

Estudio genómico y proteómico de cepas de baculovirus en líneas celulares de insectos

Giezy Sunem Asarela Feria Huitz (1), María Cristina Del Rincón Castro (2)

¹ [Ing. en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior de Macuspana] [giezy.feria@gmail.com]

² [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] [cdelrincon@ugto.mx]

Resumen

Los baculovirus son los virus entomopatógenos más usados como bioinsecticidas. Causan epizootias naturales en los insectos, persisten en el suelo por largos períodos de tiempo, son altamente específicos, e infectan solamente artrópodos (mayoritariamente a insectos). En este trabajo se analizó a nivel genómico a un nucleopoliedrovirus (NPV) de *Autographa californica* (AcNPV), y se realizó el análisis de las proteínas expresadas en líneas celulares de insectos, a diferentes tiempos post-infección. Se infectó la línea celular de insectos BTI-Tn5B1-4 (High Five) con viriones del AcNPV, se extrajo DNA, se digirió con dos enzimas de restricción EcoRI y HindIII y finalmente se realizaron análisis de proteínas en geles SDS-PAGE. La línea celular High Five fue permisiva para la infección con AcNPV y se obtuvieron cuerpos de oclusión en el núcleo de las células. Los patrones con las enzimas de restricción permitieron identificar a esta cepa y se estimó un peso molecular aproximado de 130 kb para la misma. Las proteínas obtenidas por SDS-PAGE permitieron determinar que conforme la infección del virus progresa, disminuyen las proteínas expresadas por las células de los insectos. Es posible estudiar el genoma y proteoma de los baculovirus utilizando líneas celulares de insectos en lugar de los insectos completos.

Abstract

The baculovirus are the entomopathogenic virus more used as bio-insecticides. They provoke natural epizooty in insects, persist in soil for long periods of time, are highly specific, and infect only arthropods (mainly insects). In this work we were analyzed at the genomic level to a nucleopolyhedrovirus (NPV) of *Autographa californica* (AcNPV), and analysis of proteins expressed in insect cell lines, at different times post-infection was performed. Insect cell line BTI-Tn5B1-4 (High Five) was infected with virions of AcNPV, DNA was extracted and digested with two restriction enzymes EcoRI and HindIII. Finally protein analysis were performed on SDS-PAGE gels. High Five cell line was permissive for infection with AcNPV and occlusion bodies were obtained in the nucleus of cells. Patterns with restriction enzymes allowed the identification of this strain and an approximate molecular weight of 130 kb was estimated. Proteins obtained by SDS-PAGE according allowed to determine that the virus infection progresses, decrease the proteins expressed by insect cells. It is possible that the Baculovirus genome and proteome can be studied using insect cell lines rather than the whole insects.

Palabras Clave

Baculovirus, AcNPV, control biológico, DNA, proteínas

INTRODUCCIÓN

El mercado actual de los bioinsecticidas abarca el 2.5 % de los insecticidas totales, y se estima que para finales del 2011 alcanzará los niveles del 4.2%. Los bioinsecticidas se engloban dentro del control biológico de plagas y su naturaleza puede ser muy diversa, abarcando desde los parasitoides, y depredadores, hasta los agentes patógenos. Dentro de éstos, un grupo muy importante como agentes de control biológico lo representan los virus entomopatógenos, particularmente los Baculovirus. Estos son los virus entomopatógenos más diversos, y se han aislado casi de manera exclusiva de insectos, principalmente de los órdenes Lepidóptera, Hymenóptera y Coleóptera, con la excepción de aquellos aislados de crustáceos y arañas. Los baculovirus contienen como material genético DNA de doble cadena, el cuál varía de 80 a 130 kb y una partícula viral con forma de bastón. Los viriones se ocuyen en cuerpos de oclusión (CO's) que se conocen como poliedros, los cuales están formados principalmente por una proteína denominada poliedrina [1].

Dentro de esta familia se han reconocido básicamente a dos grupos: los Nucleopolyhedrovirus a los cuales se les conoce comúnmente como NPV; y el segundo grupo es el de los Granulovirus, conocidos como GV. Recientemente se propuso una nueva división dentro de la familia Baculoviridae, en la cual se proponen cuatro géneros: 1) *Alphabaculovirus*, NPVs de lepidópteros, 2) *Betabaculovirus*, GVs de lepidópteros; 3) *Gammabaculovirus*: NPV's de himenópteros y 4) *Deltabaculovirus*, NPV's de dípteros [2].

Los insectos infectados con baculovirus adquieren los CO's presentes en el ambiente o en el alimento, y una vez que el virus entra al insecto, debido a un ambiente de alta alcalinidad (pH arriba de 10) en el intestino medio, los CO's se degradan liberándose los viriones envueltos [3]. Posteriormente, los viriones se fusionan a las microvellosidades de las células epiteliales y las nucleocápsides desnudas se dirigen hacia al núcleo celular, en el cual el virus se replica por vez primera, sin formar CO's. La progenie resultante, gema a través de estas células, hacia la hemolinfa del

insecto, por cuya vía accede al resto de los tejidos del mismo, causando una infección sistémica al reproducirse por segunda vez las partículas virales y ocluirse en un proceso *de novo* en poliedros recién formados. En una infección causada por baculovirus, las larvas afectadas no presentan síntomas durante los primeros días después de la infección. Posteriormente se observa un cambio en el comportamiento del insecto, ya que sus movimientos son más lentos, deja de comer y el crecimiento se detiene [4] [5].

En la actualidad se han establecido diversas líneas celulares a partir de distintos tejidos de insectos, dentro de los que se destacan los ovarios de hembras adultas y tejido embrionario. Inicialmente, los medios de cultivos para el crecimiento celular consistían de soluciones salinas balanceadas y suplementadas con 5-50% de hemolinfa del insecto [6]. No obstante existen muy pocos estudios relacionados con el análisis de la expresión de proteínas en células de insectos.

Debido a estas razones el estudio genómico a nivel de patrones de fragmentos de restricción de cepas de baculovirus, como el baculovirus asialdo del gusano de la alfalfa *Autographa californica* (AcNPV), y el análisis de las proteínas expresadas en líneas celulares de insectos, a diferentes tiempos del ciclo post-infección, permitirá entender mejor los mecanismos moleculares que soportan la replicación de los baculovirus y su optimización, ya sea como vectores de expresión de genes eucarióticos, o como biocontroladores de insectos plaga dentro de programas de control biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. La cepa AcNPV fue donada por el Dr. Brian Federici, de la University of California at Riverside.

Líneas celulares. Se utilizó la línea celular de insectos BTI-Tn5B1-4 (High Five), la cual se mantuvo en medio ExCell 405 a 28°C, utilizando frascos de cultivo de células de 25 cm² (Nuncloc, Thermo Scientific). Se siguió el protocolo de mantenimiento previamente establecidos [7].

Infección de la línea celular. Las células se infectaron a una concentración de 2.5x10⁴ a 1.2 x 10⁶ cel/cm². Para ello se retiró el medio de cultivo

en el cual se encontraban las células a infectar y se adicionó 1 ml de virones del AcNPV, manteniéndose en agitación a 50 rpm/28°C durante 2 horas; transcurrido el tiempo, se procedió a adicionar 5 ml de medio ExCell 405. Se monitoreó la infección de AcNPV durante 5 días en un microscopio invertido.

Análisis de infección en línea celular. La toma de muestra de la línea celular se realizó a los tiempos 24, 48, 72, 96 y 120 horas pos-infección, monitoreando la infección en el microscopio invertido (Primo, Carl Zeiss Microimaging). En la campana de flujo laminar, se golpeaba cada frasco para desprender las células y se tomaba 1mL del medio de cultivo que era transferido a un tubo Eppendorf. Las muestras que fueron utilizadas para obtener el perfil proteico mediante geles de poli-acrilamida SDS-PAGE, fueron sometidas a 3 lavados con agua destilada estéril a fin de eliminar la mayor cantidad de medio de cultivo posible, centrifugando (centrífuga Thermo Scientific Fresco 21) a 10000 rpm por 5 minutos entre cada lavado. Las muestras lavadas se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

Extracción del DNA del AcNPV. Los viriones purificados se centrifugaron a 28,000 rpm por 40 min a 4°C. se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 400 μ L de buffer de reacción para Proteinasa K (Tris- HCl 0.01 M, EDTA 0.005 M, SDS 0.5%) se incubó por 15 min a 60°C. la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 10 μ L de Proteinasa K (1 μ g / μ L en buffer de reacción para Proteinasa K) se incubó a 37°C por 2 h, se añadió un volumen de fenol equilibrado, se mezcló por inversión durante 10 min y se centrifugó 5 min a 14,000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Se realizaron 2 extracciones en un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1) bajo las condiciones anteriores. Se añadió un volumen de cloroformo/ alcohol isoamilico (24:1) realizando la extracción como el paso anterior. Se recuperó el sobrenadante, se adicionó un volumen igual de isopropanol y un décimo de volumen de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 1 h. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1mL de etanol al 70% centrifugando a 13,000 rpm por 3 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se secó la pastilla y el DNA se resuspendió en 40 μ L de agua.

Análisis con enzimas de restricción. El DNA se digirió con las enzimas de restricción Eco RI y HindIII, utilizando 5 μ L de DNA, 2 μ L de amortiguador (especifico para cada enzima) y 3 μ L de enzima, se incubó a 37°C por 2 horas en baño María. Los digeridos se analizaron geles de agarosa al 0.6% de 15x15 cm a 25 volts toda la noche o 15 horas aproximadamente. Los fragmentos se observaron con ayuda de un Gel Doc Ez System, usando la pantalla de luz ultravioleta (UV), después de haber sido teñidos con Gel Red.

Análisis de SDS-PAGE. Los geles de corrida se realizaron con 2.18 ml de agua destilada estéril, 2.24 ml de Tris 1M, 60 μ L de SDS 10%, 40 μ L de persulfato de amonio, 1.5 μ L de acrilamida y 2 μ L de Temed. Los geles concentradores contenían 1.72 ml de agua destilada estéril, 250 μ L de Tris 1.25M, 25 μ L de SDS 10%, 25 μ L de persulfato de amonio, 1337.5 μ L de acrilamida y 2.5 μ L de Temed. Se usaron 20 μ L de los CO's cuantificados y purificados, se agregaron 40 μ L de agua destilada estéril se resuspendieron y centrifugaron a 13,000 rpm por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspenderá con 50 μ L de solución de Laemmli's, los tubos se colocaron en agua hirviendo a 100°C por 10 minutos. Los geles se corrieron a 50 volts por 15 minutos, y a 90 volts por 2 horas 20 minutos, se tiñeron con azul de Coomassie por 30 minutos y se destiñeron en una solución de distinción por 24-48 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La infección con AcNPV sobre la línea celular High Five fue muy exitosa observándose una citopatología típica del virus sobre las células como puede observarse en la Imagen 1, donde entre las 48 y 72 horas pos-infección se pudieron observar los CO's de AcNPV y a partir de las 96 horas después de la infección iniciaba el proceso de lisis celular.

Con el establecimiento de las líneas celulares de insectos, se han podido obtener grandes avances en el estudio de los baculovirus. Hasta el momento se han establecido diversas líneas celulares que soportan la replicación de NPV's eficientemente. El crecimiento óptimo de los NPV's está influenciado por una gran cantidad de factores como: temperatura, composición de medio

de cultivos, multiplicidad de infección (M.O.I.), tipo y densidad celular, así como la tasa de división celular, entre otros [8]. En el presente trabajo se mantuvieron constantes todas estas condiciones y el resultado fue la infección efectiva del AcNPV en la misma.

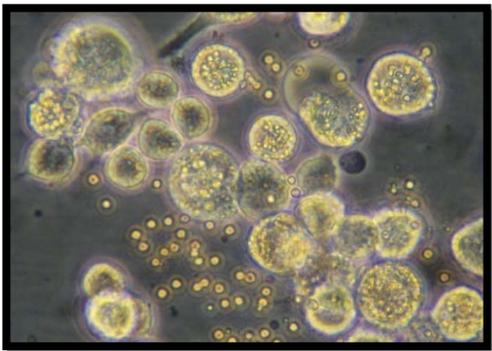


IMAGEN 1: Células High Five infectadas con AcNPV

La digestión del DNA extraído se realizó con dos enzimas de restricción EcoRI y HindIII. En la imagen 2, se muestran los patrones de restricción obtenidos al digerir el DNA del AcNPV con ambas enzimas de restricción. Como puede observarse se obtuvo un patrón de restricción distinto para cada enzima. Con la enzima EcoRI, se obtuvieron 16 fragmentos cuyo peso molecular osciló desde las 0.9 kb hasta más de 12 kb. Para el caso de la digestión con la enzima HindIII se detectaron 24 fragmentos que oscilaron entre las 0.9 y más de 12 kb. Por lo que se sugiere un tamaño del genoma de AcNPV de alrededor de 130 kb.

Por otro lado ya se han utilizado análisis con enzimas de restricción para comparar a los baculovirus aislados de diversas especies. Así se han comparado a los virus de AcNPV y TnNPV, encontrándose que ambos estaban muy relacionados pero las diferencias observadas entre ellos fueron suficientes para considerarlos como variantes [9]. Asimismo, se ha podido corroborar que los NPV's de *A. californica*, *T. ni* y *G. mellonella*, son virus relacionados pero que a su vez representan a cepas diferentes [10].

En la imagen 3 se puede observar a las proteínas obtenidas a partir de la infección de la

línea celular High Five a diferentes tiempos pos-infección (p.i.) con el baculovirus AcNPV.

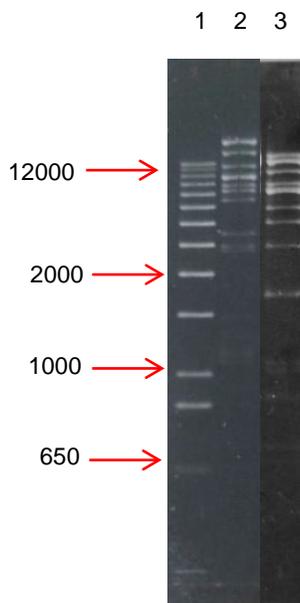


IMAGEN 2: Patrones de fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas EcoRI y HindIII al digerir el DNA del AcNPV. Carril 1: Marcador de peso molecular Ladder 1 kb (en Kb), Carril 2: DNA de AcNPV digerido con HindIII, Carril 3: DNA de AcNPV digerido con EcoRI.

Al inicio del proceso de infección fue difícil observar cambios a las 24 horas p.i., pero si se comenzaron a observar diferencias entre las células control sin infectar y las células infectadas con el AcNPV a partir de las 48 horas pos-infección, donde se observó una banda de un poco más de 40kDa cuya expresión aumentaba conforme la infección progresaba e incluso se pudo detectar hasta las 120 horas pos-infección.

Asimismo, a partir de las 48 horas pos-infección se pudo observar la expresión de la proteína poliedrina, con un peso aproximado de 30kDa cuya expresión se mantuvo hasta las 120 p.i. A las 72 horas p.i. se pudo observar la expresión de una proteína de alrededor de 18 kDa, cuya expresión se mantuvo hasta las 120 horas p.i. Se pudo observar la expresión de otras proteínas inducidas por el virus y muchas más proteínas en las células de insecto cuya expresión fue reprimida por efecto de la infección viral.

En estudios previos [11], se reportó la expresión diferencial de genes de los baculovirus AcNPV y BmNPV, en células de insectos Sf9, derivadas de *Spodoptera frugiperda*, y en la línea celular High Five. Los autores concluyeron en ese trabajo, que la mayoría de los genes que se expresaban de manera diferencial en ambas líneas celulares, correspondían a genes involucrados en el ciclo de vida de los virus. En este trabajo se pudieron observar marcadas diferencias en la expresión de proteínas a los distintos tiempos p.i., pero es necesario realizar más estudios para determinar con que genes están relacionadas las proteínas expresadas de manera diferencial.

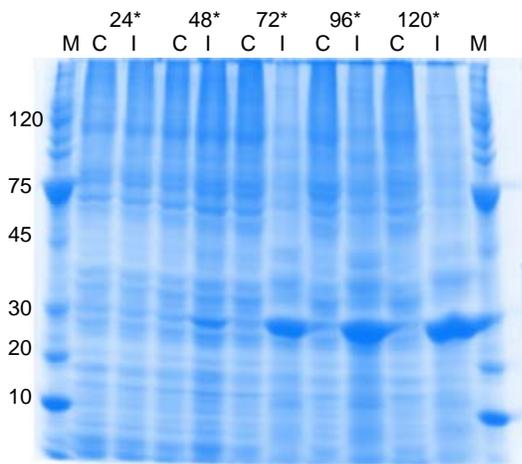


IMAGEN 3: Patrones de proteínas obtenidos a los diferentes tiempos pos-infección de las células High Five infectadas con el AcNPV. M: Marcador de peso molecular (kDa) Benchmark (Invitrogen). C: Células control sin infectar. I: Células infectadas con AcNPV. *Horas pos-infección.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró la infección permisiva de la línea celular de insectos High Five por parte del baculovirus AcNPV. Asimismo, se determinó que este virus es una cepa original diferente a las ya reportadas, con un tamaño aproximado de genoma de 130 kb. A nivel proteómico se determinó que el baculovirus AcNPV afecta la expresión de las proteínas expresadas por las células de insecto cultivadas *in vitro*, mediante una represión de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Dirección de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por el financiamiento parcial de esta investigación y por la beca otorgada a Asarela Feria, por parte del programa de Verano de Investigación Científica. También se agradece a al Instituto Tecnológico Superior de Macuspana y al CCYTET, por el apoyo económico para la realización de la estancia de verano de Asarela Feria. Las autoras agradecen a la M.B. Ma. de los Ángeles Bivián Hernández, por el apoyo técnico otorgado.

REFERENCIAS

- [1] Tinsley, T.W. & Kelly D.C. (1985). Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. En K. Maramorosh & K.E. Sherman (Eds.), *Viral insecticides for biological control* (pp.3-25.). Orlando, Florida. Academic Press.
- [2] Jehle J. A., Blissard, G.W., Bonning, B. C. Cory, J. S. Herniou, E. A. Rohmann, G. F. Theilmann, D. A. Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch Virol.* 151, 1257-1266.
- [3] Granados, R. R. (1980) Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotech. and Bioengineering.* XXII, 377-1405.
- [4] Mazzone, H. M. (1985). Pathology associated with baculovirus infection. En K. Maramorosh & K. E. Sherman (Eds.), *Viral insecticides for biological control* (pp. 81-120). Orlando, Florida. Academic Press.
- [5] Granados, R.R.& Williams, K.A. (1986). *In Vivo* infection and replication of baculoviruses. En Granados, R.R.& Federici, B.A. (Eds.), *The biology of baculoviruses* (pp. 89-108). Boca Ratón, Florida. CRC Press.
- [6] Cameron, I. R., Possee, R.D. & Bishop, D.H. (1989). Insect cell culture technology in baculovirus expression systems. *TIBTECH.* 7, 66.
- [7] Lynn, D. E. (2002). Methods for maintaining insect cell cultures. *Journal of Insect Science,* 2 (9), 1-6.
- [8] Billimoria, S.L. (1991). The biology of nuclear polyhedrosis viruses. En Kurstak, L. (Ed.). *Viruses of Invertebrates* (99. 1-72). New York, N.Y. Marcel Dekker, INC.
- [9] Miller, L.K. & Dawes, K.P. (1978). Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses: *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1206.
- [10] Summers, M.D. & Smith, G.E. (1978). Baculovirus structural polypeptides. *Virology* 84, 790.
- [11] Yamagishi J, Isobe R, Takebuchi T, & Bando H. (2003). DNA microarrays of baculovirus genomes: differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines. *Archives of Virology* 48(3), 587-97.