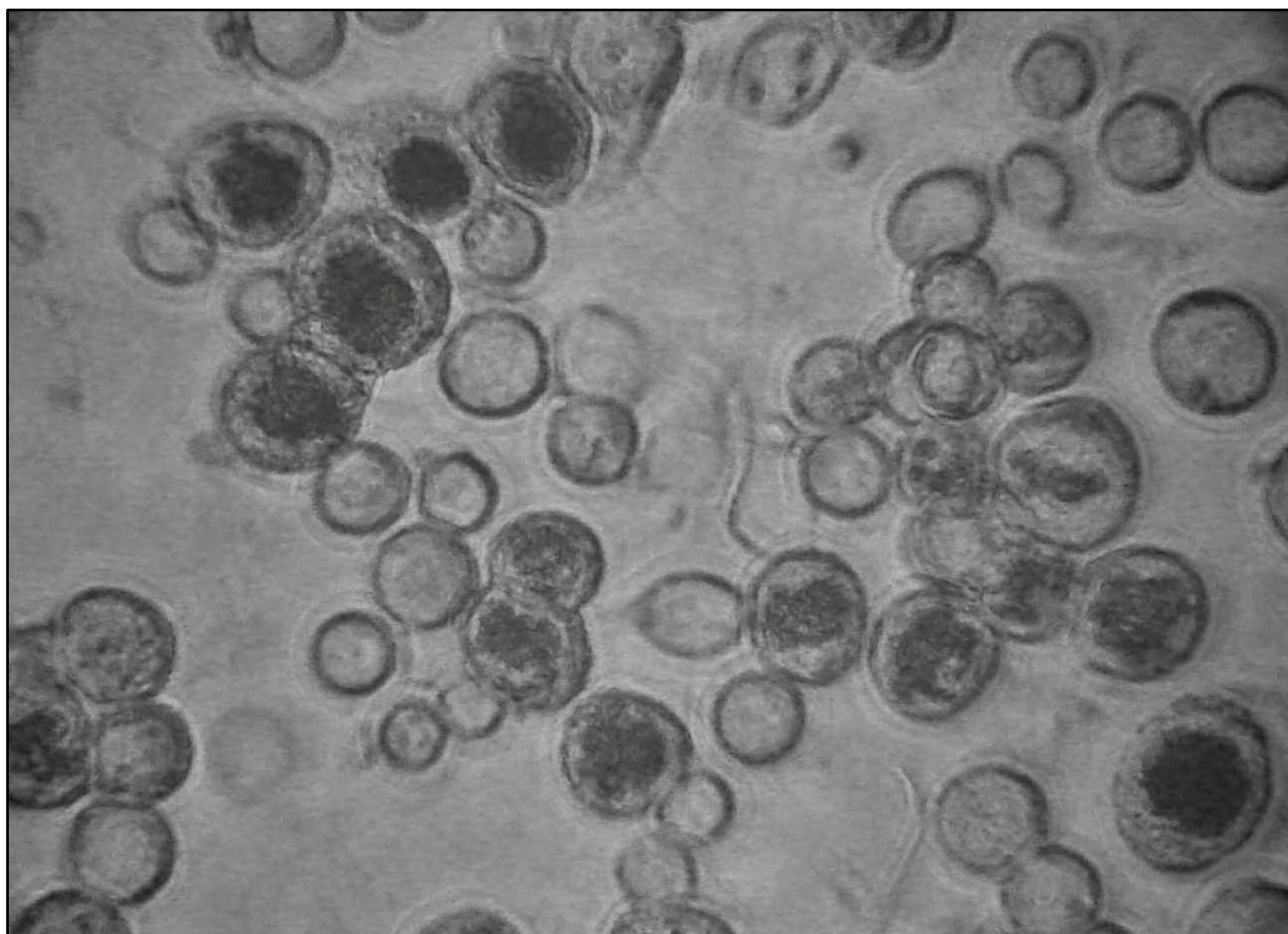


**Análise Eletroforética de Seis
Variantes Estáveis (*Many
Polyhedra*) do Baculovírus
Anticarsia gemmatalis MNPV**

Foto: Marlinda Lobo de Souza



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa 288 e Desenvolvimento

Análise Eletroforética de Seis Variantes Estáveis (*Many Polyhedra*) do Baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV

Anderson Fernandes de Brito
William Sihler
Marcia Regina da Silva Pedrini
Marlinda Lobo de Souza

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias

Ficha catalográfica: Rosamires Rocha Galvão

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Marlinda Lobo de Souza

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Análise eletroforética de seis variantes estáveis (*Many Polyhedra*) do baculovírus *Anticarsia gemmatilis* MNPV. / Anderson Fernandes de Brito... [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.
16 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 288).

1. Controle biológico. 2. Many polyhedra. 3. Baculovírus. I. Brito, Anderson Fernandes de. II. Sihler, William. III. Pedrini, Marcia Regina da Silva. IV. Souza, Marlinda Lobo de. V. Série.

632.96 – CDD 21

© Embrapa 2011

Sumário

Resumo	05
Abstract	06
Introdução	07
Material e métodos	08
Vírus	08
Células e multiplicação viral	08
Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)	09
Purificação do DNA	09
Eletroforese em gel de agarose	09
Resultados e discussão	09
Conclusões	13
Referências	14

Análise Eletroforética de Seis Variantes Estáveis (*Many Polyhedra*) do Baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV

Anderson Fernandes de Brito¹

William Sihler²

Marcia Regina da Silva Pedrini³

Marlinda Lobo de Souza⁴

Resumo

Baculovírus são patógenos que infectam insetos. Estes vírus têm sido utilizados em programas de controle de pragas como alternativa ao uso de agrotóxicos. Um exemplo bem sucedido é o uso do baculovírus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*) para o controle da lagarta-da-soja, no Brasil. A multiplicação de baculovírus pode ser feita no próprio inseto (*in vivo*), em condições de campo ou em laboratório, ou em cultura de células de inseto (*in vitro*). No entanto, uma limitação do sistema *in vitro* é o acúmulo de mutantes FP (*Few Polyhedra*), que resultam no decréscimo do número de partículas virais oclusas (poliedros) e consequente redução da virulência. Recentemente, a seleção de vírus estáveis, denominados *Many Polyhedra* (MP) tem sido apresentada como uma alternativa viável para a produção de baculovírus em alta escala em cultivos celulares. Em estudos anteriores, após sete passagens sucessivas do vírus AgMNPV-2D em culturas de células, um total de seis variantes *Many Polyhedra* (MP) foram selecionados. No presente trabalho, estes variantes foram analisados quanto ao perfil de restrição do DNA utilizando as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Inicialmente, células BTI-Tn-5B1-4 foram infectadas com o vírus e o sobrenadante coletado após 5 dias de infecção. Em seguida, as partículas virais extracelulares (*budded viruses*), contidas no sobrenadante, foram purificadas por ultracentrifugação em colchão de sacarose 25%. O DNA viral foi então extraído utilizando-se soluções de fenol, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os perfis de restrição de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8 %. Não foram detectadas alterações, por esta técnica, em relação ao inóculo original AgMNPV-2D. A análise do perfil de proteínas das células infectadas com estes variantes também não revelou diferenças significativas entre eles. As características morfológicas observadas, como formação de muitos poliedros após sucessivas passagens em cultivos celulares, juntamente com os dados obtidos pela análise do perfil de DNA e de proteínas, indicam que os seis MPs mantiveram o padrão do vírus selvagem. Para dar continuidade à caracterização destes variantes, trabalhos estão em andamento visando à análise ultraestrutural (microscopia eletrônica) e à determinação do número de partículas BVs formadas (microtitulação).

¹ Biólogo, BSc., Universidade de Brasília/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Biólogo, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Engenheira Química, Ph.D., Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

⁴ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Electrophoretic analysis of six stable variants (Many Polyhedra) of *Anticarsia gemmatalis* MNPV baculovirus

Abstract

Baculoviruses are pathogens which infect insects. These viruses have been used in plague control programs as an alternative to the use of agrottoxins. A successful example is the use of the *AgMNPV* baculovirus (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus) for controlling the soybean caterpillar in Brazil. Baculovirus multiplication can be made in the insect (*in vivo*), in field or laboratory conditions, or in insect cell culture (*in vitro*). However, a limitation in the *in vitro* system is the accumulation of FP (Few Polyhedra) mutants that results in the decrease of the occluded viral particles number (polyhedra) and, as a consequence, virulence reduction. Recently, the stable virus selection, called Many Polyhedra (MP) has been presented as a viable alternative for large scale baculovirus production in cell cultures. In previous studies a total of six Many Polyhedra (MP) variants were selected after seven successive cell passages of the *AgMNPV*-2D virus in cell culture. In the present work, these variants were analyzed according to the DNA restriction profile using the *EcoRI* and *HindIII* enzymes. Initially, BTI-Tn-5B1-4 cells were infected with the virus and the supernatant collected after 5 days of infection. After that, the extra cellular particles (budded viruses) present in the supernatant, were purified by ultracentrifugation in 25% sucrose cushion. The viral DNA was then extracted using phenol, phenol:chloroform:isoamil alcohol (25:24:1) and chloroform:isoamil alcohol (24:1) solutions. DNA restriction profiles were analyzed by electrophoresis in 0.8% agarose gel. There were no alterations detected using this technique, in comparison to the original *AgMNPV*-2D inoculum. The protein profile analysis of cells infected with these variants also did not show significant differences among them. The observed morphologic feature, such as many polyhedra formation after successive passages in cell culture, together with the data obtained from the protein and DNA profiles, indicate that the six MPs kept the wild virus pattern. In order to give continuity to these variants characterization, ultra structural analysis (electron microscopy) and the number the formed BVs particle determination (microtitration) studies are in progress.

Index terms: *AgMNPV* baculovirus, *Anticarsia gemmatalis*, Many Polyhedra, electrophoresis.

Introdução

Baculovírus são vírus que infectam artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidoptera, bem como das ordens Hymenoptera e Diptera (BONNING, 2005). Estes vírus apresentam dois fenótipos: *Budded virus* (BV) e *Occlusion-derived virus* (ODV). Os BV são responsáveis pela infecção sistêmica do hospedeiro (célula a célula). Os ODV apresentam-se envoltos por uma matriz proteica, formando estruturas denominadas corpos de oclusão (poliedros), que promovem a transmissão dos vírus entre diferentes insetos hospedeiros. (BONNING, 2005; CASTRO & SOUZA, 2006). Os baculovírus em sua forma viral oclusa podem ser utilizados em programas de controle de pragas, em alternativa ao uso de agrotóxicos. Um exemplo bem sucedido é a aplicação do baculovírus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*) para o controle da lagarta-da-soja no Brasil (MOSCARDI, 1999).

A infecção das larvas pelos baculovírus se dá principalmente por via oral, por ingestão da forma viral oclusa. Após a ingestão, os vírions são liberados mediante a dissolução dos corpos de oclusão nas condições alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) e sob ação de proteases do tubo digestivo do inseto. Em contato com as microvilosidades intestinais, os nucleocapsídeos invadem as células epiteliais (por endocitose adsorptiva), onde se multiplicam no núcleo da célula, sem ainda produzirem corpos de oclusão. Esse estágio inicial culmina com a formação de partículas BV, caracterizando o que é conhecido como infecção primária. Os vírus extracelulares (BV), quando alcançam a hemolinfa da larva hospedeira, podem gerar uma infecção sistêmica. A partir de então ocorre a produção de grandes quantidades de nucleocapsídeos e posterior formação dos corpos de oclusão no núcleo das células dos tecidos susceptíveis da lagarta, caracterizando a infecção secundária. Após 72 horas de infecção, as células infectadas podem sofrer lise, e os insetos mortos tornam-se importantes fontes de inóculos virais para infecções seguintes, tanto no campo quanto em laboratório (ALVES, 1986; ACHARYA *et al.*, 2002; CASTRO & SOUZA, 2006).

Visando à produção de um inseticida viral, a multiplicação de baculovírus pode ser feita em dois diferentes sistemas: no próprio inseto (*in vivo*), por meio da replicação do vírus em lagartas; ou em cultura de células de inseto (*in vitro*), utilizando-se linhagens celulares suscetíveis (REZENDE, 2008). Todos os bioinseticidas à base de baculovírus vendidos comercialmente envolvem produção viral *in vivo*.

Métodos de produção *in vitro* também podem ser empregados, e mostram-se promissores para a produção de bioinseticidas em larga escala e aplicação em áreas extensas de cultivo (MILLER, 1997). Entretanto, uma limitação do sistema *in vitro* é o acúmulo de mutantes *Few Polyhedra* (FP). Os variantes FP possuem um baixo padrão de produção de poliedros por célula, além de terem como característica a alta produção de partículas virais BV, que tornam os variantes FP predominantes na população após passagens consecutivas. Tais mutações geradas durante a propagação de baculovírus em cultivos celulares causam redução da virulência dos vírus produzidos, prejudicando o processo de obtenção de poliedros viáveis para a aplicação em controle biológico (SLAVICEK, 1995).

A geração de variações genotípicas em decorrência de passagens seriais em culturas de células é um fenômeno observado em várias famílias de vírus, entre elas a Baculoviridae. A predominância dos fenótipos FP, em detrimento dos MP (*Many Polyhedra*), é considerada um fenômeno comum em passagens seriais de baculovírus (VLAK *et. al.*, 1996). Mutações em regiões específicas do genoma viral (grandes inserções e deleções), principalmente no locus do gene *25K FP*, têm sido correlacionadas com a geração de variantes FP em *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) e *Galleria mellonella* MNPV (GmMNPV).

O produto gênico do *25K FP* é uma proteína de 25 KDa, a qual é essencial para a formação de poliedros e a oclusão de partículas virais nestas estruturas (BISCHOFF & SLAVICEK, 1997).

A seleção de variantes geneticamente estáveis, com alta produção de BV e com maior produção de poliedros/mL mostra-se necessária para viabilizar o emprego destes como inóculos em cultivos em escala maior de produção, com o uso de biorreatores. Vírus com tais características, denominados *Many Polyhedra*, vem sendo identificados e apresentam potencial para esta aplicação (REZENDE, 2008). Em biorreatores, o efeito passagem ocorre de maneira mais severa, tendo em vista que neste sistema o suprimento de células não infectadas é feito continuamente, possibilitando novas passagens sucessivas do vírus, em um curto espaço de tempo. A alta frequência de passagens dos vírus em novas células, aliada aos altos títulos virais produzidos em consequência destas infecções, revela a necessidade de seleção de variantes AgMNPV mais estáveis geneticamente, os quais serão capazes de suportar mais passagens, sem no entanto sofrer graves mutações genéticas que acarretam em perda de virulência (VLAK *et. al.*, 1996).

Este trabalho apresenta resultados parciais de uma pesquisa que envolve a caracterização molecular de seis variantes *Many Polyhedra* do vírus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*).

Material e métodos

Vírus

Em estudos anteriores, 6 variantes MPs foram isolados após sete passagens sucessivas do vírus AgMNPV-2D em células BTI-Tn5-B1-4 e selecionados pela técnica de *plaque assay*. Estes variantes geraram isolados denominados MP1, MP2, MP3, MP4, MP5 e MP6 (RANGEL *et al.*, 2010).

Células e multiplicação viral

Foram utilizados inóculos destes isolados para multiplicação em células BTI-Tn5-B1-4, em frascos de 75 cm², contendo meio de cultura TNMFH acrescido de antibiótico-antimicótico, suplementado de Soro Fetal Bovino. A densidade celular adotada para as infecções era equivalente a 60% de monocamada celular (estimativas visuais). Cada um dos respectivos inóculos virais (300 μ L) foi adicionado às células, e a adsorção ocorreu em 2,5 mL de meio de cultura. Após o período de 1 h, o volume final (10 mL) era restabelecido. As células foram mantidas em estufa a 27°C até 5 dias pós infecção, e então coletadas para as análises. Os efeitos citopáticos induzidos pelo vírus foram visualizados por meio de microscópio de fase (Olympus CK2).

Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

Inicialmente, as amostras de células saudáveis e células infectadas com os variantes MP foram sedimentadas (4400 rpm/5 min). Após a centrifugação de cada amostra, os precipitados foram lavados com TE (pH 8,0) e ressuspensos em 40 µL de tampão de amostra 5X, que, juntamente com 2% de β-mercaptoetanol, gerou um volume final de 200 µL. As amostras foram desnaturadas por aquecimento (100°C, 3 min.).

O gel de poliácridamida desnaturante 15% (SDS-PAGE) foi preparado de acordo com LAEMMLI (1970). Um volume de 15 µL de cada amostra foi aplicado, e como marcador de peso molecular foi utilizado o *Low Range Rainbow Molecular Weight Markers* - RPN755 (Amersham). A eletroforese ocorreu a 27 V durante a noite. O gel foi fixado com metanol 40%, ácido acético glacial 7,5% e *Coomassie blue* R-250 0,05%. A descoloração foi feita com metanol 40% e ácido acético glacial 7,5%.

Purificação do DNA

Para análise do perfil de restrição de DNA, as partículas virais *Budded Virus*, contidas no sobrenadante coletado, foram purificadas. De acordo com O'REILLY et al. (1992), as amostras foram ultracentrifugadas (24000 rpm, 5°C, 75 min.) em colchão de sacarose 25% e em seguida passaram por um tratamento com proteinase K (500 µg/mL) a 37°C durante a noite. O DNA viral foi então extraído utilizando-se soluções de fenol, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Eletroforese em gel de agarose

Após clivagem com as enzimas de restrição *Pst* I e *Hind* III, o DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0.8 %. Foram utilizados os marcadores moleculares λ/*Pst* I e 1 Kb DNA *Ladder*.

Resultados e discussão

As características morfológicas apresentadas pelos variantes selecionados, como formação de muitos poliedros no núcleo celular, revelam que eles mantiveram o mesmo padrão do vírus selvagem (Figura 1), apesar das sucessivas passagens em cultivos celulares.

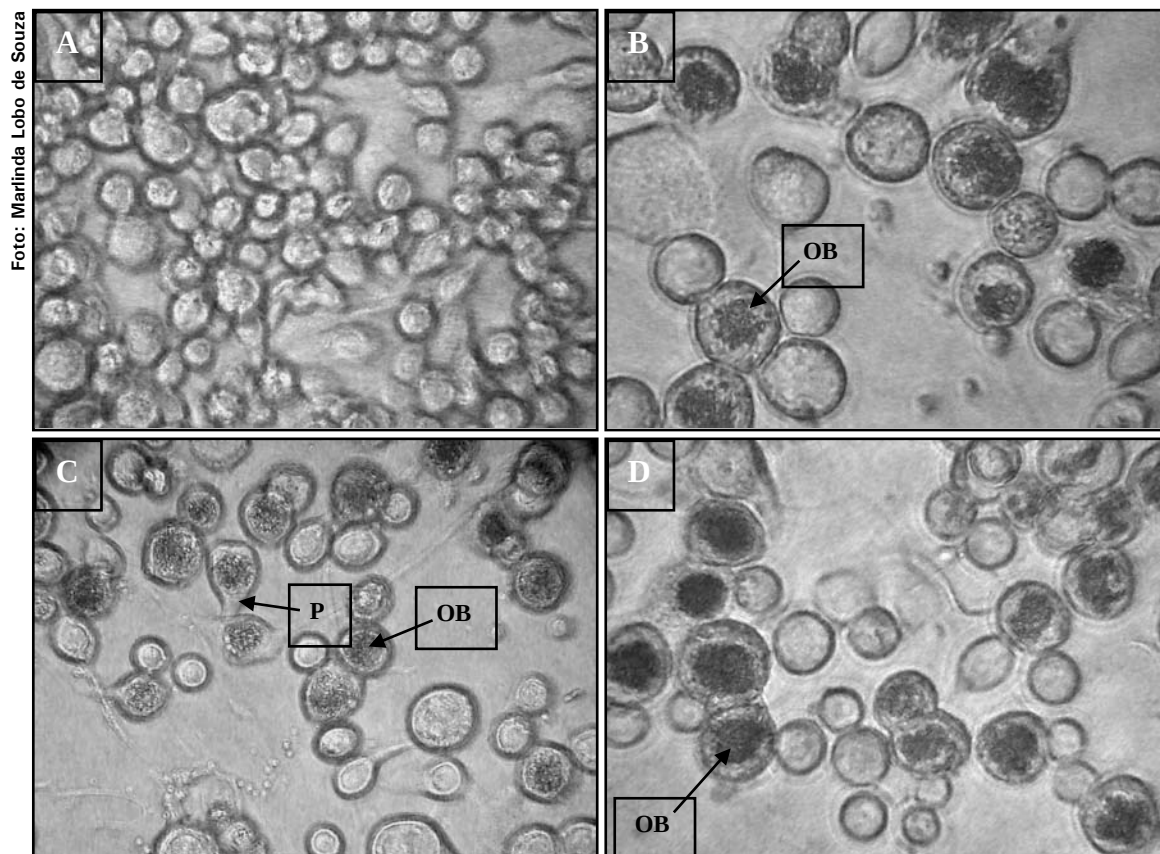


Figura 1. Multiplicação de variantes *Many Polyhedra* (MP) em células BTI-Tn-5B1-4. (A) Células não infectadas (controle). (B) Células infectadas com o protótipo AgMNPV-2D (passagem P1). (C) Células infectadas com variante MP2 (passagem P2). (D) Células infectadas com variante MP5 (passagem P2). As setas apontam o acúmulo de corpos de oclusão (OB) no núcleo e a formação de protusão celular (P).

Com base na análise do perfil de restrição do DNA por eletroforese em gel de agarose, não foram observadas alterações entre o inóculo AgMNPV-2D e os variantes MPs. Além disso, não foram detectadas grandes inserções ou deleções de regiões internas aos fragmentos de DNA já reportados para o isolado 2D. Igualmente, não foram observadas ausências ou ganhos de sítios de restrição, os quais poderiam levar à fusão ou à separação de fragmentos, respectivamente. A aparente ausência de bandas submolares indica que os clones virais foram adequadamente purificados (Figuras 2 e 3).

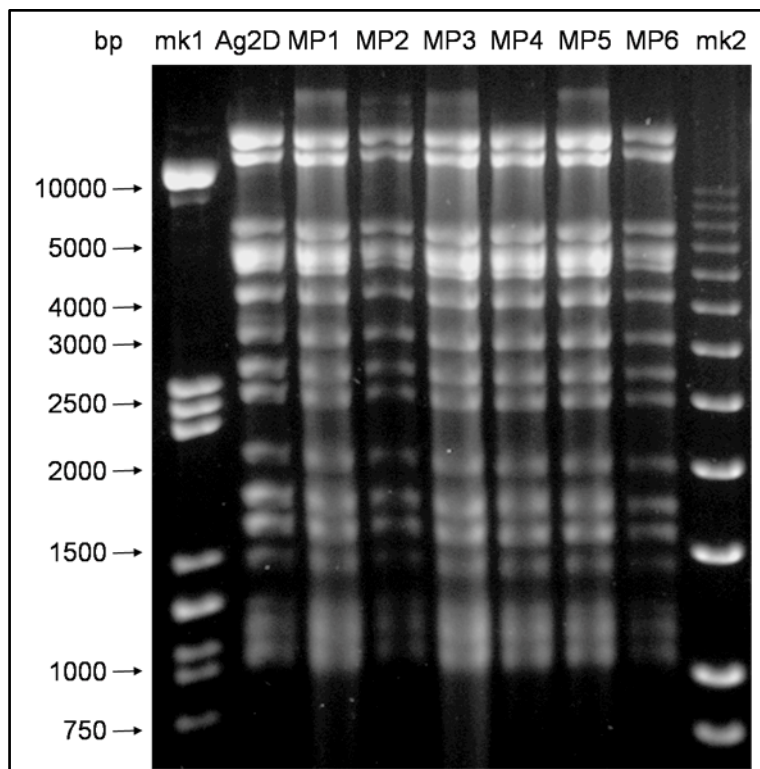


Figura 2. Perfil de restrição do DNA de variantes MPs digerido com *Hind III*. Ag2D = Inóculo AgMNPV 2D; MP = *Many Polyhedra*; mk1 = Marcador *Lambda DNA/Pst I*; mk2 = Marcador 1 Kb DNA Ladder.

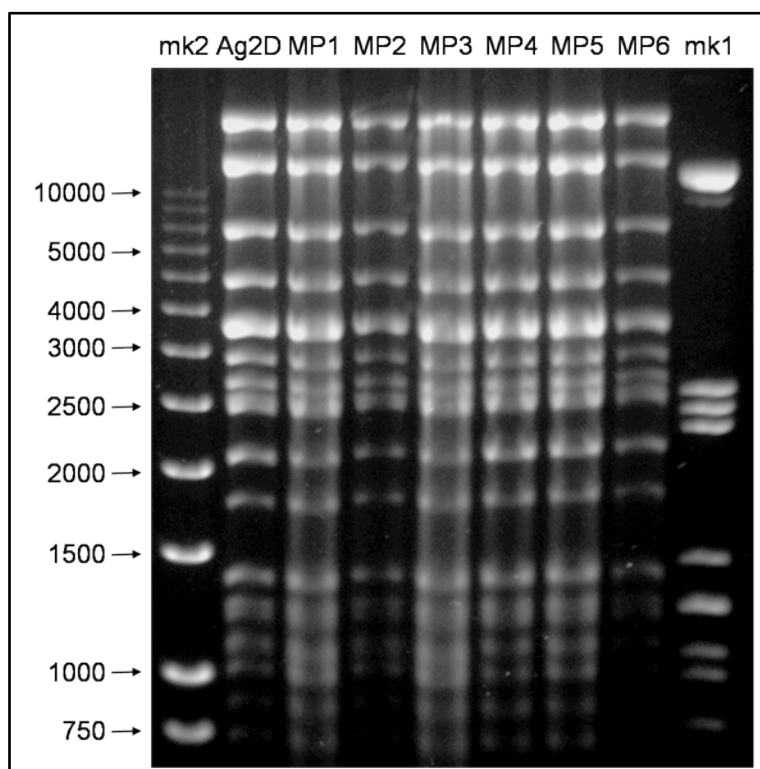


Figura 3. Perfil de restrição do DNA de variantes MPs digerido com *Pst I*. Ag2D = Inóculo AgMNPV 2D; MP = *Many Polyhedra*; mk1 = Marcador *Lambda DNA/Pst I*; mk2 = Marcador 1 Kb DNA Ladder.

A análise por SDS-PAGE revelou similaridade entre os perfis de proteínas das células infectadas com os variantes MPs. Em comparação com células não infectadas (*mock infected*), observou-se a presença de uma banda de cerca de 30 KDa no clone AgMNPV-2D e nos seis variantes MPs (Figura 4).

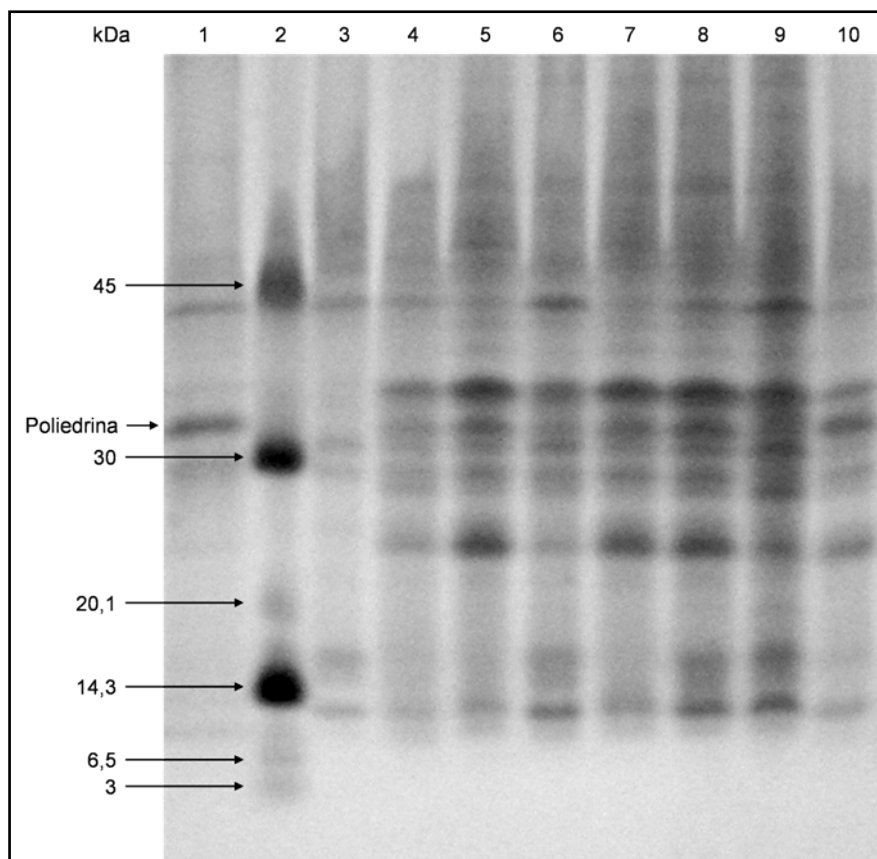


Figura 4. Análise em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 15%) do perfil de proteínas de células Tn-5B1-4 infectadas por variantes MPs. (1) Poliedros de AgMNPV-2D semipurificados (2) Marcador *Low Range Rainbow Molecular Weight Markers* - RPN755; (3) Células não infectadas; (4) Infecção com AgMNPV-2D; (5) Infecção com MP1; (6) Infecção com MP2; (7) Infecção com MP3; (8) Infecção com MP4; (9) Infecção com MP5; (10) Infecção com MP6.

Este resultado era esperado, pois nesta faixa encontra-se a poliedrina: principal componente proteico do poliedro. Por possuir um promotor forte, o gene *polh* expressa a poliedrina em grande quantidade no final do ciclo de replicação viral, representando cerca de 90% da matriz proteica do poliedro. Outras proteínas virais foram expressas, no entanto, devido à abundância de proteínas estruturais das células, não foi possível identificá-las pela técnica de SDS-PAGE.

Devido à alta especificidade e à ausência de toxicidade ao homem e ao meio ambiente, os baculovírus mostram-se como uma boa alternativa ao uso de agrotóxicos químicos. A produção de baculovírus em cultivos celulares apresenta diversas vantagens; no entanto, a geração de mutantes durante passagens seriais em cultivos celulares é ainda um importante fator limitante neste processo. A seleção de variantes geneticamente estáveis (MPs), com padrão de alta produção de poliedros, apresenta-se como uma opção viável para a otimização da produção de baculovírus em sistemas *in vitro*.

Conclusões

Os dados obtidos sugerem que os MPs podem possuir maior estabilidade genética, quando comparado a outros isolados presentes na população viral, fato que os tornariam candidatos potenciais para serem utilizados em uma estratégia de produção de partículas virais oclusas em larga escala. Para dar continuidade à caracterização destes variantes, trabalhos estão em andamento visando à análise ultraestrutural (microscopia eletrônica) e à determinação do número de partículas BVs formadas (microtitulação).

Referências

- ACHARYA, A.; SRIRAM, S.; SEHRAWAT, S.; RAHMAN, M.; SEHGAL, D.; GOPINATHAN, K. P. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: Molecular biology and biotechnological applications for large-scale synthesis of recombinant proteins. **Current Science** 83:455-465, 2002.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. 407 p.
- BISCHOFF, D. S.; SLAVICEK, J. M. Phenotypic and genetic analysis of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus few polyhedra mutants: Mutations in the 25K FP gene may be caused by DNA replication errors. **Journal of Virology** 71:1097-1106, 1997.
- BONNING, B. C. Baculoviruses: biology, biochemistry and molecular biology. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, 2005, p. 233-270.
- CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. Baculovírus: Agentes de Controle Biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Org.). Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. 1ª ed. Planaltina-DF: **Embrapa Cerrados**, 2006, v. 1, p. 175-194.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. **Nature** 227:680-685, 1970.
- MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York: Plenum press, 1997. 447 p.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. **Annual Review of Entomology** 44:257-289, 1999.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors - a laboratory manual**. New York: W. H. Freeman, 1992.
- RANGEL, J. C.; ZIMBRES, B. Q. C.; SIHLER, W.; SOUZA, M. L. **Seleção e análise de variantes estáveis (*Many Polyhedra*) do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV**. Boletim de Pesquisa nº 263. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.
- REZENDE, S. H. M. S. **Caracterização molecular de mutantes gerados pela passagem serial do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV em cultura de células**. 2008. 124 f.: Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, 2008.
- SLAVICEK, J. M.; HAYES-PLAZOLLES, N.; KELLY, M. E. Rapid Formation of Few Polyhedra Mutants of *Lymantria dispar* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus during Serial Passage in Cell Culture. **Biological Control** 5:251-261, 1995.

VLAK, J. M.; GOOIJER, C. D.; TRAMPER, J.; MILTENBURGER, H. G. **Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects** (Current Applications of Cell Culture Engineering). New York: Springer, 1996.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***