a 92°C por 10 segundos, a 55°C por 15 segundos, a 72°C por 2,15 minutos; y 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. El producto de amplificación fue clonado en el vector *pGemT-easy* y se verificó su orientación para utilizar la que contenía los sitios de restricción *NsiI* y *SalI* en la región *upstream* al promotor *poliedrina*, obteniéndose el plásmido *pGT-phn*. Así, se digirió dicho plásmido con las enzimas mencionadas, como así también se liberó el fragmento “*down*” de *p74* de AcMNPV con las mismas enzimas del plásmido *pz-p74Acmut*. Este fragmento fue ligado con el vector *pGT-phn* digerido, para generar el plásmido *pGT-phn_downp74*. Luego, se obtuvo el fragmento *phn_downp74*, al digerir el plásmido *pGT-phn_downp74* con las enzimas *SacI* y *XhoI*. Este fragmento fue clonado en el vector *pz-p74Acmut*, que fue digerido con *SacI* y *SalI*, para dar lugar al plásmido *pz-upp74_phn_downp74*.

A partir del plásmido *PBS-CAT-2*, que contenía el gen codificante para la resistencia a cloranfenicol en el vector comercial *pBlueScript* (Thermo Fisher Scientific), se obtuvo la presión de selección en bacterias. Este plásmido fue digerido con *BamHI* y *HindIII*, liberando el fragmento codificante para la resistencia, tratado con *Klenow* y clonado en el vector *pz-upp74_phn_downp74*, previamente digerido con *SalI* y también tratado con *Klenow*, dando lugar a la generación del plásmido *pz-upp74_phn_cat_down74*. El mismo fue linealizado con la enzima *SacI* para los ensayos de co-transfección con el genoma del bécrido de AcMNPV (Luckow *et al*, 1993).

Se transfectaron el genoma del bácmido de AcMNPV (Luckow *et al*, 1993), previamente purificado a partir de un *stock* viral por ultracentrifugación de las partículas BVs, con el plásmido donador linealizado, a razón de 10 veces más moléculas de éste que de genoma, con el objetivo de que en todas las células que ingrese genoma, haya plásmido donador. La transfección se llevó a cabo en un *well* de placa de 6 sembrado con células Sf9 con un 60% de confluencia con el reactivo Cellfectin II y teniendo en cuenta las consideraciones del proveedor. Transcurridos 7 días y habiendo visualizado cuerpos refringentes por microscopía óptica, se recuperó el medio condicionado y se realizó la purificación de DNA a partir de los BVs. Luego, se realizaron transformaciones en *E. coli* DH10B electrocompetentes, y posterior incubación a 37°C por 1 hora a 200 rpm, para luego plaquear en LB sólido suplementado con kanamicina, cloranfenicol, X-gal e IPTG. Se seleccionaron las colonias azules para los controles moleculares, los cuales fueron sometidos al análisis genotípico por PCR. Para ello se utilizaron los *primers* indicados en la figura V.7.5, los cuales se indicaron como 1, 2, A y B. El *primer* 1 corresponde a *pAc_upXhoI*, el 2 a *pAc_downXbaI*, el A a *apFwp74Acy* el B a *pRevBamAc* (Tabla VII.3). Las PCRs llevadas a cabo combinaron los siguientes pares de *primers*: 1-2, 1-B y A-B. La tabla VII.6 resume las reacciones de PCR realizadas para el análisis genotípico de los virus recombinantes, que

fueron realizadas con la polimerasa termoestable *High Fidelity Platinum Taq* en las condiciones antes descritas.

Línea celular *High Five*TM transgénica

ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE PUROMICINA EN HIGH FIVETM

En una policubeta de 96 *wells* se sembraron células UFL-Ag-286 (20-30% de confluencia) en medio completo. A las 24 horas se agregaron 200 μ L de diferentes concentraciones del antibiótico puromicina (8 replicados para cada una, Sigma): 0 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 1.5 μ g/mL, 2 μ g/mL. Como blanco del ensayo se reservó una fila

	Nombre del primer	Nombre según Fig V.7	Perfil de ciclado	Tamaño producto (bp)	
				Ac-bac_wt	Ac-bac_recomb
<i>Set I</i>	<i>pAc_upXhoI</i>	1	94°C por 2 min (x1); 92°C por 10 s, 55°C por 15 s, 68°C por 5 min (x35); 68°C por 10 min (x1)	NA	1626
	<i>pAc_downXbaI</i>	2			
<i>Set II</i>	<i>pAc_upXhoI</i>	1		NA	3915
	<i>pRevBamAc</i>	B			
<i>Set III</i>	<i>pFwp74Ac</i>	A	1393	4498	
	<i>pRevBamAc</i>	B			

Tabla VII.6. Análisis genotípico bácmidosAcMNPV recombinantes. Se detallan los conjuntos de primers usados en el control genotípico de los clones azules recuperados luego de la co-transfección y transformación.

completa de la policubeta libre de células. Luego, a las 72 horas se cambió el medio con iguales concentraciones de antibiótico (200 μ L). Cumplida una semana, se realizaron lavados con PBS 1X (x2), para después incubarse con 150 μ L/*well* de solución de fijación (4% formaldehído en PBS 1X) e incubar 30 minutos. Transcurrido el tiempo se retiró la solución de fijación y se agregaron 300 μ L de cristal violeta 0,1% y se incubó por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavó 2 veces la monocapa con PBS 1X. Se resuspendieron las células

en una solución de etanol 10% - ácido acético 5% en agua (200 μ L). El resultado se leyó en espectrofotómetro a 570 nm (Lector de microplacas Asys UVM 340, Biochrom US).

| ENSAYO DE ACTIVIDAD DEL PROMOTOR HSP70

Para evaluar la actividad del promotor *hsp70*, se partió de un plásmido pCDNA3 sin el promotor CMV y con la secuencia promotora de *hsp70*, pCDNA* (*Belaich, 2008*). Por otro lado, se linealizó el vector comercial pEGFP-N3 (Clontech) con HindIII y se clonó al vector pCDNA*, linealizado con la misma enzima. Se seleccionó la orientación del vector fusionado que se requería mediante RFLP con BspHI. Luego, se digirió con la enzima NotI, se religó el plásmido resultante, y se seleccionó mediante transformación en bacterias y plaqueo en LB con Ampicilina. Así se obtuvo el plásmido phsp-eGFP, el cual se utilizó para transfectar 1 μ g con Cellfectin a monocapas celulares en placa de 6 *wells* de UFL-Ag-286 y *High Five*TM. Luego de 24 horas, se realizó un estímulo térmico, sometiendo a las células a: 25°C (control no inducido), 37°C y 42°C por 30 minutos. Después de 4 horas se visualizaron al microscopio de fluorescencia.

Para la generación del báculo AcMNPV conteniendo la secuencia correspondiente al promotor *hsp70*- ORF eGFP, se partió de la construcción phsp-eGFP. Para ello, se digirió a phsp-eGFP con las enzimas de restricción BspHI y SacI, y se ligó al vector pFastBacDual, digerido con las enzimas NcoI y SacI, que liberan la zona promotora de *polH* y *p10*, generándose la construcción pFastBac-hsp-gfp. Utilizando el sistema *Bac to Bac* (Invitrogen), se realizó la transposición siguiendo las recomendaciones del fabricante, para obtener un báculo con la construcción *hsp70*-GFP-sv40polyA (AcMNPV/*polH*⁻/*hspGFP*⁺). Se realizó la transfección con Cellfectin a una monocapa de Sf9 para generar el primer inóculo viral, el cual se multiplicó en posteriores ensayos de infección. La visualización se realizó en microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000).

| PLÁSMIDO DE TRANSFERENCIA P(HSP)P74-PURO

Para la generación de la línea transgénica que exprese el gen *p74* de AgMNPV, junto con la resistencia al antibiótico Puromicina, se diseñó un plásmido *donor*. Se partió del

plásmido pCDNA*(p74), sin el promotor CMV y con el promotor *hsp70*, y con el ORF *p74* de AgMNPV (Belaich, 2008). Por otro lado, se contaba con un plásmido p(hsp)-puro, esqueleto del vector p-ZErO-2, con la secuencia del promotor *hsp70* y el ORF correspondiente al gen de resistencia a Puromicina (Belaich, 2008). La figura VI.3 resume la estrategia de clonado utilizada. El vector pCDNA*(p74) fue digerido con la enzima *StuI*, mientras que el plásmido p(hsp)-puro se linealizó con la enzima *NotI* y sus extremos fueron tratados con Klenow para llevarlos a romo. Se ligaron ambos productos, verificándose la identidad con la enzima *BamHI*. El plásmido fusión elegido fue digerido con las enzimas *ScaI* y *StuI*, liberando el fragmento no deseado, que incluía la resistencia a ampicilina. Luego de la religación y transformación, se seleccionaron las colonias sensibles a ampicilina y resistentes a kanamicina. La identidad del plásmido se corroboró mediante RFLP con la enzima *PvuII*, dando lugar al plásmido p(hsp)p74-PURO. El mismo fue digerido con la enzima *BglII* para linealizarlo antes de transfectarlo en la línea celular.

LÍNEA CELULAR HIGH FIVE TRANSGÉNICA

Con el plásmido p(hsp)p74-PURO linealizado con *BglII*, se procedió a la transfección en la línea celular High Five™. Para ello se utilizó el reactivo Cellfectin® (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se realizó la transferencia horizontal de p(hsp)-p74-puro sobre una monocapa al 70% de confluencia en una placa de 6 wells. Las células se dejaron en reposo por 48 horas, para luego comenzar con la presión de selección. Para ello, a partir de ese momento y hasta la obtención de células con crecimiento normal, se realizó el cambio de medio suplementado con puromicina (6 µg/mL) cada 4 días. Con el fin de potenciar la expresión de la resistencia al antibiótico activando el promotor *hsp70*, 4 horas antes del cambio de medio, se sometieron a las células a un shock térmico a 42°C por 30 minutos. Después de 3 meses, y de evidenciar gran mortalidad de las células, se comenzaron a visualizar clones celulares creciendo los cuales fueron seleccionados por dilución terminal.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CÉLULAS TRANSGÉNICAS PARA PIF-0

Se realizó una PCR utilizando como molde al gDNA del clon celular transgénico, denominado Hi5-C4_{_1/625}, y de la línea parental. Como control se utilizó DNA del plásmido donador p(hsp)p74-PURO. Se emplearon 2 pares de *primers*, P74-ATG, P74-247c e *InsAct5*, *InsAct3* (Tabla VII.3). El primer par para la detección de *p74* y el segundo para la detección de *actina*. Ambas reacciones se llevaron a cabo en condiciones estándar y el perfil de ciclado fue 1 ciclo a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos a 92°C por 10 segundos, a 59°C por 15 segundos, a 72°C por 30 segundos; 1 ciclo a 72°C por 3 minutos.

Por otro lado, se realizó un *Southern blot*, con gDNA de las mismas líneas celulares citadas previamente, como así el control del plásmido donador. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v de los gDNA digeridos con la enzima de restricción BstEII, mientras que el plásmido p(hsp)p74-PURO fue linealizado con la enzima BglIII, y utilizado como control positivo de la reacción. La sonda se realizó por digestión con EcoRI del mismo plásmido, y se recuperó el fragmento correspondiente a parte del ORF *p74*. La electroforesis se realizó a 130 V por 1 hora y luego se continuó con el procedimiento citado previamente en metodologías generales.

Por último, se realizó el ensayo de *Western blot*. Para ello, se purificaron las proteínas totales de una monocapa celular de un frasco de 75 cm², tal y como fue descrito previamente. Se utilizaron como muestras la línea celular *High Five*, y los clones Hi5-C4_{_1/625} y Hi5-C4. Se sembraron en un SDS-PAGE 12%, y luego se realizó el *Western blot* con anti-ODVs de AgMNPV dilución 1/7500 (Mengual Gómez DL, 2013) como anticuerpo primario y anti-rabbit IGG HRP (Sigma) dilución 1/10000 como anticuerpo secundario, siguiendo el procedimiento antes descrito.

AGMNPV defectivo en *PIF-0*

CONSTRUCCIÓN PLÁSMIDOS DONORES

Para la obtención del virus AgMNPV defectivo en *p74* se generaron 3 plásmidos donores diferentes. La construcción pLow-p74, contenía las secuencias *up* y *down* de *p74*,

interrumpida con la secuencia del origen de replicación bacteriano p15A y el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Figura VI.6.A, sección resultados, página xx; *Belaich, 2008*). El plásmido donador pLow-p74 fue linealizado con la enzima HindIII para la transfección.

En tanto, el plásmido donador pBelo-p74, contenía las mismas regiones *up* y *down* de *p74*, interrumpidas con el Origen de replicación bacteriano de simple copia miniF (*Shizuya et al, 1992*) contenido en el plásmido pBeloBAC (New EnglandBioLabs) y el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Figura VI.6.B, sección resultados, página xx). Para obtenerlo, se digirió pLow-p74 con las enzimas XbaI y EcoRV, recuperando las regiones *up* y *down* de *p74*. Por otro lado, se digirió el plásmido comercial pBeloBAC11 con las enzimas de restricción HindIII y SfoI, eliminando una pequeña fracción del MCS (*Multiple Cloning Site*). Tanto el plásmido linealizado como la región *p74* recuperada, fueron tratadas con *Klenow* para compatibilizar extremos y ligadas. Se seleccionó el plásmido pBelo-p74 por transformación de *E. coli* DH10B y selección en placas de LB suplementadas con cloranfenicol. El plásmido donador pBelo-p74 fue linealizado con la enzima HindIII para la transfección.

El tercer plásmido construido fue el pz-p74-lacZ, basado en las secuencias *up* y *down* de *p74* interrumpidas por un gen que expresa la proteína β -Galactosidasa. Para ello, se utilizó un plásmido pcDNA* conteniendo la secuencia completa del gen *p74* de AgMNPV, pcDNA*(pp74) (*Belaich, 2008*). El mismo fue digerido con las enzimas Sall y NotI, recuperando una región conteniendo gran parte del gen *p74* (1783 bp), que fue clonada en el vector pBlueScriptSK(+) (Stratagene), previamente digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido *PBS-p74*. Esta construcción se digirió con las enzimas SacI y XhoI, recuperando el fragmento correspondiente al gen *p74*, el cual fue clonado en el vector pZerO-2 (Invitrogen), previamente digerido con las mismas enzimas, para dar lugar al plásmido *pz-p74*. Por otro lado, se contaba con el plásmido *p-ie1-lacZ*, el cual contenía el ORF de *lacZ*, bajo el promotor y terminador del gen *ie1* de AgMNPV, funcional en bacterias (*Bilen, 2007*). El plásmido fue digerido con las enzimas XbaI y XhoI, recuperando un fragmento de 4485 bp correspondiente al gen *prom_{ie1}-lacZ*, el cual fue tratado con *Klenow*

para generar extremos romos. Por otro lado, el plásmido *pz-p74*, fue digerido con EcoRI, recuperando el esqueleto del vector conteniendo regiones *up* y *down* de *p74* (3926 bp), el cual también fue tratado con Klenow. Luego se ligaron ambos fragmentos para dar lugar al plásmido *pz-p74-lacZ*. El mismo fue digerido con XhoI y NotI para ser transfectado como vector donador.

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y SELECCIÓN DE RECOMBINANTES

Los plásmidos pLow-p74, pBelo-p74 y pz-p74-lacZ fueron co-transfectados lineales junto con DNA de AgMNPV (relación 10:1) sobre una monocapa de UFL-Ag-286 al 60% de confluencia utilizando Cellfectin, según consideraciones del fabricante. Para el caso de los plásmidos pLow-p74 y pBelo-p74, se recuperó el medio condicionado 5 días post-transfección para purificar DNA a partir de los BVs. El DNA recuperado fue transformado en *E.coli* DH10B y posterior selección en LB sólido suplementado con Cloranfenicol. Se seleccionaron todas las colonias allí crecidas para realizar los análisis genotípicos. Para el caso del vector pz-lacZ-p74, luego de agregar la mezcla del reactivo de transfección y el DNA pero antes de suplementar con medio completo a las células, se adicionó una capa de agarosa 1,5% p/v, y una vez gelificada, se incorporó el medio. Además, se adicionó X-gal (Life Technologies) a una concentración de 0,2 mg/ml final, con el fin de visualizar focos de precipitación azules. Luego de una incubación de 7 días, se recuperaron con sacabocado estéril las regiones de agarosa conteniendo los precipitados azules. Los tacos de agarosa se resuspendieron en medio GRACE's sin suero, con el fin de eluir losBV's contenidos en el mismo. Se utilizó ese *stock* viral para realizar infecciones en nuevas monocapas de células, realizando diluciones seriadas 1/10 para seleccionar el virus clonal azul por dilución terminal.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS GENOMAS RECOMBINANTES SELECCIONADOS

Para validar genotípicamente los virus AgMNPV defectivos en *p74*, se diseñaron diferentes PCRs para comprobar la integridad del genoma y verificar el evento de

recombinación homóloga. Para ello, se eligieron 4 regiones representantes del genoma, equidistantes entre sí, abarcando 4 extremos (Miele, 2014). Para ello, se utilizaron los pares de *primers* Hel-76511/Hel-76831c, egta-14577/egtb-14837c, odv66a/odv66b, p74-ATG/p74-247c en reacciones de PCR con los clones seleccionados (Tabla VII.3). EL perfil de ciclado fue 1 ciclo a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos a 92°C por 10 segundos, a 59°C por 15 segundos, a 72°C por 30 segundos; 1 ciclo a 72°C por 3 minutos. Por otro lado, la PCR para la validación de la recombinación se realizó con los *primers* p74-ATG/p74-Xbal(Tabla VII.3). El perfil de ciclado fue 1 ciclo a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos a 92°C por 10 segundos, a 60°C por 15 segundos, a 72°C por 4 minutos; 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. Los resultados se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Complementación de variantes virales defectivas en *PIF-0*

Los virus AcMNPV defectivo en *p74* (AcLP4) y AcMNPV *wild type*_HR3 (Faulkner et al, 1997) fueron cordialmente suministrados por el Dr. Salvador Herrero-Sendra, del Laboratorio *Genética Bioquímica y Biotecnología del Departamento de Genética de la Universitat de Valencia*, España. Para realizar los ensayos de complementación, se infectaron monocapas de células *High Five* y del clon transgénico Hi5-C4_{1/625} (frascos de 75 cm² al 80 % de confluencia), con ambos virus, a una MOI= 0,1. Pasados 7 días, se descartaron los medios condicionados y se recuperaron los OBs a partir de las células, tal y como fue descrito previamente. Se cuantificaron por microscopía óptica (marca, el del mariano) y cámara de Neubauer.

Las larvas utilizadas para los ensayos biológicos, *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*, fueron donadas por el Insectario del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA), INTA Castelar, Argentina, en el contexto de un trabajo de colaboración con la Dra. Alicia Sciocco-Cap. En todos los casos, se utilizaron larvas del segundo estadio, mantenidas luego de la eclosión de los huevos con dieta artificial (Bell et al, 1981).

Para los ensayos en larvas de *Rachiplusia nu*, se tomaron 20 larvas por experimento. Brevemente, los animales se expusieron a los virus por ingesta de los OBs utilizando el método de *droplet feeding* (Hughes et al, 1986; Jones et al, 1993, 2000). Para ello se prepararon soluciones de sacarosa 1% p/v y *Coomasie brilliant blue* al 0,5% p/v, que se utilizó para resuspender los virus en una dosis de $6,25 \times 10^6$ OBs/mL. Se alimentaron las larvas del segundo estadio con las soluciones preparadas y una vez visualizada la ingesta por presencia de coloración azul, fueron trasladadas a placas de 24 wells con dieta artificial estéril, colocándolas en celdas aisladas e incubadas en cámaras a 28°C.

Para el caso de los ensayos en *Anticarsia gemmatalis*, se utilizaron los mismos preparados de OBs, pero se evaluaron 2 dosis por condición, $6,25 \times 10^6$ OBs/mL y $6,25 \times 10^7$ OBs/mL. Cada grupo contenía 24 larvas del segundo estadio. El ensayo se realizó igual que el citado previamente.

Los ensayos se extendieron 11 días post- ingesta, transcurridos los cuales se evaluó mortalidad o supervivencia. Dentro del grupo de las que sobrevivieron, se encontraron, también las que pasaron al estadio de pupa. Se graficaron los porcentajes de muertos/vivos en función del total de larvas por ensayo.

Bibliografía

- Adams JR and McClintock JT. **Baculoviridae, nuclear polyhedrosis viruses**. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In "Atlas of Invertebrate Viruses" (J. R. Adams and J. R. Bonami, eds.), Chapter 6, pp. 87–180. CRC Press, Boca Raton, **1991**.
- Allen G, Knell JD. **A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*: Ultrastructure, replication and pathogenicity**. Fla Entomol., (60), 233-240, **1977**.
- Allen GE, Knell JD. **A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity**. The Florida Entomologist 60, 233–240, **1977**.
- Aragón J. **Insectos Perjudiciales de la Soja**. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Est. Exp. Agropecuaria Marcos Juárez. Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario (IDIA XXI). Nº 3, Oleaginosas, Sección Soja. 75-82, **2002**.
- Arceo E, Basualdo E. **Evolución y situación actual del ciclo ganadero en la Argentina**. Revista Realidad Económica Nº 221, Buenos Aires, **2006**.
- Ardisson-Araújo DM, Melo FL, Clem RJ, Wolff JL, Ribeiro BM. **A betabaculovirus-encoded gp64 homolog is a functional envelope fusion protein**. J Virol. pii: JVI.02491-15, **2015**.
- Argaud O, Croizier L, López-Ferber M, Croizier G. **Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae**. J Gen Virol, 79: 931-935, **1998**.
- Arif BM, Kuzio J, Faulkner P, Doerfler W. **The genome of *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus: molecular cloning and mapping of the EcoRI, BamHI, SmaI, XbaI and BglII restriction sites**. Virus Res 1, 605–614, **1984**.
- Arif BM. **A brief journey with insect viruses with emphasis on baculoviruses**. J Invertebr Pathol. 89(1):39-45, **2005**.
- Au S, Wu W, Panté N. **Baculovirus nuclear import: open, nuclear pore complex (NPC) sesame**. Viruses., 23;5(7):1885-900, **2013**.
- Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. **The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus**. Virology, 1;202(2):586-605, **1994**.
- Badii MH, Abreu JL. **Control biológico una forma sustentable de control de plagas**. International Journal of Good Conscience. 1(1) : 82-89, **2006**.
- Bahena JF. **Enemigos naturales de las plagas agrícolas del maíz y otros cultivos**. Texcoco Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 21-27, **2008**.
- Barrera GP, Belaich MN, Patarroyo MA, Villamizar LF, Ghiringhelli PD. **Evidence of recent interspecies horizontal gene transfer regarding nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda***. BMC Genomics; 16:1008, **2015**.
- Barsky O. **La caída de la producción agrícola pampeana en la década de 1940**. En: La Agricultura Pampeana, transformaciones productivas y sociales. FCE- IICA-CISEA, Buenos Aires, pp 31-108, **1988**.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J. **Control of coleopteran insect pests through RNA interference**. Nat Biotechnol.; 25(11):1322-6, **2007**.
- Beard J. Australian Rural Health Research Collaboration. **DDT and human health**. Sci Total Environ, 15;355(1-3):78-89. Review, **2006**.
- Beas-Catena A, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Contreras-Gómez A, Molina-Grima E. **Baculovirus biopesticides: an overview**. The J. of Animal & Plant Sciences, 24(2): p362-373, **2014**.
- Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ. **Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress**. J Cell Biol.; 117(6):1137-50, **1992**.

- Belaich MN, Rodríguez VA, Bilen MF, Pilloff MG, Romanowski V, Sciocco-Cap A, Ghiringhelli PD. **Sequencing and characterisation of p74 gene in two isolates of Anticarsia gemmatalis MNPV**. *Virus Genes*; 32(1):59-70, **2006**.
- Belaich, MN. **Estudios básicos y aplicados sobre el gen p74 del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de Anticarsia gemmatalis**. Tesis de doctorado, UNQ, **2008**.
- Bell RA, Owens CD, Shapiro M, Tardif JR. **Mass Rearing and Virus Production- Development of Mass-Rearing Technology**. In: *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*. Forest Service Science and Education Agency, Technical Bulletin 1584, US Department of Agriculture, Washington DC, **1981**.
- Benz G. **Environment**, En: **Epizootiology of infectious diseases**, JR Fuxa y Y Tanada (Ed), John Wiley & Sons, NY. **1987**.
- Berreta MF, Ferrelli ML, Salvador R, Sciocco-Cap A, Romanowski V. **Baculovirus Gene Expression**. In: *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*. Dr. Romanowski V (Ed), ISBN 978-953-51-1207-5, InTech, **2013**.
- Bézier A, Annaheim M, Herbinière J, Wetterwald C, Gyapay G, Bernard-Samain S, Wincker P, Roditi I, Heller M, Belghazi M, Pfister-Wilhem R, Periquet G, Dupuy C, Huguet E, Volkoff AN, Lanzrein B, Drezen JM. **Polydnviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus**. *Science*. 13;323(5916):926-30, **2009**.
- Bézier A, Thézé J, Gavory F, Gaillard J, Poulain J, Drezen JM, Herniou EA. **The genome of the nucleopolyhedrosis-causing virus from Tipula oleracea sheds new light on the Nudiviridae family**. *J Virol.*, 89(6):3008-25, **2014**.
- Bideshi DK, Renault S, Stasiak K, Federici BA, Bigot Y. **Phylogenetic analysis and possible function of bro-like genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria**. *J Gen Virol.*; 84: p. 2531-44, **2003**.
- Bilen MF, Pilloff MG, Belaich MN, Da Ros VG, Rodrigues JC, Morais Ribeiro B, Romanowski V, Lozano ME, Ghiringhelli, PD. **Functional and structural characterisation of AgMNPV ie1**. *Virus Genes* 35(3), 549-62, **2007**.
- Bilen, MF. **Caracterización del locus ie1 de AgMNPV y empleo de las regions regulatorias en la generación de nuevos bioinsecticidas**. Tesis de doctorado, UNQ, **2007**.
- Bilimoria, SL. **The biology of nuclear polyhedrosis viruses**. In "Viruses of Invertebrates" (E. Kurstak, ed.), 1–60. Marcel Dekker Inc., New York, **1991**.
- Bishop, DH, Hirst ML, Possee RS, Cory JS. **Genetic engineering of microbes: virus insecticides—a case study**. p. 249–277. In G. K. Darby, P. A. Hunter, and A. D. Russell (ed.), *Fifty years of microbials*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, **1995**.
- Blissard GW, Rohrmann GF. **Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus**. *Virology*. 170: p. 537-555, **1989**.
- Blissard GW, Rohrmann GF. **Baculovirus diversity and molecular biology**. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 127–155, **1990**.
- Blissard GW., and Wenz JR. **Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH dependent membrane fusion**. *J. Virol.* 66:6829–6835, **1992**.
- Boucias DG, and Pendland JC. **Baculoviruses**. In "Principles of Insect Pathology," 111–146. Kluwer Academic Publishers, Norwell, **1998**.
- Boucias DG, Farmerie WG, Pendland JC. **Cloning and sequencing of cDNA of the insecticidal toxin hirsutellin A**. *J Invertebr Pathol.*, 72, 258-61, **1998**.
- Boutanaev AM, Kalmykova AI, Shevelyov YY, Nurminsky DI. **Large clusters of co-expressed genes in the Drosophila genome**. *Nature*; 420(6916):666-9, **2002**.
- Boyce FM, Bucher NLR. **Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (6): 2348-2352, **1996**.
- Braconi CT, Ardisson-Araújo DM, Paes Leme AF, Oliveira JV, Pauletti BA, Garcia-Maruniak A, Ribeiro BM, Maruniak JE, Zanotto PM. **Proteomic analyses of baculovirus Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus budded and occluded virus**. *J Gen Virol*;95(Pt 4):980-9, **2014**.

- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. **Poisoning due to pyrethroids**. *Toxicol Rev.* 24(2):93-106. Review, **2005**.
- Braunagel SC, Elton DM, Ma H, Summers MD. **Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56**. *Virology*, 1;217(1):97-110, **1996**.
- Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD. **Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus**. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 19;100(17):9797-802, **2003**.
- Braunagel SC, Summers MD. ***Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles**. *Virology.*, 202, 315-28, **1994**.
- Braunagel SC, Williamson ST, Saksena S, Zhong Z, Russell WK, Russell DH, Summers MD. **Trafficking of ODV-E66 is mediated via a sorting motif and other viral proteins: Facilitated trafficking to the inner nuclear membrane**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(22):8372–8377, **2004**.
- Caballero P, Aldebis HK, Vargas-Osuna E, Santiago-Álvarez C. **Epizootics caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of *Spodoptera exigua* in southern Spain**. *Biocontrol Science and Technology* 2: 35-38, **1992**.
- Caballero P, López-Ferber M, Williams T. **Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas**. Editorial: Phytoma, **2001** (1ª Ed.)
- Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T, Menotti L. **The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell**. *Rev. Med. Virol.* 17:313–326, **2007**.
- Cañedo V, Alfaro A, Kroschel J. **Manejo integrado de las plagas de insectos en hortalizas. Principios y referencias técnicas**
- Carner, GR. and Turnipseed SG. **Potential of a nuclear polyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean**. *J. Econ. Entomol.*, 70, 608-610, **1977**.
- Carnero A, Espino A, Hernández M, Barroso J. **La lucha integrada, una nueva estrategia para combatir las plagas. Ministerio de Agricultura**. H.D. 12/88. Madrid. 20 pp, **1988**.
- Carpentier DC, Griffiths CM, King LA. **The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection**. *Virology*, 20; 371(2):278-91, **2008**.
- Carpentier DC, Griffiths CM, King LA. **The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection**. *Virology*, 371(2): p. 278-91, **2008**.
- Carrasco AE, Sánchez NE, Tamagno LE. **Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios**. Primera edición electrónica, AUGM-Comité de Medio Ambiente, **2012**.
- Castro ME, Souza ML, Araujo S, Bilimoria SL. **Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines**. *J Invertebr Pathol.*, 69(1):40-5, **1997**.
- Centro de economía política argentina. **La producción de soja en la Argentina**. <http://centrocepa.com.ar/la-produccion-de-soja-en-la-argentina/>, **2014**.
- Cerrudo CS, Miele SAB, Belaich MN, Ghiringhelli PD. **Búsqueda de patrones para la identificación de señales de localización nuclear en proteomas de baculovirus**. XI Congreso Argentino de Virología. Palais Rouge, CABA, **2015**.
- Chakravarthy VS, Reddy TP, Reddy VD, Rao KV. **Current status of genetic engineering in cotton (*Gossypium hirsutum* L): an assessment**. *Crit Rev Biotechnol.*;34(2):144-60, **2014**.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R. **Bacterial insecticidal toxins**. *Crit Rev Microbiol* 30(1):33-54. Review, **2004**.
- Chen YR, Zhong S, Fei Z, Hashimoto Y, Xiang JZ, Zhang S, Blissard GW. **The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells**. *J Virol.* 87(11):6391-405, **2013**.

- Cheng CH, Liu SM, Chow TY, Hsiao YY, Wang DP, Huang JJ, Chen HH. **Analysis of the complete genome sequence of the Hz-1 virus suggests that it is related to members of the Baculoviridae.** J Virol. 76(18):9024-34, **2002.**
- Chikhalya A, Luu DD, Carrera M, De La Cruz A, Torres M, Martinez EN, Chen T, Stephens KD, Haas-Stapleton EJ. **Pathogenesis of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus in fifth-instar Anticarsia gemmatalis larvae.** J Gen Virol.; 90(Pt 8):2023-32, **2009.**
- Claus JD, Remondetto GE, Guerrero SA, Demonte AM, Murguía M, Marcipar AJ. **Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures.** J Biotechnol. 31(1):1-1, **1993.**
- Clem RJ, Duckett CS. **The iap genes: unique arbitrators of cell death.** Trends Cell Biol., 7(9):337-9, **1997.**
- Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. **Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells.** Science, 254 (5036): 1388-1390, **1991.**
- Clem RJ, Miller LK. **Apoptosis reduces both the invitro replication and the invivo infectivity of a baculovirus.** J Virol, 67 (7): 3730-3738, **1993.**
- Clem RJ, Robson M, Miller LK. **Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene P35 and the adjacent gene P94.** J Virol, 68 (10): 6759-6762, **1994.**
- Condreay JP, Kost TA. **Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells.** Curr Drug Targets, 8:1126-1131, **2007.**
- Copping LG, Duke SO. **Natural products that have been used commercially as crop protection agents.** Pest Manag Sci., 63(6), 524-54, **2007**
- Cornalia, E. **Monografia del bombice del gelso (Bombyx mori Linneo).** Memorie dell' I.R. Istituto Lombardo di Scienze, Lettere ed Arti 6:3-387 (Parte quarta: Patologia del baco. pp. 332-336), **1856.**
- Cortés E, Morcos E, Venier F. **Evaluación de insecticidas para el control de Anticarsia gemmatalis Hubner en el cultivo de soja.** Boletín editado por el INTA Unidad de Extensión y Experimentación San Francisco, **2013.**
- Cory JS, Myers JH. **The ecology and evolution of insect baculoviruses.** Annu Rev Ecol Evol Syst 34: 239-272, **2003.**
- Croizier G, Croizier L, Argaud O, Poudevigne D. **Extension of Autographa-californica nuclear polyhedrosisvirus host-range by interspecific replacement of a short DNA-sequence in the P143 helicase gene.** Proc Natl Acad Sci USA, 91 (1): 48-52, **1994.**
- Croizier G, Croizier L, Argaud O, Poudevigne D. **Extension of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene.** Proc Natl Acad Sci U S A.; 91(1):48-52, **1994.**
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. **An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc fingerlike motif.** J Virol, 67 (4): 2168-2174, **1993.**
- Da Silva MTD, Corre-Costa E, Boss A. **Controle de Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) con reguladores de crescimento de insetos.** Ciencia Rural, Santa María.(33),4, 601-605, **2003.**
- Datsenko KA, Wanner BL. **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** Proc Natl Acad Sci U S A., 6;97(12):6640-5, **2000.**
- De Lima ME, Figueiredo SG, Pimenta AM, Santos DM, Borges MH, Cordeiro MN, Richardson M, Oliveira LC, Stankiewicz M, Pelhate M. **Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol., 146, 264-79, **2007.**
- Dean RL, Locke M, Collins JV. **Structure of the fat body.** En: Comprehensa Insect Physiology, biochemistry and phamacology. GA Kerkut y LI Gilbert (Ed), Pargamont Press, Londres, Reino Unido, (9), 155-210, **1985.**
- Deng F, Wang R, Fang M, Jiang Y, Xu X, Wang H, Chen X, Arif BM, Guo L, Wang H, Hu Z. **Proteomics analysis of Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100.** J Virol., 81(17):9377-85, **2007.**

- Detvisitsakun C, Cain EL, Passarelli AL. **The *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor accelerates host mortality.** *Virology*. 365(1): 70-8, **2007**.
- Dong ZQ, Chen TT, Zhang J, Hu N, Cao MY, Dong FF, Jiang YM, Chen P1, Lu C, Pan MH. **Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells.** *Antiviral Res.*; pii: S0166-3542(16)30147-4, **2016**.
- Dow, JA. **pH gradients in lepidopteran midgut.** *J Exp Biol*, 172(Pt 1): p. 355-375, **1992**.
- Doyle C J, Hirst ML, Cory JS, Entwistle PF. **Risk assessment studies: detailed host range testing of wild-type cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), nuclear polyhedrosis virus.** *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2704-2710, **1990**.
- Dror A, Haviva E, Menachem K, Noam R, Michal S, Baruch S, Aviah Z. **The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants.** *Plant Sci.* 176: 315-324, **2009**.
- Du XL, Thiem SM. **Characterization of host range factor 1 (hrf-1) expression in *Lymantria dispar* M nucleopolyhedrovirus and recombinant *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus-infected IPLB- Ld652Y cells.** *Virology*, 227 (2): 420-430, **1997**.
- Duffy SP, Becker EM, Whittome BH, Lucarotti CJ, Levin DB. **In vivo replication kinetics and transcription patterns of the nucleopolyhedrovirus (*NeabNPV*) of the balsam fir sawfly, *Neodiprion abietis*.** *J Gen Virol.*; 88(Pt 7):1945-51, **2007**.
- Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR. **The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse.** *J Bacteriol.* 190(7):2597-606, **2008**
- Ebbinghaus-Kintscher U, Lümmer P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Masaki T, Yasokawa N, Tohnishi M. **Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca²⁺ release channels in insects.** *Cell Calcium* 39: 21-33, **2006**.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. **Suggestions for unifying the terminology in biological control.** *BioControl* 46: 387–400, **2001**.
- Eldridge R, O'Reilly DR, Hammock BD, Miller LK. **Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene.** *Appl Environ Microbiol.* 58(5):1583-91, **1992**.
- Eilfgang C, Rosorius O, Hofer L, Jaksche H, Hauber J, Bevec D. **Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 25;96(11):6229-34, **1999**.
- El-Menofy W, Osman G, Assaeedi A, Salama M. **A novel recombinant baculovirus overexpressing a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin enhances insecticidal activity.** *Biol Proced Online.*, 15;16:7, **2014**.
- Engelhard EK, Kam-Morgan LN, Washburn JO, Volkman LE. **The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 3224-3227, **1991**.
- Eppstein DA, Thoma JA, Scott HA, Young SY 3rd. **Degradation of matrix protein from a nuclear-polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by an endogenous protease.** *Virology*, 67(2):591-4, **1975**.
- Eppstein DA, Thoma JA. **Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 20;62(2):478-84, **1975**.
- Ernst O, Zor T. **Linearization of the Bradford protein assay.** *J Vis Exp.*;12;(38), **2010**.
- Espinel-Correal C, Léry X, Villamizar L, Gómez J, Zeddám JL, Cotes AM, López-Ferber M. **Genetic and biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae).** *Appl Environ Microbiol.* 76(22):7617-25, **2010**.
- Espinel-Correal C, López-Ferber M, Zeddám JL, Villamizar L, Gómez J, Cotes AM, Léry X. **Experimental mixtures of *Phthorimaea operculella* granulovirus isolates provide high biological efficacy on both *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae).** *J Invertebr Pathol.*, 110(3):375-81, **2012**.
- Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW, Koziel MG. **Transgenic plants: an emerging approach to pest control.** *Nat Biotechnol*, 15(2):137-41, **1997**.

- Fang M, Nie Y, Harris S, Erlandson MA, Theilmann DA. **Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus Core Gene ac96 encodes a Per Os Infectivity Factor (pif-4)**. J. Virol, 83: 12569-12578, **2009**.
- Fang M, Nie Y, Wang Q, Deng F, Wang R, Wang H, Wang H, Vlask JM, Chen X, Hu Z. **Open reading frame 132 of Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus encodes a functional per os infectivity factor (PIF-2)**. J Gen Virol., 87 (9):2563-9, **2006**.
- Fatyol K, Illes K, Praznovszky T, Langridge WH, Hadlaczky G, Szalay AA. **Molecular characterization of a stably transformed Bombyx mori cell line: identification of alternative transcriptional initiation sites of the A3 cytoplasmic actin gene**. Mol Gen Genet.; 260(1):1-8, **1998**.
- Faulkner P, Kuzio J, Williams GV, Wilson JA. **Analysis of p74, a PDV envelope protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo**. Journal of General Virology, 78(12), 3091–3100, **1997**.
- Federici BA. **Ultrastructure of Baculoviruses**. En: The biology of Baculoviruses: biological properties and molecular biology, Vol 1, RR Granados y BA federici (Ed), Academic Press, San Diego, EEUU. 61-88, **1986**.
- Ferrelli ML, Salvador R, Biedma ME, Berretta MF, Haase S, Sciocco-Cap A, Ghiringhelli PD, Romanowski V. **Genome of Epinotia aporema granulovirus (EpapGV), a polyorganotropic fast killing betabaculovirus with a novel thymidylate kinase gene**. BMC Genomics 13:548, **2012**.
- Ffrench-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR. **Insecticidal toxins from Photorhabdus bacteria and their potential use in agriculture**. Toxicon. 49(4):436-51, **2007**.
- Flipsen JT, Martens JW, van Oers MM, Vlask JM, van Lent JW. **Passage of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of Spodoptera exigua larvae**. Virology. 208(1): 328-35, **1995**.
- Fraser, M.J. **Ultrastructural observations of virion maturation in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus infected Spodoptera frugiperda cell cultures**. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 95(1–3):189–195, **1986**.
- Friesen PD. **Regulation of baculovirus early gene expression**. In: Miller LK, editor. The Baculoviruses. New York and London: Plenum Press; p. 141-70, **1997**.
- Friesen PD. **Regulation of baculovirus early gene expression**. In: Miller LK, editor. The Baculoviruses. New York and London: Plenum Press; 141-70, **1997**.
- Fukamizo T, Sato H, Mizuhara M, Ohnuma T, Gotoh T, Hiwatashi K, Takahashi S. **Chitinase from Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus: Rapid Purification from Sf-9 Medium and Mode of Action**. Biosci Biotechnol Biochem., 75(9): 1763-9, **2011**.
- Gao L, Qi J. **Whole genome molecular phylogeny of large dsDNA viruses using composition vector method**. BMC Evol Biol., 15, 7-41, **2007**.
- Gao L, Qi J. **Whole genome molecular phylogeny of large dsDNA viruses using composition vector method**. BMC Evol Biol., 15, 7-41, **2007**.
- Garavaglia MJ, Miele SA, Iserre JA, Belaich MN, Ghiringhelli PD. **The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae**. J Virol., 86(22):12069-79, **2012**.
- Giberti H. **Historia Económica de la Ganadería Argentina**. Ediciones Solar, Buenos Aires, Argentina, **1970**.
- Godiska R, Mead D, Dhodda V, Wu C, Hochstein R, Karsi A, Usdin K, Entezam A, Ravin N. **Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in Escherichia coli**. Nucleic Acids Res.;38(6): e88, **2010**.
- Goley ED, Ohkawa T, Mancuso J, Woodruff JB, D'Alessio JA, Cande WZ, Volkman LE, Welch MD. **Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein**. Science. 20;314(5798):464-7, **2006**.
- Gramkow AW, Perecmanis S, Sousa RL, Noronha EF, Felix CR, Nagata T, Ribeiro BM. **Insecticidal activity of two proteases against Spodoptera frugiperda larvae infected with recombinant baculoviruses**. Virol J., 29;7:143, **2010**.
- Green MR, Sambrook J. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 4th Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2012**.

- Gross CH, Rohrmann GF. **Analysis of the role of 5' promoter elements and 3' flanking sequences on the expression of a baculovirus polyhedron envelope protein gene.** *Virology*, 192(1):273-81, 1993.
- Gross CH, Russell RLQ, Rohrmann GF. **The *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure.** *J. Gen. Virol.*, 75: 1115-1123, 1994.
- Guarino, LA, Smith, MW. **Nucleotide sequence and characterization of the 39k gene region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.** *Virology* 179(1):1–8, 1990.
- Gutiérrez S, Kikhno I, López Ferber M. **Transcription and promoter analysis of pif, an essential but low-expressed baculovirus gene.** *J Gen Virol*; 85(Pt 2):331-41, 2004.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. **Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives.** *Viruses*, 30;7(5):2230-67, 2015.
- Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE. **P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae.** *J. Virol.* 78:6786–6791, 2004.
- Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE. ***Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut.** *J Gen Virol*, 86: 1349-1355, 2005.
- Habib S, Hasnain SE. **Differential activity of two non-hr origins during replication of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome.** *J Virol.*; 74(11):5182-9, 2000.
- Harrap KA. **The ultrastructure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body.** *Virology.* (50), 114-123, 1972.
- Harrison R, Hoover K. **Baculoviruses and Other Occluded Insect Viruses chapter 4 in *Insect Pathology 2nd edition*.** Editorial: Elsevier, 2012.
- Harrison RL, Bonning BC. **Application of maximum-likelihood models to selection pressure analysis of group I nucleopolyhedrovirus genes.** *J Gen Virol.* 85(Pt 1):197-210, 2004.
- Harrison RL, Popham HJ. **Genomic sequence analysis of a granulovirus isolated from the Old World bollworm, *Helicoverpa armigera*.** *Virus Genes*; 36(3):565-81, 2008.
- Harrison RL, Sparks WO, Bonning BC. ***Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by *Rachiplusia* ou multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56.** *J Gen Virol.*, 91(Pt 5):1173-82, 2010.
- Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA, Possee RD. **Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes.** *Virology*, 238, 243-253, 1997.
- Hayakawa T, Ko R, Okano K, Seong SI, Goto C, Maeda S. **Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome.** *Virology*; 262(2):277-97, 1999.
- Hayakawa T, Rohrmann GF, Hashimoto Y. **Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses.** *Virology*, 278(1), 1–12, 2000.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. **New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.** *Annu Rev Entomol.* 54:285-302, 2009.
- Herniou EA, Arif BM, Becnel JJ, Blissard GW, Bonning B, Harrison R, Jehle JA, Theilmann DA, Vlaskin JM. **Family Baculoviridae in Virus Taxonomy 9th report.** Elsevier. ISBN : 978-0-12-384684-6, 2012.
- Herniou EA, Luque T, Chen X, Vlaskin JM, Winstanley D, Cory JS, O'Reilly DR. **Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny.** *Journal of Virology*, 75(17), 8117–8126, 2001.
- Herniou EA, Olszewski JA, Cory JS, O'Reilly DR. **The genome sequence and evolution of baculoviruses.** *Annual Review of Entomology*, 48, 211–234, 2003.
- Herniou EA, Olszewski JA, O'Reilly DR, Cory JS. **Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts.** *J Virol.*, 78, 3244-3251, 2004.
- Hershberger PA, Dickson JA, Friesen PD. **Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis- virus-cell line-specific effects on virus-replication.** *J Virol*, 66 (9): 5525-5533, 1992.

- Hill JE, Kuzio J, Wilson JA, MacKinnon EA, Faulkner P. **Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, Choristoneura fumiferana multicapsid nuclear polyhedrosis virus.** Biochim Biophys Acta, 20;1172(1-2):187-9, 1993.
- Hilton S, Kemp E, Keane G, Winstanley D. **A bacmid approach to the genetic manipulation of granuloviruses.** J Virol Methods; 152(1-2):56-62, 2008.
- Hinds WE, Osterberger BA. **The soybean caterpillar in Louisiana.** Journal of Economic Entomology 24: 1168-1173, 1931.
- Hokkanen HM, Lynch JM. **Biological control: benefits and risks.** Cambridge University Press, 1995.
- Hong T, Braunagel SC, Summers MD. **Transcription, translation, and cellular localization of PDVE66: A structural protein of the PDV envelope of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.** Virology; 204: p. 210-224, 1994.
- Hong T, Summers M, Braunagel S. **N-terminal sequences from Autographa californica nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 8: 4050- 4055, 1997.
- Horton HM and Burand JP. **Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion.** J. Virol. 67(4):1860–1868, 1993.
- Horton HM, Burand JP. **Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane-fusion.** J Virol, 67 (4): 1860-1868, 1993.
- Hou D, Zhang L, Deng F, Fang W, Wang R, Liu X, Guo L, Rayner S, Chen X, Wang H, Hu Z. **Comparative proteomics reveal fundamental structural and functional differences between the two progeny phenotypes of a baculovirus.** J Virol., 87(2):829-39, 2013.
- Hou S, Chen X, Wang H, Tao M, and Hu Z. **Efficient Method to Generate Homologous Recombinant Baculovirus Genomes in E. coli.** BioTech., 32:783-788, 2002.
- Hughes PR, van Beek NAM, Wood HA. **A modified droplet-feeding method for rapid assay of Bacillus thuringiensis and baculoviruses in noctuid larvae.** Journal of Invertebrate Pathology 48, 187–192, 1986.
- Huvenne H, Smagghe G. **Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review.** J Insect Physiol.; 56(3):227-35, 2010.
- Inceoglu AB, Kamita SG, Hammock BD. **Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook.** Adv Virus Res. 2006, 68, 323-60, 2006.
- Ishimwe E, Hodgson JJ, Passarelli AL. **Expression of the Cydia pomonella granulovirus matrix metalloprotease enhances Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus virulence and can partially substitute for viral cathepsin.** Virology; 481:166-78, 2015.
- Iwahori S, Ikeda M, Kobayashi M. **Association of Sf9 cell proliferating cell nuclear antigen with the DNA replication site of Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol.;85(10):2857-62, 2004.
- Iwaki T, Figuera M, Ploplis VA, Castellino FJ. **Rapid selection of Drosophila S2 cells with the puromycin resistance gene.** Biotechniques; 35(3):482-4, 486, 2003.
- Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L. **Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses.** Virus Res, 117(1):156-84, 2006
- Jackes R, Maromorosch E, Sherman K. **Stability of Insect Viruses in the Environment.** Viral Insecticides for Biological Control, AcademicPress, NewYork, NY, USA, 1985.
- Jehle JA, Abd-Alla AM, Wang Y. **Phylogeny and evolution of Hytrosaviridae.** J Invertebr Pathol.,112 Suppl:S62-7, 2013.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlask JM. **On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision.** Arch Virol., 151, 1257-66. Review, 2006 (A).
- Jehle JA, Lange M, Wang H, Hu Z, Wang Y, Hauschild R. **Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera.** Virology, 346, 180-193, 2006 (B).

- Jinn TR, Tu WC, Lu CI, Tzen JT. **Enhancing insecticidal efficacy of baculovirus by early expressing an insect neurotoxin, LqhIT2, in infected *Trichoplusia ni* larvae.** Appl Microbiol Biotechnol., 72(6), 1247-53, **2006**.
- Johnston KA, Lee MJ, Gatehouse JA, Anstee JH. **The partial purification and characterization of serine protease activity in *Helicoverpa armigera*.** Insect Biochem, 21, 389–397, **1991**.
- Jones KA, Moawad G, McKinley DJ, Grzywacz D. **The effect of natural sunlight on *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus.** Biocontrol Science and Technology 3, 189–197, **1993**.
- Jones KA. **Bioassays of entomopathogenic viruses.** In: Navon A and Asher KRS (eds) Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Department of Entomology Agricultural Research Organization Bet Dagan Israel. CAB international, New York, USA, pp. 95-140, **2000**.
- Kathryn AB. **Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).** Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension. <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>. **2000**.
- Katou Y, Ikeda M, Kobayashi M. **Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: Defective nuclear transport of the virions.** Virology, 347 (2): 455-465, **2006**.
- Keneth M. **The DDT Story.** The British Crop Protection Council, London, UK Carson, R. L. Silent Spring, The Riverside Press Cambridge, USA, **1992**.
- Kikhno I, Gutiérrez S, Croizier L, Croizier G, Ferber ML. **Characterization of *pif*, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol., 83(Pt 12):3013-22, **2002**.
- Kikhno I, Gutiérrez S, Croizier L, Croizier G, Ferber ML. **Characterization of *pif*, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol., 83(12):3013-22, **2002**.
- Kimelman A, Levy A, Sberro H, Kidron S, Leavitt A, Amitai G, Yoder-Himes DR, Wurtzel O, Zhu Y, Rubin EM, Sorek R. **A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria.** Genome Res.; 22(4):802-9, **2012**.
- Kimura RH, Choudary PV, Schmid CW. **Silk worm Bm1 SINE RNA increases following cellular insults.** Nucleic Acids Res.; 15;27(16):3380-7, **1999**.
- King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. **Virus Taxonomy 9th report.** Elsevier. ISBN : 978-0-12-384684-6, **2012**.
- Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. **Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors.** Nucleic Acids Res.; 11;18(19):5667-72, **1990**.
- Kitts PA, Possee RD. **A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency.** Biotechniques. 1993 May;14(5):810-7, **1993**.
- Kondo A, Maeda S. **Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx-mori* nuclear polyhedrosis-virus and *Autographa-californica* nuclear polyhedrosis-virus.** J Virol, 65 (7): 3625-3632, **1991**.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EEL. **Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes.** J. Mol. Biol., 305(3):567–580, **2001**.
- Kust N, Rybalkina E, Mertsalov I, Savchenko E, Revishchin A, Pavlova G. **Functional analysis of *Drosophila* HSP70 promoter with different HSE numbers in human cells.** PLoS One; 7;9(8):e101994, **2014**.
- Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. **Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies.** Virology, 173(2):759-63, **1989**.
- Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. **Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies.** Virology, 173(2):759-63, **1989**.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. **Insect pathogens as biological control agents: Back to the future.** J Invertebr Pathol., 27;132:1-41, **2015**.
- Lan Q, Riddiford LM. **DNA transfection in the ecdysteroid-responsive GV1 cell line from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.** In Vitro Cell Dev Biol Anim.; 33(8):615-21, **1997**.

- Lanier, L.M, and Volkman, LE. **Actin binding and nucleation by Autographa californica M nucleopolyhedrovirus**. *Virology* 243(1):167–177, 1998.
- Lanier, LM, Volkman, LE. **Actin binding and nucleation by Autographa californica M nucleopolyhedrovirus**. *Virology*, 243: 167–177, 1998.
- Lapointe R, Popham HJ, Straschil U, Goulding D, O'Reilly DR, Olszewski JA. **Characterization of two Autographa californica nucleopolyhedrovirus proteins, Ac145 and Ac150, which affect oral infectivity in a host-dependent manner**. *J Virol.*, 78(12):6439-48, 2004.
- Lauzon HA, Jamieson PB, Krell PJ, Arif BM. **Gene organization and sequencing of the Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus genome**. *J Gen Virol.*; 86(Pt 4):945-61, 2005.
- Leikina E, Onaran HO, Zimmerberg J. **Acidic pH induces fusion of cells infected with baculovirus to form syncytia**. *FEBS Lett.* 304(2–3):221–224, 1992.
- Li G, Chen H, Tang Q, Huang G, Deng R, Wang J, Wang X. **Effect of ac68 knockout and lef3 leading sequence disruption on viral propagation**. *Curr Microbiol*, 62(1):191-7, 2011.
- Li G, Wang J, Deng R, Wang X. **Characterization of AcMNPV with a deletion of ac68 gene**. *Virus Genes*, 37(1):119-27, 2008.
- Li X, Song J, Jiang T, Liang C, Chen X. **The N-terminal hydrophobic sequence of Autographa californica nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection**. *Arch Virol.*, 152(10):1851-8, 2007.
- Life Technologies. **Bac to Bac® Baculovirus Expression System. User Guide**. Document Part Number 10359. Publication Number MAN0000414, revision A.0, 2015.
- Lopez S, Arias CF. **Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance**. *Trends Microbiol.* 12:271–278, 2004.
- Luckow VA, Lee SC, Barry GB, Olins PO. **Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli**. *J Virol.*, 67(8): 4566–4579, 1993.
- Luque T, Finch R, Crook N, O'Reilly DR, Winstanley D. **The complete sequence of the Cydia pomonella granulovirus genome**. *J Gen Virol.* 82(Pt 10):2531-47, 2001.
- Machesky LM, Insall RH, Volkman LE. **WASP homology sequences in baculoviruses**. *Trends Cell Biol.* 11: 286–287, 2001.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. **Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol**. *Nat Biotechnol.*; 25(11):1307-13, 2007.
- Maruniak JE. **Molecular Biology of Anticarsia gemmatalis Baculovirus**. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (84), 107-111. 1989.
- Maruniak JE. **Molecular Biology of Anticarsia gemmatalis Baculovirus**. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, (84): 107-111, 1989.
- Massaro R. **Plagas insectiles del cultivo**. EEA Oliveros. Trabajo publicado en CREA, Cuaderno de actualización soja, capítulo 6, pág. 63-70, 2008.
- McCarthy CB, Dai X, Donly C, Theilmann DA. **Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ac142, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment**. *Virology*, 372, 325–39, 2008.
- McCarthy WJ, DiCapua RA. **Characterization of solubilized proteins from tissue culture-and host-derived nuclear polyhedra of Lymantria dispar and Autographa californica**. *Intervirology*, 11(3):174-81, 1979.
- Mccutchen BF, Choudary PV, Crenshaw R, Maddox D, Kamita SG, Palekar N, Volrath S, Fowler E, Hammock BD, Maeda S. **Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin potential for pest-control**. *BioTechnology (N Y)*, 9:848-852, 1991.
- McGaughey WH, Gould F, Gelernter W. **Bt resistance management**. *Nat Biotechnol*, 16(2), 144-6, 1998.
- McLachlin JR, Miller LK. **Stable transformation of insect cells to coexpress a rapidly selectable marker gene and an inhibitor of apoptosis**. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*; 33(7):575-9, 1997.

- Means JC, Passarelli AL. **Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses.** Proc Natl Acad Sci U S A. 25;107(21): 9825-30, **2010**.
- Meng T, Kolpe AB, Kiener TK, Chow VT, Kwang J. **Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human enterovirus 71 strains in mice.** PLoS One. 2011;6(7):e21757, **2011**.
- Mengual Gómez DL. **Virus de la poliedrosis nuclear múltiple de Anticarsia gemmatalis: Proteómica estructural e impacto del hospedador en su producción in vitro.** Tesis de doctorado, UNQ, **2013**.
- Miele SA, Garavaglia MJ, Belaich MN, Ghiringhelli PD. **Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation.** Int J Evol Biol.,2011-379424, **2011**.
- Miele, SAB. **Secuencias genómicas esenciales en Baculoviridae. Estudios básicos y aplicados.** Tesis de doctorado, UNQ, **2014**.
- Moscardi F, de Souza Lobo M, de Castro Batista ME, Moscardi LM, Szewczyk B. **Baculovirus pesticides: Present state and future perspectives.** In Microbes and Microbial Technology; Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, P., Eds.; Springer: New York, NY, USA, pp. 415–445, **2011**.
- Moscardi F. **A Nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian Soybeans.** In Biological Control: A Global Perspective; Vincent, C., Goethel, M.S., Lazarovits, G., Eds.; CAB International: Oxford, UK, pp. 344–352, **2007**.
- Moscardi F. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** Annu. Rev. Entomol. 44:257–289, **1999**.
- Motohashi T, Shimojima T, Fukagawa T, Maenaka K, Park EY. **Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus bacmid system.** Biochem Biophys Res Commun.; 1;326(3):564-9, **2005**.
- Nava-Pérez E, García-Gutiérrez C, Camacho-Báez JR, Vázquez-Montoya EL. **Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas.** Ra Ximhai. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable, Universidad Autónoma Indígena de México, **2012**.
- Nie Y, Fang M, Erlandson MA, Theilmann DA. **Analysis of the autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair lef3 and ac68 reveals that AC68 is a per os infectivity factor and that LEF3 is critical, but not essential, for virus replication.** J. Virol., 86: 3985-3994, **2012**.
- Nobiron I, O'Reilly DR, Olszewski JA. **Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection of Spodoptera frugiperda cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach.** J Gen Virol, (Pt 11): p. 3029-39, **2003**.
- Ohkawa T, Majima K, Maeda S. **A cysteine protease encoded by the baculovirus Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus.** J. Virol., 68, 6619-25, **1994**.
- Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD. **Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface.** J Cell Biol., 26;190(2):187-95, **2010**.
- Ohkawa T, Washburn JO, Sitapara R, Sid E, Volkman LE. **Specific binding of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of Heliothis virescens larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115 .** J Virol., 79(24):15258-64, **2005**.
- Ohkawa T, Washburn JO, Sitapara R, Sid E, Volkman LE. **Specific binding of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of Heliothis virescens larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115.** J Virol, 79 (24): 15258-15264, **2005**.
- Oliveira JV, de Brito AF, Braconi CT, de Melo Freire CC, Iamarino A, de Andrade Zanotto PM. **Modularity and evolutionary constraints in a baculovirus gene regulatory network.** BMC Syst Biol.; 4;7:87, **2013**.
- Oliveira JV, Wolff JL, Garcia-Maruniak A, Ribeiro BM, de Castro ME, de Souza ML, Moscardi F, Maruniak JE, Zanotto PM. **Genome of the most widely used viral biopesticide: Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol., 87(Pt 11):3233-50, **2006**.

- Oliveira MG, De Simone SG, Xavier LP, Guedes RN. **Partial purification and characterization of digestive trypsinlike proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*.** Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 140, 369–380, **2005**.
- Ono C, Kamagata T, Taka H, Sahara K, Asano S, Bando H. **Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences.** Virus Res., 165(2):197-206, **2012**.
- Pan L, Li Z, Gong Y, Yu M, Yang K, Pang Y. **Characterization of gp41 gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus.** Virus, 110(1-2):73-9, **2005**.
- Panizzi AR, Corrêa-Ferreira BS. **Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics.** Trends Entomol. (1),71-88, **1997**.
- **para la Sierra Central de Perú.** Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 48p, **2011**.
- Parodi L. **La agricultura aborigen argentina.** Eudeba, Buenos Aires, Argentina, **1966**.
- Passarelli AL, Guarino LA. **Baculovirus late and very late gene regulation.** Curr Drug Targets., 8(10):1103-15. Epub, **2007**.
- Patmanidi AL, Possee RD, King LA. **Formation of P10 tubular structures during AcMNPV infection depends on the integrity of host-cell microtubules.** Virology, 317(2): p. 308-20, **2003**.
- Pearson MN, Groten C, Rohrmann GF. **Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the Baculoviridae.** J. Virol. 74: p. 6126-6131, **2000**.
- Pearson MN, Russell R, Rohrmann GF. **Characterization of a baculovirus encoded protein that is associated with infected- cell membranes and budded virions.** Virology. 291: p. 22-31, **2001**.
- Peng K, van Lent JW, Vlak JM, Hu Z, van Oers MM. **In situ cleavage of baculovirus occlusion-derived virus receptor binding protein P74 in the peroral infectivity complex.** J Virol, 85(20):10710-8, **2011**.
- Peng K, van Lent JWM, Boeren S, Fang M, Theilmann DA, Erlandson MA, Vlak JM, van Oers M. **Characterization of Novel Components of the Baculovirus Per Os Infectivity Factor Complex.** J. Virol., 86(9):4981, **2012**.
- Peng K, van Oers MM, Hu Z, van Lent JW, Vlak JM. **Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion derived virus.** J. Virol. 84:9497–9504, **2010**.
- Pereira ME, Dorr FA, Peixoto NC, Lima-Garcia JF, Dorr F, Brito GG. **Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae).** Braz J Med Biol Res., 38, 1633–1641, **2005**.
- Perera O, Green TB, Stevens SM Jr, White S, Becnel JJ. **Proteins associated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions.** J Virol., 81(9):4585-90, **2007**.
- Perera OP, Valles SM, Green TB, White S, Strong CA, Becnel JJ. **Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV).** J Invertebr Pathol, 91(1):35-42, **2006**.
- Peter JV, Cherian AM. **Organic insecticides.** Anaesth Intensive Care., 28(1), 11-21, **2000**.
- Pijlman GP, Pruijssers AJ, Vlak JM. **Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects.** Gen Virol. 84(Pt 8):2041-9, **2003**.
- Possee RD. **Baculoviruses as expression vectors.** Current Opinion in Biotechnology, 8(5), 569–572, **1997**.
- Preston, A. **E. coli plasmid vectors.** Methods and Applications. Casali N, Preston A, (Eds).XII, 316p. Humana Press, **2003**.
- Prikhod'ko EA, Lu A, Wilson JA, Miller LK. **In vivo and in vitro analysis of baculovirus ie-2 mutants.** J Virol.; 73(3): p. 2460-8, **1999**.
- Rahman M, Gopinathan KP. **Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines.** Virus Res, 93(1): 13-23, **2003**.
- Rajendra W, Hackett KJ, Buckley E, Hammock BD. **Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: potential for effective pest management.** Biochim Biophys Acta; 1760(2):158-63, **2006**.
- Rangannan V, Bansal M. **Relative stability of DNA as a generic criterion for promoter prediction: whole genome annotation of microbial genomes with varying nucleotide base composition.** Mol Biosyst.;5(12):1758-69, **2009**.

- Rashidan KK, Nassoury N, Giannopoulos PN, Guertin C. **Transcription, translation, and immunolocalization of ODVP-6E/ODV-E56 and p74 proteins: two highly conserved ODV-associated envelope proteins of Choristoneura fumiferana Granulovirus.** J Biochem Mol Biol.; 38(1):65-70, **2005.**
- Rashidan KK, Nassoury N, Tazi S, Giannopoulos PN, Guertin C. **Choristoneura fumiferana Granulovirus p74 protein, a highly conserved baculoviral envelope protein.** J Biochem Mol Biol., 30;36(5):475-87, **2003.**
- Razin SV, Ioudinkova ES, Trifonov EN, Scherrer K. **Non-clonability correlates with genomic instability: a case study of a unique DNA region.** J Mol Biol.; 307(2):481-6, **2001.**
- Rice WC, Miller LK. **Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive Drosophila cells.** Virus Res., 6(2):155-72. Epub 1986/11/01, **1986.**
- Rodríguez VA, Belaich MN, Gómez DL, Sciocco-Cap A, Ghiringhelli PD. **Identification of nucleopolyhedrovirus that infect Nymphalid butterflies Agraulis vanillae and Dione juno.** J Invertebr Pathol. 106(2):255-62, **2011.**
- Rodríguez VA, Belaich MN, Quintana G, Sciocco-Cap A, Ghiringhelli PD. **Isolation and Characterization of a Nucleopolyhedrovirus from Rachiplusia nu (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae).** Int J Virol & Mol Biol, 1(3): 28-34, **2012.**
- Roelvink, PW, Corsaro, BG, Granados, RR. **Characterization of the Helicoverpa armigera and Pseudaletia unipuncta granulovirus enhancer genes.** J Gen Virol 76, 2693–2705, **1995.**
- Rohrmann GF. **Baculovirus diversity.** En: Baculovirus Molecular Biology, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); **2008.**
- Rohrmann GF. **Baculovirus molecular biology, 3rd ed.** National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>, **2013.**
- Röling NG, van de Fliert E. **Introducing integrated pest management in rice in Indonesia: a pioneering attempt to facilitate large-scale change.** In N.G. Röling and M.A.E. Wagemakers (eds.), Facilitating Sustainable Agriculture. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1998.**
- Rukmini V, Reddy CY, Venkateswerlu G. **Bacillus thuringiensis crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin.** Biochimie., 82, 109–116, **2000.**
- Russell RL, Rohrmann GF. **Characterization of P91, a protein associated with virions of an Orgyia pseudotsugata baculovirus.** Virology, 23;233(1):210-23, **1997.**
- Sagy O, Shamir R, Rechavi O. **Examination of exhaustive cloning attempts reveals that C. elegans piRNAs, transposons, and repeat sequences are efficiently cloned in yeast, but not in bacteria.** Front Genet.; 28;5:275, **2014.**
- Sah NK, Taneja TK, Pathak N, Begum R, Athar M, Hasnain SE. **The baculovirus antiapoptotic p35 gene also functions via an oxidant-dependent pathway.** Proc Natl Acad Sci U S A.; 27;96(9):4838-43, **1999.**
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. **Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989.**
- SantaLucia J Jr. **A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.** Proc Natl Acad Sci U S A.; 17; 95(4):1460-5, **1998.**
- Santos A, García M, Cotes AM, Villamizar L. **The effect of the formulation on the shelf-life of biopesticides based on two Colombian isolates of Trichoderma koningiopsis Th003 and Trichoderma asperellum Th034.** Rev Iberoam Micol., 29(3):150-6, **2012.**
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. **Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Rev., 62(3):775-806, **1998.**
- Schwartz RM, Dayhoff MO. **Matrices for detecting distant relationships.** In Atlas of Protein Sequences, M. O. Dayhoff, Ed, 353–358, National Biomedical Research Foundation, **1979.**
- Sciocco-Cap A, Parola AD, Goldberg AV, Ghiringhelli PD, Romanowski V. **Characterization of a granulovirus isolated from Epinotia aporema Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae.** Appl Environ Microbiol., 67, 3702-3706, **2001.**
- Senkevich TG, Ojeda S, Townsley A, Nelson GE, Moss B. **Poxvirus multiprotein entry-fusion complex.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:18572–18577, **2005.**

- Shackelton LA, Holmes EC. **The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts.** Trends Microbiol., 12, 458-65. Review, **2004.**
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. **Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector.** Proc Natl Acad Sci U S A.; 5;89(18):8794-7, **1992.**
- Sieburth PJ, Maruniak JE (a). **Growth characteristic of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).** In vitro Cell Dev Biol., (24), 195-198, **1988.**
- Sieburth PJ, Maruniak JE (b). **Susceptibility of a established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses.** J Invertebr Pathol., (52), 453-458, **1988.**
- Sieburth PJ, Maruniak JE. **Growth characteristic of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).** In vitro Cell Dev Biol., (24), 195-198, **1988 (A).**
- Sieburth PJ, Maruniak JE. **Susceptibility of a established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses.** J Invertebr Pathol. (52), 453-458, **1988 (B).**
- Simón O, Gutiérrez S, Williams T, Caballero P, López-Ferber M. **Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the pif gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV).** Virus Res.; 108(1-2):213-20, **2005.**
- Simón O, Palma L, Williams T, López-Ferber M, Caballero P. **Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus reveals sf58 as a new per os infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses.** J Invertebr Pathol., 109(1):117-26, **2012.**
- Slack JM, Arif BM. **The baculoviruses occlusion-derived viruses: virion structure and function.** Adv Virus Res., 69:99-165, **2007.**
- Slack JM, Dougherty EM, Lawrence SD. **A study of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein p74 using a GFP tag.** J Gen Virol., 82(Pt 9):2279-87, **2001.**
- Slack JM, Kuzio J, Faulkner P. **Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus.** J Gen Virol., 76, 1091-1098, **1995.**
- Slack JM, Lawrence SD, Krell PJ, Arif BM. **A soluble form of P74 can act as a per os infectivity factor to the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol, 91, 915–918, **2010.**
- Slack JM, Lawrence SD, Krell PJ, Arif BM. **Trypsin cleavage of the baculovirus occlusion-derived virus attachment protein P74 is prerequisite in per os infection.** J Gen Virol. 89(Pt 10):2388-97, **2008.**
- Slack JM, Lawrence SD. **Evidence for proteolytic cleavage of the baculovirus occlusion-derived virion envelope protein P74.** J Gen Virol. 86(Pt 6):1637-43, **2005.**
- Slavicek, JM and Popham HJ. **The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancins are components of occlusion-derived virus.** J Virol, 79(16): 10578-88, **2005.**
- Soares JS, Ribeiro BM. **Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A. gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses.** Res Microbiol.; 156(2):263-9, **2005.**
- Song J, Wang R, Deng F, Wang H, Hu Z. **Functional studies of per os infectivity factors of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol., 89(Pt 9):2331-8, **2008.**
- Sosa-Gómez DR. Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Londrina, Brazil. Personal Communication, **2014.**
- Sosa-Gómez DR., Moscardi F, Santos B, Alves LFA, and Alves SB. **Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina.** In Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios, eds. S. B. Alves and R. B. Lopes, pp. 49–68. Piracicaba: FEALQ, **2008.**
- Sparks WO Rohlfling A, Bonning BC. **A peptide with similarity to baculovirus ODV-E66 binds the gut epithelium of *Heliothis virescens* and impedes infection with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus.** J Gen Virol., 92, 1051–1060, **2011 [B].**

- Sparks WO, Harrison RL, Bonning BC. **Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut.** *Virology*, 409: 69–76, **2011** [A].
- Suenaga T1, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. **Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system.** *Microbiol Immunol.*; 58(9):513-22, **2014**.
- Szewczyk B, Rabalski L, Krol E, Sihler W, Lobo de Souza M. **Baculovirus biopesticides—A safe alternative to chemical protection of plants.** *J. Biopestic.*, 2, 209–216, **2009**.
- Taha A, Nour-El-Din A, Croizier L, Ferber ML, Croizier G. **Comparative analysis of the granulin regions of the Phthorimaea operculella and Spodoptera littoralis granuloviruses.** *Virus Genes*; 21(3):147-55, **2000**.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599, **2007**.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol.* 30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197, **2013**.
- Tanada Y, Heiss RT. **Baculoviridae. Granulosis viruses.** En: Atlas of invertebrate viruses, JR Adams y JR Bonami (ED), Academic Press, San Diego, EEUU., 227-257, **1991**.
- Terra WR, Ferreira C. **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109B, 1-62, **1994**.
- TerraWR, Ferreira C. **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** *Comp Biochem Physiol.*, 109, 1–62, **1994**.
- Teubal M, Giarraca N. **El campo argentino en la encrucijada.** Ed. Alianza, **2005**.
- Thézé J, Bézier A, Periquet G, Drezen JM, Herniou EA. **Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 20;108(38):15931-5, **2011**.
- Thiem SM, Cheng XW. **Baculovirus host-range.** *Virologica Sinica*, 24(5): 436-457, **2009**.
- Thiem SM, Du X, Quentin ME, Berner MM. **Identification of a Baculovirus gene that promotes Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line.** *J Virol*, 70 (4): 2221-2229, **1996**.
- Thompson CG, Maksymiuk B. **Virus in Biological Control.** Laboratory and simulated field tests. En: The Douglas-fir tussock moth: a synthesis, MW Brookes, RW Starck y RW Campbell (Ed), USDA tech. Bull. No 1585, Washington, EEUU., 147-149, **1978**.
- Thompson JD, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D. **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882, **1997**.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research* 11; 22(22), 4673-80, **1994**.
- Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T. **Flubendiamide, a novel class insecticide with high activity against Lepidoptera.** *J Pestic Sci* 30, 354-360, **2005**
- Toprak U, Harris S, Baldwin D, Theilmann D, Gillott C, Hegedus DD, Erlandson MA. **Role of enhancin in Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus virulence: selective degradation of host peritrophic matrix proteins.** *J Gen Virol.*, 93(Pt4):744-53, **2012**.
- Torres Braconi C, Ardisson-Araújo DM, Paes Leme AF, Oliveira JV, Pauletti BA, Garcia-Maruniak A, Ribeiro BM, Maruniak JE, Zanotto PM. **Proteomic analyses of baculovirus Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus budded and occluded virus.** *J Gen Virol.*, 95(Pt 4):980-9, **2014**.
- Uhlířová M, Asahina M, Riddiford LM, Jindra M. **Heat-inducible transgenic expression in the silkworm Bombyx mori.** *Dev Genes Evol.*; 212(3):145-51, **2002**.
- Urretabizkaya N, Vasicek A, Saini E. **Insectos Perjudiciales de Importancia Agronómica, I-Lepidópteros.** Ediciones INTA, **2010**.
- van den Bosch R, Messenger PS, Gutierrez AP. **An Introduction to Biological Control.** Plenum Press, 247 págs, **1982**.
- van Oers MM, Vlak JM. **Baculovirus genomics.** *Current Drug Targets*, 8(10), 1051–1068, **2007**.

- van Regenmoertel MHV. **Introduction to the species concept in virus taxonomy.** In: Virus Taxonomy- Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, pp. 3 –16, **2000.**
- Virto C, Zárate CA, López-Ferber M, Murillo R, Caballero P, Williams T. **Gender-mediated differences in vertical transmission of a nucleopolyhedrovirus.** PLoS One 5;8(8):e70932, **2013.**
- Vlak, JM, Klinkenberg FA, Zaal KJ, Usmany M, Klinge-Roode EC, Geervliet JB, Roosien J, van Lent JW. **Functional studies on the p10 gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-b-galactosidase fusion gene.** J. Gen. Virol.,69: 765-776, **1988.**
- Volkman LE, Goldsmith PA. **Mechanism of neutralization of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis.** Virology 143(1):185–195, **1985.**
- Volkman LE. **Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton.** Curr Drug Targets.8(10):1075-83, **2007.**
- Volkman LE. **The 64k envelope protein of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.** Curr Top Microbiol Immunol., 131, 103-118, **1986.**
- Volkman, LE. **The 64K envelope protein of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 131: 103-118, **1986.**
- Volohonsky G, Terenzi O, Soichot J, Naujoks DA, Nolan T, Windbichler N, Kapps D, Smidler AL, Vittu A, Costa G, Steinert S, Levashina EA, Blandin SA, Marois E. **Tools for Anopheles gambiae Transgenesis.** G3 (Bethesda); 13;5(6):1151-63, **2015.**
- Wallimann T. **Bt toxin: assessing GM strategies.** Science. 7(287), 5450-41, **2000.**
- Wang H, Deng F, Pijlman GP, Chen X, Sun X, Vlak JM, Hu Z. **Cloning of biologically active genomes from a Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome.** Virus Res., 97(2):57-63, **2003.**
- Wang H, Deng F, Pijlman GP, Chen X, Sun X, Vlak JM, Hu Z. **Cloning of biologically active genomes from a Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome.** Virus Res.; 97(2):57-63, **2003.**
- Wang XF, Zhang BQ, Xu HJ, Cui YJ, Xu YP, Zhang MJ, Han YS, Lee YS, Bao YY, Zhang CX. **ODV-associated proteins of the Pieris rapae granulovirus.** J Proteome Res., 3;10(6):2817-27, **2011.**
- Wang Y, Bininda-Emonds OR, van Oers MM, Vlak JM, Jehle JA. **The genome of Oryctes rhinoceros nudivirus provides novel insight into the evolution of nuclear arthropod-specific large circular double-stranded DNA viruses.** Virus Genes, 42(3):444-56, **2011.**
- Wang Y, Kleespies RG, Huger AM, Jehle JA. **The genome of Gryllus bimaculatus nudivirus indicates an ancient diversification of baculovirus-related nonoccluded nudiviruses of insects.** J Virol. 81(10):5395-406, **2007.**
- Wang Y, Kleespies RG, Huger AM, Jehle JA. **The genome of Gryllus bimaculatus nudivirus indicates an ancient diversification of baculovirus-related nonoccluded nudiviruses of insects.** J Virol. 81(10): 5395-406, **2007.**
- Wang, P. and Granados RR. **An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin.** Proc Natl Acad Sci U S A, 94(13): 6977-82, **1997.**
- Wang, R, Deng F, Hou D, Zhao Y, Guo L, Wang H, Hu Z. **Proteomics of the Autographa californica Nucleopolyhedrovirus Budded Virions.** J Virol, 84: 7233 – 7242, **2010.**
- Wardhaugh KG. **Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: an Australian perspective.** Environ Toxicol Chem., 24(4), 789-96, **2005.**
- Washburn JO, Kirkpatrick BA, Volkman LE. **Comparative pathogenesis of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus in larvae of Trichoplusia ni and Heliothis virescens.** Virology, 209, 561-568, **1995.**
- Washburn JO, Trudeau D, Wong JF, Volkman LE. **Early pathogenesis of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus and Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus in Heliothis virescens: a comparison of the “M” and “S” strategies for establishing fatal infection.** J Gen Virol, 84: 343-351, **2003.**

- Wei W, Xin H, Roy B, Dai J, Miao Y, Gao G. **Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori***. PLoS One; 9(7):e101210, 2014.
- Westenberg M, Veenman F, Roode EC, Goldbach RW, Vlak JM, Zuidema D. **Functional analysis of the putative fusion domain of the baculovirus envelope fusion protein F**. J Virol., 78, 6946-6954, 2004.
- Westenberg M, Wang H, IJkel WF, Goldbach RW, Vlak JM, Zuidema D. **Furin is involved in baculovirus envelope fusion protein activation**. J Virol., 76, 178-184, 2002.
- Williams, T. Trevor Williams Homepage. <http://www.trevorwilliams.info/index.html>
- Wilson ME, Consigli RA. **Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella***. Virology. (143), 526-535, 1985.
- Wilson ME, Price KH. **Association of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) with the nuclear matrix**. Virology;167(1):233-41, 1988.
- Wimmer EA. **Innovations: applications of insect transgenesis**. Nat Rev Genet.; 4(3):225-32. Review, 2003.
- Wolff JLC, Valicente FH, Martins R, Oliveira JV, Zanotto PM. **Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses**. Journal of General Virology, 89 (5): 1202–11, 2008.
- Wong EY, Hironaka CM, Fischhoff DA. ***Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants**. Plant Mol Biol., 20(1):81-93, 1992.
- Wu YJ, Teng CY, Chen YJ, Chen SC, Chen YJ, Lin YT, Wu TY. **Internal ribosome entry site of *Rhopalosiphum padi* virus is functional in mammalian cells and has cryptic promoter activity in baculovirus-infected Sf21 cells**. Acta Pharmacol Sin.;29(8):965-74, 2008.
- Xiang X, Chen L, Guo A, Yu S, Yang R, Wu X. **The *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) ODV-E56 envelope protein is also a per os infectivity factor**. Virus Res., 155(1):69-75, 2011.
- Xiang X, Chen L, Hu X, Yu S, Yang R, Wu X. ***Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus odv-e66 is an essential gene required for oral infectivity**. Virus Res.; 158(1-2):72-8, 2011 (B).
- Xiang X, Shen Y, Yang R, Chen L, Hu X, Wu X. ***Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus BmP95 plays an essential role in budded virus production and nucleocapsid assembly**. J Gen Virol., 94(Pt 7):1669-79, 2013.
- Xing K, Deng R, Wang J, Feng J, Huang M, Wang X. **Analysis and prediction of baculovirus promoter sequences**. Virus Res.; 113(1):64-71, 2005.
- Xu F, Ince IA, Boeren S, Vlak JM, van Oers MM. **Protein composition of the occlusion derived virus of *Chrysodeixis chalcites* nucleopolyhedrovirus**. Virus Res., 158(1-2):1-7, 2011.
- Xu HJ, Yang ZN, Wang F, Zhang CX. ***Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF79 encodes a 28-kDa structural protein of the ODV envelope**. Arch Virol., 151(4):681-95, 2006.
- Xu HJ, Yang ZN, Zhao JF, Tian CH, Ge JQ, Tang XD, Bao YY, Zhang CX. ***Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production**. J Gen Virol., 89(5):1212-9, 2008.
- Yang S, Miller LK. **Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1**. J Virol., 73(4):3404-9. Epub, 1999.
- Yang YT, Lee DY, Wang Y, Hu JM, Li WH, Leu JH, Chang GD, Ke HM, Kang ST, Lin SS, Kou GH, Lo CF. **The genome and occlusion bodies of marine *Penaeus monodon* nudivirus (PmNV, also known as MBV and PemoNPV) suggest that it should be assigned to a new nudivirus genus that is distinct from the terrestrial nudiviruses**. BMC Genomics. 25;15:628, 2014.
- Yao L, Zhou W, Xu H, Zheng Y, Qi Y. **The *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus envelope protein P74 is required for infection of the host midgut**. Virus Res., 1;104(2):111-21, 2004.
- Yao LG, Liu ZC, Zhang XM, Kan YC, Zhou JJ. **A highly efficient method for the generation of a recombinant *Bombyx mori* nuclear-polyhedrosis-virus Bacmid and large-scale expression of foreign proteins in silkworm (*B. mori*) larvae**. Biotechnol Appl Biochem. 48(Pt 1):45-53, 2007.
- Yin C, Yu J, Wang L, Li Z, Zhang P, Pang Y. **Identification of a novel protein associated with envelope of occlusion-derived virus in *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus**. Virus Genes; 26(1):5-13, 2003.

- Young JC, Mackinnon EA, Faulkner P. **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, **1993**.
- Yu M, Carstens EB. **Identification of a domain of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus single-strand DNA-binding protein LEF-3 essential for viral DNA replication.** J Virol.; 84(12): p. 6153-62, **2010**.
- Yuan M, Huang Z, Wei D, Hu Z, Yang K, Pang Y. **Identification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus ac93 as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids.** J Virol, 85(22): p. 11664-74, **2011**.
- Zacharia JT. **Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides, Pesticides in the Modern World** - Trends in Pesticides Analysis, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-437-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticidesanalysis/identity-physical-and-chemical-properties-of-pesticides>, **2011**.
- Zerba, M. **Enciclopedia del Centro Científico Tecnológico (CCT) CONICET Mendoza** <http://www.mendoza-conicet.gob.ar/portal>. **2011**
- Zhang X, Liang Z, Yin X, Shao X. **Proteomic analysis of the occlusion-derived virus of *Clostera anachoreta* granulovirus.** J Gen Virol., 96(8):2394-404, **2015**.
- Zhao Y, Chapman DA, Jones IM. **Improving baculovirus recombination.** Nucleic Acids Res.; 15;31(2):E6-6, **2003**.
- Zhao Y, Chapman DA, Jones IM. **Improving baculovirus recombination.** Nucleic Acids Res.; 15;31(2):E6-6, **2003**.
- Zhou W, Yao L, Xu H, Yan F, Qi Y. **The Function of Envelope Protein P74 from *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in Primary Infection to Host.** Virus Genes 30:2, 139–150, **2005**.
- Zhou W, Yao L, Xu H, Yan F, Qi Y. **The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host.** Virus Genes; 30(2):139-50, **2005**.
- Zhu S, Wang W, Wang Y, Yuan M, Yang K. **The baculovirus core gene ac83 is required for nucleocapsid assembly and per os infectivity of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus.** J Virol., 87(19):10573-86, **2013**.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director y co-director, Dr. P. Daniel Ghiringhelli y Dr. Mariano N. Belaich por haberme permitido desarrollar este trabajo. Su orientación y apoyo fue esencial para llevar adelante este proceso. También, expresar mi gratitud con la Universidad Nacional de Quilmes, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por proveer de subsidios y espacio para desarrollar el trabajo presentado.