

Baculovirus: Hospederos y especificidad

Baculovirus: Hosts and specificity

*Juliana Gómez Valderrama**, *Laura Villamizar***

Resumen

Los baculovirus son virus patógenos de insectos ampliamente empleados a nivel mundial como bioinsecticidas para el control de diferentes plagas de importancia agrícola y más recientemente como vectores de expresión de proteínas y vectores para terapia génica. Una de sus características principales es su alta especificidad de hospedero que incluye un rango muy estrecho de especies de insectos, que a menudo pertenecen a la misma familia. Sin embargo, es necesario entender los mecanismos involucrados en la definición del rango de hospederos de los baculovirus con el fin de evaluar la seguridad e inocuidad de su uso y determinar la posibilidad de mejorar sus propiedades para aplicaciones biotecnológicas mediante la construcción de baculovirus recombinantes con diferentes rangos de hospederos. En el presente artículo se revisarán los principales mecanismos comprendidos en la definición del rango de hospederos de los baculovirus, dentro de los que se destacan la especificidad para entrar en las células, la posibilidad de replicación del genoma viral, el control de los procesos bioquímicos y moleculares del insecto y las interacciones virus-hospedero que regulan la multiplicación del agente infeccioso, así como las perspectivas de la aplicación de este conocimiento.

Palabras clave: infección viral, rango de hospederos, evolución, resistencia.

Abstract

Baculoviruses are insect pathogenic viruses widely used as bioinsecticides for controlling of several agricultural important pests and more recently as protein expression vectors and gene therapy vectors. One of its main characteristics is its high host-specificity including a very narrow range of insect species, which often belong to the same family. However, to understand the mechanisms involved in the definition of baculoviruses host range is necessary in order to assess the security and safety of its use and to determine the possibility of improving their properties for biotechnological applications through the construction of recombinant baculovirus with different host ranges. In the present article the main mechanisms involved in baculoviruses host range as specificity for entering into the host cells, the possibility of viral genome replication, the control of biochemical and molecular insect processes and the interactions virus-host regulating the multiplication of the infectious agent, and the prospects of applying this knowledge will be reviewed.

Key words: viral infection, host range, evolution, resistance.

Recibido: agosto 15 de 2012

Aceptado: octubre 30 de 2013

* Microbióloga Industrial. Candidata a PhD. en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Investigador Profesional. Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. jagomez@corpoica.org.co.

** Química farmacéutica. PhD. Directora del Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. lvillamizar@corpoica.org.co.

Introducción

La especificidad de los baculovirus, los virus patógenos de insectos mejor estudiados, es una característica importante de estos organismos que les confieren ventajas dentro de sus posibles aplicaciones biotecnológicas como bioinsecticidas, vectores de expresión de proteínas y agentes para terapia génica. Diferentes estudios han demostrado que cada especie de baculovirus establece interacciones únicas con su hospedero, que definen su susceptibilidad y que también se pueden ver influenciadas por el ambiente en el que se desarrollen. El análisis de estas interacciones virales requiere gran atención con el fin de identificar y caracterizar los factores virales y celulares que son responsables del rango de hospederos de los baculovirus.

En esta revisión se abordarán las principales vías implicadas en el establecimiento de infecciones causadas por baculovirus, incluyendo genes y proteínas que definen el rango de hospederos, mecanismos de inmunidad e interacciones coevolutivas virus-insecto que delimitan su especificidad.

Baculovirus

Generalidades

Los baculovirus son una familia diversa de virus ocluidos que poseen ADN de doble cadena y afectan invertebrados, especialmente insectos (Miller 1997; Caballero *et al.*, 2001). Su genoma se encuentra empaquetado en viriones con forma de bastón y ocluidos dentro de una matriz proteica conocida como cuerpo de inclusión (CI), que los protege de las condiciones ambientales (Rohrmann 2011). Los viriones se presentan en dos formas importantes: viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV) y viriones brotados (BV), los cuales son similares en la estructura de su nucleocápside pero difieren en su origen, composición de las envolturas y rol en el ciclo infectivo del virus (Miller 1997). La familia *Baculoviridae* está compuesta por cuatro géneros, dentro de los que se destacan dos grupos: los nucleopoliedrovirus (NPV) y los granulovirus (GV) (Thiem y Cheng 2009).

Ciclo de infección y patología

El ciclo de replicación de los baculovirus es un proceso complejo que involucra diferentes mecanismos.

Las partículas virales se encuentran en el ambiente en forma de CIs. Las larvas del insecto consumen los CIs, los cuales se disuelven en el intestino medio del insecto por el pH alcalino que oscila entre 9 y 11 (Caballe-

ro *et al.*, 2001) liberando los ODV. Una vez liberados, los viriones deben atravesar la membrana peritrófica del intestino (Wang y Granados 2000; Haas-Stapleton *et al.*, 2003) y se unen por fusión a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio, ingresando a las células. Una vez producida la fusión, las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen al núcleo (Volkman 2007), donde comienza la transcripción de los genes virales, se genera la nueva progenie viral y se producen alteraciones en las funciones fisiológicas del insecto en beneficio de un mejor desarrollo de la infección en el hospedero (Caballero *et al.*, 2001). Las nucleocápsides formadas son transportadas hasta la membrana celular, de donde brotan adquiriendo una envoltura de dicha membrana para formar los BVs. Estos circulan a través de la hemolinfa diseminando la infección a los demás tejidos y órganos susceptibles según el tropismo celular del aislamiento viral (Passarelli 2011) como hemocitos, cuerpo graso y tráquea, entre otros, proceso conocido como infección secundaria (Caballero *et al.*, 2001; Rohrmann 2011). En el núcleo de estas células se lleva a cabo la replicación y transcripción viral y se ensamblan las nuevas nucleocápsides. En los estados más tardíos de la infección, las nucleocápsides son ocluidas en la matriz proteica de poliedrina o granulina, para formar los CIs (Slack y Arif 2006) y ocasionar la muerte de la larva. Los CIs pueden ser liberados al ambiente por licuefacción de la larva infectada para comenzar un nuevo ciclo de infección (Miller 1997). Entender este proceso y los factores involucrados permite dilucidar los posibles puntos donde se bloquea o se permite la infección viral.

Taxonomía

Es difícil clasificar una especie viral en términos taxonómicos, pues se deben establecer los límites que definen cuando una variante corresponde a una nueva especie. La taxonomía de los baculovirus ha evolucionado gracias a los avances en el entendimiento de la genética y la biología de los miembros de esta familia. Además de estas características, los baculovirus tienen rasgos que se hacen evidentes cuando infectan un insecto o célula hospedero, como el rango de hospederos, el tropismo y la patología, entre otros. A la fecha más de 50 genomas de baculovirus han sido secuenciados, lo cual ha facilitado los avances en la clasificación de nuevas especies virales, además de proveer información importante acerca de la organización y contenido del genoma (Harrison 2009).

Los análisis filogenéticos para la clasificación de los baculovirus se basan principalmente en la comparación

de las secuencias de los genes más conservados de los baculovirus, el de la poliedrina y el de la granulina (Rohrmann 2011) y de los genes *lef-8* y *lef-9* (factores de expresión tardíos) (Lange *et al.*, 2004; Jehle *et al.*, 2006; Okano *et al.*, 2006). En el octavo reporte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus ICTV, la familia Baculoviridae se dividió en dos grandes grupos: los NPV y los GV (Lange *et al.*, 2004; Posse *et al.*, 2010). Los NPVs han sido aislados principalmente de hospederos lepidópteros y de otros órdenes como dípteros e himenópteros, mientras que los GV solo han sido aislados de lepidópteros (Okano *et al.*, 2006; Harrison 2009; Jakubowska 2010). Gracias a la disponibilidad de secuencias completas de genomas de los baculovirus y su análisis filogenético, Jehle *et al.*, (2006) propusieron una nueva clasificación, en la que se reconocen cuatro grandes grupos: los Alfabaculovirus (NPVs de lepidópteros), los Betabaculovirus (GVs de lepidópteros), los Gammabaculovirus (NPVs de himenópteros) y los Deltabaculovirus (NPVs de dípteros).

Genoma y variabilidad genética

Los baculovirus tienen genoma ADN circular de doble cadena de tamaño entre 90 y 180 kpb (Herniou *et al.*, 2003; Posse *et al.*, 2010). Tienen entre 90 y 181 marcos abiertos de lectura y más de 800 genes diferentes (Jehle *et al.*, 2006). Los genomas de baculovirus secuenciados han demostrado que existen 37 genes conservados en todas las especies, considerados como el grupo de genes núcleo de los baculovirus (Herniou *et al.*, 2003; Rohrmann 2011; Miele *et al.*, 2011; Garavaglia *et al.*, 2012), que pertenecen a varias categorías funcionales y están involucrados en la replicación, la transcripción, el ensamblaje de los viriones y la infectividad oral. Esto sugiere que los baculovirus han co-evolucionado con sus insectos hospederos y se han diversificado genéticamente con el tiempo (Herniou *et al.*, 2004).

Las regiones no codificantes del genoma constituyen menos del 10% de éste y contienen regiones promotoras de los genes, regiones no traducidas (UTRs), regiones homólogas (*hrs*) que son ricas en secuencias repetidas y genes con ORFs (Marcos Abiertos de Lectura) repetidos *bro* (Harrison 2009; Jakubowska 2010).

La organización del genoma es más conservada en los GV que en los NPVs (Lange *et al.*, 2004), pero en general se observa alta variabilidad genotípica en los baculovirus. Dicha variabilidad se encuentra tanto entre aislamientos colectados de la misma especie hospedera en diferentes sitios geográficos, como entre aislamientos colectados en el mismo lugar e inclusive en un único individuo (Cory y Myers 2003; Hitchman

et al., 2007). Tal es el ejemplo del NPV de *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae) (AcNPV) en el cual se encontraron siete genotipos a partir de un solo aislamiento viral (Stiles y Himmerich 1998). El NPV del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (SfNPV) aislado en Nicaragua es una mezcla de nueve genotipos (Simón *et al.*, 2004) y el SfNPV aislado en Colombia tiene 12 genotipos diferentes (Barrera *et al.*, No publicado). En una única larva de *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae) se encontraron 24 genotipos de NPV (PfnPV) (Cory *et al.*, 2005). Inclusive en los GV, los cuales tienen menor probabilidad de variabilidad genética, se han encontrado mezclas de genotipos en un solo aislamiento viral, como se reportó para el GV de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) (PhopGV) (Espinel-Correal *et al.*, 2010). Estos casos han demostrado que la variabilidad de los baculovirus se encuentra limitada a unas cuantas regiones hipervariables, más que a una variación de todo el genoma (Cory y Myers 2003; Harrison 2009). La alta variabilidad genética puede deberse a las altas tasas de recombinación, demostradas en cultivo celular con una frecuencia superior al 50% entre genotipos cercanamente relacionado (Hajos *et al.*, 2000), a mutaciones puntuales, a la duplicación de secuencias y a la transferencia horizontal entre baculovirus, sus hospederos y otros patógenos del hospedero (Cory y Myers 2003; Hitchman *et al.*, 2007; Harrison 2009).

La diversidad viral proporciona ventajas para la selección natural, ya que pequeños cambios en el genoma pueden originar modificaciones significativas en las características biológicas del virus como la patogenicidad, la virulencia y la productividad, que pueden favorecer la adaptación al hospedero o a las condiciones ambientales. Este es el caso del SfNPV, en el cual se demostró que un único genotipo tiene un desempeño biológico inferior que la mezcla de los 9 genotipos naturales (Simón *et al.*, 2005a), indicando que la variabilidad genética se mantiene porque puede maximizar la probabilidad de infección sobre un hospedero específico o la supervivencia en el ambiente (Hodgson *et al.*, 2004; Espinel-Correal *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta la importancia de la diversidad genética para la supervivencia de los baculovirus, estos deben desarrollar estrategias que les permitan mantener dicha variabilidad. En los últimos años se han sugerido diferentes mecanismos para esto, muchos de ellos relacionados con las interacciones con el hospedero, como lo son: especificidad de la inmunidad del insecto, equilibrio entre los componentes virales y de la célula, interacción entre genotipos, selección diferencial

de genotipos, mecanismos de dispersión, entre otros (Hodgson *et al.*, 2001; Cory *et al.*, 2005).

Hospederos y especificidad

Los estudios acerca del rango de hospederos de baculovirus han permitido clasificar los hospederos como altamente susceptibles o permisivos, semi-permisivos y no permisivos (Liu 1987). Onstad y McManus (1996) (Citado por Takatsuka *et al.*, 2007) proponen dos tipos de rangos de hospederos: el fisiológico que se basa únicamente en las observaciones de la infección en laboratorio y el rango de hospederos ecológico, correspondiente al conjunto de especies con las que un agente patógeno interactúa para dar lugar a una progenie viable.

Las técnicas analíticas actuales (herramientas moleculares, serológicas, microscopía electrónica) han permitido realizar estudios finos de las interacciones entre virus y hospederos, facilitando el entendimiento de los mecanismos relacionados con la especificidad. A continuación se describen los mecanismos involucrados en la definición de la especificidad viral, los genes virales implicados en esta definición, los aspectos del hospedero que permiten o evitan el desarrollo de una infección y la posible coevolución de los virus y sus hospederos.

Rango de hospederos

El rango de hospederos de un virus está limitado por su capacidad de entrar a las células de un organismo, replicar su genoma, ensamblar nuevas partículas virales y liberar la progenie infecciosa (Liu 1987; Thiem 1997; Rahman y Gopinathan 2003; Thiem y Cheng 2009). Según estos aspectos, se indica que el rango de hospederos de baculovirus se encuentra limitado a un orden y la mayoría a una única familia con muy pocas especies, pero en realidad este no es un concepto general. Por ejemplo, el baculovirus más estudiado a nivel mundial, el AcNPV, puede infectar 39 especies de larvas de lepidópteros, pertenecientes a 13 familias y replicarse en sus líneas celulares derivadas (Guo *et al.*, 2005; Harrison 2009), aunque cada especie varía en su susceptibilidad (Doyle *et al.*, 1990; El-Salamouny *et al.*, 2003). En contraste el NPV del gusano de seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (BmNPV), muy cercano taxonómicamente al AcNPV, tiene un rango de hospederos más estrecho infectando solo siete familias de lepidópteros (Thiem y Cheng 2009). El NPV de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) (AfNPV) infecta 31 especies de lepidópteros de 10 familias (Vail *et al.*, 1993). El NPV de *Mamestra brassicae*

(Lepidoptera: Noctuidae) (MbNPV) puede infectar 32 especies de 4 familias de lepidópteros (Doyle *et al.*, 1990; Cory y Myers 2003). En el caso de los granulovirus, estos no han sido estudiados al detalle aunque la evidencia disponible sugiere que tienen un estrecho rango de hospederos, incluso que la mayoría pueden ser monoespecíficos o infectivos en un solo género (Gelernter y Federici 1986).

Para realizar estudios de infectividad cruzada de aislamientos de baculovirus sobre diferentes especies de insectos, es necesario tener en cuenta las características moleculares del genotipo del inóculo y compararlas con la progenie viral obtenida, con el fin de evitar la posibilidad de infecciones ocultas o latentes (Doyle *et al.*, 1990; Herz *et al.*, 2003. Takatsuka *et al.*, 2007). Cuando se infecta un insecto con un virus heterólogo (aislado de una especie diferente), se puede desencadenar la infección con su propio virus homólogo (aislado de la misma especie) (Maramorosch *et al.*, 2011) latente (Matthews *et al.*, 2002; Bourne y Cory 2004). Esto fue demostrado por Hughes *et al.* (1993), quienes determinaron que en una colonia de laboratorio de *M. brassicae* se encontraba un baculovirus latente, el cual fue activado por la infección de las larvas con el AcNPV, un virus filogenéticamente lejano y el PfNPV, filogenéticamente cercano al MbNPV.

Los estudios de especificidad de los baculovirus han sido facilitados por la disponibilidad de cultivos celulares donde se desarrolla el ciclo viral completo, aunque estos no necesariamente reflejan el verdadero espectro de organismos susceptibles. Además, los estudios en cultivo celular no tienen en cuenta las barreras físicas a la infección ni la respuesta inmune del insecto.

Con respecto al efecto sobre especies no blanco, se sabe que los baculovirus son inocuos para la mayoría de organismos incluyendo vertebrados (Miller 1997; Smith *et al.*, 2000) y solo son capaces de infectar especies de artrópodos. Esto se evidencia en el hecho de que en el pH neutro o ácido del tracto digestivo de los vertebrados, los CIs pasan sin disolverse y son excretados intactos o son inactivados durante la digestión (McWilliam 2006). En este sentido, Gröner (1986) realizó una revisión de la literatura que describía los efectos de la aplicación de productos a base de baculovirus en diferentes especies, encontrando principalmente que no se presentan efectos letales ni tóxicos sobre mamíferos, aves, ni animales acuáticos. Además, consistentemente con la restricción de la infección viral a la familia o por lo menos al orden del insecto del cual fue aislado, no se han encontrado efectos sobre insectos benéficos como polinizadores (abejas), parasitoides y depredadores (Smith *et al.*, 2000).

Mecanismos de especificidad

La especificidad de hospederos de los baculovirus puede ser determinada a varios niveles dependiendo de varios eventos debido a la complejidad de su ciclo de infección.

Entrada del virus a la célula. El primer paso crítico para producir infecciones efectivas es la entrada en la célula hospedera. La primera barrera para la infección viral es la membrana peritrófica (MP) del insecto, la cual es una membrana semipermeable que delinea el intestino medio. Está compuesta de microfibras de quitina, proteoglicanos y proteínas (Lehane 1997) y tiene como función proteger al intestino medio de la abrasión del material vegetal consumido y de microorganismos y sustancias químicas. Su grosor se ve influenciado por el tipo de follaje consumido por los insectos, lo que puede afectar la capacidad de ingreso de los baculovirus (Plymale *et al.*, 2008), los cuales usan la actividad de sus proteínas quitinasas y enhancinas para romper la membrana y de esta forma iniciar la infección de las células intestinales (Wang y Granados 2000).

Una vez el ODV es capaz de atravesar la MP, éste debe unirse a las células epiteliales del intestino medio. Aunque en la mayoría de los virus la entrada a la célula está determinada por la presencia de receptores específicos que facilitan la unión del virus, en el caso de los baculovirus este mecanismo no se encuentra bien dilucidado. Por ejemplo, el AcNPV es capaz de entrar en células de insectos no permisivas (Morris y Miller 1993) e incluso en células de mamíferos (Kost y Condreay 2002), indicando que si los baculovirus emplean receptores específicos para su entrada, posiblemente estos son comunes en insectos y en mamíferos. Se sabe muy poco de los receptores específicos de estos virus. Sin embargo, un estudio confirmó que los baculovirus poseen un factor sinérgico que aumenta y facilita la entrada a las células del intestino medio (Nakagaki *et al.*, 1987). Posteriormente, otros trabajos han descrito que los ODVs se unen a receptores específicos y que diferentes virus pueden tener diferentes receptores.

Tal es el caso del NPV de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) (LdNPV), para el cual se confirmó que la entrada de ODVs a la célula hospedera se da por una vía diferente a la endocitosis (Horton y Burand 1993). En otro estudio se demostró que el AcNPV es infectivo sobre larvas de *S. frugiperda* pero solo a dosis muy altas. Al comparar la unión de los ODVs del AcNPV y del SfNPV con células del intestino medio de larvas de *S. frugiperda*, se observó que el AcNPV se unió a estas células en niveles mucho menores que el

SfNPV. Además, el AcNPV no compite con el SfNPV por los sitios de unión en ensayos de co-inoculación, sugiriendo que los dos virus se unen a receptores diferentes (Haas-Stapleton *et al.*, 2003; Haas-Stapleton *et al.*, 2005).

Jakubowska (2010) demostró que dos NPV cercanamente relacionados, el de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (SeNPV) y el de *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) (AgseNPV), a pesar del alto nivel de similitud de secuencias de su genoma difieren significativamente en su capacidad para infectar especies de insectos *per os*. Mientras el AgseNPV causó infección letal en larvas de *S. exigua* cuando se administró por vía oral, el SeNPV solo fue letal para *A. segetum* cuando se inyectó en el hemocele. El seguimiento del proceso de infección del SeNPV en larvas de *A. segetum* reveló que la principal barrera para la infección en el sistema virus/hospedero se dio en el intestino medio del insecto.

Varios genes de los baculovirus que codifican para proteínas requeridas para la infectividad vía oral han sido identificados. Estos factores de infectividad *per os* son conocidos como *pifs* y están compuestos por las proteínas PIF0, PIF1, PIF2, PIF3, PIF4, PIF5 y PIF6 (Kikhno *et al.*, 2002; Haas-Stapleton *et al.*, 2004; Slack y Arif 2006; Thiem y Cheng 2009; Garavaglia *et al.*, 2012), componentes de la envoltura de los ODVs y todos excepto PIF3, involucrados en la unión a receptores (Ohkawa *et al.*, 2005). Cabe destacar que tres de estos genes se encuentran conservados en todos los baculovirus secuenciados hasta la fecha (Okano *et al.*, 2006; Rohrmann 2011), lo que sugiere su importancia funcional y la probable relación entre la resistencia de algunos insectos a infecciones con ciertos baculovirus con una unión y fusión ineficiente de estos con las células del intestino medio.

Este el caso de la proteína P74, sugerida como un factor determinante del rango de hospederos, ya que la delección del gen *p74* en el genoma de SeNPV resultó en la ausencia completa de infectividad *per os* sobre larvas de *S. exigua*, mientras que la inyección de BV en el hemocele permitió el desarrollo normal de la infección (Simón *et al.*, 2005b). Igualmente, cuando se reemplazó el gen *p74* de AcNPV con el del NPV de *S. litura*, se eliminó la infectividad oral del AcNPV sobre larvas de *Argyrogramma agnata* (Lepidoptera: Noctuidae) (Wu *et al.*, 2003).

Luego de la unión de los ODVs a las células y su replicación, los BVs deben salir de las células del intestino medio para diseminar la infección. En este sentido, la siguiente barrera que deben atravesar es la lámina basal,

un conjunto de capas delgadas y flexibles ubicadas en el lado basal de las células epiteliales, compuestas por proteínas como colágeno, laminina y proteoglicano (Pasarelli 2011). Si los virus son capaces de atravesar la lámina basal, se establecerá una infección exitosa gracias a la infección de la tráquea, que posee un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que le permite ramificarse y alcanzar diferentes tejidos (Detvisitsakun *et al.*, 2006). Los baculovirus son los únicos virus que también presentan un factor proteico FGF codificado por el gen *fgf* viral (*vfgf*), que se encuentra conservado en los alfa y beta baculovirus pero no en los gamma y los delta baculovirus (Jehle *et al.*, 2006; Katsuma *et al.*, 2008), los cuales solo infectan el intestino medio del insecto, lo que sugiere su incapacidad para atravesar la lámina basal. Además, existe una alta correlación entre la presencia de *vfgf* en el genoma viral y la capacidad de generar infecciones sistémicas, sugiriendo que este factor puede tener un efecto diferente en cada tejido y ser un factor clave de especificidad (Detvisitsakun *et al.*, 2006).

El siguiente paso que contempla uniones del virus a la célula, es el ingreso de los BVs al espacio intracelular, para lo que no se identificado un receptor específico. Por ejemplo, los BVs del AcNPV pueden entrar en diversas células incluyendo células de mamíferos (Morris y Miller 1993; Huang *et al.*, 1997), observaciones que sugerirían que la unión de los BVs a receptores tiene poca influencia en la especificidad de los baculovirus a nivel celular. Sin embargo, existen dos tipos de proteínas de fusión asociadas a los BVs: la proteína GP64 y la proteína F, para las cuales se ha demostrado la unión a diferentes receptores (Okano *et al.*, 2006; Westenberg *et al.*, 2007; Li y Blissard 2009). Para el caso de las proteínas GP64 del AcNPV y del BmNPV que comparten un 95% de homología de sus aminoácidos, se ha demostrado que la proteína GP64 del AcNPV es más eficiente para realizar la fusión con las membranas que la GP64 del BmNPV (Rahman y Gopinathan 2003). Sin

embargo, a pesar de estas evidencias no es posible asegurar que la entrada de los BVs determine una restricción importante para el rango de hospederos.

Replicación viral, ensamblaje y liberación: genes involucrados en la especificidad. No siempre la entrada de los baculovirus al intestino medio o la infección primaria son los factores limitantes para su rango de hospederos (Simón *et al.*, 2004). Desde los años 90, muchos genes de los baculovirus que influyen en su especificidad han sido identificados pero su función específica y los mecanismos que controlan el rango de hospederos aún no han sido entendidos completamente. Las evidencias disponibles sugieren que la restricción para el desarrollo de la infección de los baculovirus ocurre después de la entrada del virus a la célula y que puede ser bloqueada en diferentes puntos del ciclo replicativo (Morris y Miller 1993; Wang *et al.*, 2008. Jakubowska 2010). Estos puntos, que incluyen transporte al sitio de replicación, expresión de los genes virales y generación de la progenie viral, requieren interacciones complejas entre el virus y su célula hospedera.

Nuevamente el modelo AcNPV y BmNPV ha sido el más estudiado, determinando que el patrón de expresión de genes de cada baculovirus es diferente en células permisivas comparado con células no permisivas (Huang *et al.*, 1997; Iwanaga *et al.*, 2004). En los estudios *in vivo* también se ha demostrado un patrón de comportamiento diferente en hospederos permisivos y no permisivos (Hernández-Crespo *et al.*, 2001.; El-Salamouny *et al.*, 2003). Por ejemplo, el NPV de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (HaNPV) sobre larvas de *S. exigua* que es un insecto semi-permisivo a la infección por dicho virus, causó sintomatología de infección diferente a la normal, sin licuefacción de tejidos, productividad de poliedros muy baja e infección localizada (Herz *et al.*, 2003). Esto sugiere que en insectos menos susceptibles, la infección viral puede ser detenida por apoptosis u otros mecanismos.

Tabla 1. Genes relacionados con el rango de hospederos de baculovirus.

Gen	Función
<i>p143</i>	Replicación del ADN
<i>p35 - iap</i>	Previenen apoptosis
<i>ie-2</i>	Transactivador, control de ciclo celular
<i>lef-7</i>	Estimula la replicación del ADN viral
<i>hcf-1</i>	Factor de expresión tardía
<i>hrf-1</i>	Previene la detención de síntesis de proteínas

Se han identificado 6 genes principales que afectan el rango de hospederos (tabla 1). La mayoría de estos han sido identificados en el AcNPV.

La posible función de las proteínas relacionadas con la especificidad de los baculovirus se describe a continuación:

P143: Es una helicasa involucrada en la replicación del ADN (Rohrmann 2011). El gen que la codifica fue el primero en asociarse con el rango de hospederos de los baculovirus, cuando el BmNPV y el AcNPV fueron usados para coinfectar células TN368 y Sf21, las cuales soportan la replicación del AcNPV pero no del BmNPV. En dicho trabajo, se determinó que hubo recombinación entre los dos virus y el virus resultante presentó mayor rango de líneas celulares infectadas. También se determinó que la inserción en el genoma de una región de 600 pb del AcNPV, corresponde al gen *p143* (Maeda *et al.*, 1993). En otro estudio, la sustitución de dos aminoácidos en la proteína P143 del AcNPV fue suficiente para generar la infección y muerte de larvas de *B. mori* (Argaud *et al.*, 1998)

El hecho de que la sustitución o modificación de la helicasa del AcMNPV permita su replicación en células no permisivas de *B. mori*, implica la posible participación de algunos de estos dominios en su interacción con factores específicos del hospedero o del virus. En este sentido, se sabe que P143 interactúa con el factor de expresión tardía 3 (LEF-3) y facilita su transporte al núcleo (Wu y Carsten 1998). Por lo tanto, se sugiere que la interacción de la helicasa con otros factores virales o celulares es necesaria para llevar a cabo la replicación del ADN y la expresión de genes tardíos del virus.

P35: Las células de insectos tienen habilidad para detectar la presencia de la infección viral e iniciar la apoptosis (Sparks *et al.*, 2008). Sin embargo, los baculovirus son capaces de interferir con la apoptosis mediante la expresión de proteínas inhibitorias de la misma, como P35 (Rohrmann 2011). Esto se demostró con un AcNPV que tenía una delección en el gen *p35*, la cual resultó en una lisis y muerte celular prematuras (Clem y Miller 1994). El mecanismo consiste en que P35 se escinde y se une fuertemente a las caspasas, proteasas fundamentales en el proceso de muerte celular, provocando un cambio conformacional y la formación de un enlace covalente entre la caspasa y P35. Los productos de degradación permanecen de forma estable asociados a la caspasa inhibida (Fisher *et al.*, 1999; Hefferon 2004; Sparks *et al.*, 2008), evitando la cascada de señalización y por ende inhibiendo la apoptosis.

Se considera que *p35* es un factor de especificidad de los baculovirus, ya que se ha demostrado para el AcNPV, que su delección reduce la habilidad del virus para infectar células Sf21 y larvas de *S. frugiperda* (Thiem y Cheng 2009). Cuando al virus AcNPV con la delección se le insertó otro gen supresor de la apoptosis, *iap* del GV de *Cydia pomonella*, el virus fue capaz de infectar nuevamente células Sf21 (Hefferon 2004). Esto evidencia que además del gen *p35*, existen otros genes con la misma función de supresión de la apoptosis, como *iap* y *p49* (Thiem 1997), que realizan esta función por mecanismos diferentes (Zoog *et al.*, 2002; Katsuma *et al.*, 2008). Por ejemplo, el OpNPV no posee el gen *p35* pero sí el *iap*, el cual actúa como reemplazo funcional de *p35* bloqueando la activación de las caspasas (Hefferon 2004; Rohrmann 2008).

IE-2: Es un factor de transcripción que puede detener el ciclo celular y que contiene motivos que sugieren alta interacción con otras proteínas y con factores de la maquinaria de transcripción (Yoo y Guarino 1994, Rohrmann 2011). De hecho la habilidad de *ie-2* de detener el ciclo celular depende de la integridad del dominio RING finger (Hefferon 2004).

Durante la infección del AcNPV se ha observado que el factor IE-2 es necesario para la transcripción de genes tardíos sobre células Sf21 pero no lo es sobre células Tn368 o Hi5, sugiriendo que es un gen asociado al rango de hospederos (Lu y Miller 1995). Por ejemplo, en un ensayo en el que AcNPV sufrió una delección de *ie-2*, el virus fue capaz de infectar células pero se presentaron deficiencias en la replicación del ADN, la transcripción y la producción de BVs y CIs en líneas celulares Sf21, Tn368 y Hi5, con un efecto más drástico en la línea celular Sf21 (Gomi *et al.*, 1997, revisado por Thiem y Cheng 2009). Estos efectos en las diferentes líneas celulares sugieren que el factor IE-2 puede estar involucrado en tropismo celular.

En otro trabajo, Harrison (2009) reportó que la variante del gen *ie-2* del NPV de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) (PlxyNPV) pudo haber sido adquirida por recombinación con el AcNPV y que dicha variación es la responsable de su rango de hospederos.

LEF-7: Este es un factor de expresión tardío capaz de transactivar promotores que contienen TAAG (Jakubowska 2010). Tiene efectos estimulantes pero no es esencial para la replicación (Lu y Miller 1995; Hasnain *et al.*, 1997; Thiem 1997; Hefferon 2004) y solo se ha encontrado en diez de los baculovirus secuenciados hasta el momento (Thiem y Cheng 2009). Se consideró un factor de especificidad cuando su delección en el genoma del AcNPV disminuyó su capacidad de repli-

cación y se produjeron cantidades menores de BVs y de CIs en células Sf21 (Chen y Thiem 1997). Sin embargo, no es esencial para la replicación del virus en células Tn368 ni BmN (Thiem 1997; Thiem y Cheng 2009).

HCF-1 (Host Cell Factor): Está presente en 4 especies de baculovirus. Es uno de los tres genes *lef* que están en el genoma del AcNPV pero no en el de BmNPV, por lo cual se presume que está involucrado con el rango de hospederos. No tiene homólogos fuera de los baculovirus y tiene escasez de motivos que puedan sugerir una función (Thiem y Cheng 2009). Solo se sabe que es un factor necesario para la expresión transitoria de un gen promotor tardío (Rohrmann 2011). La falta del gen *hcf-1* hace que se produzcan CIs morfológicamente diferentes y que se retrase su producción (Lu y Miller 1996). Podría decirse que el gen *hcf-1* funciona más como un factor de virulencia que como un factor determinante para el rango de hospederos y parece tener un rol importante en el tropismo celular en el insecto (Thiem y Cheng 2009). Esto posiblemente porque su ausencia en el AcNPV reduce la patogenicidad pero no detiene la infección (Lu y Miller 1996).

Aunque el rol de la proteína HCF-1 en la infección aún no está claro, su actividad parece requerir asociación y tiene localización nuclear (Hefferon 2004). Puede desempeñar un papel importante en la replicación del ADN viral o en la respuesta inmune, promoviendo vías de defensa en cada hospedero (Lu y Miller 1996; Hefferon 2004).

HRF-1: Es una proteína de 25 kDa que de alguna manera inhibe el apagado de síntesis de proteínas en células infectadas, permitiendo la replicación viral (Popham *et al.*, 2010). Se identificó en un tamizado genético de factores involucrados en el rango de hospederos del LdNPV (Thiem *et al.*, 1996) y solo se ha identificado un homólogo, que se encuentra en el baculovirus de *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae) OpNPV que también se replica en la línea celular de *L. dispar* Ld652Y (Thiem y Cheng 2009).

La línea celular Ld652Y se considera semipermissiva para el AcNPV ya que se transcriben todos los genes virales, pero la traducción del ARNm del hospedero y del virus se bloquea en la infección tardía (Rohrmann 2011). Cuando las células Ld652Y se coinfectaron con el AcNPV y el LdNPV, el primero fue capaz de producir infección viral (Thiem 1997), sugiriendo que la presencia del factor *hrf-1* del LdNPV fue capaz de ampliar el rango de hospederos del AcNPV. En otro trabajo, un AcNPV recombinante que expresaba el gen *hrf-1* de LdNPV se replicó eficientemente en la línea celular Ld652Y y la presencia de este gen convirtió la línea ce-

lular no permisiva en permisiva (Ishikawa *et al.*, 2004). Sin embargo, no se conoce el mecanismo mediante el cual *hrf-1* recupera la traducción.

Interacciones virus – hospedero que afectan la especificidad

Las interacciones de los baculovirus y sus hospederos son la evidencia de sus complejas relaciones y evolución conjunta. Entender la influencia del insecto en los baculovirus y su desempeño también da las pautas para el entendimiento de la especificidad de estos virus.

Inmunidad del insecto: barreras para los baculovirus.

Los insectos presentan múltiples mecanismos de defensa que deben ser atravesados por los baculovirus con el fin de multiplicarse en el hospedero. Cada uno podría imponer la selectividad en el sistema y esto ha sido descrito como el “modelo de defensa” (Schmid-Hempel y Ebert 2003, citado por Cory y Myers 2003). La resistencia de los insectos a los baculovirus se encuentra bien documentada, tanto en poblaciones de laboratorio como de campo (Sparks *et al.*, 2008).

Las barreras físicas y fisiológicas representan la primera línea de defensa de los insectos antes las infecciones virales. Como se describió anteriormente, la primera barrera que deben atravesar los baculovirus para establecer infecciones sistémicas eficientes es el intestino medio. El insecto emplea múltiples defensas innatas para proteger las células columnares de esta infección, como la MP, la muda de las células del intestino medio (Wang y Granados 2000; Haas-Stapleton *et al.*, 2003) y la excreción de proteasas y lipasas con actividad antiviral (Cory y Myers 2003; Sparks *et al.*, 2008).

Posteriormente, el insecto puede ejercer defensas relacionadas con la inmunidad celular, como la habilidad del insecto para reconocer los tejidos infectados y eliminarlos sin causar daños mayores. Los insectos reconocen los tejidos normales de los infectados basados en la presencia o ausencia de una correcta estructura de la lámina basal, la cual es importante para la respuesta inmune de los hemocitos (Passarelli 2011). En el caso de infecciones virales, la replicación de los virus puede dar lugar a la distensión de la membrana basal, generando un reconocimiento por parte del insecto (McNeil *et al.*, 2010).

Después del reconocimiento, una de las estrategias de defensa del insecto puede ser la encapsulación de los focos virales y la resistencia a la infección en los hemocitos, las células encargadas de la encapsulación. Este es el caso del AcNPV, con el cual se realizó un estudio

sobre su hospedero permisivo *Heliiothis virescens* (Lepidoptera: Lymantriidae) y uno semi-permisivo *H. zea*, encontrando que la diferencia en la susceptibilidad a la infección viral en los dos insectos, se basa en que el virus es incapaz de replicarse en los hemocitos de *H. zea* (Trudeau *et al.*, 2001, citado por Sparks *et al.*, 2008). Los hemocitos infectados con baculovirus no son capaces de realizar encapsulación, por lo tanto, la infección exitosa de los hemocitos también reduce la capacidad del insecto hospedero para defenderse.

Otro mecanismo de defensa del hospedero es la apoptosis, que es activada por las caspasas del hospedero. Sin embargo, estas enzimas pueden a su vez ser inactivadas por proteínas de los baculovirus, definiendo de esta forma el rango de hospederos. Se cree que la inducción de la apoptosis en el insecto también puede estar dada por la expresión de las proteínas necesarias para la síntesis del ADN viral (Sparks *et al.*, 2008).

Con respecto a la inmunidad humoral, en el caso de infecciones por baculovirus una de las vías más estudiadas es la de la fenoloxidasasa (PO), una enzima presente en el plasma de los insectos con efectos virucidas comprobados sobre algunos NPVs y con un papel importante en la inmunidad (McNeil *et al.*, 2010). Esta enzima existe como zimógeno en el plasma y se activa por la presencia de compuestos fúngicos, bacterianos y virales (Sparks *et al.*, 2008). Su efecto antiviral se encuentra demostrado en el trabajo realizado por Popham *et al.* (2004), en el que la incubación del NPV de *H. zea* con el plasma de este insecto en el que se encontraba la enzima PO activada, redujo la infectividad del virus más de diez veces. Otros factores humorales con actividad antiviral descritos son los eicosanoides, las lipasas y las serin-proteasas entre otros (Guo *et al.*, 2005; Sparks *et al.*, 2008).

Las diferencias en la respuesta inmune de hospederos permisivos y no permisivos también pueden estar relacionadas con diferencias genéticas de los insectos (Popham *et al.*, 2010). Por ejemplo, Guo *et al.* (2005) demostraron que la diferencia genética entre poblaciones de *B. mori* altamente susceptibles y poco susceptibles a la infección con el AcNPV, es la presencia de un gen dominante anti-AcNPV o un conjunto de genes relacionados que previenen la infección, aunque aún no se conoce cómo funcionan. Una posibilidad es que este factor impida la propagación del AcNPV, por la inhibición de la transcripción y la expresión de genes virales esenciales para el proceso de infección. Otra posibilidad es que estos factores generen mecanismos de defensa.

Diferentes patrones de expresión de proteínas dependiendo del tipo de hospedero han sido evidenciados,

tal es el caso de un trabajo en líneas celulares permisivas y no permisivas en las que se expresaron 154 genes del AcNPV, pero su expresión se retrasó más de 12 horas en las células no permisivas y 74 genes se expresaron a mayores niveles en células no permisivas comparado con células permisivas (Iwanaga *et al.*, 2004). En el caso del NPV de *B. mori* se estudiaron dos líneas celulares con diferente susceptibilidad comparando su proteoma y se determinó la expresión diferencial de dos proteínas, la beta-N-acetilglucosaminidasa y la aminoacilasa, que presentaron mayores niveles de expresión en la línea resistente (Liu *et al.*, 2010)

En otro estudio realizado por Popham *et al.* (2010) también se demostró la hipótesis de que la infección por diferentes baculovirus influencia la expresión de proteínas celulares. Estos autores evaluaron tres sistemas: hospederos permisivos, semi-permisivos y no permisivos y observaron el aumento o reducción de la expresión de proteínas del hospedero dependiendo de su susceptibilidad. Las proteínas sobre-expresadas en células permisivas infectadas estaban asociadas a la transducción de señales, la protección celular y el superenrollamiento del ADN. Esto sugiere que el éxito de los baculovirus en infecciones permisivas está favorecido por la regulación positiva de proteínas selectas involucradas en el desarrollo de la infección y en la regulación negativa de proteínas involucradas en la protección y el funcionamiento celular.

Coevolución virus-insecto. Gracias a la disponibilidad de genomas secuenciados de baculovirus filogenéticamente cercanos y lejanos, se han logrado establecer los parámetros importantes de la evolución de los baculovirus y evidenciar eventos de transferencia horizontal de genes, duplicación de genes o captura de estos del hospedero o de otros virus (Herniou *et al.*, 2001; Jakubowska 2010).

Los análisis filogenéticos de baculovirus de especies de los órdenes Lepidoptera, Diptera e Himenoptera muestran una clara división de los baculovirus de acuerdo al orden de sus hospederos, sugiriendo interacciones coevolutivas ancestrales entre baculovirus y sus hospederos (Herniou *et al.*, 2004). Correspondiente con estos análisis genéticos, actualmente existen muchas evidencias de la adaptación de los baculovirus a sus insectos susceptibles, lo cual ha influenciado su especificidad y rango de hospederos. Existen dos hipótesis que soportan esta teoría: la primera es que los baculovirus evolucionaron dentro de un grupo de artrópodos como los lepidópteros y luego cambiaron a otros grupos de insectos y la segunda propone que la asociación entre baculovirus y sus hospederos se

remonta al origen de los insectos o incluso de los artrópodos y que han coevolucionado con los virus, colonizando diferentes órdenes de insectos (Miller 1997; Herniou *et al.*, 2004; Rohrmann 2011).

En primer lugar, la heterogeneidad geográfica en las interacciones hospedero-patógeno juega un papel importante en los procesos evolutivos (Cory y Myers, 2003). Los baculovirus deben adaptarse a la población local de insectos, lo cual es posible debido a la variabilidad genética en el insecto y en el virus (Espinel-Correal *et al.*, 2010). Esta separación geográfica da lugar a que los mismos virus aislados en diferentes regiones presenten diferencias a nivel molecular y en su patogenicidad y virulencia (Hodgson *et al.*, 2001; Cory y Myers 2003; Espinel-Correal *et al.*, 2010, Barrera *et al.*, 2011). Cuando un baculovirus invade una nueva especie hospedera, generalmente este insecto está relacionado con el hospedero inicial. La adaptación del virus al hospedero puede llevar al aislamiento de un nuevo genotipo (Herniou *et al.*, 2004).

Uno de los casos más estudiados a nivel mundial ha sido el del granulovirus de *P. operculella*, el cual ha sido ampliamente investigado en términos de diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos de diversos orígenes geográficos. Por ejemplo, Vickers *et al.*, (1991) compararon 14 aislamientos del PhopGV de ocho regiones del mundo y encontraron tres genotipos diferentes y diferencias significativas en la actividad biológica de los aislamientos. Jakubowska (2010) también estableció que el NPV de *Leucoma salicis* (Lepidoptera: Lymantriidae) y el de *O. pseudotsugata* son variantes genéticas del mismo virus, ya que *L. salicis* está presente en Europa y Asia y fue introducido en América en 1920, mientras que *O. pseudotsugata* solo está presente en Norteamérica, sugiriendo que LesaNPV pudo haber migrado junto con su insecto hospedero *L. salicis* a Norteamérica y puede ser el ancestro de OpNPV. También podría sugerir que LesaNPV y OpNPV tienen un ancestro común con una distribución geográfica más amplia.

El segundo factor que influye la coevolución es la recombinación entre variantes genéticas dentro de un mismo individuo. Los baculovirus se replican clonalmente, pero la co-infección puede permitir el intercambio de material genético. La recombinación ocurre *in vivo* con alta frecuencia entre genotipos cercanamente relacionados (Hajós *et al.*, 2000; Cory y Myers 2003) y es un mecanismo de adaptación más favorable que la mutación (Harrison 2009). Las variantes individuales de la misma población viral obtenidas *in vitro* e *in vivo* también varían en sus características biológicas (Hernández-Crespo *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2001).

Por otra parte, existe amplia evidencia de que los baculovirus pueden adquirir genes de sus hospederos por transmisión horizontal, mejorando su adaptación. Un ejemplo es el trabajo de Hughes y Friedman (2003, citado por Katsuma *et al.*, 2008) quienes evaluaron 13 genomas de baculovirus y mediante análisis filogenéticos propusieron que los genes *iap* y *egt* pudieron haber sido transferidos desde organismos celulares. Katsuma *et al.* (2008) también sugirieron dicho fenómeno, al determinar que 15 de 136 proteínas de BmNPV (11%) son significativamente similares a proteínas del insecto *B. mori*, nueve son genes auxiliares y seis genes son esenciales para la replicación del virus. Esta presencia de genes auxiliares en el genoma de los baculovirus, posiblemente les confiere ventajas evolutivas (O'Reilly 1995) y se presume que puedan haber sido adquiridos de los insectos.

Por último, existe evidencia del efecto evolutivo de los pases sucesivos de poblaciones de baculovirus sobre diferentes especies de insectos, posiblemente por cambios en la estructura genética y la actividad biológica del virus (Cory y Myers 2003; Espinel-Correal *et al.*, 2010). Esto se evidencia en diferentes estudios que se resumen a continuación: cinco pases sucesivos del HzNPV en larvas de *H. zea* resultaron en un aumento del 80% en su virulencia (Shapiro e Ignoffo 1970). Siete pases del NPV de *O. pseudotsugata* en *T. ni* resultaron en la adaptación de este virus a *T. ni*. A partir del séptimo la infección pasó de ser localizada a sistémica (Martignoni e Iwai 1986). Tres pases sucesivos de una población viral del PfNPV a través de cinco especies de insectos diferentes, demostró que la intensidad de los marcadores de genotipos cambió en cada insecto, sugiriendo que la infección de diferentes especies juega un papel importante en el mantenimiento de la diversidad genética de poblaciones de baculovirus (Hitchman *et al.*, 2007)

Conclusiones y perspectivas

La especificidad de los baculovirus es la principal característica que les permite ser empleados exitosamente en diversas aplicaciones biotecnológicas y el entendimiento de las bases fisiológicas, ecológicas y moleculares que definen su rango de hospederos es la clave para mejorar y aprovechar su uso. Cada secuenciación del genoma de un nuevo baculovirus continúa revelando información importante sobre el rango de hospederos y su especificidad, por esto los esfuerzos de investigación deben encaminarse a continuar con esta actividad, con el fin de establecer nuevas relaciones evolutivas y filogenéticas.

Por otra parte, todos los genes implicados en el rango de hospederos, hasta el momento han sido encon-

trados usando cultivos celulares, por lo que se deben desarrollar sistemas que permitan la evaluación *in vivo* de dichos genes con el fin de lograr un mejor entendimiento de sus funciones. También es necesario identificar más genes implicados en el rango de hospederos de los baculovirus y estudiar más a fondo el desarrollo de la respuesta inmune de los insectos, parámetro que también influye en la capacidad de replicación viral. Trabajar con nuevos modelos de virus taxonómicamente similares pero con rango de hospederos diferentes, como se ha hecho hasta el momento con el modelo AcNPV - BmNPV, que ha permitido encontrar diferentes interacciones virales involucradas en la especificidad, podría ser de gran utilidad para elucidar los mecanismos involucrados ésta. En este sentido, uno de los modelos podría ser el de el NPV de *L. salicis* y el de *O. pseudotsugata*, los cuales tienen las características necesarias para encontrar nuevos genes y proteínas que definan el rango de hospederos.

Por último, para las aplicaciones de los baculovirus en campo, cada modelo biológico debe ser evaluado individualmente con el fin de determinar la necesidad de especialización del agente viral, además de seguir cuidadosamente su evolución en campo. Esto permitirá obtener nuevas herramientas que permitan entender la coevolución entre los baculovirus y sus insectos hospedero además de ampliar la seguridad del uso de estos.

Referencias bibliográficas

- Argaud, O., Croizier, L., López-Ferber, M., Croizier, G. 1998. Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. *Journal of General Virology*. 79: 931 - 935.
- Barrera, G., Oihane, S., Villamizar, L., Williams, T., Caballero, P. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control*. 58 (2): 113-120.
- Caballero, P., López-Ferber, M., Williams, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial Phytoma. España. Universidad Pública de Navarra. p 517.
- Chen, C., Thiem, S. 1997. Differential infectivity of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of *lef-7* deletion. *Virology*. 227 (1): 88-95.
- Clem, R., Miller, L. 1994. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Molecular and Cellular Biology*. 14 (8) : 5212-5222
- Cory, J., Myers, J. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34: 239-272
- Cory, J., Green, B., Paul, R., Hunter-Fujita, F. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89 : 101-111.
- Detvisitsakun, C., Hutfless, E., Berreta, M., Passarelli, L. 2006. Analysis of a baculovirus lacking a functional viral fibroblast growth factor homolog. *Virology*. 346 : 258-265.
- Doyle, C., Hirst, M., Cory, J., Entwistle, P. 1990. Risk assessment studies-Detailed host range testing of wild type cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) Nuclear Polyhedrosis-Virus. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(9) : 2704-2710.
- Espinell-Correal, C., Léry, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddani, J-L., Cotes, A., López-Ferber, M. 2010. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (22) : 7617 - 7625.
- El-salamouny, S., Lange, M., Jutzi, M., Huber, J., Jehle, J. 2003. Comparative study on the susceptibility of cutworms (Lepidoptera: Noctuidae) to *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus and *Agrotis ipsilon* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84 : 75-82.
- Fisher, A., de la Cruz, W., Zoog, S., Schneider, C., Friesen, P. 1999. Crystal structure of baculovirus P35: Role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. *EMBO Journal*. 18 : 2031-2039.
- Garavaglia, M. J., Miele, S. A. B., Iserete, J.A., Belaich, M.N., Ghiringhelli, P.D. 2012. The *ac53*, *ac78*, *ac101*, and *ac103* genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. *Journal of virology*. 86 (22) : 12069-12079.
- Gröner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. In: The biology of baculoviruses. Vol. 1 pp. 177 - 202. Editado por: Granados, R., Federici, A. Boca Raton: CRC Press.
- Gelernter, W., Federici, B. 1986. Isolation, identification, and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*. 15 : 240 - 245.
- Guo, T., Wang, S., Guo, X., Lu, C. 2005. Productive infection of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus in silkworm *Bombyx mori* strain Haoyue due to the absence of a host antiviral factor. *Virology*. 341: 231 - 237.
- Haas-Stapleton, E., Washburn, J., Volkman, L. 2003. Pathogenesis of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus in fifth instar *Spodoptera frugiperda*. *Journal of General Virology*. 84 : 2033-2040.
- Haas-Stapleton, E., Washburn, J., Volkman, L. 2004. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Virology*. 78 : 6786 - 6791.
- Haas-Stapleton, E., Washburn, J., Volkman, L. 2005. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of General Virology*. 86 : 1349-1355.
- Hajos, J., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Zavodszky, P., Vlak, J. 2000. High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. *Archives of Virology*. 145: 159-164.
- Hasnain, S., Jain, A., Habib, S., Ghosh, S., Chatterji, U., Ramachandran, A., Das, P., Venkaiah, B., Pandey, S., Liang, B., Ranjan, A., Natarajan, K., Azim, A. 1997. Involvement of host factors in

- transcription from baculovirus very late promoters – a review. *Gene*. 190 : 113 – 118.
- Harrison, R. 2009. Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101 : 181 – 186.
- Hefferon, K., 2004. Baculovirus late expression factors. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 7 : 89 – 101.
- Hernández-Crespo, P., Sait, S., Hails, R., Cory, J. 2001. Behavior of a recombinant baculovirus in lepidopteran hosts with different susceptibilities. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (3): 1140 – 1146.
- Herniou, E., Luque, T., Chen, X., Vlák, J., Winstanley, D., Cory, J., O'Reilly, D. 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology*. 75 : 8117-8126.
- Herniou, E., Olszewski, J., Cory, J., O'Reilly, D. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Reviews in Entomology*. 48 : 211 – 234.
- Herniou, E., Olszewski, J., O'Reilly, D., Cory, J. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*. 78 (7) : 3244-3251.
- Herz, A., Kleespies, R., Huber, J., Chen, X., Vlák, J. 2003. Comparative pathogenesis of the *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus in noctuid hosts of different susceptibility. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83 : 31–36.
- Hitchman, R., Hodgson, D., King, L., Hails, R., Cory, J., Possee, R. 2007. Host mediated selection of pathogen genotypes as a mechanism for the maintenance of baculovirus diversity in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*. 94 : 153 – 162.
- Hodgson, D., Vanbergen, A., Watt, A., Hails, R., Cory, J. 2001. Phenotypic variation between naturally coexisting genotypes of a Lepidopteran baculovirus. *Evolutionary Ecological Research*. 3: 687–701.
- Hodgson, D., Hitchman, R., Vanbergen, A., Hails, R., Cory, J. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. *Journal of Evolutionary Biology*. 17 : 1018-1025.
- Horton, H., Burand, J. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology*. 67 (4) : 1860 – 1868.
- Hughes, D., Possee, R., King, L. 1993. Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects. *Virology*. 194 (2) : 608 – 615.
- Huang, X., Davis, T., Hughes, P., Wood, A. 1997. Potential replication of recombinant baculoviruses in nontarget insect species: reporter gene products as indicators of infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69 : 234 – 245.
- Ishikawa, H., Ikeda, M., Alves, C., Thiem, S., Kobayashi, M. 2004. Host range factor 1 from *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (NPV) is an essential viral factor required for productive infection of NPVs in IPLB-Ld652Y cells derived from *L. dispar*. *Journal of Virology*. 78 (22) : 12703-12708.
- Iwanaga, M., Takaya, K., Katsuma, S., Ote, M., Tanaka, S., Kamita, S., Kang, W., Shimada, T., Kobayashi, M. 2004. Expression profiling of baculovirus genes in permissive and nonpermissive cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 323 : 599 – 614.
- Jakubowska, A. 2010. Genomic support for speciation and specificity of baculoviruses. Tesis de Doctorado Universidad de Wageningen. 138 p.
- Jehle, J., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y., Hauschild, R. 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*. 346 : 180 – 193.
- Katsuma, S., Kawaoka, S., Mita, K., Shimada, T. 2008. Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38 : 1080–1086.
- Kikhno, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G., López-Ferber, M. 2002. Characterization of pif, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*. 83 : 3013-3022.
- Kost, T., Condreay, P. 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*. 20 (4) : 173 180.
- Lange, M., Wang, H., Zhihong, H., Jehle, J. 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. *Virology*. 325 : 36-47.
- Lehane, M. 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*. 42 : 525–550.
- Li, Z., Blissard, G. 2009. The *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein: analysis of transmembrane domain length and sequence requirements. *Journal of Virology*. 83 (9) : 4447 – 4461.
- Liu, H. 1987. Host specific gene expression of the baculovirus, *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus, in insect cell lines. Tesis de doctorado. Texas Tech University. 72p.
- Liu, X., Yao, Q., Wang, Y., Chen, K. 2010. Proteomic analysis of nucleopolyhedrovirus infection resistance in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 105: 84–90.
- Lu, A., Miller, L. 1995. The roles of 18 baculovirus late expression factor genes in transcription and ADN replication. *Journal of Virology*. 69 (2) : 975-982.
- Lu, A., Miller, L. 1996. Species-specific effects of the hcf-1 gene on baculovirus virulence. *Journal of Virology*. 70 (8) : 5123-5130.
- Maeda, S., Kamita, S., Kondo, A. 1993. Host-range expansion of *Autographa-californica* nuclear polyhedrosisvirus (NPV) following recombination of a 0.6-Kilobasepair ADN fragment originating from *Bombyx-mori* NPV. *Journal of Virology*. 67 (10) : 6234-6238.
- Maramorosch, K., Shatkin, A., Murphy, F. 2011. Advances in Virus Research. Academic Press. Estados Unidos. P. 195 .
- Martignoni, M., Iwai, P. 1986. Propagation of multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orygia pseudotsugata* in larvae of *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 4 : 32–41.
- Matthews, H., Smith, I., Edwards, J. 2002. Lethal and sublethal effects of a granulovirus on the tomato moth *Lacanobia oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 80 : 73 – 80.
- McNeil, J., Cox-Foster, D., Slavicek, J., Hoover, K. 2010. Contributions of immune responses to developmental resistance in *Lymantria dispar* challenged with baculovirus. *Journal of Insect Physiology*. 56 : 1167 – 1177.
- McWilliam, A. 2006. Environmental impact of baculoviruses. Food and Agriculture Organization. www.fao.org/teca/system/files/R7299_FTR_anx3.pdf
- Miller, L. 1997. The Viruses: The Baculoviruses. New York: Plenum Press. 433 p.

- Morris, T., Miller, L. 1993. Characterization of productive and non-productive AcMNPV Infection in selected insect cell lines. *Virology*. 197 : 339 – 348.
- Nakagaki, M., Ohba, M., Tanada, Y. 1987. Specificity of receptor sites on insect cells for the synergistic factor of an insect baculovirus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 50 : 169 – 175.
- Okano, K., Vanarsdall, A., Mikhailov, V., Rohrmann, G. 2006. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. *Virology*. 344 : 77 – 87.
- O'Reilly, D. 1995. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25 : 541-550.
- Ohkawa, T., Washburn, J., Sitapara, R., Sid, E., Volkman, L. 2005. 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. *Journal of Virology*. 79 (24) : 15258 - 15264.
- Pasarelli, L. 2011. Barrier to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology*. 411 : 383 – 392.
- Plymale, R., Grove, M., Cox-Foster, d., Ostiguy, N., Hoover, K. 2008. Plant-mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in Lepidoptera larvae. *Journal of Insect Physiology*. 54 : 737 – 749.
- Popham, H., Shelby, K., Brandt, S., Coudron, T. 2004. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*. 85 : 2255-2261.
- Popham, H., Grasela, J., Goodman, C., McIntosh, A. 2010. Baculovirus infection influences host protein expression in two established insect cell lines. *Journal of Insect Physiology*. 56 : 1237-1245.
- Posse, R., Griffiths, C., Hitchman, R., Chambers, A., Murguía-Meca, F., Danquah, J., Jeshtadi, A., King, L. 2010. Baculoviruses: biology, replication and exploitation. En: *Insect Virology*. Edited by Asgari, S., Johnson, K. School of Biological Sciences. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 435p.
- Rahman, M., Gopinathan, K. 2003. Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines. *Virus Research*. 93 : 13 – 23.
- Rohrmann, G. 2011. Baculovirus molecular biology Second edition. Ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>.
- Shapiro, M., Ignoffo, C. 1970. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis*: activity of isolates from *Heliothis zea*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 16 : 107-111.
- Simon, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M., Caballero, P. 2004. Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera* spp. nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology*. 85 : 2845-2855.
- Simon, O., Gutierrez, S., Williams, T., Caballero, P., López-Ferber, M. 2005a. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the pif gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). *Virus Research*. 108 : 213-220.
- Simon, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M., Caballero, P. 2005b. Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environment Microbiology*. 71 : 4254-4262.
- Slack, J., Arif, B. 2006. The baculoviruses occlusion derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research*. 69: 99-165.
- Smith, C., Heinz, K., Sansone, C., Flexner, L. 2000. Impact of recombinant baculovirus applications on target heliothines and non-target predators in cotton. *Biological Control*. 19 : 201-214.
- Stiles, S., Himmerich, B. 1998. *Autographa californica* NPV isolates: restriction endonuclease analysis and comparative biological activity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72 : 174-177.
- Sparks, W., Bartholomay, L., Bonning, B. 2008. Insect Immunity to viruses. En: *Insect Immunology*. NE Beckage, Ed. Elsevier Academic Press pp. 209-242.
- Takatsuka, J., Okuno, S., Ishii, T., Nakai, M., Kunimi, Y. 2007. Host range of two multiple nucleopolyhedroviruses isolated from *Spodoptera litura*. *Biological Control*. 41 : 264-271.
- Thiem, S., Du, X., Quentin, M. 1996. Identification of a Baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. *Journal of Virology*. 70 (4) : 2221-2229.
- Thiem, S. 1997. Prospects for altering host range for baculovirus bioinsecticides. *Current Opinion in Biotechnology*. 8 : 317-322.
- Thiem, S., Cheng, X. 2009. Baculovirus Host Range. *Virologica Sinica*. 24 (5) : 436-457.
- Vail, P., Hoffmann, D., Streett, D. 1993. Infectivity of a Nuclear Polyhedrosis Virus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) against production and postharvest pests and homologous cell lines. *Environmental Entomology*. 22 (5) : 1140-1145.
- Vickers, J., Cory, J., Entwistle, P. 1991. ADN characterization of eight geographic isolates of granulosis virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 57: 334-342.
- Volkman, L. 2007. Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. *Current Drug Targets* 8: 1075-1083.
- Wang, P., Granados, R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 135-143.
- Wang, L., Salem, T., Lynn, D., Cheng, X. 2008. Slow cell infection, inefficient primary infection and inability to replicate in the fat body determine the host range of *Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*. 89: 1402-1410.
- Westenberg, M., Uijtewilligen, P., Vlak, J. 2007. Baculovirus envelope fusion proteins F and GP64 exploit distinct receptors to gain entry into cultured insect cells. *Journal of General Virology*. 88: 3302-3306.
- Wu, W., Wang, J., Xie, F., Long, Q., Wang, X. 2003. Baculovirus p74 Gene is a Species-specific Gene. *Acta Biochimica et Biophysica sinica*. 35 (9): 834-840
- Wu, Y., Carstens, E. 1998. A baculovirus single-stranded ADN binding protein, LEF-3, mediates the nuclear localization of the putative helicase P143. *Virology*. 247 (1): 32-40.
- Yoo, S., Guarino, L. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ie2 gene encodes a transcriptional regulator. *Virology*. 202: 164-172.
- Zoog, S., Schiller, J., Wetter, J. 2002. Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 *in vivo*. *EMBO Journal*. 21 (19): 5130-5140.