

INTERACCIONES DE LOS VIRUS ENTOMOPATÓGENOS Y SU EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Fecha de recepción: 23 de junio de 2011 • Fecha de aceptación: 20 de noviembre de 2011

ENTOMOPATHOGENIC VIRUSES INTERACTIONS AND ITS EFFECT OVER THE BIOLOGICAL ACTIVITY

Paola Cuartas Otálora^{1,2} • Laura Villamizar Rivero³

RESUMEN

Los virus entomopatógenos son objeto de investigación de diversos trabajos dirigidos al control microbial de insectos plaga, la ingeniería genética, la terapia génica, la química y la expresión de proteínas. En el área de control biológico de insectos, las interacciones virus-virus determinan cambios en el curso de la infección, como resultado de una concurrente o previa infección con una especie o cepa viral diferente. La mayoría de estas interacciones han sido descubiertas por casualidad y rara vez han sido estudiadas sistemáticamente; aunque la actual evidencia sugiere que dichas interacciones son comunes y críticas para entender la patogénesis viral en hospederos naturales. En esta revisión se analizan tres sistemas de clasificación de las interacciones virales: (1) interacciones directas de genes virales o productos de genes, (2) interacciones indirectas que resultan en la alteración del medio ambiente del hospedero, e (3) interacciones que alteran el sistema inmune del insecto. Dado que las interacciones virales documentadas han mostrado tener un efecto significativo en la patogénesis viral, es necesario profundizar en el estudio de genes, proteínas y vías de señalización involucradas, que permitan un mayor conocimiento y por lo tanto una posible aplicación de este tipo de relaciones.

Palabras clave: Coinfección, interacción viral.

- 1 Investigadora cPh.D. Biotecnología. Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica.
- 2 Autor para correspondencia: pcartas@corpoica.org.co
- 3 Investigadora Ph.D. Ciencias Farmacéuticas. Directora Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. lvillamizar@corpoica.org.co

INTRODUCCIÓN

Los insectos son uno de los grupos de animales más exitosos del planeta y su prosperidad se debe en parte a su increíble habilidad para defender su cuerpo de organismos invasores. Sin embargo, algunos microorganismos incluyendo los virus, pueden causar infecciones crónicas o letales en insectos hospederos ocasionando la disminución de la población. Estos virus son actualmente muy estudiados tanto por su aplicación en el control biológico de plagas de importancia agrícola, como por el impacto negativo que ocasionan en las poblaciones de insectos benéficos (Caballero y Williams 2008). El estudio de estos virus, ha permitido elucidar los mecanismos de los procesos de coevolución, que les han permitido la adaptación a nuevos hospederos y la potenciación de su infección (Cory y Myers 2003; Herniou *et al.* 2004). Además, algunos parámetros epizootiológicos de los patógenos como su infectividad, productividad y tasa de transmisión, o de los hospederos como el desarrollo, la mortalidad y el tiempo de muerte, pueden alterarse por infecciones virales mixtas (Da Palma *et al.* 2010).

VIRUS ENTOMOPATÓGENOS

Las enfermedades producidas por virus están entre las infecciones de invertebrados más ampliamente estudiadas. Actualmente se conocen más de 1100 especies de virus patógenos de invertebrados que afectan a un importante número de especies de insectos pertenecientes a más de 13 órdenes. Los virus se han definido como entidades

infecciosas, estrictamente intracelulares que se caracterizan por tener un solo tipo de ácido nucleico y por estar recubiertos por una envoltura de proteína o cápside, la cuál puede estar a su vez protegida por una bicapa lipídica formando una estructura que se conoce como virión (Caballero *et al.* 2001; Flint *et al.* 2009). Algunos virus a su vez pueden estar incluidos en una matriz proteica conocida como cuerpo de inclusión (CI), que protege a los viriones cuando éstos son liberados al ambiente; siendo los virus de las familias *Baculoviridae*, *Entomopoxviridae* y *Reoviridae* los únicos que presentan esta característica (Wieden 2000).

Los virus entomopatógenos tienen partículas de morfología variable tanto en forma como en tamaño, siendo la morfología de la partícula infecciosa o virión una característica importante para asignar el virus a un determinado grupo. Además, el material genético viral que puede ser de ADN o ARN, de cadena sencilla o doble. La clasificación actual de los virus se basa en sus características morfológicas, genéticas y bioquímicas y su nomenclatura según el hospedero del cual han sido aislados (Caballero *et al.* 2001; Cory y Myers 2003; Okano *et al.* 2006; ICTV 2009). Todos los virus patógenos de insectos conocidos se agrupan en 16 familias y 31 géneros, sin que hasta ahora se hayan definido para la mayoría de los grupos, otros niveles taxonómicos superiores (Caballero y Williams 2008) según la categorización del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV 2009) (Tabla 1). Solo algunas familias de virus entomopatógenos han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas, la mayoría de ellas por su uso potencial en control biológico de plagas (Asgari y Johnson 2010).

Familia	Ácido nucleico ^a	Cuerpo de inclusión	Virión envuelto	Forma de virión	Hospederos ^b	Sitio de replicación
<i>Ascoviridae</i>	csADN	No	Si	Baciliforme u ovoide	L, Hy	Núcleo: Cuerpo graso, hipodermis y matriz traqueal
<i>Baculoviridae</i>	cdADN	Si	Si	Baciliforme	L, D, Hy	Núcleo: Intestino medio o infección sistémica
<i>Iridoviridae</i>	cdADN	No	No	Icosahédrica	C, D, He, L, O, Tr	Citoplasma: Cuerpo graso, hemocitos, hipodermis, algunas veces sistémica
<i>Hytrosaviridae</i>	cdADN	No	Si	Baciliforme	D	Núcleo: Glándula salivar
<i>Nudiviridae</i>	cdADN	No	Si	Baciliforme	L, C	Núcleo: Intestino medio o infección sistémica
<i>Parvoviridae</i>	csADN	No	No	Redondeada	L, D, O, Od, Di, He	Mayoría de tejidos, excepto el intestino medio
<i>Polydnaviridae</i>	cdADN	No	Si	Cilíndrica o elipsoide	Hy	No en parasitoides
<i>Poxviridae</i>	cdADN	Si	Si	Ovoide o forma de ladrillo	C, L, O, D, Hy	Citoplasma: Principalmente en cuerpo graso, pero otros órganos se puede infectar
<i>Birnaviridae</i>	csARN	No	No	Icosahédrica	D	No en tejidos, adultos sensibles a CO ₂
<i>Dicistroviridae</i>	csARN	No	No	Icosahédrica	Hy, He, O, D	Intestino y sistema reproductor
<i>Iflaviridae</i>	csARN	No	No	Icosahédrica	L, Hy, He	Células epiteliales del intestino medio y células calciformes
<i>Metaviridae</i>	csARN	No / Si	No	Esféricos u ovoides	L, D, C	Hemocitos, infección sistémica
<i>Nodaviridae</i>	csARN	No	No	Icosahédrica	C, D, L	Citoplasma: Intestino y después infección sistémica
<i>Pseudoviridae</i>	csARN	No	No	Redondeada	D	Citoplasma o núcleo
<i>Reoviridae</i>	cdARN	Si / No	Si / No	Redondeada	L, Hy	Citoplasma: Células del intestino
<i>Tetraviridae</i>	csARN	No	No	Redondeada	L	Citoplasma: Infección crónica.

a. ADN o ARN cs: cadena sencilla y cd: cadena doble | b. Órdenes de insectos. C: Coleóptera; D: Díptera; Di: Dictióptera; He: Hemíptera; Hy: Himenóptera; L: Lepidóptera; O: Ortóptera; Od: Odonata; | Th: Thysanoptera; Tr: Trichoptera.

Tabla 1. Características de las familias y géneros de los virus patógenos de insectos (Tomado y modificado de: Caballero y Williams 2008; Cory y Evans 2007).

A continuación se describen las familias de virus entomopatógenos en donde se han descrito algún tipo de interacción virus-virus.

Ascovirus.

Los virus de la familia *Ascoviridae* son virus ADN de doble cadena, encapsulado en viriones de forma baciliforme (Federici *et al.* 2009). Estos virus son mecánicamente transmitidos por avispas parasitoides a las larvas y pupas de lepidópteros, principalmente de la familia Noctuidae afectando su crecimiento y desarrollo (Cheng *et al.* 2000; Federici y Govindarajan 1990; Tillman *et al.* 2004). La infección viral ocasiona una citopatología caracterizada por la modificación de la muerte celular programada (apoptosis)

Baculovirus.

La familia *Baculoviridae* es la familia de virus más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos, los cuales han sido exitosamente utilizados para el control de insectos de importancia agrícola (Kelly 1982; Moscardi 1999). La familia *Baculoviridae* agrupa a virus ADN de doble cadena (Nucleopoliedrovirus y Granulovirus) cuyos viriones tienen forma de bastón y están incluidos dentro de cuerpos de inclusión (Caballero *et al.* 2001). El ciclo de infección de los baculovirus comienza cuando la larva hospedera consume las partículas virales directamente de su fuente de alimento. En el intestino medio, los CIs se desintegran por las condiciones alcalinas (pH 9-11) y por la acción de las protea-

La familia *Baculoviridae* agrupa a virus ADN de doble cadena (Nucleopoliedrovirus y Granulovirus) cuyos viriones tienen forma de bastón y están incluidos dentro de cuerpos de inclusión (Caballero *et al.* 2001).

(Bideshi *et al.* 2010; Caballero y Williams 2008). El ciclo de infección por ascovirus empieza por el ingreso tras la picadura de la avispa y disseminación de las partículas virales en el insecto infectado. Continúa con la transmisión a nuevos hospederos a través de hembras de avispas parasitoides que se contaminan de partículas virales al introducir su ovipositor en las larvas infectadas, transmitiéndolas horizontalmente a nuevos hospederos, con una eficiencia estimada del 80% (Bideshi *et al.* 2010).

sas, liberando las partículas infectivas o viriones. Estos atraviesan la membrana peritrófica del intestino medio del insecto e infectan las células epiteliales replicándose en el núcleo, terminando en la formación de nuevas nucleocápsides que dan lugar a viriones brotados encargados de la infección secundaria y a viriones ocultos encargados de disseminarse nuevamente en el ambiente (Caballero y Williams 2008). Los baculovirus infectan insectos de los órdenes lepidóptera, díptera e himenóptera (ICTV 2009; Moscardi *et al.* 2011).

Entomopoxvirus.

Los entomopoxvirus son una subfamilia de virus de insectos de ADN de doble cadena, que se clasifica dentro de la familia *Poxviridae*, los cuales se caracterizan por formar CIs de tipo esferoide, cuyos viriones se replican en el citoplasma de las células infectadas. Durante el ciclo de infección, los CIs se disuelven en el intestino medio por el pH alcalino y por la acción de proteasas, liberando las partículas infectivas que ingresan a las células intestinales por fusión con la membrana y se replican en el citoplasma de las mismas. Al final del proceso infeccioso se producen nuevas partículas virales que infectan otros tejidos susceptibles de las larvas y se convierten en la fuente de nuevas infecciones (Perera et al. 2010). Estos virus pueden infectar insectos de los órdenes coleóptera, lepidóptera, ortóptera, díptera e himenóptera. Específicamente, las larvas de lepidópteros infectadas se hinchan y adquieren una apariencia blancuzca. Su muerte puede ocurrir a los 12 días o retrasarse hasta más de 70 días de haberse iniciado la infección (Caballero y Williams 2008).

Errantivirus.

La familia *Metaviridae* está compuesta por varios géneros entre los que se encuentran los errantivirus. Estos virus se caracterizan por ser virus ARN de cadena sencilla con partículas virales de tipo esférico, que ocasionan infecciones sistémicas en los insectos de los órdenes lepidóptera, díptera y coleóptera a través de los hemocitos (Pearson y Rohrmann 2006). Estos virus son considerados retroelementos, que son elementos móviles que se incorporan a las células a través de un ARN intermediario, considerándose su transposición como una infección, ya que no ocurre en una única célula, sino que se extiende a las células vecinas

(Friesen y Nissen 1990; Kim et al. 2004). Estos retrovirus tienen la capacidad de retrotranscribirse de ARN a ADN a través de una transcriptasa reversa y de esta forma se insertan en el genoma de las células hospederas (Pearson y Rohrmann 2006). La mayoría de investigaciones sobre errantivirus, se han enfocado en el elemento *gypsy* encontrado en *Drosophila melanogaster* (Meigen 1830) (Diptera: Drosophilidae); pues el estudio de la infectividad de estos virus ha sido muy limitado por su difícil manipulación empleando técnicas comunes en virología (Pearson y Rohrmann 2006).

Polydnavirus.

Los virus de la familia *Polydnviridae* sólo han sido aislados de especies de parasitoides braconidos (*Bracovirus*) e ichneumonidos (*Ichnovirus*) (ICTV, 2009) y se caracterizan por ser virus simbióticos ADN de doble cadena, de genoma segmentado (Federici y Bigot 2003; Soldevila y Webb 1996; Strand 2010). Este virus se escinde del genoma del himenóptero y sólo se replica en el tracto reproductivo de las hembras, sin efectos patogénicos para éstas. Cuando la hembra del parasitoide oviposita en un insecto hospedero, el virus es transferido junto con los huevos para suprimir el sistema inmune (melanización y encapsulación) y para generar alteraciones en el crecimiento y desarrollo de éste (Soldevila y Webb 1996; Strand 2010).

Reovirus.

La familia *Reoviridae* está compuesta por virus ARN de doble cadena, que se caracterizan por tener viriones con forma icosaédrica incluidos dentro de cuerpos de inclusión poliedrales (Renault et al. 2005), cuya morfogénesis ocurre en el citoplasma y no en el núcleo de las células infectadas (Caballero y Williams 2008; Mori y Metcalf

2010). Los reovirus de insectos se clasifican dentro de los géneros *Cypovirus* e *Idnoreovirus*, siendo los primeros los más estudiados y de mayor interés (Caballero y Williams 2008; ICTV 2009; Mori y Metcalf 2010). Estos virus se transmiten horizontalmente por ingestión de partículas contaminadas del suelo y de las plantas, y verticalmente a través de los huevos. Las partículas virales ingresan por vía oral e infectan células epiteliales del intestino medio de los insectos, produciendo nuevos viriones y cuerpos de inclusión (Renault et al. 2005), los cuales son muy infecciosos pero actúan muy lentamente y por medio de infecciones crónicas (Caballero y Williams 2008).

INTERACCIONES ENTRE VIRUS ENTOMOPATÓGENOS.

Una interacción viral se define como una diferencia medible en el curso de una infección de un virus como resultado de una previa o actual infección por una especie o cepa viral diferente. Una infección

actual, puede incluir la infección de una misma célula por dos o más especies virales, o dos virus que pueden infectar diferentes tipos de células dentro de un organismo y producir una interacción viral medible (Kasman 2010). Las diferencias medibles incluyen cambios en los tejidos permisivos o tropismo, en la replicación viral, en los patrones de producción de la progenie y la liberación de partículas virales, la latencia y la patología incluyendo respuesta inmune (Waner 1994). Estas interacciones tienen como resultado el incremento de las tasas de replicación y de la patología de los virus en comparación a una infección separada (Kasman 2010).

Las interacciones entre virus entomopatógenos como los baculovirus, en la mayoría de los casos se han conocido por el estudio de la comunicación célula a célula y de las secreciones celulares involucradas en este proceso (Cheng y Lynn 2009). Las interacciones entre virus entomopatógenos se pueden clasificar en interacciones directas, indirectas y aquellas que afectan el sistema inmune (Tabla 2).

Una interacción viral se define como una diferencia medible en el curso de una infección de un virus como resultado de una previa o actual infección por una especie o cepa viral diferente.

Tipo de interacción	Subtipo de interacción	Proceso	Factores involucrados	Coinfección
Interacciones directas	Virus ayudado-dependientes "Helper dependent viruses"	Acción de genes o proteínas transactivadoras que permiten la replicación y la infección del virus en células no permisivas.	Gen <i>hrf-1</i> (host range factor - 1)	LdMNPV y AcMNPV
		Potenciación de genotipos defectivos a través de la coinfección con genotipos completos.	Factor trans-activador	AcMNPV y SeMNPV; AcMNPV y ThorMNPV
	Recombinación genómica	Recombinación del material genético de dos virus, que resulta en una progenie viral con una mayor capacidad de replicación en células no permisivas.	Genes <i>pif</i> (per os infectivity factor)	SfMNPV, CfMNPV
Interacciones indirectas	Virus incrustados "Embedded viruses"	Integración de un retrovirus al genoma de un virus ADN no relacionado, alterando el proceso normal de replicación.	Recombinación del gen <i>p143</i> (helicasa)	BmNPV y AcMNPV
		Adquisición de nuevos genes para los retrovirus a partir de la coinfección con virus ADN.	Expresión de genes retrovirales LTR (long terminal repeats)	TnED y AcMNPV
	Cambios en la susceptibilidad del hospedero por alteración de barreras físicas	Alteración de la integridad estructural de la membrana peritrófica, que permite un ingreso rápido de las partículas virales a las células. Disminución del tiempo de mortalidad y aumento de la patogenicidad.	Gen <i>env</i> (envoltura)	Gypsy y BV (SeMNPV, LdMNPV y XcnGV)
Interacciones indirectas	Factores de potenciación que inducen cambios citopáticos	Inducción de cambios citopáticos en las células infectadas que ocasionan transformaciones celulares y disminuyen el tiempo de infección. Aumento en la fusión de las partículas virales con las microvellosidades de las células columnares del intestino medio.	Gen <i>enhancin</i> (enhancina)	PsunMNPV y PsunGV; AcMNPV y TnGV; SeMNPV y TnGV; AgNPV y TnGV; LdMNPV y HaGV; LdMNPV y SfGV; MbNPV y XcnGV; SIMNPV y SIGV
	Inhibición del sistema inmune	Supresión del sistema inmune por inhibición de la melanización y encapsulación. Alteración de la adhesión y de la morfología de los hemocitos.	Péptido EF (enhancing factor)	PsunMNPV y PsEV; PsunGV y PsEV
	Alteración del sistema inmune	Supresión del sistema inmune por inhibición de la melanización y encapsulación. Alteración de la adhesión y de la morfología de los hemocitos.	Proteínas IEP, VHv1.1, CrV1, RdRp y proteínas motivos cis	CcPV y AcMNPV DpRV y DpAV
Alteración del sistema inmune	Inhibición del sistema inmune	Supresión del sistema inmune por inhibición de la apoptosis.	Genes <i>p49</i> , <i>p35</i> e <i>iap</i> (inhibidores de apoptosis)	McbPV y SIMNPV; CfMNPV y AcMNPV

AV: Ascovirus; BV: Baculovirus; ED: Retrovirus; EV: Entomopoxvirus; GV: Granulovirus; MNPV: Nucleopoliedrovirus múltiple; NPV: Nucleopoliedrovirus; PV: Polydnavirus; RV: Reovirus. Ac: *Autographa californica*; Ag: *Anticarsia gemmatilis*; Bm: *Bombyx mori*; Cc: *Cotesia congregata*; Cf: *Choristoneura fumiferana*; Gypsy element: *Drosophila melanogaster*; Dp: *Drosophila dromus pulchellus*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Ld: *Lymantria dispar*; Mb: *Mamestra brassicae*; Mcb: *Microplitis bicoloratus*; Ps: *Pseudaletia unipuncta*; Psun: *Pseudaletia unipuncta*; Se: *Spodoptera exigua*; Sf: *Spodoptera frugiperda*; Si: *Spodoptera litura*; Tn: *Trichoplusia ni*; Thor: *Thysanoplusia orichalcea*; Xcn: *Xestia c-nigrum*.

Interacciones directas.

Hablando de las interacciones virales, una interacción directa se define como un suceso en el cuál el ácido nucleico o las proteínas de un virus, interactúan físicamente con los genes o el producto de los genes de un virus coinfectivo (Da Palma et al. 2010). Esta definición comprende tres diferentes subtipos de interacción: virus ayuda-dependientes "Helper-dependent viruses", recombinación genómica y virus incrustados "Emmbedded viruses". Las interacciones directas requieren que la coinfección se lleve a cabo en una misma célula, pero no necesariamente que la infección se desarrolle al mismo tiempo (Da Palma et al. 2010).

1. Virus ayuda-dependientes "Helper dependent viruses"

Los virus ayuda-dependientes son cualquier tipo de virus, cuya replicación o proceso de infección es defectivo por sí solo y requiere del producto de los genes de otros virus para producir una progenie infecciosa. Este tipo de interacciones se presentan cuando el virus dependiente no cuenta con toda la maquinaria de replicación o de empaquetamiento de su material genético (Da Palma et al. 2010).

Un ejemplo de este proceso se presenta en la interacción entre el MNPV de *Lymantria dispar* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Ld-MNPV) y el MNPV de *Autographa californica* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) (AcMNPV) en la línea celular Ld652Y de *L. dispar* (McClintock y Dougherty 1987). Cuando hay una infección separada de AcMNPV en células Ld652Y se observa que aunque el virus es capaz de ingresar a las células, el nivel de proteínas que produce después de 20 horas de infección es muy bajo (Guzo et al. 1992);

Específicamente, para este virus se ha evidenciado en líneas celulares no permisivas como

Ld652Y, que el genoma se replica y que los genes tempranos y tardíos son transcritos y exportados al citoplasma celular, indicando que el punto de restricción se encuentra a nivel de la traducción (Cheng y Lynn 2009; Guzo et al. 1992). Sin embargo, cuando en esta línea celular se realiza una coinfección entre LdMNPV y AcMNPV, a las ocho horas postinfección se observa una disminución en la producción de partículas virales de LdMNPV y una alta producción de partículas virales de AcMNPV (McClintock y Dougherty 1987).

Thiem y colaboradores (1996) identificaron que el factor de LdMNPV que potencia la traducción de los genes de AcMNPV en las células no permisivas Ld652Y corresponde a un polipéptido ácido de 25,7 kDa, denominado como factor 1 de rango de hospedero (HRF-1: host range factor 1), el cual aumenta la síntesis de proteínas posiblemente por la activación de factores de transcripción y traducción y por la elución de los mecanismos de defensa del hospedero.

Otras interacciones de virus ayuda-dependientes se evidencian en la coinfección de AcMNPV y el MNPV de *Spodoptera exigua* (Hübner 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) (SeMNPV) en las líneas celulares Sf21 de *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y High 5 de *Trichoplusia ni* (Hübner 1800-1803) (Lepidoptera: Noctuidae) (Cheng y Lynn 2009; Yanase et al. 1998) y en la coinfección entre AcMNPV y el MNPV de *Thysanoplusia orichalcea* (Fabricius 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) (ThorMNPV) en la línea celular Sf21 (Wang et al. 2008a). En estos casos, un virus potencia significativamente la replicación del ADN del otro virus a través de factores de trasn-activación aún no identificados (Cheng y Lynn 2009; Yanase et al. 1998; Wang et al. 2008a).

Otro tipo de interacción de virus ayuda dependientes, es la que se presenta en la coinfección entre genotipos defectivos y genotipos completos

de algunos nucleopoliedrovirus. En los MNPVs de *Choristoneura fumiferana* (Lederer 1859) (Lepidoptera: Tortricidae) (CfMNPV) y de *S. frugiperda*, se ha encontrado la presencia de múltiples genotipos en larvas aisladas en campo, entre los que se encuentran genotipos completos y genotipos defectivos, que no son infectivos por vía oral al carecer de los genes *pif* (gen de infectividad *per os*). La coinfección entre estos genotipos potencia la infección viral y permite que los genotipos defectivos atraviesen el intestino medio y entren al hemocele de la larva para replicarse en otros tejidos (Lauzon *et al.* 2005; López-Ferber *et al.* 2003).

2. Recombinación genómica

La recombinación es generalmente considerada como un mecanismo genético que contribuye a la heterogeneidad del genoma y a su plasticidad, considerándose como una de las principales fuerzas evolutivas de la filogenia viral (Jehle *et al.* 2003). La coinfección entre dos o más cepas de la misma especie viral en la misma célula hospedera, puede resultar en una progenie viral resultado de una recombinación genética entre los virus parentales (Da Palma *et al.* 2010).

Un ejemplo de este tipo de interacción es la que se presenta entre algunos NPVs que se pueden replicar muy bien dentro de una línea celular específica, pero en algunas otras se replican pobremente (Caballero *et al.* 2001; Cheng y Lynn, 2009; Wang *et al.* 2008b). Entre el NPV de *Bombyx mori* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) (BmNPV) y el AcMNPV, se ha evidenciado cerca de 90% de homología entre su ADN genómico; sin embargo, el AcMNPV se replica muy bien en líneas celulares de *T. ni* y *S. frugiperda* en las cuales el BmNPV no es capaz de replicarse y aunque es capaz de replicarse en la línea celular de *B. mori*, no es capaz de producir viriones brotados por la falta

de transcripción de sus genes tardíos que codifican para proteínas estructurales (Rahman y Gopinathan 2003).

La coinfección entre el BmNPV y el AcMNPV en la línea celular de *B. mori* resulta en la producción de virus recombinantes que tienen la capacidad de crecer en esta línea celular no permisiva (Kondo y Maeda 1991; Rahman y Gopinathan 2003). Clones puros obtenidos después de la coinfección, fueron analizados a través de mapeo de restricción observándose una alta variabilidad de patrones diferentes a los virus parentales, lo que evidencia la recombinación genética entre estas dos cepas virales (Kondo y Maeda 1991), aún en genes altamente conservados como el de la poliedrina (Mori *et al.* 1992). Croizier *et al.* (1994) y Maeda *et al.* (1993) determinaron que esta interacción entre el BmNPV y el AcMNPV, le permitía al AcMNPV replicarse en células no permisivas, por la recombinación de una pequeña región del gen de la ADN helicasa *p143*, favoreciendo el proceso de replicación.

En otro estudio, durante la coinfección entre dos genotipos del GV de *Cryptophlebia leucotreta* (Meyric 1913) (Lepidoptera: Tortricidae) (CrleGV) en larvas de este hospedero, se evaluó la recombinación genética de los aislamientos mediante un análisis con enzimas de restricción. Se observaron 33 progenies virales con el mismo patrón de restricción de los parentales y un solo recombinante que mostró un patrón de restricción diferente, evidenciándose una baja tasa de recombinación intra-específica (3%) de estos aislamientos. En este trabajo también se evaluó la tasa de recombinación inter-específica de este virus en la coinfección del CrleGV con el granulovirus de *Cydia pomonella* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) (CpGV). Mediante PCR se detectaron fragmentos quiméricos del gen de la granulina, a pesar de no observar patrones diferentes mediante los análisis de restricción, indicando la recombinación entre estos dos aislamientos (Jehle *et al.* 2003).

3. Virus incrustados "Embedded viruses"

Mientras que la recombinación genómica involucra la transferencia de ácido nucleico entre dos virus con una significativa homología de las secuencias y una similar si no idéntica organización genómica, los virus incrustados son retrovirus que se han integrado en el genoma de un virus ADN grande no relacionado. Probablemente, la integración es al azar, pero sólo aquellas integraciones que son capaces de dejar el ADN retroviral en el virus hospedero son capaces de propagar la infección (Da Palma *et al.* 2010).

Este tipo de interacción se ha evidenciado en baculovirus, con un errantivirus de *D. melanogaster*, específicamente con el elemento *gypsy*, en donde el errantivirus ha adquirido gran parte de sus genes por recombinación con baculovirus. Este es el caso del gen *env* (Malik *et al.* 2000; Pearson y Rohrmann 2002 y 2006), para el que se ha evidenciado un alto nivel de homología entre errantivirus y los NPVs de *S. exigua*, *L. dispar* y el GV de *Xestia c-nigrum* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) (XcnGV) (Malik *et al.* 2000).

Otro ejemplo de este tipo de interacción es la que ocurre entre un retrovirus de *T. ni* (TED) incrustado dentro del genoma del AcMNPV. En este trabajo se observó que el TED es capaz de integrarse al genoma de AcMNPV durante la replicación viral y de esta manera adquirir una alternativa de transmisión y de entrada a la vía de infección del hospedero, activando también la expresión de los genes retrovirales y alterando la transcripción de los genes de AcMNPV. Asimismo, la integración de TED al genoma del NPV activa la expresión de un promotor tardío del NPV que dirige la síntesis de nuevo y abundante ARN a partir del LTR (long terminal repeats) del retrovirus, activando su expresión (Friesen y Nissen 1990).

Interacciones indirectas.

Las interacciones virales indirectas resultan de la alteración del sistema de defensa del hospedero, debido a la coinfección preexistente o simultánea de dos cepas virales, con un aumento de su virulencia y patogenicidad (Da Palma *et al.* 2010). Para el caso de las interacciones indirectas entre virus entomopatógenos se han reportado dos tipos, la primera debida a cambios en la susceptibilidad del hospedero debido a la alteración de las barreras físicas del sistema inmune y la segunda relacionada con factores de potenciación que inducen cambios citopáticos.

1. Cambios en la susceptibilidad del hospedero por alteración de las barreras físicas

La replicación viral y la producción de progenie son eventos que a menudo se caracterizan por los efectos citopáticos en las células hospederas. Los daños en los tejidos que pueden comprometer las barreras físicas del hospedero, permiten que las partículas virales tengan acceso a los tejidos que normalmente están protegidos en el hospedero (Da Palma *et al.* 2010).

En muchos baculovirus, la mayoría de ellos GVs, se ha encontrado un gen que codifica para una proteína llamada enhacina, la cual actúa digiriendo las proteínas de la membrana peritrófica de los insectos infectados. La enhacina, altera la integridad estructural de esta membrana (Fig. 1) y permite un ingreso rápido de las partículas virales a las células, disminuyendo el tiempo de mortalidad y aumentando la patogenicidad viral (Granados *et al.* 2001; Harrison y Bonning 2001). Esta proteína de 104 kDa fue clasificada dentro de la familia de las metaloproteasas y corresponde al 5% de las proteínas presentes en el cuerpo de inclusión de los BV (Lepore *et al.* 1996). La primera evidencia de

potenciación de un NPV por efecto de la enhanci-
na de un GV, fue encontrada por Tanada (1959ab)
en larvas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth 1809)
(Lepidoptera: Noctuidae) (PsunGV). Desde enton-
ces y hasta la actualidad se han desarrollado di-
versos trabajos que confirman estas interacciones.

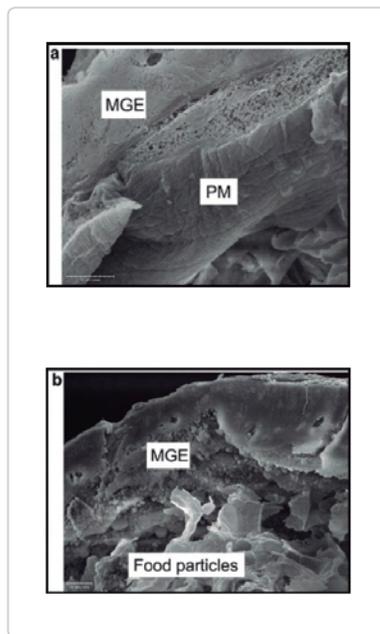


Figura 1. a) Estructura normal de la membrana peritrófica, b) alteración de la estructura de la membrana peritrófica por acción de proteasas. MGE: Células epiteliales del intestino medio, PM: Membrana peritrófica (Hoover *et al.* 2010).

Hayakawa *et al.* (2000) encontraron que en larvas de *S. exigua*, la coinfección entre el GV de *T. ni* (TnGV) y el MNPV de *A. californica* (AcMNPV) potencia la actividad insecticida del NPV hasta en 21 veces. En el mismo trabajo se evaluó la potenciación de este granulovirus (SeGV) sobre el NPV de *S. exigua*, encontrando un aumento de 10 veces en la patogenicidad del NPV. En otro estudio se evaluó la actividad del GV de *T. ni* sobre el NPV de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) (AgNPV) en larvas de *T. ni*, encontrando que esta

interacción potencia la actividad insecticida del NPV en 16 veces y disminuye el tiempo medio de mortalidad (TL₅₀) en 55 horas (Corsaro *et al.* 1993).

Para el caso del MNPV de *L. dispar* (LdMNPV) se ha encontrado en larvas de su hospedero nativo, que en coinfección con GV de *Helicoverpa armigera* (Hübner 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (HaGV) disminuye su concentración letal media (CL₅₀) hasta en 300 veces y su TL₅₀ en un 18%. También se observa que la coinfección entre el LdMNPV y el GV de *S. frugiperda* (SfGV), disminuye la CL₅₀ del NPV hasta en 13 veces; (Hoover *et al.* 2010; Shapiro 2000). En cuanto al NPV de *Mamestra brassicae* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Noctuidae) (MbNPV), la interacción con el GV de *X. c-nigrum* en larvas de *M. brassicae* incrementa la actividad insecticida del NPV en 10 veces y disminuye su TL₅₀ en 2 horas y en larvas de *H. armigera* potencia 24 veces su patogenicidad (Mukawa y Goto 2007 y 2010). En larvas de *Spodoptera litura* (Fabricius 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) también se ha evidenciado el efecto potenciador del GV de este insecto (SIGV), que al ser coinfectado con el MNPV de *S. litura* (SIMNPV), disminuye su CL₅₀ de 2,17x10⁶ a 3,35x10⁵ CI/mL (Guo *et al.* 2007).

2. Factores de potenciación que inducen cambios citopáticos

Los efectos citopáticos que inducen las infecciones virales en las células incluyen tanto cambios bioquímicos, como moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, que son visibles a través de técnicas de microscopía y que se presentan durante todo el ciclo viral. Estos efectos se manifiestan como cambios morfológicos en las células infectadas como pérdida de adherencia al sustrato, inhibición por contacto, agregación celular, formación de sincitios, cuerpos de inclusión citosólicos, entre otros (Murray 2006).

Durante la coinfección entre MNPV de *P. unipuncta* (PsunMNPV) y un entomopoxvirus de *Pseudaletia separata* (Walker 1865) (Lepidoptera: Noctuidae) (PsEV), se observó que existe un factor de potenciación (EF) viral del PsEV que aumenta la infectividad y la patogenicidad del PsunMNPV (Hukuhara et al. 1999; Hukuhara et al. 2001; Hukuhara y Wijonarko 2001). El EF se caracterizó como una glicoproteína de 38 kDa con alto nivel de homología (49% de identidad de aminoácidos) con los genes *fusolin* de otros entomopoxvirus (Mitsuhashi et al. 1998). A través de técnicas de microscopía confocal en cultivo celular, se comprobó que este factor aumenta la fusión entre las partículas virales y las células, permitiendo que el NPV que ingresa a las células epiteliales del intestino medio por fusión con las microvellosidades de la membrana, potencie su infección (Hukuhara y Wijonarko 2001). Esta interacción también se ha observado entre el granulovirus de *P. unipuncta* (PsunGV) y el PsEV, en donde se presentó un aumento en la patogenicidad tanto por el factor de potenciación del PsEV, como por la enhancina presente en el GV (Hukuhara et al. 2003).

Alteración del sistema inmune.

La respuesta inmune en los insectos está dada únicamente por el sistema inmune innato que los protege de manera inespecífica de las infecciones ocasionadas por hongos, bacterias, nematodos, virus, entre otros. Esta respuesta está conformada por varios mecanismos que incluyen en primer lugar las barreras físicas como el tegumento y la membrana peritrófica, la inmunidad celular que incluye los mecanismos de reconocimiento de las células infectadas, la encapsulación de las mismas y la apoptosis, y la inmunidad humoral que incluye la síntesis de sustancias anti-virales, como la fenoloxidasa, la hemolina, las léctinas y los ercosanoides

entre otros (Rolff y Reynolds 2009). Sin embargo, estos sistemas de defensa se pueden evadir de varias formas, permitiendo el desarrollo exitoso de la infección viral (Sparks et al. 2008).

1. Inhibición del sistema inmune.

Los polydnavirus han sido los virus entomopatógenos más estudiados en cuanto a la supresión del sistema inmune de sus insectos hospederos (Himenópteros). Como parte de su ciclo de vida, los polydnavirus ocasionan alteraciones fisiológicas en las larvas infectadas que favorecen el desarrollo del parasitoide al cual se encuentran asociados. Estos cambios incluyen alteración en el crecimiento y en el desarrollo, en la inmunidad, en la composición de las proteínas de la hemolinfa y en el comportamiento del insecto (Soldevila y Webb 1996).

Por ejemplo, la coinfección entre un polydnavirus de *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae) (CcPV) y el nucleopoliedrovirus AcMNPV en larvas de *Manduca sexta* (Linnaeus 1763) (Lepidoptera: Sphingidae), incrementó la susceptibilidad de éstas a la infección por NPV. *M. sexta* es un hospedero poco permisivo para la replicación de AcMNPV, ya que en condiciones normales se observa una falla en la dispersión de la infección por encapsulación de los hemocitos infectados, como parte de la respuesta inmune del hospedero. Durante la interacción entre el polydnavirus y el baculovirus se observó una mayor susceptibilidad del insecto a la infección del baculovirus, traducida como un menor tiempo de mortalidad. Esto es posiblemente debido a que el polydnavirus suprime la respuesta inmune del hospedero evitando la encapsulación de las células infectadas (Washburn et al. 2000). Esta supresión también se ha reportado en el reovirus (DpRV-1) del himenóptero *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) el cual altera la respuesta inmune de las pupas lepidópteras

hospederas, favoreciendo la reproducción de la progenie del parasitoide cuando hay una coinfección con el ascovirus del mismo (DpAV-4) (Renault *et al.* 2005).

También se ha observado la capacidad de algunos virus de alterar los procesos de apoptosis, como se observó en la coinfección entre MNPV de *S. litura* (SIMNPV) y un polydnavirus (MbcPV) asociado a la avispa parasitoide *Microplitis bicoloratus* (Chen) (Hymenoptera: Braconidae), en donde el MNPV inhibe la apoptosis, posiblemente por la presencia de la proteína P49 que actúa bloqueando la acción de la caspasa efectora 3 (Luo y Pang 2006).

Además se ha evidenciado que el AcMNPV produce algunas proteínas lap (inhibidores de apoptosis) (Rohrmann 2011) capaces de bloquear la apoptosis en líneas celulares permisivas (Schultz y Friesen 2009; Zoog *et al.* 2002). Sin embargo, cuando este virus infecta líneas celulares no permisivas como la línea celular CF-203 de *C. fumiferana*, se evidencian algunos cambios morfológicos en la célula característicos de un proceso de apoptosis. Se ha comprobado que la coinfección entre MNPV de *C. fumiferana* (CfMNPV) y el AcMNPV en la línea celular CF-203 reduce los niveles de muerte celular hasta en un 99% permitiendo la replicación viral del AcMNPV; evidenciándose la síntesis de la proteína p35 y de otras proteínas lap (Palli *et al.* 1996), inhibidoras de la apoptosis (Schultz y Friesen 2009; Zoog *et al.* 2002).

APLICACIONES PRÁCTICAS

Actualmente existen más de 50 productos comerciales para el control biológico de plagas de importancia agrícola, desarrollados con virus entomopatógenos como ingrediente activo (Copping 2001; Van Driesche *et al.* 2007; Caballero y Williams 2008, Moscardi *et al.* 2011). Algunas limitaciones que se presentan en el desarrollo de este tipo de

productos, además de la producción masiva y las condiciones ambientales a las que se expondrán los bioplaguicidas, son la selección de aislamientos virales con alta actividad insecticida o de mecanismos de potenciación de dicha actividad, que les confieran además de una ventaja ambiental, una ventaja frente a los plaguicidas de síntesis química (Caballero *et al.* 2001; Lacey *et al.* 2001, Moscardi *et al.* 2011). A partir del conocimiento de las interacciones entre virus entomopatógenos, se pueden elucidar algunas bases moleculares y ecológicas, en donde las infecciones *in vitro* de estos virus pueden ser evaluadas como un fenómeno ecológico con posible potencial para el desarrollo de insecticidas virales para programas de manejo integrado de plagas en agricultura (Cheng y Lynn, 2009; Lacey *et al.* 2001).

El primer uso de las interacciones virus-virus se podría enfocar en la ampliación del rango de hospederos de ciertos aislamientos virales, ya sea por el uso de virus-ayuda dependientes que potencien la acción a través de sus genes o proteínas *Trans*-activadoras (Cheng y Lynn 2009; López-Ferber *et al.* 2003; Thiem *et al.* 1996; Wang *et al.* 2008a; Yanase *et al.* 1998), o por la coinfección con un aislamiento viral capaz de suprimir la respuesta inmune del insecto hospedero, que permita la infección exitosa de células no permisivas y la producción de progenie viral infectiva (Schultz y Friesen 2009; Soldevilla y Webb 1996; Washburn *et al.* 2000; Zoog *et al.* 2002).

Por otro lado se podría pensar en potenciar la actividad insecticida de los aislamientos virales tanto por mecanismos que permitan suprimir la respuesta inmune del insecto (Rohrmann 2011; Schultz y Friesen 2009; Zoog *et al.* 2002), como por mecanismos que permitan acelerar la entrada de los virus a las células blanco y una rápida diseminación de la infección (Lacey *et al.* 2001). Estas interacciones se han reportado para dos grupos de virus entomopatógenos importantes, los baculovirus

que a través de su proteína enhancina potencian la entrada de las partículas infectivas a las células blanco (Granados *et al.* 2001; Harrison y Bonning 2001; Tanada, 1959ab) y los entomopoxvirus que a través de su proteína fusolina aumentan la fusión de las partículas virales a las células disminuyendo el tiempo de entrada y de diseminación de la infección (Hukuhara *et al.* 1999; Hukuhara *et al.* 2001; Hukuhara y Wijonarko 2001; Mitsunashi *et al.* 1998).

Estos mecanismos de potenciación han sido claves en el desarrollo de formulaciones exitosas de agentes microbiales para el control de insectos plaga, convirtiéndose entonces en posibles metodologías de potenciación biológica de dichos productos (Lacey *et al.* 2001). Una aplicación práctica de este tipo de interacción, fue desarrollada por Hukuhara y colaboradores (1999), quienes introdujeron el gen potenciador de PsEV en plantas de arroz y por Hayakawa y colaboradores (2004) quienes introdujeron el gen de la enhancina en plantas de tabaco, evidenciando un alto nivel de proteína en las plantas transformadas y un aumento en la susceptibilidad de las larvas de *P. separata* y *S. exigua* infectadas con un NPV.

Además de la mezcla natural de dos virus, se podría pensar en métodos de recombinación genética que permitan mejorar el estrecho espectro de hospederos y la actividad biológica viral (Rahman y Gopinathan 2003). En esta aplicación, los baculovirus son la familia de virus entomopatógenos más utilizada para la producción de virus recombinantes por medio de la modificación del genoma a través de ingeniería genética. Estas transformaciones se han realizado desde 1983 y han tenido múltiples aplicaciones tanto en procesos industriales, como en el desarrollo de agentes de control biológico (Caballero *et al.* 2001; Lapied *et al.* 2009; Rahman y Gopinathan 2003). Estas modificaciones involucran cambios del espectro de hospederos y de la eficacia biológica, que incluyen la disminución de dosis,

modificaciones estructurales, delección e inserción de genes e inserción de hormonas y toxinas. Sin embargo, se han reportado algunos riesgos en el uso de baculovirus recombinantes, como el uso de proteínas tóxicas para otros organismos no blanco y la dispersión del virus o del gen incluido en él fuera del contexto ecológico para el cual se ha desarrollado (Caballero *et al.* 2001).

CONCLUSIONES

Las interacciones virales documentadas han mostrado tener un efecto significativo en la severidad de las enfermedades virales, en el rango de hospederos, en la transmisión y en la inmunopatología de los virus entomopatógenos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios de las interacciones virales, para conocer la acción específica de genes y proteínas involucrados sobre receptores o vías de señalización en el hospedero; debido a que se evidencia una posible aplicación de las interacciones virus-virus, para el desarrollo de herramientas de control biológico, que permitan aumentar tanto el rango de acción, como la capacidad insecticida de los virus utilizados. No obstante, el estudio de estas interacciones virales debe ser tan específico que permita asegurar que no se pone en riesgo poblaciones de organismos no blancos, como insectos benéficos (predadores, parasitoides y polinizadores); además de garantizar que son seguros ambientalmente y para el hombre.

Sigla	Virus	Familia viral	Insecto hospedero	Clasificación hospedero
AcMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Autographa californica</i>	Lepidoptera: Noctuidae
AgNPV	Nucleopoliedrovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lepidoptera: Noctuidae
BmNPV	Nucleopoliedrovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera: Bombycidae
CcPV	Polydnavirus	<i>Polydnaviridae</i> (<i>Bracovirus</i>)	<i>Cotesia congregata</i>	Hymenoptera: Braconidae
CfMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Lepidoptera: Tortricidae
CpGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Lepidoptera: Tortricidae
CrleGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	Lepidoptera: Tortricidae
DpAV-4	Ascovirus	<i>Ascoviridae</i>	<i>Diadromus pulchellus</i>	Hymenoptera: Ichneumonidae
DpRV-1	Reovirus	<i>Reoviridae</i>	<i>Diadromus pulchellus</i>	Hymenoptera: Ichneumonidae
Gypsy	Retrovirus	<i>Metaviridae</i> (Género: <i>Errantivirus</i>)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera: Drosophilidae
HaGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera: Noctuidae
LdMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera: Lymantriidae
MbNPV	Nucleopoliedrovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Mamestra brassicae</i>	Lepidoptera: Noctuidae
McbPV	Polydnavirus	<i>Polydnaviridae</i> (<i>Bracovirus</i>)	<i>Microplitis bicoloratus</i>	Hymenoptera: Braconidae
PsEV	Entomopoxvirus	<i>Poxviridae</i> (Subfamilia: <i>Entomopoxvirus</i>)	<i>Pseudaletia separata</i>	Lepidoptera: Noctuidae
PsunGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Lepidoptera: Noctuidae
PsunMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Lepidoptera: Noctuidae
SeGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera: Noctuidae
SeMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera: Noctuidae
SfGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lepidoptera: Noctuidae
SfMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lepidoptera: Noctuidae
SIGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Spodoptera litura</i>	Lepidoptera: Noctuidae
SIMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Spodoptera litura</i>	Lepidoptera: Noctuidae
TED	Retrovirus	<i>Metaviridae</i> (Género: <i>Errantivirus</i>)	<i>Trichoplusia ni</i>	Lepidoptera: Noctuidae
ThorMNPV	Nucleopoliedrovirus múltiple	<i>Baculoviridae</i>	<i>Thysanoplusia orichalcea</i>	Lepidoptera: Noctuidae
TnGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	Lepidoptera: Noctuidae
TnNPV	Nucleopoliedrovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	Lepidoptera: Noctuidae
XcnGV	Granulovirus	<i>Baculoviridae</i>	<i>Xestia c-nigrum</i>	Lepidoptera: Noctuidae

Tabla 3. Descripción de siglas utilizadas en el texto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asgari S, Johnson K. 2010. Insect virology. Caister Academic Press. Gran Bretaña. Pp. 435.
2. Bideshi D, Bigot Y, Federici B, Spears T. 2010. Ascoviruses. In: Insect virology. Caister Academic Press. Gran Bretaña. 3-34.
3. Caballero P, López-Ferber M, Williams T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones en el control biológico de plagas. Editorial Phytoma. Pp. 518.
4. Caballero P, Williams T. 2008. Capítulo 8: Virus entomopatógenos. En: Control Biológico de Plagas Agrícolas. Ed. Phytoma. 121-135.
5. Cheng X, Carner G, Arif B. 2000. A new ascovirus from *S. exigua* and its relatedness to the isolate from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of General Virology*. 81: 3083-3092.
6. Cheng X, Lynn D. 2009. Baculovirus interactions in vitro and in vivo. *Advances in Applied Microbiology*. 68: 217-239.
7. Copping L. 2001. The BioPesticide Manual. Second Edition. British Crop Protection Council.
8. Corsaro J, Gijzen M, Wang P, Granados R. 1993. Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. In: Parasites and pathogens of insects. Academic. New York. 2: 127-145.
9. Cory J, Evans H. 2007. Viruses. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Second edition. United States. 149-174.
10. Cory J, Myers J. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34: 239-272.
11. Croizier G, Croizier L, Argaud O, Poudevigne D. 1994. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 48-52.
12. Da Palma T, Doonan B, Tragerm N, Kasman L. 2010. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus research*. 149: 1-9.
13. Federici B, Bideshi D, Tan Y, Spears T, Bigot Y. 2009. Ascoviruses: superb manipulators of apoptosis for viral replication and transmission. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 328: 171-196.
14. Federici B, Bigot Y. 2003. Origin and evolution of polydnviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. *Journal of Insect Physio*. 49: 419-432.
15. Federici B, Govindarajan R. 1990. Comparative histopathology of three ascovirus isolates in larval noctuids. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56: 300-311.
16. Flint S, Enquist L, Racaniello V, Skalka A. 2009. Principles of Virology. Editorial ASM Press, tercera edición. Estados Unidos. 569.
17. Friesen P, Nissen M. 1990. Gene organization and transcription of TED, a lepidopteron retrotransposon integrated within the baculovirus genome. *Molecular and Cellular Biology*. 10 (6): 3067-3077.

18. Granados R, Fu Y, Corsaro B, Hughes P. 2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancin from *Trichoplusia ni* granulovirus. *Biological Control*. 20: 153-159.
19. Guo H, Fang J, Wang J, Zhong F, Liu B. 2007. Interaction of *Xestia c-nigrum* granulovirus with peritrophic matrix and *S. litura nucleopolyhedrovirus* in *Spodoptera litura*. *Journal of Economical Entomology*. 100 (1): 20-25.
20. Guzo D, Rathburn H, Guthrie K, Dougherty E. 1992. Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected Gypsy moth cell lines. *Journal of Virology*. 66 (5): 2966-2972.
21. Harrison R, Bonning B. 2001. Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses. *Biological Control*. 20: 199-209.
22. Hayakawa T, Hashimoto Y, Mori M, Kaido M, Shimojo E, Furusawa I, Granados R. 2004. Transgenic Tobacco transformed with the *Trichoplusia ni* granulovirus enhancin gene affects insect development. *Biocontrol Science and Technology*. 14 (2): 211-214.
23. Hayakawa T, Shimojo E, Mori M, Kaido M, Furusawa I, Miyata S, Sano Y, Matsumoto T, Hashimoto Y, Granados R. 2000. Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus *enhancin* gene. *Applied Entomology and Zoology*. 35 (1): 163-170.
24. Herniou E, Olszewski J, O'Reeilly D, Cory J. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*. 78 (7): 3244-3251.
25. Hoover K, Humphries M, Gendron A, Slavicek J. 2010. Impact of viral *enhancing* genes on potency *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 150-152.
26. Hukuhara T, Hayakawa T, Wijonarko A. 1999. Increased baculovirus susceptibility of armyworm larvae feeding on transgenic rice plants expressing an entomopoxvirus gene. *Nature America*. 17: 1122-1124.
27. Hukuhara T, Hayakawa T, Wijonarko A. 2001. A bacterially produced virus enhancing factor from an entomopoxvirus enhances NPV infection in armyworm larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 25-30.
28. Hukuhara T, Wijonarko A. 2001. Enhanced fusion of a nucleopolyhedrovirus with cultured cells by a virus enhancing factor from an entomopoxvirus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 77: 62-67.
29. Hukuhara T, Wijonarko A, Hosokawa Y, Iwano H. 2003. Enhanced infection of an entomopoxvirus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae), by a granulovirus. *Applied Entomology and Zoology*. 38 (2): 255-259.
30. ICTV. 2009. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy. En: <http://www.ictvonline.org>. Consulta: 26/03/11.
31. Jehle J, Fritsch E, Huber J, Backhaus H. 2003. Intra-specific and inter-specific recombination of tortricid-specific granuloviruses during co-infection in insect larvae. *Archives of Virology*. 148: 1317-1333.

32. Kasman L. 2010. Virus-virus interactions. En: www.musc.edu/vvi. Consulta: 19/03/11.
33. Kelly D. 1982. Baculovirus replication. *Journal of General Virology*. 63: 1-13.
34. Kim F, Battini J, Manel N, Sitbon M. 2004. Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture. *Virology*. 318: 183-191.
35. Kondo A, Maeda S. 1991. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*. 65 (7): 3625-3632.
36. Lacey L, Frutos R, Kaya H, Vails P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?. *Biological Control*. 21: 230-248.
37. Lapied B, Pannetier C, Apaire-Marchais V, Licznar P, Corble V. 2009. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Cell Press. Trends Biotechnology*. 27 (4): 190-198.
38. Lauzon H, Jamieson P, Krell P, Arif B. 2005. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*. 86: 945-961.
39. Lepore L, Roelvink P, Granados R. 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *Journal of Invertebrate Pathology*. 68 (2): 131-140.
40. López-Ferber M, Simón O, Williams T, Caballero P. 2003. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society*. 270: 2249-2255.
41. Luo K, Pang Y. 2006. *Spodoptera litura* multi-capsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *Journal of Insect Physiology*. 52: 795-806.
42. Maeda S, Kamita S, Kondo A. 1993. Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *Journal of Virology*. 67 (10): 6234-6238.
43. Malik H, Henikoff S, Eickbush T. 2000. Poised for contagion: Evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Research*. 10: 1307-1318.
44. McClintock T, Dougherty E. 1987. Superinfection of baculovirus-infected gypsy moth cells with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Lymantria dispar*. *Virus Research*. 7: 351-364.
45. Mitsuhashi Y, Furuta Y, Sato M. 1998. The spindles of an entomopoxvirus of coleoptera (*Anomala cuprea*) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in Lepidoptera (*Bombyx mori*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 186-188.
46. Mori H, Metcalf P. 2010. Cypoviruses. In: *Insect virology*. Caister Academic Press. Gran Bretaña. 308-323.
47. Mori H, Nakazawa H, Shirai N, Shibata N, Sumida M, Matsubara F. 1992. Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *Journal of General Virology*. 73: 1877-1880.

48. Moscardi F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 44: 257-289.
49. Moscardi F, Lobo M, Batista M, Lara M, Szewczyk B. 2011. Chapter 16: Baculovirus Pesticides: Present state and future perspectives. *Agricultural and Environmental Applications*. 1-31.
50. Mukawa S, Goto C. 2007. Enhancement of nucleopolyhedrovirus infectivity against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by proteins derived from granulovirus and a fluorescent brightener. *Journal of Economical Entomology*. 100 (4): 1075-1083.
51. Mukawa S, Goto C. 2010. *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus infection and enhancing effect of proteins derived from *Xestia c-nigrum* granulovirus in larvae of *Mamestra brassicae* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cabbage. *Journal of Economical Entomology*. 103 (2): 257-264.
52. Murray P. 2006. *Microbiología médica*. Quinta edición. Editorial Elsevier. España. Pp. 976.
53. Okano K, Vanarsdall A, Mikhailov V, Rohrmann G. 2006. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. *Virology*. 344: 77-87.
54. Palli S, Caputo G, Sohi S, Brownwright A, Ladd T, Cook J, Primavera M, Arif B., Retnakaran, A. 1996. CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line. *Virology*. 222 (1): 201-213.
55. Pearson M, Rohrmann G. 2002. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (Insect retrovirus) families. *Journal of Virology*. 76 (11): 5301-5304.
56. Pearson M, Rohrmann G. 2006. Envelope gene capture and insect retrovirus evolution: The relationship between errantivirus and baculovirus envelope proteins. *Virus Research*. 118: 7-15.
57. Perera S, Li Z, Pavlik L, Arif B. 2010. Entomopoxviruses. In: *Insect virology*. Caister Academic Press. Gran Bretaña. 83-102.
58. 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.
59. Renault S, Stasiak K, Federici B, Bigot Y. 2005. Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *Journal of Insect Physiology*. 51: 137-148.
60. Rohrmann G. 2011. Baculovirus infection: The cell cycle and apoptosis. In: *Baculovirus molecular biology*. Second edition. Estados Unidos. 1-10.
61. Rolff J, Reynolds S. 2009. Insect infection and immunity. Evolution, ecology, and mechanisms. *Oxford Biology*. Estados Unidos. 254.
62. Schultz K, Friesen P. 2009. Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection. *Journal of Virology*. 83 (21): 11123-11132.
63. Shapiro M. 2000. Effect of two granulosis viruses on the activity of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Biological and Microbial Control*. 93 (6): 1633-1637.

64. Soldevila A, Webb B. 1996. Expression of polydnavirus genes under polydnavirus promoter regulation in insect infected with baculovirus recombinants. *Journal of General Virology*. 77: 1379-1388.
65. Sparks W, Bartholomay L, Bonning B. 2008. Insect immunity to viruses. Elsevier. Estados Unidos. 209-242.
66. Strand M. 2010. Polydnaviruses. In: *Insect virology*. Caister Academic Press. Gran Bretaña. 172-197.
67. Tanada Y. 1959a. Descriptions and characteristics of a nuclear polyhedrosis virus and a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 1: 197-214.
68. Tanada Y. 1959b. Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 1: 215-231.
69. Thiem S, Du X, Quentin M, Berner M. 1996. Identification of a baculovirus gene that promotes *A. californica polyhedrovirus* replication in a nonpermissive insect cell line. *Journal of Virology*. 70(4): 2221-2229.
70. Tillman P, Styer E, Hamm J. 2004. Transmission of an ascovirus from *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) and the effects of the pathogen on survival of a parasitoid, *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*. 33: 633-643.
71. Van Driesche R, Hoddle M, Center T. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Forest Health Technology Enterprise Team. Capítulos 23 y 24. 431-366.
72. Waner J. 1994. Mixed viral infections: Detection and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 7 (2): 143-151.
73. Wang L, Salem T, Lynn D, Cheng X. 2008a. 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.
74. Wang Y, Young Y, Yul J, Dong S, Rae B, Ho Y. 2008b. Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. *The Journal of Microbiology*. 46 (6): 704-708.
75. Washburn J, Haas-Stapleton E, Tan F, Beckage N, Volkman L. 2000. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *A. californica M nucleopolyhedrovirus*. *Journal of Insect Physiology*. 46: 179-190.
76. Wieden R. 2000. Biological Control. Midwest Institute for Biological Control. URL: <http://www.inhs.uiuc.edu/research/biocontrol/home.html>. Consulta: 16/08/2008.
77. Yanase T, Yasunaga C, Hara T, Kawarabata T. 1998. Coinfection of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* cell lines with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *S. exigua*. *Intervirology*. 41 (6): 244-252.
78. Zoog S, Schiller J, Wetter J, Chejanovsky N, Friesen P. 2002. Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 *in vivo*. *The EMBO journal*. 21 (19): 5130-5140.