

ROL DE LOS ESTEROLES EN LA DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES, DINÁMICAS Y FUNCIONALES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN CÉLULAS DE INSECTO. SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN CON BACULOVIRUS

María Alejandra Baqué

mabaque@fbc.unl.edu.ar

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Juan Daniel Claus

Co-directora: Dra. Nieves María Claudia Casado

Lugares de realización: Laboratorio de Virología y Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

Fecha de la defensa: 6 de septiembre de 2019

RESUMEN

La línea celular UFL-AG-286 (*Anticarsia gemmatalis*), utilizada para la producción in vitro del *virus de la poliedrosis nuclear múltiple de Anticarsia gemmatalis (AgMNPV)*, fue adaptada a tres nuevos medios de cultivo libres de componentes de origen animal, que difieren entre sí en su contenido de esteroides: libre de esteroides, suplementado con colesterol y suplementado con sitosterol, un esteroide de origen vegetal. Las líneas adaptadas fueron cultivadas por más de 200 pasajes, al cabo de los cuales presentaron similares cinéticas de proliferación, de consumo de nutrientes y de producción de catabolitos, si bien el tamaño de las células adaptadas al medio conteniendo colesterol fue significativamente mayor. Cuando se ensayó la capacidad de las tres líneas para multiplicar *AgMNPV* en cultivos infectados, se observó que el virus sólo replicó, y produjo elevados niveles de las dos progenies virales, virus brotados y cuerpos de oclusión, en las células cultivadas en medio con colesterol. Los cultivos infectados en los medios sin colesterol sólo presentaron evidencias de efecto citopático en células aisladas. Estos resultados indican que el colesterol es esencial para la replicación de *AgMNPV* en células UFL-AG-286, y sugieren que en ausencia de colesterol la replicación viral se bloquea en una etapa temprana del ciclo de replicación, previa a la expresión de los mecanismos de daño que conducen a la muerte celular.

A los efectos de verificar si la adsorción viral, primera etapa del ciclo de replicación donde la estructura de la membrana citoplasmática juega un rol central, es modificada por el contenido de esteroides de las células, se realizó una determinación de la cinética de adsorción de *AgMNPV* sobre células UFL-AG-286 adaptadas a los tres medios de cultivo. Si bien se observaron diferencias en la cinética, posiblemente asociadas a cambios en la estructura de la membrana citoplasmática, el virus fue capaz de adsorberse en los cultivos celulares con fuente de esteroide en el medio, en mayor medida si esa fuente era colesterol.

Se comprobó que la falta de esterol en el medio de cultivo afectó la viabilidad del virus utilizado para infectar ese tipo de cultivo celular.

Por otro lado se evaluó por Resonancia Paramagnética electrónica si la presencia de esteroides y sus diferencias estructurales afectan la fluidez de membrana tanto en membranas modelo como en membranas celulares.

ABSTRACT

Sterols: role in structural and dynamic properties of the plasma membrane in insect cells. Relationship with viral infection.

The cell line UFL-AG-286 (*Anticarsia gemmatalis*), which is used for the in vitro production of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), was adapted to grow in three new culture media, which differ in their sterol contents. The three of them showed similar kinetics of proliferation, nutrient intake, and catabolite production, they only differed in size. Regarding the ability of the cell lines to multiply AgMNPV in infected cultures, the virus only replicated, and produced high levels of the two viral progenies in the cells cultured in the cholesterol containing medium. Infected cultures in media without cholesterol only presented cytopathic evidences in isolated cells. These results indicate that cholesterol is essential for AgMNPV replication in UFL-AG-286 cells, suggesting that in the absence of cholesterol, viral replication stops in an early stage of the replication cycle, prior to the expression of the mechanisms of damage leading to cell death.

Viral adsorption is the first stage of the replication cycle, where plasma membrane structure plays a central role. In order to determine the influence of cell cholesterol content in this process, a study of AgMNPV adsorption kinetics on UFL-AG-286 cells adapted to the three culture media was performed. Although differences in the kinetics were observed, probably associated to changes in plasma membrane structure, the virus was adsorbed in both cell cultures having sterol sources.

On the other hand, it was evaluated by Electron Paramagnetic Resonance if the presence of sterols and their structural differences affect membrane fluidity in both model membranes and cell membranes.