

Capítulo 2

Biología y patogénesis de los baculovirus

ALICIA SCIOCCO DE CAP

1. Introducción	48
1.1. Sintomatología	48
1.2. Citopatología	50
2. Ciclo de infección	52
2.1. Infección primaria	52
2.2. Infección secundaria	55
3. Patogénesis	56
3.1. Virus de la poliedrosis nuclear	57
3.1.1. En lepidópteros.....	58
3.1.2. En himenópteros	61
3.1.3. En dípteros	62
3.1.4. En crustáceos	62
3.2. Virus de la granulosis	63
4. Conclusiones	65
5. Bibliografía	67

1. Introducción

El estudio de la biología y la patogénesis viral es de importancia fundamental en la determinación de las interacciones virus-huésped y en la estimación de los factores que condicionan los mecanismos de infección. Existen numerosos antecedentes relacionados con los efectos histopatológicos producidos por baculovirus, así como, sobre las influencias de la infección en el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo de los insectos susceptibles (ver revisiones GRANADOS Y WILLIAMS, 1986; VOLKMAN Y KNUDSON, 1986; FEDERICI, 1993, 1997; VOLKMAN, 1997; WILLIAMS Y FAULKNER, 1997).

Los avances en el conocimiento de la biología molecular de estos patógenos y la caracterización de la expresión y funcionalidad de ciertos genes, ha contribuido a un mayor entendimiento de los mecanismos de infección. De igual manera, la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas, y más recientemente, la utilización de baculovirus recombinantes que expresan genes marcadores (*LacZ*, *Green Fluorescent Protein*, etc.) han permitido el análisis de ciertos eventos no detectables a través de estudios realizados mediante microscopía tradicional (VOLKMAN, 1997).

En este capítulo, nos referiremos a la biología de los baculovirus relacionando la misma con el proceso de infección producido en larvas de lepidópteros y tomando como base los conocimientos existentes acerca del baculovirus más estudiado hasta el presente, el nucleopoliedrovirus (NPV) de *Autographa californica* (AcMNPV). Por otra parte, se incluirán ejemplos de patogénesis producidas por otros NPVs y por granulovirus (GV), en los diferentes órdenes de insectos susceptibles.

1.1. Sintomatología

Los signos y síntomas de infección producida por baculovirus se hacen evidentes en estados avanzados de la enfermedad. En general, se observa primeramente un cambio de coloración, debido a la acumulación de cuerpos de inclusión en los tejidos afectados. Esta sintomatología es más notoria en aquellas especies que presentan una cutícula transparente o levemente pigmentada, tornándose las larvas de color blanquecino o amarillento (Figura 1a). Los insectos exhiben, además, una menor movilidad, mayor flaccidez, pérdida de apetito y retraso en el desarrollo.

En el caso particular de los lepidópteros, se observa que las larvas tienden a alejarse de su fuente de alimentación, emigrando hacia las partes superiores de la planta, dónde mueren colgando de sus espuripedios. En las infecciones producidas por NPVs, tras la muerte de la larva los tejidos se desintegran, se produce la ruptura del tegumento larval y la liberación de masas de cuerpos de inclusión. Como se detallará más adelante, lo mismo puede ocurrir en larvas muertas por GVs, cuando la epidermis se encuentra altamente infectada (Figura 1b).

La aparición de los primeros signos de enfermedad y el tiempo letal dependen de una serie de factores, tales como: virulencia del aislamiento, dosis ingerida, edad larval, temperatura y estado nutricional. En general, en el caso de aislamien-

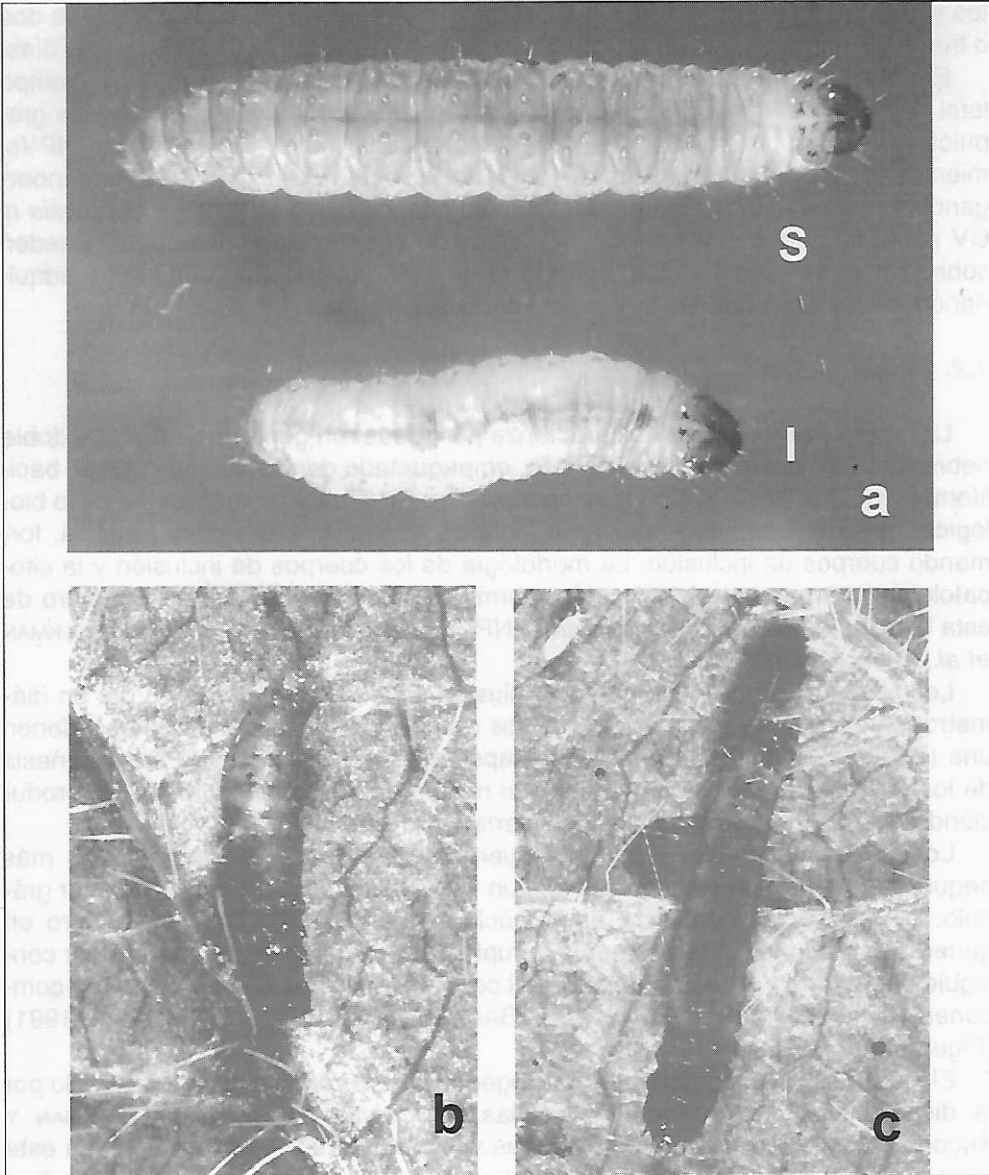


Figura 1. (a) Larvas de último estadio de *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) sana (S) y en estado avanzado de infección (I) producida por EpapGV; la larva infectada presenta una coloración blanquecina debido a la acumulación de gránulos en el tejido adiposo y en la epidermis, así como un retraso en su crecimiento. (b) Larva de segundo estadio de la misma especie, muerta por la infección producida por EpapGV; la larva adquirió una coloración castaño oscura y, debido a la proliferación de células del tejido adiposo, presenta un aspecto globoso a diferencia de la larva sana (c). Tras la ruptura del tegumento larval, se liberarán los cuerpos de inclusión en el ambiente.

tos virulentos de NPVs, las larvas de los primeros estadios mueren al cabo de dos o tres días, mientras que larvas de mayor tamaño demoran entre cinco y seis días.

En infecciones causadas por GV's, además de los factores citados, el tiempo letal depende del tipo de GV de que se trate y así, el comportamiento de los granulovirus de tipo II (infecciones poliorganotrópicas) es similar al de los NPVs, mientras la velocidad de acción de los pertenecientes al tipo I (infección monoorganotrópica) es menor. Entre estos últimos, citando como ejemplo *Trichoplusia ni* GV sobre su huésped homólogo, las larvas de cuarto estadio infectadas pueden sobrevivir entre 10 a 14 días, período en el cual siguen alimentándose y adquiriendo mayor peso que las larvas no infectadas (DOUGHERTY *et al.*, 1987).

1.2. Citopatología

La familia Baculoviridae se caracteriza por poseer un genoma de ADN de doble hebra (dsDNA) circular superenrollado, empaquetado dentro de una cápside baciliforme, cubierta por una envoltura lipoproteica. En ciertos momentos del ciclo biológico, estos viriones se encuentran incluso dentro de una matriz proteica, formando cuerpos de inclusión. La morfología de los cuerpos de inclusión y la citopatología que presenta la infección, permiten diferenciar dos géneros dentro de esta familia: los *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) y los *Granulovirus* (GVs) (VOLKMAN *et al.*, 1995; MILLER, 1996).

Los NPVs presentan cuerpos de inclusión poliédricos de 0,5 a 15 μ m en diámetro, en los que se encuentran incluso gran número de viriones que contienen una (SNPV) o varias (MNPVs) nucleocápsides. La replicación y la morfogénesis de los cuerpos de inclusión ocurre en el núcleo de las células infectadas, produciéndose una hipertrofia nuclear característica (Figura 2 a y b).

Los GV's, en cambio, presentan cuerpos de inclusión de forma oval, más pequeños ($< 1 \mu$ m), que contienen sólo un virión (excepcionalmente 2 ó 3) por gránulo. La replicación comienza en el núcleo de las células infectadas, pero en general se produce inmediatamente la ruptura de la membrana nuclear y por consiguiente, el ciclo y la morfogénesis viral continúa en la mezcla resultante de componentes citoplasmáticos y nucleares (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986; CROOK, 1991) (Figuras 2 c y d).

El estudio de la citopatología y morfogénesis de los NPVs ha sido facilitado por la disponibilidad de cultivos de células permisivas de insectos (VOLKMAN Y KNUDSON, 1986; BLISSARD, 1996; WILLIAMS Y FAULKNER, 1997). En relación con este tema, la información disponible respecto a los GV's es menor y si bien se han logrado avances en el desarrollo y mantenimiento de líneas celulares susceptibles a *Cydia pomonella* GV (CpGV) (WINSTANLEY Y CROOK, 1993), los trabajos publicados hasta el presente se basan en el análisis de tejidos de larvas infectadas.

En las secciones 3.1.1 y 3.2 de este capítulo, se describirán con mayor detalle los cambios citopatológicos producidos por infecciones de NPVs y GV's en larvas de lepidópteros. Complementariamente, se hará referencia a los procesos patológicos y fisiológicos asociados con la replicación y la morfogénesis viral.

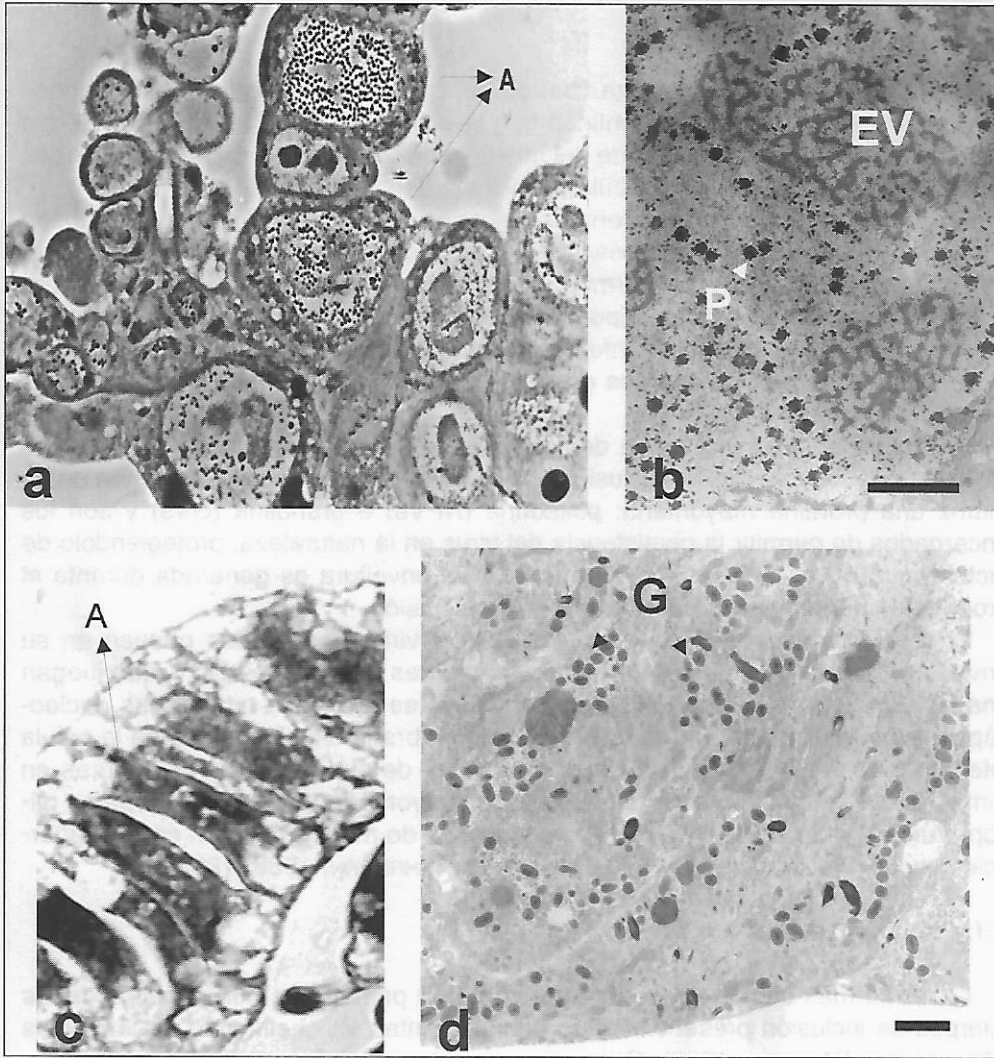


Figura 2. Microscopía por contraste de fase mostrando la infección producida por NPV en el cuerpo graso de una larva de lepidóptero. (a) Células infectadas (A) en diferentes estados citopatológicos, desde hipertrofia nuclear hasta desarrollo de estroma virogénico y células conteniendo gran cantidad de poliedros en su interior. (b) Micrografía de una célula infectada por NPV, con formación de estroma virogénico (EV) y poliedros (P) dentro del núcleo celular (Barra = 10 μ m). (c) Microscopía de un corte de cuerpo graso de una larva de lepidóptero infectada con GV, en donde, tal como se observa en detalle en la sección (d) la morfogénesis de los cuerpos de inclusión (G) se produce en la mezcla resultante de los contenidos nucleares y citoplasmáticos de las células infectadas, tras la ruptura de la membrana nuclear (Barra = 2,5 μ m). (Fotos a y b, gentilmente provistas por el Dr. Brian A. Federici).

2. Ciclo de infección

El ciclo de infección comienza cuando los cuerpos de inclusión son ingeridos por las larvas al alimentarse, continúa con la dispersión de la enfermedad dentro del insecto y finaliza tras la muerte del mismo, con la liberación de nuevos cuerpos de inclusión que contienen partículas infectivas (Figura 3).

Durante este ciclo, se producen dos fenotipos de viriones con idéntico genotipo (BLISSARD Y ROHRMANN, 1990; BLISSARD, 1996). Uno de ellos es el responsable de la transmisión horizontal de la enfermedad y por ende, el causante de la infección primaria en el insecto. El otro fenotipo viral, disemina la enfermedad dentro del hemocele del insecto, provocando la infección secundaria que dará como resultado final la generación de nuevos cuerpos de inclusión y, eventualmente, la muerte de los individuos afectados.

El primer fenotipo (occlusion derived virions ODV) lo constituyen los viriones derivados de los cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión contienen en su matriz una proteína mayoritaria: poliedrina (NPVs) o granulina (GVs) y son los encargados de permitir la persistencia del virus en la naturaleza, protegiéndolo de factores ambientales adversos. En los ODV la envoltura es generada durante el proceso de morfogénesis de los cuerpos de inclusión.

El segundo fenotipo (budded virions BV) o viriones brotados poseen en su envoltura ciertas estructuras y proteínas diferentes a las de los ODV, que juegan una función específica. La envoltura de los BV es adquirida cuando las nucleocápsidas sintetizadas brotan a través de la membrana citoplasmática de la célula infectada. Los viriones maduros poseen en uno de sus extremos estructuras en forma de clavos (peplómeros) cuya proteína mayoritaria, en AcMNPV, es una glicoproteína denominada GP64 EFP y encargada de mediar la unión con la superficie celular (VOLKMAN *et al.*, 1984; BLISSARD Y ROHRMANN, 1989, 1992).

2.1. Infección primaria

La forma más común de inicio de la infección primaria es por ingestión de los cuerpos de inclusión presentes como contaminantes en el alimento de las larvas (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986). Otras vías de entrada e infección incluyen la transmisión transovárica o por contaminación superficial de los huevos al ovipositar hembras infectadas (ej. SMITH Y VLAK, 1988; FUXA Y RICHTER, 1991; TANADA Y KAYA, 1993; KUKAN, 1999), el paso a través de los espiráculos (KIRKPATRICK *et al.*, 1994) y el parasitismo (ej. CABALLERO *et al.*, 1990, 1991), aunque estos últimos mecanismos no se consideran de importancia ya que la frecuencia de ocurrencia es relativamente baja.

Ingeridos los cuerpos de inclusión, debido a la alta alcalinidad presente en los jugos intestinales del insecto huésped (pH 9,5-11), se produce la hidrólisis de la proteína mayoritaria de los cuerpos de inclusión, facilitada por la acción de una proteasa alcalina (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986; HORTON Y BURAND, 1993). El hecho de que, entre otras cosas, los poliedros producidos en cultivos celulares no poseen

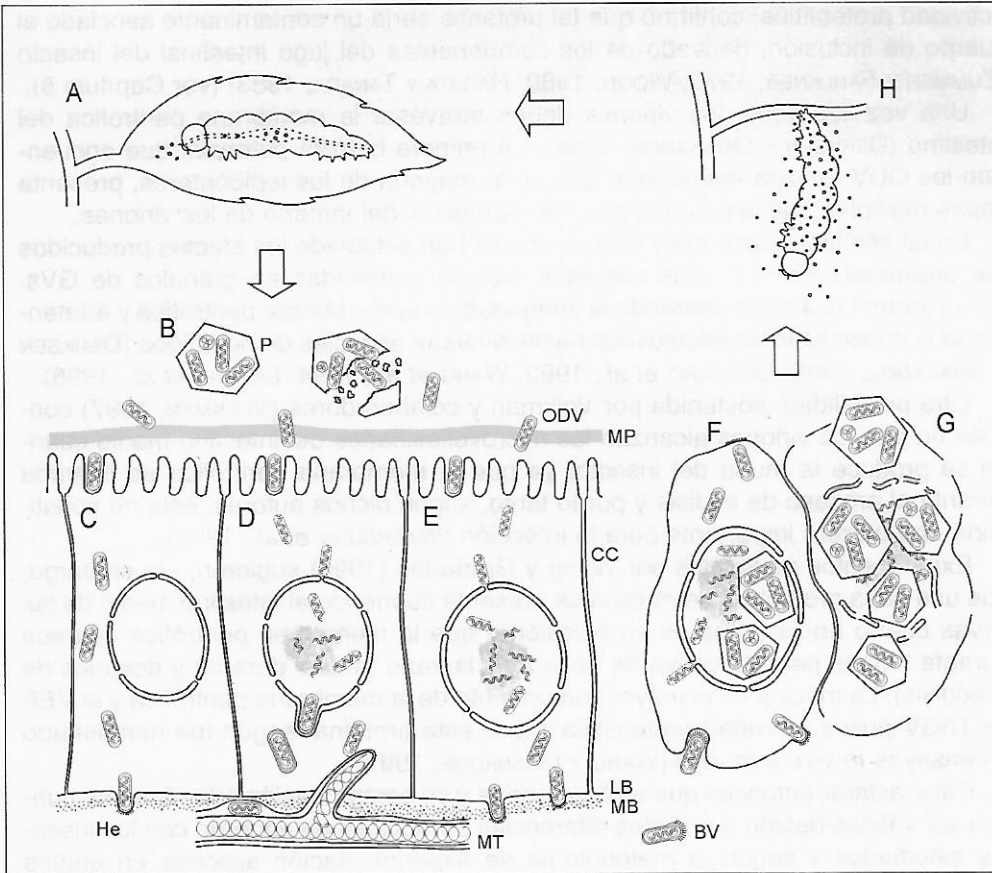


Figura 3. Esquemización del ciclo biológico de un NPV (con el fin de obtener una mejor visualización de los eventos, los tamaños ilustrados no guardan proporción con los tamaños reales). (A) La larva ingiere los cuerpos de inclusión al alimentarse. (B) En el intestino medio se disuelven los cuerpos de inclusión (P) y quedan así liberados los viriones (ODV) que luego de atravesar la membrana peritrófica (MP), se unen por fusión a las microvellosidades del intestino. A partir de este estado, han sido descritas diferentes vías de infección hacia el hemocele. (C) Las nucleocápsidas pueden pasar directamente a través de la célula atravesando la lámina basal (LB) y brotando hacia la hemolinfa (He). (D) El ciclo inicial de replicación ocurre en las células columnares (CC) del intestino medio y la progenie viral brota hacia los traqueoblastos diseminándose la enfermedad a través del sistema traqueal. (E) Tras replicación en el núcleo de las células del intestino, los viriones brotan hacia la hemolinfa. (MB) Membrana basal. (MT) Matriz traqueal. Los viriones brotados (BV) causan la infección secundaria dentro del hemocele. (F) Las partículas virales entran a las células de los tejidos susceptibles por endocitosis; las nucleocápsidas se dirigen hacia el núcleo y allí liberan el DNA; se inicia un nuevo ciclo de replicación que culmina en la formación de nuevos BV y de viriones que se incluyen en los cuerpos de inclusión. (G) Se produce la lisis nuclear y celular. (H) Finalmente, se rompe el tegumento larval y quedan liberados los cuerpos de inclusión en el ambiente, que al ser ingeridos por otras larvas al alimentarse comenzarán un nuevo ciclo de infección.

actividad proteolítica, confirmó que tal proteasa sería un contaminante asociado al cuerpo de inclusión, derivado de los componentes del jugo intestinal del insecto (ZUMMER Y FAULKNER, 1979; WOOD, 1980; NAGATA Y TANADA, 1983) (ver Capítulo 5).

Una vez liberados, los viriones deben atravesar la membrana peritrófica del intestino (DERKSEN Y GRANADOS, 1988). La primera barrera potencial que encuentran los ODV es esta membrana, que en la mayoría de los lepidópteros, presenta capas múltiples que impiden el paso de partículas del tamaño de los viriones.

En tal sentido, Granados y colaboradores han estudiado los efectos producidos por proteínas (VEFs o *virus enhancin factors*) contenidas en gránulos de GVs. Estas proteínas actúan alterando la integridad de la membrana peritrófica y aumentando la infectividad de baculovirus hacia diversas especies de noctuidos (DERKSEN Y GRANADOS, 1988; CORSARO *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1994; LEPORE *et al.*, 1996).

Otra posibilidad, sostenida por Volkman y colaboradores (VOLKMAN, 1997) consiste en que los viriones alcanzan las microvellosidades del intestino medio cuando se produce la muda del insecto, ya que la membrana peritrófica es liberada durante el proceso de ecdisis y por lo tanto, según dichos autores, ésta no constituiría una barrera importante para la infección (WASHBURN *et al.*, 1995).

Experimentos realizados por Wang y Granados (1998) sugieren, sin embargo, que una capa protectora de mucina se presenta cubriendo el intestino medio de las larvas cuatro horas antes de su eclosión y que la membrana peritrófica aparece durante todo el período activo de desarrollo larvario (antes, durante y después de la ecdisis). La mucina es el mayor componente de la membrana peritrófica y el VEF de TnGV posee actividad proteolítica sobre esta proteína, según fue demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* (WANG Y GRANADOS, 1997).

Cabe aclarar entonces que ambas teorías y su comprobación experimental pueden ser válidas debido a posibles diferencias producidas de acuerdo con los insectos estudiados y según la metodología de experimentación aplicada en ambos casos.

Posteriormente, continuando el ciclo de infección, los viriones se unen por fusión a la membrana citoplasmática de las microvellosidades de las células del intestino medio (GRANADOS, 1978; GRANADOS Y LAWLER, 1981; HORTON Y BURAND, 1993; ENGELHARD *et al.*, 1994). Según trabajos recientes, se ha demostrado que existen proteínas específicas en los ODV que podrían inducir tal fusión (RUSSEL Y ROHRMANN, 1993; BRAUNAGEL *et al.*, 1996; THEILMANN *et al.*, 1996). En este sentido, Horton y Burand (1993) realizaron experimentos utilizando microvesículas derivadas de células columnares del intestino medio de *Lymantria dispar* e infectando con LdMNPV, producto de cuyo análisis se sugiere que podrían existir sitios de unión y receptores específicos, aún no identificados.

Una vez producida la fusión, las nucleocápsidas penetran en el citoplasma de las células y se dirigen hacia el núcleo, donde se desnudan y liberan el DNA a través de los poros nucleares (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986). El núcleo se hipertrofia, los nucleolos se dirigen hacia la periferia nuclear y decrecen en tamaño. Comienza entonces la transcripción de los primeros genes virales, mediada inicialmente por la *RNA polimerasa II* de la célula huésped, para luego continuar a partir de la RNA

polimerasa del virus (BLISSARD Y ROHRMANN, 1990). Se activan cascadas replicatorias del DNA, se genera nueva progenie viral y se producen alteraciones en las funciones fisiológicas del insecto en beneficio de un mejor desarrollo de la enfermedad en el huésped.

Así, se forman nuevas nucleocápsidas, las cuales pasan a través de la membrana nuclear adquiriendo una envoltura de dicha membrana; se alinean con la membrana plasmática (plasmalemma) en la base de la célula, emergen a través de esta membrana como viriones brotados (BV) que atraviesan la lámina basal circulando a través de la hemolinfa (GRANADOS Y LAWLER, 1981) (ver Figura 3).

Según estudios posteriores, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, se estableció que se pueden producir infecciones simultáneas en células columnares y en células regenerativas del epitelio del intestino medio (KEDDIE *et al.*, 1989).

El ciclo de replicación dentro de la célula depende del aislamiento de virus y del género al que pertenece. A nivel citopatológico, el cambio más característico es el agrandamiento del núcleo de las células infectadas, apareciendo una zona electrodensa correspondiente al estroma virogénico. En las infecciones producidas por NPVs, la progenie viral aparece entre las 8 y 24 horas post-infección, en el núcleo de las células infectadas. En los GVs, en cambio, al producirse la ruptura de la membrana nuclear, normalmente se observan nucleocápsidas entre los componentes núcleo-citoplasmáticos resultantes de la mezcla de ambos contenidos a las 36 horas post-infección.

Una vez producida la primera progenie, comienza la dispersión del virus hacia las células de los tejidos a ser infectados produciéndose la infección secundaria dentro del hemocele.

Si bien éstas son las vías más comunes para dar inicio a la infección secundaria, no siempre se ha detectado a las células del intestino medio como el primer foco de infección. Estudios realizados mostraron que en ciertos casos una porción de nucleocápsidas del inóculo puede penetrar directamente a través del epitelio del intestino medio, atravesar la lámina basal y producir infecciones sistémicas dentro del hemocele (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986; KEDDIE *et al.*, 1989).

De igual manera, en el caso de ciertos GVs, no se han detectado infecciones en el intestino medio, asumiéndose que podría presentarse el pasaje de partículas infectivas por espacios intercelulares, en pequeñas porciones del intestino medio (BEGON *et al.*, 1993).

2.2. Infección secundaria

La diseminación de la enfermedad dentro del huésped es causada por la progenie de virus brotantes que infectan células vecinas y diversos tejidos, según el aislamiento de virus de que se trate. Existen aún ciertos interrogantes respecto a cuál es la vía principal de diseminación de la infección dentro del hemocele del insecto. Sin embargo, según los trabajos realizados hasta el presente, se puede concluir que tanto los hemocitos como las células traqueales infectadas que rodean los tejidos susceptibles juegan el papel más importante en tal diseminación.

En exámenes realizados por microscopía electrónica, se observó que los viriones brotados atraviesan la membrana basal para iniciar la infección secundaria (GRANADOS Y LAWLER, 1981). En el mismo estudio, se detectaron hemocitos que contienen poliedros a las 16 horas post-infección, lo cual sugiere que éstos fueron infectados con anterioridad. Según Granados y Williams (1986), los hemocitos actúan como "fábricas eficientes" en la producción de virus para la consecuente infección dentro del insecto.

Posteriores investigaciones mostraron que otra vía de diseminación es a través de las traqueolas, tal como fuera sugerido anteriormente por Adams *et al.* (1977). En tal sentido, larvas de *Trichoplusia ni* fueron inoculadas *per os* con un baculovirus recombinante, AcMNPV conteniendo un gen marcador (β -galactosidasa) bajo el promotor temprano *Drosophila hsp70*. Mediante la observación de la expresión de este gen, se determinó la función del sistema traqueolar y las células traqueales en la diseminación de la enfermedad desde el intestino medio hacia los diferentes tejidos (ENGELHARD *et al.*, 1994). Resultados similares fueron obtenidos en larvas de *Heliothis zea* y de *H. virescens* (KIRKPATRICK *et al.*, 1994; WASHBURN *et al.*, 1995).

Una vez producida la infección secundaria, desde cada sitio de infección inicial se produce la dispersión de la enfermedad por paso de los viriones brotados, de célula en célula (KEDDIE *et al.*, 1989; MONSMA *et al.*, 1996). En este caso, la entrada del virión a la célula se produce por endocitosis (VOLKMAN Y GOLDSMITH, 1984, 1985).

En cuanto a los tejidos susceptibles de ser infectados, el tropismo es variable según el baculovirus y el huésped de que se trate, como se detallará más adelante.

Durante el proceso de infección secundaria se producen, además, viriones ocluidos. Gobernada por la expresión de genes virales muy tardíos (p10, *poliedrina* o *granulina*, entre otros), comienza la inclusión de los viriones dentro de los cuerpos de inclusión. En un estado de infección avanzada, los cuerpos de inclusión son fácilmente observables por microscopía óptica con contraste de fase, extrayendo una muestra de cuerpo graso o de hemolinfa. En esta última, se observan cuerpos de inclusión libres, debido a la ruptura de las membranas celulares. Avanzada la infección el insecto muere y, en el caso de infecciones poliorganotrópicas en donde se ve afectada la epidermis, se produce la lisis del tegumento y la liberación de masas de cuerpos de inclusión que darán origen a un nuevo ciclo y proceso de infección.

3. Patogénesis

Como se expresó anteriormente, las patologías causadas por los dos grupos principales de baculovirus (NPVs y GVs) muestran diferencias en cuanto a la invasión, replicación, desarrollo y diseminación dentro del insecto según el huésped y el aislamiento viral. A continuación se detallarán ejemplos de tales patologías en distintos órdenes de insectos y en casos específicos en los que hasta el presente se cuenta con mayor información.

Paralelamente, en la Tabla 1, se puede observar la relación entre virus-huésped y tropismo de la infección hacia los diversos tejidos.

3. 1. *Virus de poliedrosis nuclear*

Los virus de poliedrosis nucleares son los baculovirus más ampliamente distribuidos y se han detectado en más de 400 especies, en siete órdenes de insectos (VOLKMAN *et al.*, 1995). En ciertos órdenes, las infecciones se ven restringidas al epitelio del intestino medio, donde se producen además los cuerpos de inclusión. En los lepidópteros, en cambio, se produce una infección transitoria en el intestino medio, sin producción inicial de cuerpos de inclusión, para luego invadir la mayoría de los tejidos generándose una infección de tipo poliorganotrópica con formación de poliedros avanzado el desarrollo de la enfermedad (FEDERICI, 1997).

Tabla 1. Principales órganos y tejidos infectados por Baculovirus (1).

Tipo de Baculovirus	Principales tejidos infectados						
	Intestino medio	Hemocitos	Tejido adiposo	Matriz traqueal	Epidermis	Tejido muscular	Tejido nervioso
NPVs							
Lepidópteros	*	+	+	+	+	+	+
Himenópteros	+	-	-	-	-	-	-
Dípteros	+	+/-	-	-	-	-	-
Tisanópteros	+	-	-	-	-	-	-
Crustáceos	+	-	-	-	-	-	-
GVs							
Tipo 1	*	-	+	-	-	-	-
Tipo 2	*	+/-	+	+	+	-	-
Tipo 3	+	-	-	-	-	-	-

(1) Federici (1997), modificada.

* Las células epiteliales del intestino medio son utilizadas como sitio inicial de la replicación viral y en la formación de nueva progenie que dará origen a la infección secundaria dentro del hemocele. En general, no se producen cuerpos de inclusión aún en estados avanzados de la enfermedad.

+/- En estos casos, puede o no producirse infección en el tejido, según el aislamiento y el huésped de que se trate. En ciertos GVs, los hemocitos desempeñarían un aparente papel de fagocitosis de cuerpos de inclusión, sin mostrar signos de infección.

+ Se observa replicación y formación de cuerpos de inclusión. En los crustáceos, el órgano digestivo afectado es el hepatopáncreas, comparable al intestino medio de los insectos.

3.1.1. En lepidópteros

Tal como fuera expuesto, la principal vía de infección es por ingestión de cuerpos de inclusión y por consiguiente, el estado susceptible es el estado larval. En pocos minutos, los cuerpos de inclusión son disueltos en el intestino medio del insecto y los viriones quedan liberados en el medio.

Como se ha descrito con anterioridad, producida la infección primaria, los BV pasan al hemocele, dispersándose la enfermedad a través de los hemocitos o por el sistema traqueal.

Según ciertos autores, los BV encontrarían en la membrana basal otra barrera que impediría el paso directo de los viriones (VOLKMAN, 1997). Así, se ha propuesto que una vía posible de dispersión de los BV, es a través del sistema traqueal (ENGELHARD *et al.*, 1994). Las traqueolas penetran la lámina basal de órganos y tejidos con el fin de suplir la demanda de oxígeno, estableciendo una íntima relación entre las membranas plasmáticas de las células. Dichos autores proponen que los BVs se dirigen desde el intestino medio hasta la hemolinfa u otros tejidos, a través del sistema linfático traqueolar y por espacios intercelulares del epitelio traqueal facilitándose una rápida diseminación del virus hacia los diferentes tejidos.

Sin embargo, Federici (1997) cuestiona esta última hipótesis y sostiene que existen estudios que muestran que los BVs de AcMNPV atraviesan la lámina basal del intestino medio (GRANADOS Y LAWLER, 1981; FLIPSEN *et al.*, 1993, 1995) pudiéndose ello deberse a un posible proceso enzimático aún no conocido, más que a un mero proceso físico. Por otra parte, además de la matriz traqueal, el cuerpo graso, los hemocitos y los músculos cercanos al intestino medio se infectan rápidamente y tal infección no sería posible si los BVs se dispersaran sólo a través de la matriz traqueal, especialmente si uno a más ciclos de replicación fueran necesarios para la generación de gran número de viriones infectivos capaces de llegar a tales tejidos (FEDERICI, 1997).

Utilizando un baculovirus recombinante AcMNPV-GFP (proteína fluorescente verde), con expresión de la GFP bajo el control del promotor del gen de poliedrina, Barrett *et al.* (1998) aportaron ciertas evidencias para el esclarecimiento de los eventos de diseminación del virus en el hemocele. A 24 hs post-infección (pi), tanto las células epiteliales del intestino medio como los hemocitos mostraron fluorescencia, demostrándose que en las mismas se produjo un proceso de replicación viral. A 36 hs, la fluorescencia en el intestino fue decreciendo mientras las traqueas asociadas a tales células aparecieron fluorescentes. En el tejido adiposo, a partir de 24 h pi se observó parches de fluorescencia en las células asociadas con las tráqueas, dispersándose luego por completo a 60 h pi. Un hecho similar ocurrió en la epidermis. En el intestino medio, a 60 h pi las células aparecieron nuevamente sanas mostrando la infección "transitoria" ocurrente en este tejido y atribuyendo ello a la descamación de células infectadas tal como fuera señalado anteriormente por Keddie *et al.* (1989) y Flipsen *et al.* (1993). Algo interesante de destacar es que según las observaciones realizadas, la fluorescencia en el tejido traqueal fue en un inicio localizada y no continua, lo que sugiere que la infección ocurre en puntos específicos para luego dispersarse desde los mismos.

Como conclusión de dicho trabajo, Barrett *et al.* (1998) sugieren que el primer sitio de infección son las células epiteliales del intestino medio, donde el virus se replica y se generan nuevas nucleocápsidas que pasan directamente a través del sistema reticular de la membrana plasmática para infectar a los hemocitos. Tales hemocitos liberarían partículas virales infectando el sistema traqueal en numerosos sitios desde los cuales proseguiría la infección. Las células traqueales susceptibles serían los traqueoblastos, donde encontrarían una menor protección tal como fuera sugerido por Engelhard *et al.* (1994).

En general, en infecciones producidas por NPVs en larvas de lepidópteros, se ven afectados varios tejidos, entre los que se incluyen: hemocitos, matriz traqueal, epidermis, cuerpo graso, tejidos muscular, nervioso, reproductivo, glandular y células pericardiales.

Como se vio anteriormente, una vez iniciada la infección secundaria, se producen dos tipos distintos de viriones. Aquellos que repiten el ciclo de infección similar al que se produce en el intestino medio, con formación de viriones brotados que infectarán a las células vecinas (Figura 4a), y viriones que serán incluidos durante la formación de los Obs.

A nivel citopatológico las células infectadas exhiben una serie de cambios, que incluyen primeramente alteraciones en el citoesqueleto, en microtúbulos y en sistemas membranosos (VOLKMAN Y ZAAL, 1990). La mayoría de los estudios relacionados con este tema han sido efectuados principalmente mediante el análisis ultramicroscópico y por técnicas histoquímicas, en células provenientes de cultivos celulares y sobre la especie tipo de los NPVs, AcMNPV.

Una vez que las nucleocápsidas entran en el citoplasma, las mismas son transportadas hacia el núcleo, en un proceso aún no conocido en detalle pero en el cual la formación de microfilamentos de actina podría desempeñar un papel importante. El número de microfilamentos de actina polimerizada es directamente proporcional a la multiplicidad de infección (CHALTON Y VOLKMAN, 1993). La formación de tales microfilamentos requiere la presencia de las nucleocápsidas pero no demanda síntesis de nuevas proteínas, lo cual sugiere que aquellas contienen la actividad necesaria para la inducción de tal formación. Según estudios realizados, F-actina inmovilizada se une, directa o indirectamente, a la proteína mayoritaria de las nucleocápsidas de AcMNPV (P39) y a un polipéptido de 67 kDa (CHALTON Y VOLKMAN, 1991; LANIER *et al.*, 1996).

Alcanzado el núcleo de las células, se produce la liberación del DNA viral (GRANADOS, 1978; GRANADOS Y WILLIAMS, 1986) mediada por la acción de una proteína quinasa asociada a la envoltura viral y por fosforilación de la nucleoproteína P6.9 (MILLER *et al.*, 1983).

Por microscopía electrónica es posible observar la formación de estroma virogénico en la región central del núcleo y la formación de nuevas nucleocápsidas (Figura 4b). En este momento, disminuye la transcripción del DNA y la síntesis de proteínas de la célula huésped. El ensamblaje de las nucleocápsidas ocurre por condensación del genoma viral en un complejo de nucleoproteínas proteínas, en un proceso mediado por la proteína de unión del DNA (P6.9). Se observan cambios

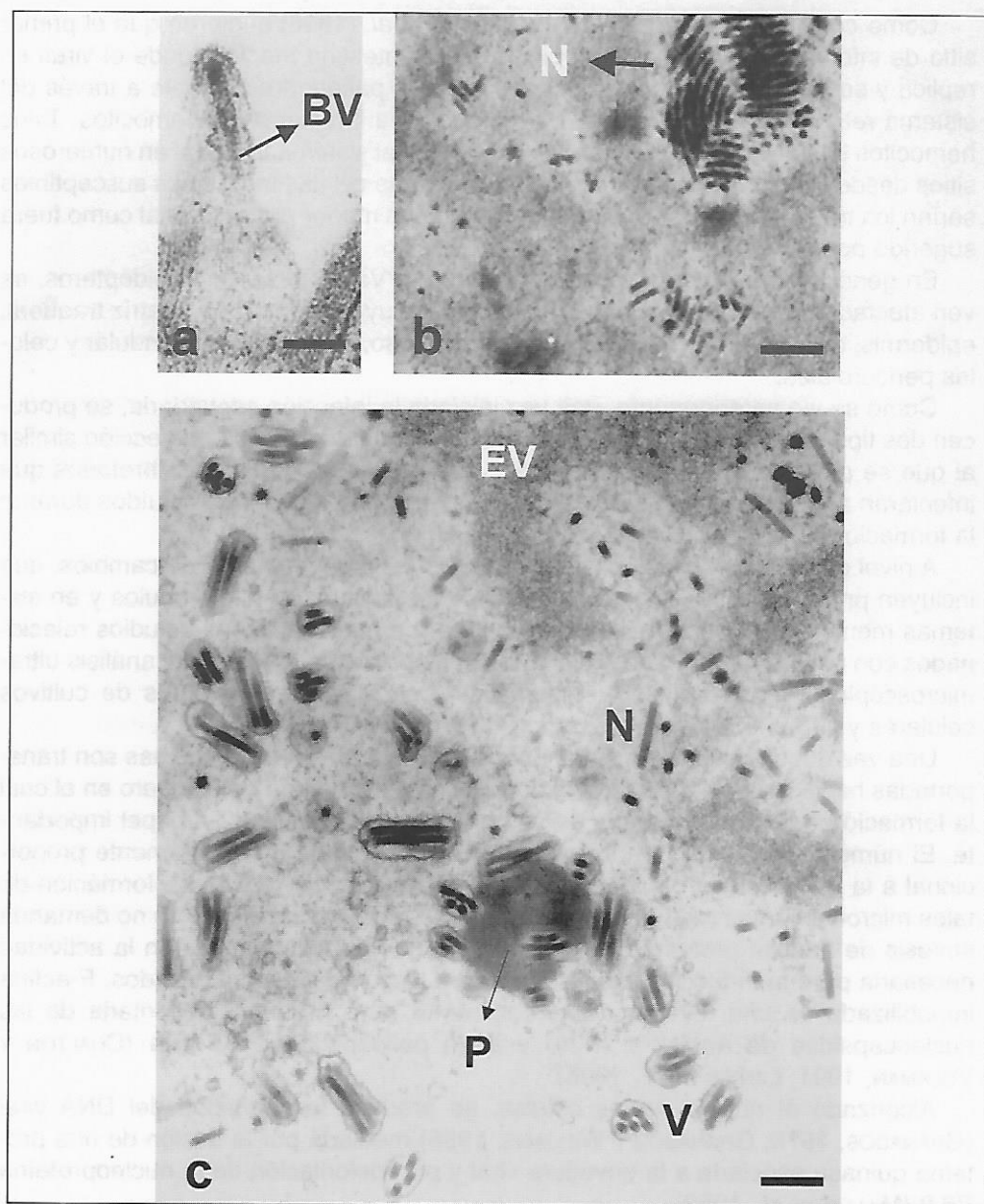


Figura 4. Micrografías electrónicas de NPV. (a) Virus en proceso de brotación a través de la membrana basal de una célula. (b) Detalle de un estado inicial de la infección dentro del núcleo celular, mostrando el estroma virogénico y nucleocápsidas (N). (c) En un estado más avanzado de la infección se observan la morfogénesis de los cuerpos de inclusión; (EV) estroma virogénico; (V) viriones con varias nucleocápsidas; (P) poliedro en formación. (Barra= 100 nm en (a); 400 nm en (b); 200 nm en (c). (Fotos gentilmente cedidas por el Dr. Brian A. Federici).

en la morfología nucleolar con un incremento en la cantidad de RNA. Se producen involuciones de la membrana nuclear, aumenta la actividad metabólica celular y alteraciones en los microtúbulos (ver WILLIAMS Y FAULKNER, 1996, 1997), relacionadas estas últimas con la acción de genes virales tempranos y tardíos (VOLKMAN Y ZAAL, 1990) y con la hiperexpresión de la proteína p10 (VLAK *et al.*, 1988).

La morfogénesis de los cuerpos de inclusión ocurre por condensación de poliedrina en la zona intranuclear de la célula infectada, a partir de 24 hs pi (VOLKMAN Y KNUDSON, 1986) (Figura 4c). Las células infectadas muestran hipertrofia nuclear (con un aumento del diámetro de hasta 10 veces su tamaño original) y presentan numerosos poliedros en su interior.

Avanzada la infección se produce la lisis celular, adquiriendo la hemolinfa la característica coloración blanquecina opaca debido a la acumulación de cuerpos de inclusión. En tal sentido, estudios realizados *in vitro* con AcMNPV y SeMNPV mostraron que este último proceso es dependiente de la presencia de p10 (WILLIAMS *et al.*, 1989; VAN OERS *et al.*, 1993), de la acción de una proteína quinasa y de catepsina codificadas por el virus (LANIER *et al.*, 1996; WILLIAMS Y FAULKNER, 1997).

En infecciones *in vivo*, cuando la mayor parte de los tejidos se ven afectados, el insecto muere. El tegumento de la larva se rompe y se liberan los poliedros en el ambiente, ayudado este proceso por la acción de una quitinasa codificada por el mismo virus (HAWTIN *et al.*, 1995).

Es interesante destacar que, durante el ciclo de infección, se pone en marcha una maquinaria genómica que incluye genes esenciales para la transcripción, replicación y morfogénesis, mientras paralelamente se expresan una variedad de genes auxiliares que ayudan al virus en tal proceso (ver Capítulo 8). Entre ellos cabe citar el gen *egt* (*ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*), identificado inicialmente en el genoma de AcMNPV (O'REILLY Y MILLER, 1989) y posteriormente en numerosos baculovirus (O'REILLY, 1997). Este gen codifica una proteína (EGT) que se acumula en la hemolinfa del insecto infectado, provocando la conjugación de los esteroides responsables de la muda del insecto e inhibiendo consecuentemente el proceso de ecdisis. La delección del gen *egt* ha sido utilizada en la mejora de baculovirus como pesticidas, debido a que la misma provoca una disminución en el consumo de alimentos por parte de las larvas infectadas y disminuye el tiempo letal (ver Capítulo 8).

3.1.2. En himenópteros

Por su importancia económica como plagas forestales, los baculovirus más estudiados han sido los que afectan las especies del suborden Symphyta (tentredínidos), los cuales han demostrado ser altamente específicos. Entre ellos, se destacan *Neodiprion sertifer* NPV y *Gilpinia hercyniae* NPV por ser las más utilizadas en control biológico. En general, todos los NPVs que afectan estos himenópteros presentan un efecto patológico similar, restringiendo la infección sólo a las células epiteliales del intestino medio del insecto. La replicación del virus se produce en el núcleo de las células infectadas y la velocidad de acción es rápida. Al cabo de dos

o tres días se observa una coloración blanquecina en la intersección de los segmentos abdominales, las larvas pierden el apetito y presentan menor tamaño que las larvas sanas, produciéndose la muerte de la larva infectada al cabo de 4-7 días (FEDERICI, 1997).

Muchos de los tentredínidos plaga poseen hábitos gregarios, lo cual las hace particularmente susceptibles a epizootias virales pues cuando un individuo es infectado, contamina el follaje y produce la transmisión de la enfermedad hacia otros individuos de la colonia (HUBER, 1986). Ya que los adultos se ven también infectados por NPV, se produce, además, transmisión vertical de la enfermedad a la progenie (CUNNINGHAM Y ENTWISTLE, 1981), lo cual contribuye a su dispersión.

3.1.3. En dípteros

Entre los NPVs que afectan dípteros se distinguen dos tipos: los que infectan el intestino medio (en mosquitos) y los que infectan hemocitos (*Tipula padulosa* NPV).

Hasta el presente, se han identificado NPVs en sólo pocas especies de mosquitos de los géneros *Culex* y *Aedes*. Entre ellos, los más estudiados han sido los aislados de *Aedes sollicitans* (AsSNPV) y *Aedes triseriatus* (AtSNPV). La enfermedad es de tipo agudo, ocasionando la muerte de las larvas al cabo de 2-4 días (FEDERICI Y LOWE, 1972). Los primeros signos de la enfermedad es el cese de la alimentación y la aparición de esferas blancas observables en el intestino de la larva, las cuales consisten en acumulación de cuerpos de inclusión en el núcleo de las células infectadas. La citopatología y morfogénesis viral es similar a la que ocurre en NPVs de lepidópteros (FEDERICI, 1997).

En *Tipula padulosa*, la infección posee una característica única en NPVs y consiste en que se ven infectados sólo los hemocitos, desconociéndose el proceso de infección inicial. La enfermedad fue descrita originalmente por K.A. Smith en el año 1955. Las larvas presentan coloración amarillenta y gran cantidad de cuerpos de inclusión en hemocitos y hemolinfa. La muerte se produce al cabo de 10-14 días post-infección (FEDERICI, 1997).

3.1.4. En crustáceos

La importancia de los NPVs en crustáceos reside en que infecciones ocasionadas por estos virus pueden diezmar poblaciones en producciones comerciales de camarones, con el consecuente daño económico. Uno de los más estudiados es el NPV de *Penaeus* spp., que causa una enfermedad extremadamente aguda y difícilmente detectable en los inicios de la infección debido a que el único órgano afectado es el hepatopáncreas. A las 18-24 h post-infección es posible detectar poliedros en el órgano infectado (STUCK Y WANG, 1996) y realizar diagnósticos de la infección mediante el uso de técnicas moleculares que permiten la detección de la enfermedad a las 12 h post-infección.

La citopatología producida es similar a la de otros NPVs (COUCH, 1991; BRUCE *et al.*, 1994), mientras los cuerpos de inclusión presentan forma tetraédrica y de gran tamaño. Según experiencias realizadas, el proceso de infección y la veloci-

dad de acción están relacionados, como en el caso de otros NPVs, con la edad de los individuos infectados y el tipo de inóculo suministrados (Hammer *et al.*, 1998).

3.2. Virus de la granulosis

Los granulovirus (GVs), sólo han sido detectados infectando insectos del Orden Lepidoptera (VOLKMAN *et al.*, 1995; MILLER, 1996). Según Federici (1993, 1997), existen tres tipos de granulovirus que se diferencian según el tropismo de infección que presentan hacia determinados tejidos.

En el tipo I (*Trichoplusia ni* GV y otros granulovirus que infectan larvas de noctuidos), el virus invade el intestino medio en forma transitoria y posteriormente la infección se ve limitada al cuerpo graso (infección monoorganotrópica). A diferencia de lo que ocurre en NPVs, las larvas mantienen su apetito por períodos prolongados y crecen más que las larvas sanas, entrando en estado de inactividad uno o dos días antes de la muerte (8-12 días post-infección). Las larvas se tornan de color blanquecino debido a la acumulación de cuerpos de inclusión en el tejido infectado. No se produce la ruptura del tegumento, por no encontrarse infectada la epidermis. Una vez muertas, las larvas adquieren una coloración oscura, casi negra debido a la invasión del cadáver por microorganismos saprófitos, presentando luego un aspecto seco que culmina en la posterior desintegración de la larva.

En los GVs de tipo II la infección es poliorganotrópica y de características patológicas similares a las producidas por NPVs en lepidópteros. Son ejemplo de este tipo de GVs, los virus de la granulosis de *Pieris brassicae*, de *Cydia pomonella* y de *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). Los tejidos que se presentan más afectados incluyen el cuerpo graso, la matriz traqueal y la epidermis. La velocidad de acción de este tipo de virus es más rápida, muriendo las larvas al cabo de 5-6 días postinfección, momento en que se produce la licuefacción de los tejidos y la ruptura de la cutícula permitiendo la liberación de los cuerpos de inclusión. Al igual que en los NPVs, en este último proceso estarían involucrados genes cuyos productos actúan sobre la quitina del tegumento del insecto (KANG *et al.*, 1998).

Por último, los GVs de tipo III también producen infecciones monoorganotrópicas, pero en este caso, limitadas al intestino medio del insecto, tanto en el estado de larva como en el de adulto. El único virus de este tipo registrado hasta el presente, es el *Harrisinia brillians* GV (FEDERICI Y STERN, 1990). La infección produce diarrea en los individuos afectados, y es transmisible a través de las heces. Al cabo de una semana, en larvas de tercero o cuarto estadio, se produce la muerte de las larvas infectadas.

Si bien el tipo de virus no condiciona su valor como agente de control biológico, se considera que los pertenecientes al tipo II son los que cuentan con mayor potencialidad de utilización debido a su virulencia y a su mayor rendimiento de producción de cuerpos de inclusión.

Tal como se expresara anteriormente, los estudios relacionados con la patogénesis viral en GVs se han realizado exclusivamente sobre insectos infectados,

mediante análisis histopatológicos por microscopía óptica y electrónica. La información disponible es escasa cuando se la compara con los avances producidos en este tema respecto a los nucleopoliedrovirus que infectan lepidópteros y aún restan por caracterizar una serie de eventos no conocidos en GVs.

Los cuerpos de inclusión ingeridos por la larva, son disueltos debido al medio alcalino de los jugos del intestino medio, tal como sucede en NPVs. Los viriones liberados atraviesan la membrana peritrófica, facilitado este proceso por la acción de proteínas virales específicas (*virus enhancer factor* o VEF) que producen la ruptura de dicha membrana (DERKSEN Y GRANADOS, 1988; CORSARO *et al.*, 1993).

Una vez producida la infección primaria, se han descrito diferentes cambios patológicos, según el virus de que se trate. Sin embargo, ciertas características son idénticas a nivel citopatológico para todos los GVs y diferentes de lo que ocurre en NPVs.

En tal sentido, una vez que las nucleocápsidas se hallan dentro de la célula, se dirigen hacia el núcleo donde inyectan el DNA por los poros nucleares (SUMMERS, 1971). Se produce inicialmente un agrandamiento del núcleo, marginación de los nucleolos y formación de estroma virogénico. Los cambios citoplásmicos que acompañan la infección indican una marcada alteración metabólica producida presumiblemente por la síntesis de productos virales. Se observan "complejos tipo-membranas" de estructuras similares a cisternas aplanadas del retículo endoplasmático rugoso que algunos autores han atribuido a fragmentos de componentes nucleares (TANADA Y LEUTENEGGER, 1968) o a una excesiva producción de membranas celulares (WALKER *et al.*, 1982). La replicación comienza en el núcleo pero, inmediatamente, se rompe la membrana nuclear y se produce una mezcla del material nuclear y citoplásmico (TWEETEN *et al.*, 1981; TANADA Y HESS, 1991).

En este punto, se observa la formación de nuevas nucleocápsidas, las cuales brotan a través de la membrana plasmática o se dirigen a través del sistema traqueal para infectar (tipos I y II) otros tejidos. Cabe destacar que tanto el proceso de brotación como la caracterización de los fenotipos virales infectivos dentro del hemocoele no han sido determinados aún con exactitud y ello es debido, principalmente, a la escasa disponibilidad de cultivos celulares susceptibles.

Si bien mediante microscopía electrónica se han observado estructuras parecidas a las de los viriones brotados de los NPVs (TWEETEN *et al.*, 1981), no se ha detectado hasta el presente un análogo de la proteína GP64 en GVs. En un trabajo reciente sobre la secuencia genómica del granulovirus de *Cydia pomonella*, se detectó un homólogo del ORF130 de *Lymantria dispar* NPV cuya función sería similar, aunque aún no se ha determinado su funcionalidad y expresión en BV de CpGV (LUQUE *et al.*, 1999).

En granulovirus del tipo II, como CpGV, el virus podría tener acceso a la matriz traqueal por penetración directa vía traqueolas, desde las células del intestino medio, o vía hemolinfa (FEDERICI, 1997).

Una vez producida la ruptura de la membrana nuclear de las células infectadas, las células comienzan a disociarse desapareciendo las uniones (desmosomas y hemidesmosomas) que las mantenían unidas. Este proceso se observa tanto en los granulovirus de tipo III, donde se produce liberación de células infectadas hacia la cavi-

dad intestinal, como en los GVs de tipos I y II. En estos últimos, se observa además una proliferación de células de cuerpo graso (WALKER *et al.*, 1982), lo que confiere un aspecto característico a las larvas enfermas.

En larvas infectadas con GV, la mayoría de las nucleocápsidas generadas se observaron incluídas dentro de estructuras tipo vesicular emigrando hacia la membrana basal y que podrían estar involucradas en el transporte de las nucleocápsidas dentro del hemocele del insecto (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986; HESS Y FALCON, 1987). Este tipo de estructuras con gran cantidad de nucleocápsidas alineadas paralelamente en su interior, ha sido observado en diversos granulovirus (Figura 5c).

En el caso de CpGV, estudios sobre el proceso de infección mediante microscopía electrónica mostraron que el intestino medio juega un papel importante en la generación de progenie infectiva, aún en estados avanzados de la infección (HESS Y FALCON, 1987). Sin embargo, en infecciones ocasionadas por otros GVs, no se ha detectado infección en el intestino medio, tal vez debido a que la misma se produce en una región limitada y no detectable mediante las técnicas clásicas de microscopía electrónica (BERGON *et al.*, 1993).

En granulovirus de tipo II, en general, la secuencia temporal de la infección continúa en el cuerpo graso, luego en la epidermis y por último en la matriz traqueal. En estos últimos tejidos se observa, en mayor o menor grado, la formación de cuerpos de inclusión a partir de 36-48 hs post-infección. Los viriones comienzan a ocluirse desde uno de sus extremos, hasta quedar formados los gránulos (Figuras 5 a y b). Excepcionalmente, dos o más viriones pueden ser incluídos en un mismo gránulo (FALCON Y HESS, 1985; Vargas OSUNA *et al.*, 1994; SINGARAVELU Y RAMAKRISHNAN, 1998) considerándose tales cuerpos de inclusión como formas aberrantes debido a que se presentan en mínima proporción respecto a los que poseen un sólo virión.

Durante el proceso de infección, tal como sucede en NPVs, se producen cambios metabólicos en las larvas infectadas. Estos cambios derivan en un retraso en el desarrollo larval, aumento de peso larval, expansión de la vida de la larva e inhibición de la ecdisis o muda. La presencia de genes auxiliares tales como el gen *egt*, ha sido detectado en el genoma de *Cydia pomonella* GV (LUQUE *et al.*, 1999), *Lacanobia oleracea* GV (SMITH Y GOODALE, 1998) y *Epinotia aporema* GV (MANZÁN *et al.*, 1999), mientras no se detectó homología hacia dicho gen en otros GVs como el de *Xestia c-nigrum* (HAYAKAWA *et al.*, 1999).

Por otra parte, tanto los productos génicos codificados por los genes *cathepsina* y *quitinasa* (KANG *et al.*, 1998) estarían involucrados en la lisis celular y ruptura del tegumento de las larvas infectadas con CpGV, y posiblemente en el resto de los granulovirus de tipo II.

4. Conclusiones

Los estudios relacionados con la biología y patogénesis de baculovirus han experimentado en las últimas décadas un gran avance y han brindado información que permite un mayor conocimiento de la interacción huésped-patógeno, contribu-

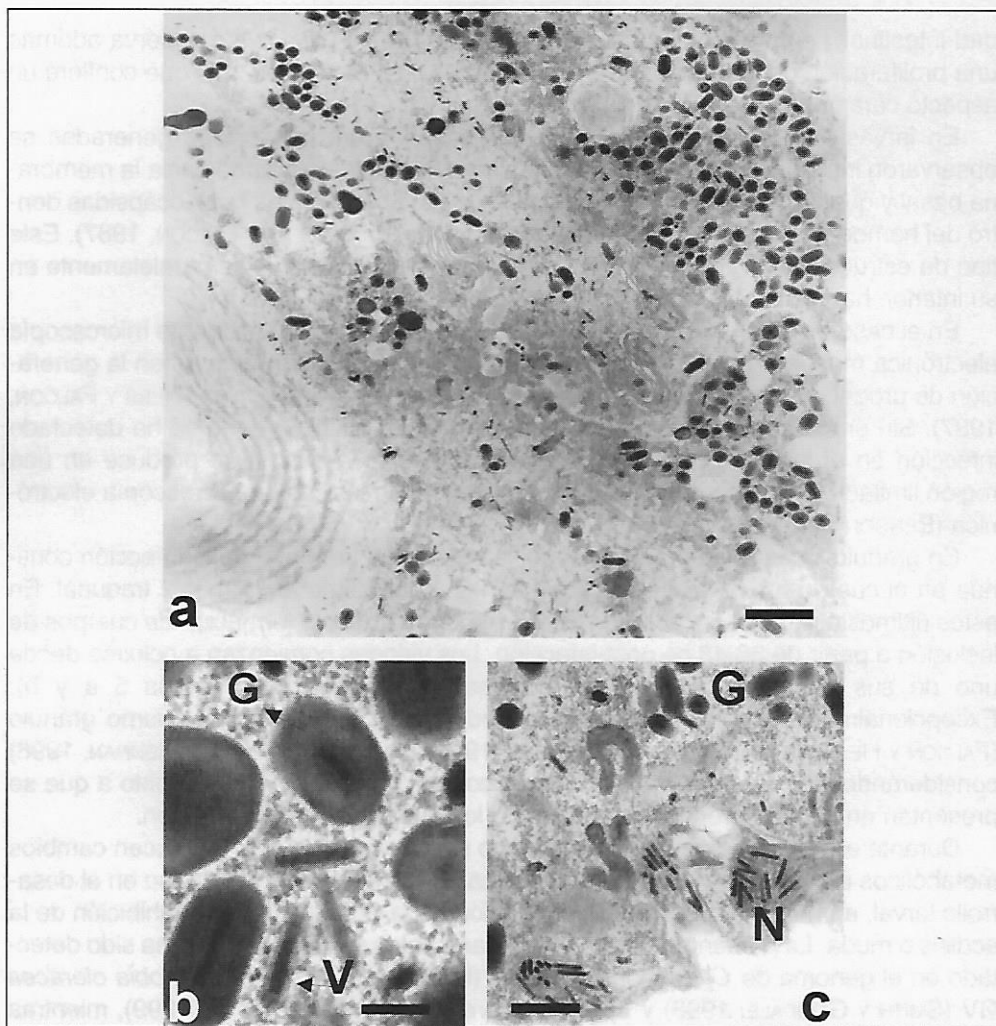


Figura 5. Micrografías electrónicas de GV. (a) Célula de cuerpo graso infectada por un granulovirus, en donde se observan los cuerpos de inclusión dentro de una mezcla de contenidos nucleares y citoplasmáticos. (b) Morfogénesis de los cuerpos de inclusión (G); como es característico, los viriones (V) se incluyen a partir de uno de sus extremos. (c) Nucleocápsidas (N) alineadas en forma paralela dentro de estructuras de tipo vesicular. (Barra = 2,5 μ m en (a); 200 nm en (b); 1 nm en (c)).

yendo al diseño de estrategias de mejora genética de estos virus con el fin de lograr el aumento de su eficacia natural. Sin embargo, aún quedan por dilucidar ciertos aspectos y es de esperar que en un futuro inmediato y mediante la disponibilidad de las nuevas técnicas en biotecnología se avance aún más en el conocimiento de estos virus.

Los estudios sobre el proceso de infección a nivel citológico e histopatológico, los efectos de la infección sobre el desarrollo y crecimiento de los insectos, análisis refinados sobre posible espectro de huéspedes, los mecanismos de transmisión y los de resistencia a la enfermedad son todos aspectos relacionados íntimamente. Su comprensión y conocimiento son indispensables para el desarrollo y manejo de baculovirus recombinantes mejorados, así como para la evaluación de los posibles riesgos ambientales.

La mayor parte de los conocimientos relacionados con la patogénesis de baculovirus y sus bases moleculares han sido obtenidos en estudios realizados sobre los NPVs de *Autographa californica*, *Lymantria dispar*, *Bombix mori*, *Orgyia pseudotsugata* y *Spodoptera exigua*. Es por ello que aún restan por definir los procesos patogénicos en una serie de especies de baculovirus que hasta el presente han sido poco estudiados, a pesar de su importancia en el control biológico de plagas y de su potencial genético aún no determinado.

Esto asegura la continuidad de estudios futuros relacionados con la biología y patogénesis viral, tanto en NPVs de lepidópteros como también y con mayor énfasis en aquellos baculovirus como los GV's y NPVs de especies de diferentes órdenes en los que no se conoce en detalle el ciclo biológico y los factores determinantes relacionados con su patogénesis, el paso de célula en célula, las bases moleculares del tropismo de la infección y otros tantos interrogantes aún no resueltos.

5. Bibliografía

- ADAMS, J.R., R.H. GOODWIN Y T.A. WILCOX. 1977. *Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses in vivo and in vitro*. Biol. Cell. 28:261-268.
- BARRETT, J.W., A.J. BROWNRIGHT, M.J. PRIMAVERA Y S.R. PALLI. 1998. *Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the Green Fluorescent Protein as a reporter*. J. Virol. 72:3377-3382.
- BEGON, M., K. HADI DAUD, P. YOUNG Y R. HOWELLS. 1993. *The invasion and replication of a granulosis virus in the indian meal moth, Plodia interpunctella: An electron microscope study*. J. Invertebr. Pathol. 61:281-295.
- BLISSARD, G.W. 1996. *Baculovirus-cell interactions*. Cytotechnol. 20:73-93.
- BLISSARD, G.W. Y G.F. ROHRMANN. 1989. *Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the Orgyia pseudotsugata Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus*. Virology 170:537-555.
- BLISSARD, G.W. Y G.F. ROHRMANN. 1990. *Baculovirus diversity and molecular biology*. Annu. Rev. Entomol. 35:127-155.
- BLISSARD, G.W. Y G.F. ROHRMANN. 1992. *Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH dependent membrane fusion*. J. Virology 66:6829-6835.
- BRAUNAGEL, S.C., D.M. ELTON, H. MA Y M. SUMMERS. 1996. *Identification and analy-*

- sis of an Autographa californica nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. Virology* **217**:97-110.
- BRUCE, L.D., D.V. LIGHTNER, R.M. REDMAN Y K.C. STUCJ. 1994. *Comparison of traditional and molecular detection methods for Baculovirus penaei infection in larval Penaeus vannamei*. J. Aquat. Anim. Health **6**:355-359.
- CABALLERO, P., E. VARGAS OSUNA Y C. SANTIAGO-ÁLVAREZ. 1990. *Development of Apanteles telegai (Hym., Braconidae) and Campoletis annulata (Hym., Ichneumonidae) in granulosis virus (GV) infected Agrotis segetum (Lep., Noctuidae) larvae*. J. Appl. Entomol. **10**:358-364.
- CABALLERO, P., E. VARGAS OSUNA Y C. SANTIAGO-ÁLVAREZ. 1991. *Parasitization of granulosis virus infected and noninfected Agrotis segetum larvae and virus transmission by three hymenopteran parasitoids*. Entomol. Exp. Appl. **58**:55-60.
- CHALTON, C.A. Y L.E. VOLKMAN. 1991. *Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected Spodoptera frugiperda cells*. J. Virol. **65**:1219-1227.
- CHALTON, C.A. Y L.E. VOLKMAN. 1993. *Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf-21 cells induces actin cable formation*. Virology **197**:245-254.
- CORSARO, B.G., M. GIJZEN, P. WANG Y R.R. GRANADOS. 1993. *Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis*, p. 127-145. En: N.E. Beckage, S.N. Thompson y B.A. Federici (ed.), Parasites and Pathogens of Insects, Vol.2. Academic Press, San Diego.
- COUCH, J.A. 1991. Baculoviridae, p. 205-226. En J.R. Adams y J.R. Bonami (ed.), Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Boca Raton, FL.
- CROOK, N.E. 1991. *Granulosis viruses*, p. 73-110. En E. Kurstak (ed.), Viruses of Invertebrates, Marcel Dekker, N.Y.
- CUNNINGHAM, J.C. Y P.F. ENTWISTLE. 1981. *Control of sawflies by baculovirus*, p. 379-408. En H.D. Burges (ed.), Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London.
- Derksen, A.C.G. y R.R. Granados. 1988. *Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection*. Virology **167**:242-250.
- DOUGHERTY, E.M, T.J. KELLY, R. ROCHFORD, J.A. FORNEY Y J.R. ADAMS. 1987. *Effects of infection with a granulosis virus on larval growth, development and ecdysteroid production in the cabbage looper, Trichoplusia ni*. Physiol. Entomol. **12**:23-30.
- ENGELHARD, E.K., N.W. KAM-MORGAN, J.O. WASBURN Y L.E. VOLKMAN. 1994. *The insect tracheal system: A conduit for the systematic spread of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**:3224-3227.
- FALCON, L.A. Y R.T. HESS. 1985. *Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth, Cydia pomonella*. J. Invertebr. Pathol. **45**:245-252.
- FEDERICI, B.A. 1993. *Viral pathobiology in relation to insect control*, p.81-101. En: N.E. Beckage, S.N. Thompson y B.A. Federici (ed.), Parasites and Pathogens of Insects, Vol.2. Academic Press, San Diego.

- FEDERICI, B.A. 1997. *Baculovirus pathogenesis*, p. 33-59. En: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, N.Y.
- FEDERICI, B. A. Y R. E. LOWE. 1972. *Studies on the pathology of a baculovirus in Aedes triseriatus*. J. Invertebr. Pathol. **20**:14-17.
- FEDERICI, B. A. Y V.M. STERN. 1990. *Replication and occlusion of a granulosis virus in larval and adult midgut epithelium of the western grapeleaf skeletonizer, Harrisinia brillians*. J. Invertebr. Pathol. **56**:401-414
- FLIPSEN, J.T.M., J.W.M. VAN LENT, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1993. *Expression of the polyhedrin and p10 in the midgut of AcMNPV-infected Spodoptera exigua larva: an immunoelectron microscopic investigation*. J. Invertebr. Pathol. **61**:17-23.
- FLIPSEN, J.T.M., J.W. MARTENS, M.M. VAN OERS, J.M. VLAK Y J.W.N. VAN LENT. 1995. *Passage of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of Spodoptera exigua larvae*. Virology **208**:328-335.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1991. *Selection for an increased rate of vertical transmission of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus*. Environ. Entomol. **20**:603-609.
- GRANADOS, R.R. 1978. *Early events in the infection of Heliothis zea midgut cells by a baculovirus*. Virology **90**:170-174.
- GRANADOS, R.R. Y K.A. LAWLER. 1981. *In vivo pathway of Autographa californica baculovirus invasion and infection*. Virology **108**:297-308.
- GRANADOS, R.R. Y K.A. WILLIAMS. 1986. *In Vivo Replication of Baculoviruses*, p. 89-108. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. I. C.R.C. Press, Boca Raton Fl.
- HAMMER, H.S., K.C. STACK Y R.M. OVERSTREET. 1998. *Infectivity and pathogenicity of Baculovirus penaei (BP) in cultured larval and postlarval pacific white shrimp, Penaeus vannamei, related to the stage of viral development*. J. Invertebr. Pathol. **72**:38-43.
- HAWTIN, R.E., K. ARNOLD, M.D. AYRES, P.M. DE A. ZANOTTO, S.C. HOWARD, G.W. GOODAY, L.H. CHAPPELL, P.A. KITTS, L.A., KING Y R.D. POSSEE. 1995. *Identification and preliminary characterization of the chitinase gene in the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome*. Virology **212**:673-685.
- HAYAKAWA, T., R. KO, K. OKANO, S. SEONG, C. GOTO Y S. MAEDA. 1999. *Sequence analysis of the Xestia c-nigrum granulovirus genome*. Virology **262**:277-297.
- HESS, R.T. Y L.A. FALCON. 1987. *Temporal events in the invasion of the codling moth, Cydia pomonella, by a granulosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **50**:85-105.
- HORTON, H.M. Y J.P. BURAND. 1993. *Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion*. J. Virol. **67**:1860-1868.
- HUBER, J. 1986. *Use of baculoviruses in pest management programs*, p. 181-202. En: R R.Granados and B.A. Federici (ed.), *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. C.R.C. Press, Boca Raton Fl.
- KANG, W., M. TRISTEM, S. MAEDA, N.E. CROOK Y D.R. O'REILLY. 1998. *Identification and characterization of the Cydia pomonella granulovirus cathepsin and chitinase genes*. J. Gen. Virol. **79**:2283-2292.

- KEDDIE, B.A., G.W. APONTE Y L.E. VOLKMAN. 1989. *The pathway of infection of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in an insect host*. Science **243**:1728-1730.
- KIRKPATRICK, B.A., J.O. WASHBURN, E.K. ENGELHARD Y L.E. VOLKMAN. 1994. *Primary infection of insect tracheae by Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus*. Virology **203**:184-186.
- KUKAN, B. 1999. *Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects*. J. Invertebr. Pathol. **74**:103-111.
- LANIER, L.M., J.M. SLACK Y L.E. VOLKMAN. 1996. *Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: The role of virion-associated V-cath*. Virology **216**:380-388.
- LEPORE, L.S., P.R. ROELVINK Y R.R. GRANADOS. 1996. *Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates NPV infections, is a metalloprotease*. J. Invertebr. Pathol. **68**:131-140.
- LUQUE, T., R. FINCH, D. WINSTANLEY Y D.R. O'REILLY. 1999. *Determination of the complete CpGV genome sequence*. Abstracts XXXII Meeting of the Soc. Invert. Pathol., Irvine, 22 al 27 de Agosto, p. 55.
- MANZÁN, M.A., M.E. LOZANO, P.D. GHIRINGHELLI, A. SCIOTTO-CAP, Y V. ROMANOWSKI. 1999. *Molecular cloning of the Epinotia aporema granulovirus genome and identification of the egt gene*. Abstracts XXXII Meeting of the Soc. Invert. Pathol., Irvine, 22 al 27 de Agosto, p. 57.
- MILLER, L.K. 1996. *Insect viruses*, p.533-556. En: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. Fields Virology, Third Edition. Lippincott-Ravens, Publishers, Philadelphia.
- MILLER, L.K., M.J. ADANG Y D. BROWNE. 1983. *Protein kinase activity associated with the extracellular and occluded forms of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **46**:275-278.
- MONSMA, S.A., A.G.P. OOMENS Y G.W. BLISSARD. 1996. *The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell to cell transmission of infection*. J. Virol. **70**:4607-4616.
- NAGATA, M. Y Y. TANADA. 1983. *Origin of an alkaline protease associated with the capsule of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Haworth)*. Archives of Virology **76**:245-256.
- O'REILLY, D.R. 1997. *Auxiliary genes of Baculoviruses*, p. 267-300. En: L.K. Miller (ed.), The Baculoviruses, Plenum Press, N.Y.
- O'REILLY, D.R. Y L.K. MILLER. 1989. *A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*. Science **245**:1110- 1112.
- RUSSEL, R.L. Y G.F. ROHRMANN. 1993. *A 25 KDA PROTEIN IS ASSOCIATED WITH THE ENVELOPES OF OCCLUDED BACULOVIRUS VIRIONS*. Virology **195**:532-540.
- SINGARAVELU, B. Y N. RAMAKRISHNAN. 1998. *Characterization of a granulosis virus from the castor semilooper, Achaea janata L.* J. Invertebr. Pathol. **71**:227-235.
- SMITH, I. Y C. GOODALE. 1998. *Sequence and in vivo transcription of Lacanobia oleacea granulovirus*. J. Gen. Virol. **79**:405-403.
- SMITH, P.H. Y J.M. VLAK. 1988. *Biological activity of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus against S. exigua larvae*. J. Invertebr. Pathol. **51**:107-114.

- STUCK, K.C. Y S.Y. WANG. 1996. *Establishment and persistence of Baculovirus penaei infections in cultured Pacific White Shrimp, Penaeus vannamei*. J. Invertebr. Pathol. **68**:59-64.
- SUMMERS, M.D. 1971. *Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of Trichoplusia ni*. J. Ultrastruct. Res. **35**:606-625.
- TANADA, Y. Y R.T. HESS. 1991. *Baculoviridae. Granulosis viruses*, p. 227-257. En: J.R. Adams and J. Bonami (ed.), *Atlas of Invertebrate Viruses*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- TANADA, Y. Y H.K. KAYA. 1993. *DNA viral infection: Baculoviridae*, p. 171-244. En: Y. Tanada y H.K. Kaya (ed.), *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.
- TANADA, Y. Y R. LEUTENEGER. 1968. *Histopathology of a granulosis virus disease of the codling moth, Carpocapsa pomonella*. J. Invertebr. Pathol. **10**:39-42.
- THEILMANN, D.A., J.K. CHANTLER, S. STEWART, H.T. FLIPSEN, J.M. VLAK Y N.E. CROOK. 1996. *Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions*. Virology **218**:148-158.
- TWEETEN, K.A., L.A. BULLA Y R.A. CONSIGLI. 1981. *Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses*. Microbiol. Rev. **45**:379-407.
- VAN OERS, M.M., J.T.M. FLIPSEN, C.B.E. REUSKEN, E.L. SLIWINSKY, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1993. *Functional domains of the p10 protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Gen. Virol. **74**:563-574.
- VARGAS OSUNA, E., H.K. ALDEBIS, P. CABALLERO, J. LIPA Y C. SANTIAGO-ALVAREZ. 1994. *A newly described baculovirus (Subgroup B) from Ocnogyna baetica (Rambur) (Lepidoptera: Arctiidae) in Southern Spain*. J. Invertebr. Pathol. **63**:31-36.
- VLAK, J.M., F.A. KLINKENBERG, K.J.M. ZAAL, M. USMANY, E.C. KLINGE-ROODE, J.B.F. GEERVLIT, J. ROOSIEN Y J.W.M. VAN LENT. 1988. *Functional studies on the p10 gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10—galactosidase fusion gene*. J. Gen. Virol. **69**:765-776.
- VOLKMAN, L.E. 1997. *Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect host*. Adv. Virus Res., Vol. **48**:313-347.
- VOLKMAN, L.E. Y P.A. GOLDSMITH. 1984. *Budded Autographa californica NPV 64K protein: further biochemical analysis and effects of postimmunoprecipitation sample preparation conditions*. Virology **139**:295-302.
- VOLKMAN, L.E. Y P.A. GOLDSMITH. 1985. *Mechanism of neutralization of budded Autographa californica NPV by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis*. Virology **143**:185-195.
- VOLKMAN, L.E., P.A. GOLDSMITH, R.T. HESS Y P. FAULKNER. 1984. *Neutralization of budded Autographa californica NPV by a monoclonal antibody: Identification of the target antigen*. Virology **133**:354-362.
- VOLKMAN, L.E. Y D.L. KNUDSON. 1986. *In Vitro Replication of Baculovirus*, p. 109-128. En: R.R. Granados and B.A. Federici (ed.), *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. C.R.C. Press, Boca Raton FL.
- VOLKMAN, L.E. Y K.J.M. ZAAL. 1990. *Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus: Microtubules and replication*. Virology **175**:292-302.

- VOLKMAN, L.E., G.W. BLISSARD, P. FRIESEN, B.A. KEDDIE, R. POSSEE Y D.A. THEILMANN. 1995. *Family Baculoviridae*, p 104-113. En F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, and M.D. Summers (ed.), *Virus Taxonomy* Springer-Verlag, New York.
- WALKER, S., C.Y. KAWANISHI Y J.J. HAMM. 1982. *Cellular pathology of a granulosis virus infection*. J. Ultrastruct. Res. **80**:163-177.
- WANG, P., D.A. HAMMER Y R.R. GRANADOS. 1994. *Interaction of Trichoplusia ni granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects*. J. Gen. Virol. **66**:541-550.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1997. *An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:6977-6982.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1998. *Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval Trichoplusia ni and its role in limiting baculovirus infection*. J. Invertebr. Pathol. **72**:57-62.
- WASHBURN, J.O., B.A. KIRKPATRICK Y L.E. VOLKMAN. 1995. *Comparative pathogenesis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in larvae of Trichoplusia ni and Heliothis virescens*. Virology **209**:561-568.
- WILLIAMS, G.V., D.Z. ROHEL, J. KUZIO Y P. FAULKNER. 1989. *A cytopathological investigation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants*. J. Gen. Virol. **70**:187-202.
- WILLIAMS, G.W. Y P. FAULKNER. 1996. *Replication patterns and cytopathology of cells infected with baculoviruses*. Cytotechnology **20**:95-110.
- WILLIAMS, G.W. Y P. FAULKNER. 1997. *Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection*, p. 61-107. En: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses* Plenum Press, N.Y.
- WINSTANLEY, D. Y N.E. CROOK. 1993. *Replication of Cydia pomonella granulosis virus in cell cultures*. J. Gen. Virol. **74**:1599-1609.
- WOOD, H.A. 1980. *Protease degradation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus proteins*. Virology **103**:392-399.
- ZUMMER, M. Y P. FAULKNER. 1979. *Absence of protease in baculovirus polyhedral bodies propagated in vitro*. J. Invertebr. Pathol. **33**:383-384.