medigraphic Artemisa

Revista Latinoamericana de MICROBIOLOGÍA
ALAM
Vol. 48, No. 1
January - March. 2006
pp. 31 - 43

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Estrategias co-evolutivas de la interacción entre parasitoides y polidnavirus

Mario A. Rodríguez-Pérez,* Nancy E. Beckage**

RESUMEN El polidnavirus es material genético en simbiosis con las avispas endoparasitoides del orden himenóptera, particularmente de las familias Icneumonidae (icnovirus) y Braconidae (bracovirus). Los polidnavirus se encuentran en estado de pro-virus integrados en el genoma cromosómico de las avispas y de ahí se escinden para posteriormente replicarse cuando la avispa está en desarrollo hacia el estado adulto. Durante la oviposición, las partículas virales, ya bien formadas, son depositadas junto con los huevos de la avispa parasitoide dentro del insecto huésped de donde nacen larvas que se desarrollan. La principal función de los polidnavirus es suprimir el sistema inmune del insecto huésped, por consecuencia, las células de defensa (o hemocitos) no pueden encapsular los huevos o larvas del parasitoide. Las proteínas o ARN de los polidnavirus se producen una vez que ocurre la parasitosis alterando las propiedades de adhesión de los hemocitos y, por tanto, no encapsulan al parasitoide; en algunas especies, los productos génicos conducen al proceso de apoptosis de los hemocitos del insecto huésped y, por tanto, su sistema inmune queda deprimido. Este artículo revisa las principales características de los polidnavirus ofreciendo una perspectiva general de su función dentro del lepidóptero hospedador de la avispa parasitoide la cual contiene los polidnavirus integrados en su genoma o en forma libre para regular la fisiología del insecto huésped una vez que es parasitado.

Palabras clave: Bracovirus, icnovirus, simbiosis, supresión inmune de hospederos, apoptosis en hemocitos, expresión génica de virus, co-evolución huésped-parásito.

ABSTRACT. Polydnaviruses are genetic symbionts of wasp endoparasitoids belonging to the hymenopteran families Ichneumonidae (ichnoviruses) and Braconidae (bracoviruses). They exist as proviruses integrated in the wasp's chromosomal genome, which then excise and undergo replication during the stage of adult development of the wasp. During wasp oviposition into their caterpillar host, the fully formed virus particles are injected along the parasitoid's eggs into the host hemocoel, where the eggs hatch and undergo larval development. The primary function of the polydnavirus is to trigger host immunosuppression so that host hemocytes are prevented from encapsulating the parasitoid's eggs and/or larvae. Polydnavirus transcripts are expressed following parasitization and alter host hemocyte adhesive properties that prevents encapsulation; in some species, viral gene expression triggers host hemocyte apoptosis, thereby rendering the host immunosuppressed. This review summarizes the major features of polydnaviruses and provides a global view of their functions in the lepidopteran hosts of the parasitoid wasps that carry them both as integrated viral sequences in their genome and as free virus to function physiologically in host regulation following parasitization of the host.

Key words: Bracovirus, ichnovirus, symbiont, host immunosuppression, hemocyte apoptosis, viral gene expression, host-parasite co-evolution.

INTRODUCCIÓN

Las avispas, cuyo tamaño promedio es de 3 mm, parasitan y se desarrollan dentro de otros insectos, a los cuales les producen su muerte. Estas avispas son diferentes a otros tipos de parásitos que debilitan a su hospedador o huésped pero no lo matan. Debido a esta característica, estas avispas son consideradas como parasitoides.[40] Las especies de parasitoides que pertenecen a las familias Braconidae e Icneumonidae, del orden himenóptera, contienen polidnavirus (PDV) que inoculan, en grandes cantidades, dentro de su insecto huésped en el momento de la oviposición.

En 1965, George Salt, un entomólogo de la Universidad de Cambridge, observó que al larvar los huevos del parasitoide *Nemeritis canescens* de la familia Icneumonidae provocaba que éstos fueran encapsulados y eliminados por las células de defensa de la oruga huésped, *Ephestia kuhniella*. Por el contrario, los huevos que no eran larvados escapaban del ataque de defensa de la oruga.[63] Posteriormente, se encontró que el material depositado sobre los huevos consistía de partículas virales.[61] Las investigaciones siguientes tuvieron como objetivo determinar la función de genes virales, particularmente su efecto sobre el sistema inmune del insecto huésped.

La mayoría de las especies de parasitoides de otros insectos, generalmente de moscas y palomillas, contienen partículas virales. Las partículas virales del tipo PDV (término derivado de virus con ADN polidisperso) son únicas entre los virus simbiontes[72,75,97-99] debido a que su secuencia de ADN está integrada dentro del genoma del parasitoide.[12,30-32,46,65,84,86-88]

Existe una extensa variedad y número de especies de parasitoides. Más de 30,000 especies de parasitoides contienen PDV y, por lo general, parasitan la fase de larva del insecto. Los parasitoides que contienen PDV no parasitan

* Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.
** Departments of Entomology and Cell Biology and Neuroscience. Riverside, CA 92521, EE.UU. University of California-Riverside.

Received ; received in revised form; accepted

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

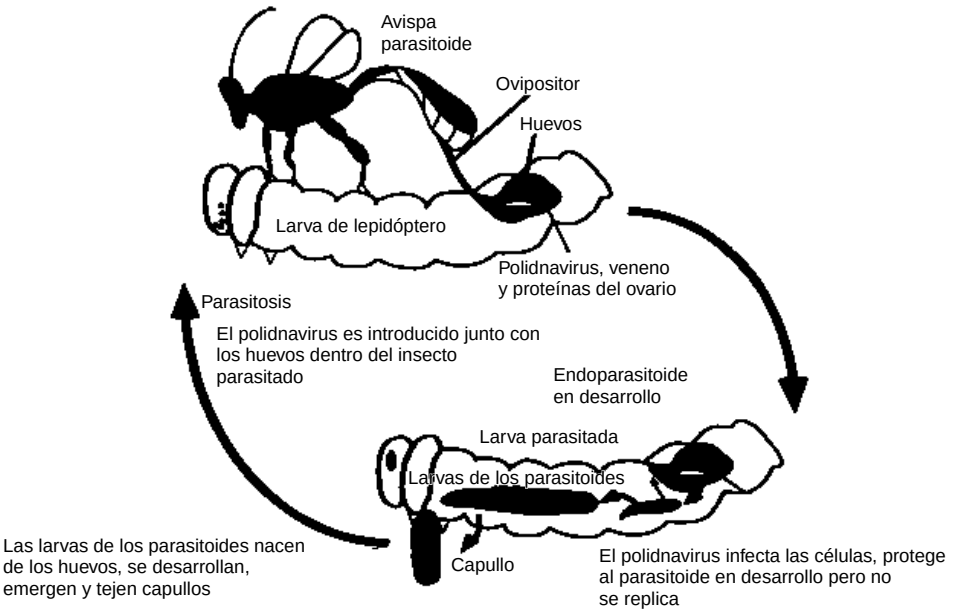

Figura 1. *Ciclo de vida del parasitoide. El parasitoide deposita huevos, polidnavirus, veneno, partículas virales y proteínas del aparato reproductor dentro del insecto huésped. De los huevos nacen larvas que pasan por varios estadios y emergen del insecto, tejiendo capullos que culminan en avispas adultas, y el insecto huésped muere. Reproducción de Webb (1998) con permiso de la Editorial Plenum, Nueva York (A Division of Plenum Publishing Corporation).*[93]

la fase de pupa del insecto.[30] Existen parasitoides que ovipositan en la fase de huevo del insecto, como el caso de las especies de la familia Trichogrammatidae, pero éstos no contienen PDV. La excepción son algunos parasitoides con PDV de huevo-larva (por ejemplo *Chelonus inanitus* de *Spodoptera littoralis*)[101] que ovipositan en la fase de huevo del insecto huésped pero completan su desarrollo en la fase de larva del mismo. La biología de los PDV es interesante desde el punto de vista evolutivo, debido a su íntima asociación genética con las avispas que los contienen.[12,22,29,44,46,88,99] En este artículo de revisión describiremos el papel que desempeñan los PDV y la interacción del parasitoide con el insecto huésped, subrayando la función de los PDV, como agentes inmunodepresores.

Figura 2. *Larva de 2º y 3er estadio de* Cotesia congregata *obtenidas de larvas maduras de* Manduca sexta*. La vesícula anal como globo está en el extremo caudal del parasitoide y se observa una segunda cutícula que envuelve la vesícula anal. La cutícula de la exhubia se desprende durante la emergencia. Fotografía: Frances Tan.*

ASOCIACIÓN DEL PARASITOIDE Y EL POLIDNAVIRUS

La asociación del PDV con el parasitoide se ilustra en la Figura 1 que muestra una larva del gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*), un insecto huésped del parasitoide *Cotesia congregata* (familia Braconidae). El proceso de replicación del PDV se lleva a cabo únicamente en el ovario de la avispa. En el momento en que el parasitoide emerge del huésped como larva de tercer estadio (Fig. 2), ésta contiene muchos viriones (nombre que recibe el estado infeccioso del polidnavirus) en las células del cáliz del ovario. El cáliz es la región en forma de cuello entre el ovario y el conducto del ovario u oviducto (Fig. 3). Los núcleos de las células del cáliz contienen los viriones en replicación como se muestra en la Figura 4a. Los núcleos de las células del cáliz de *C. congregata* están llenos de viriones. La célula se rompe y los viriones son liberados en el lumen (Fig. 4b). Como consecuencia, el fluido del cáliz se llena de viriones. El mecanismo de replicación del virus no se conoce bien, pero se requiere como molde, el cromosoma de la célula del cáliz del parasitoide de donde se escinde el genoma del PDV.[36,46,64]

Una vez que los viriones del PDV se han formado en las células del cáliz del ovario, éstos se depositan sobre el corión o cubierta de los huevos del parasitoide. La producción de viriones es continua. Los huevos con viriones se almacenan en el aparato reproductor de la avispa y salen junto con las proteínas del fluido del cáliz en

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

el momento de la ovoposición. El fluido del cáliz contiene proteínas que son secreciones de las células epiteliales que revisten el ovario. Algunas de estas proteínas tienen función fisiológica en el desarrollo del parasitoide. Estas proteínas protegen a los huevos del ataque del sistema inmune del insecto huésped y previenen la encapsulación del parasitoide.[53,93,95]

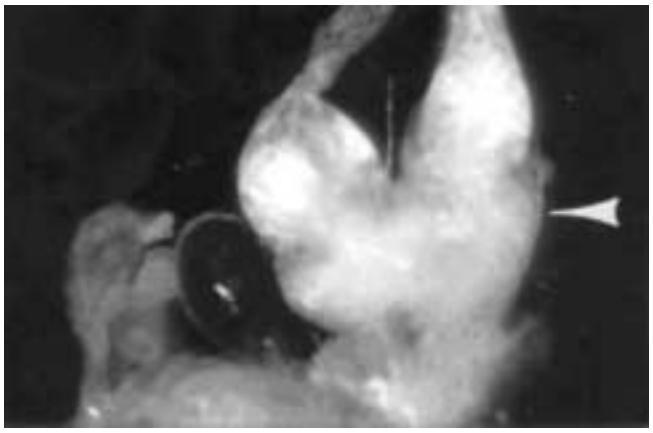

Figura 3. *Aparato reproductor de* Cotesia congregata*. El par de ovarios está en la parte derecha y el cáliz (señalado con flecha) está arriba del oviducto común que conduce al ovipositor. La glándula de veneno en forma de globo está en la parte izquierda. Reproducción de Beckage y colaboradores,[9] con permiso de Alan R. Liss. Fotografía: Frances Tan.*

Las proteínas del fluido del cáliz protegen, al igual que los PDV, a los huevos del parasitoide. La función es suprimir la respuesta inmune del insecto parasitado y prevenir la encapsulación de los huevos por las células de defensa o hemocitos.[50,80] Después que los huevos son depositados dentro de una larva huésped, se puede observar un gran número de viriones del PDV invadiendo los tejidos del huésped, incluyendo el cuerpo graso (Fig. 5)[15] y penetrando en los hemocitos que se encuentran en circulación en la hemolinfa.[50,78,81]

El PDV perdura en el insecto huésped con el parasitoide durante la parasitosis.[37,51,82] Durante la parasitosis, se modula la expresión de proteínas del insecto huésped[66-68] y se promueve la expresión de proteínas codificadas por los genes del PDV (Fig. 6). En varias especies de insectos parasitados se producen proteínas, que están codificadas en el genoma del PDV en la fase inicial de la parasitosis. Estas proteínas pueden ser detectadas en las células de defensa o en la hemolinfa del insecto huésped.[51] El parasitoide puede depositar uno o varios huevos en el huésped, dependiendo de si la especie es de hábito solitario o gregario. El parasitoide *C. congregata* puede depositar, en una sola oviposición, entre 50 y 150 huevos en una sola larva del gusano del cuerno del tabaco. Después de 14 ó 15 días, un número elevado de parasitoides emerge de la larva huésped. Posteriormente, las larvas del parasitoide forman capullos. La replicación del PDV se inicia en la fase de pupa, la fase previa al desarrollo de la avispa adulta. La replicación del virus perdura en la fase adulta de la avispa.

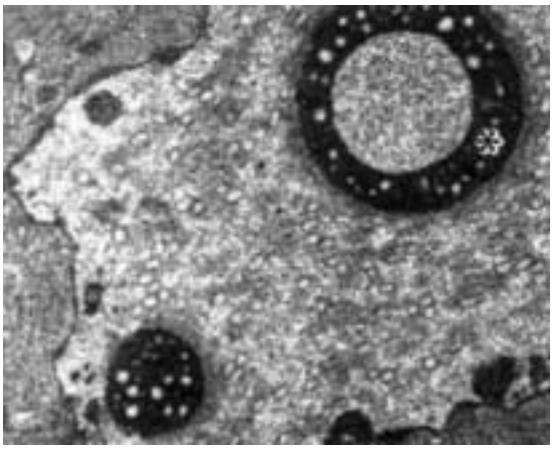

Figura 4A.

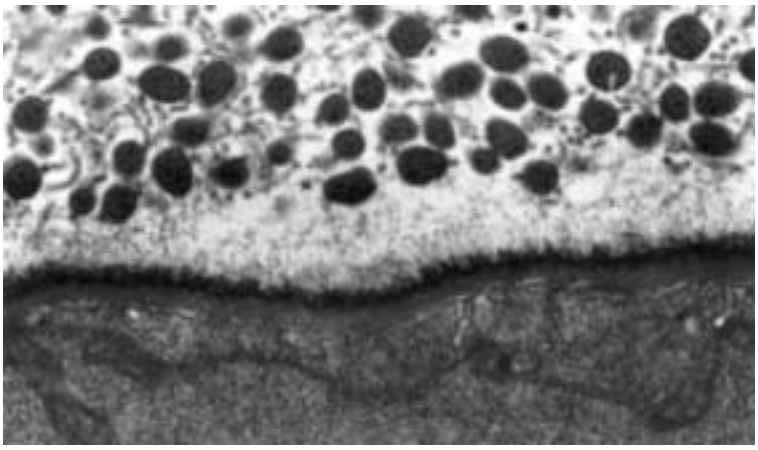

Figura 4B.

Figura 4A. *Núcleo de una célula del cáliz del parasitoide, donde se produce el polidnavirus. La síntesis de la envoltura de las nucleocápsides se puede observar en la periferia del estroma virogénico (asterisco); la nucleocápside (que contiene el ADN viral) está siendo recubierta en el nucleoplasma y termina en forma de virión. Reproducción de De Buron y Beckage,[15] Invertebr. Pathol., con permiso de Harcourt Brace. Fotografía: Isaure de Buron (College of Charleston, Charleston, SC).*

Figura 4B. *Viriones de polidnavirus en el lumen del cáliz (parte superior) y superficie de un huevo de* Cotesia congregata *(Parte inferior). Cada virión contiene de una a 15 nucleocápsides y presenta una cola. Reproducción de De Buron y Beckage,[15] Invertebr. Pathol., con permiso de Harcourt Brace. Fotografía: Isaure de Buron (College of Charleston, Charleston, SC).*

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

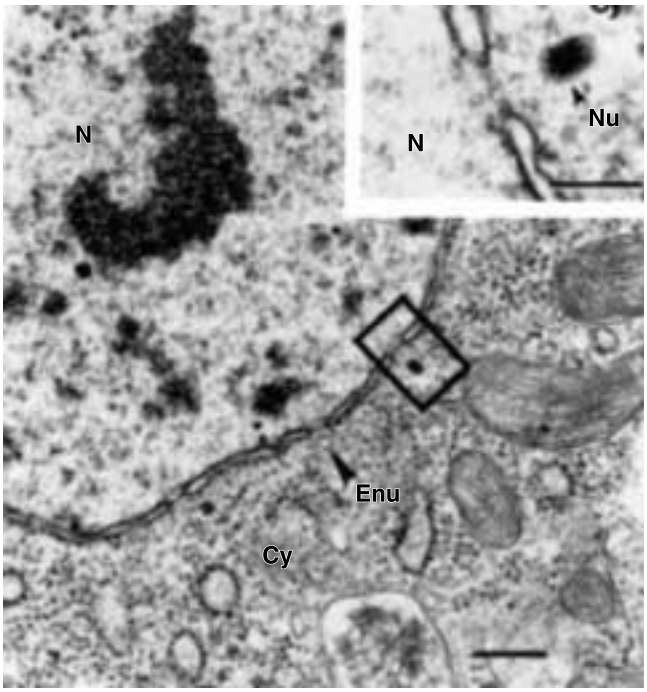

Figura 5. Célula del cuerpo graso de una larva 1.5 horas post-parasitismo que muestra nucleocápsides del polidnavirus enfrente de los poros nucleares de las células blanco (escala de la barra = 250 NM). El cuadro en la parte superior derecha muestra la cabeza de una nucleocápside (señalada con la flecha) enfrente de un poro nuclear (escala de la barra = 100 nm). En el cuadro principal, una nucleocápside vacía está enfrente de un poro nuclear (Enu) y es señalada con una flecha. N, núcleo; Nu, nucleocápside; Cy, citoplasma. Reproducción de De Buron y Beckage[15] con permiso de Academic Press, Inc.

Figura 6. Transcriptoma del polidnavirus obtenido del cuerpo graso de larvas parasitadas (líneas 2-24 horas post-parasitismo y con sólo ADN del polidnavirus [obtenido de 4 avispas]) y el ARN del cuerpo graso de una larva no parasitada. Observe que varios ARNs (aproximadamente 6-8) del polidnavirus son producidos en el cuerpo graso de la larva recién parasitada. Reproducción de Le y colaboradores,[51] con permiso de Elsevier Science Limited Ltd.

Existen dos tipos de PDV que han evolucionado, en forma paralela, con dos familias de parasitoides: el bracovirus de la familia Braconidae y el icnovirus de la familia Icneumonidae.[97-99] Los PDV típicos de la familia Icneumonidae son los del parasitoide de *Hyposoter exigua*[45] y *Campoletis sonorensis*.[30,46,88,89] El fenotipo de cada tipo de polidnavirus presenta cuatro diferencias principales: 1) morfología (la cápside que contiene el ADN viral de los bracovirus es cilíndrica y la de los icnovirus es fusiforme). 2) El número de cápsides de los viriones (los bracovirus presentan varias nucleocápsides por virión y los icnovirus sólo una cápside por virión). 3) El sitio de replicación (los viriones de bracovirus se replican y se ensamblan en el núcleo y los viriones de icnovirus en el citoplasma). 4) Las propiedades de la cubierta del virión (los bracovirus tienen sólo una cubierta y los icnovirus doble cubierta, Figura 7a,b).

La asociación entre el PDV y el parasitoide es evidente. Se ha demostrado, mediante pruebas de hibridación de ADN, que el genoma del PDV está integrado en el genoma de la avispa.[12,31,32,46,72,84,88] Existen genes del PDV en los cromosomas del parasitoide indicando que los PDV forman parte de su genoma. Algunos investigadores señalan que los PDV son simples organelos de los parasitoides.[29]

El genoma del PDV consiste de varios segmentos de ADN circular de doble cadena (Fig. 8).[22,31,72] Cada segmento está en el genoma del PDV, por lo general, en forma superhelicoidal. El ADN está encerrado en cápsides multiproteicas rodeadas por una envoltura (bracovirus) o dos envolturas (icnovirus) de lípidos. En los bracovirus, la envoltura de lípidos de la cápside se adquiere en el estroma virogénico que se forma en los núcleos de las células del cáliz.[46,88] Por el contrario, otros virus presentan un genoma no segmentado compuesto por una cadena simple de ADN o ARN. El genoma del PDV contiene familias de genes. No se conoce cuánto ADN (o genes) del PDV está contenido en cada nucleocápside. Si cada nucleocápside contiene todos los segmentos de ADN o sólo una porción específica (programada o por azar) de cada segmento.

Debido a que el genoma del PDV está integrado en el genoma de la avispa, existe la hipótesis de que el PDV es una estrategia de ésta, para la entrega de genes del parasitoide al insecto huésped. Una vez que el parasitoide parasita a su huésped, los viriones infectan las células y se transfieren los genes que codifican proteínas que se producen, en algunos casos de manera simultánea, en varios tejidos del insecto huésped.

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

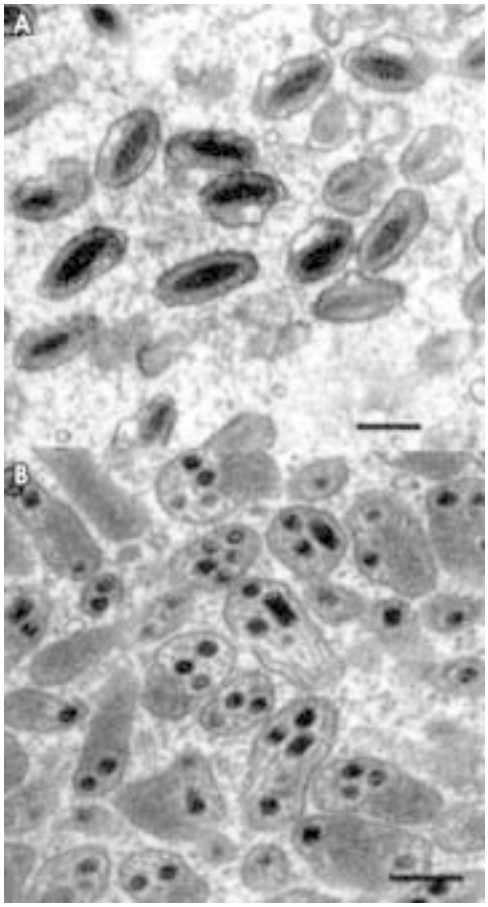

***Figura 7 A y B**. Viriones del polidnavirus. A. icnovirus. B. bracovirus. Los viriones de los icnovirus se asemejan a los viriones de ascovirus y los viriones de bracovirus se asemejan a los viriones de nudivirus y baculovirus. Barras = 200 nm. Reproducción de Federici y Bigot[29] con permiso de Elsevier Science Limited Ltd. Microfotografía: D.B. Stoltz.*

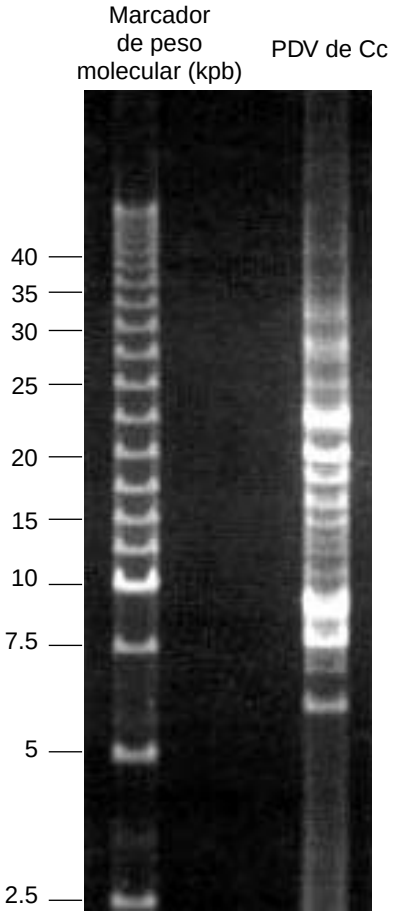

***Figura 8.** Genoma del polidnavirus de* Cotesia congregata*. El ADN viral (0.5 µg), obtenido de ovarios de* C. congregata *sin digerir con enzimas y purificado por filtración, fue separado en un gel por electroforesis de campo invertido. Se pueden observar 18 diferentes segmentos en el genoma. Reproducción de Drezen y colaboradores[22] con permiso de Elsevier Science Limited Ltd.*

Existen virus de parasitoides, además de los PDV, los parecidos a los baculovirus, los no baculovirus de tipo filamentoso y los poxvirus. Se requiere investigar si el genoma de algún virus en particular (excluyendo los polidnavirus) está contenido en el genoma del parasitoide. La replicación de los PDV se lleva a cabo en las células del cáliz del ovario, mientras que otros virus se replican en el veneno o células de la glándula del veneno. Es probable que en diferentes momentos evolutivos se haya originado la asociación entre el parasitoide y un tipo particular de virus. El sitio de replicación subcelular de los PDV (es decir, en el núcleo [bracovirus] o en el citoplasma [icnovirus]) indica una co-evolución particular.

Esta asociación pudo haberse dado cuando los parasitoides "cosecharon" o aprovecharon los PDV para modular la fisiología de su huésped. El PDV funciona como supresor del sistema inmune del huésped, un proceso que sería equivalente al establecido por los virus que producen el SIDA.[22,29] En presencia de PDV, los hemocitos del insecto huésped son incapaces de envolver a los huevos del parasitoide. Sería interesante conocer el genoma de los PDV y del genoma nuclear de los parasitoides,[46,97-99] para entender esta asociación y, en particular, determinar cuáles secuencias del PDV están integradas en el genoma nuclear del parasitoide.

Las partículas proteicas que se encontraron en la avispa *Venturia* (= *Nemeritis*) *canescens*, fueron las primeras en reportarse en los parasitoides.[61] Estas proteínas están codificadas en el genoma de la avispa y funcionan como virus infectando el corión del huevo del parasitoide durante su paso del ovario al oviducto, produciendo una

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

Figura 9. Insectos de la misma edad, uno no está parasitado (el cual ha formado un capullo) y a los otros dos se les inoculó el polidnavirus. Los dos insectos a los que se les inoculó el polidnavirus murieron en fase de pre-pupa días después de que la fotografía fue tomada. Reproducción de Beckage y colaboradores[9] con permiso de Wiley-Liss, Inc.

"máscara de antígeno" (se imita a una proteína de la membrana basal del insecto huésped) por lo que el huevo no puede ser reconocido por el sistema de defensa del insecto huésped.[27]

EL GENOMA DEL POLIDNAVIRUS, SUS GENES Y PRODUCTOS GÉNICOS

Las investigaciones en desarrollo tienen como objetivo determinar la secuencia de nucleótidos del genoma de los dos tipos de PDV de los parasitoides. Los genes de los PDV se clasifican, de acuerdo a su patrón de expresión, en tres clases (clase I: los que sólo se expresan en el parasitoide; II: sólo se expresan en el insecto parasitado; III: se expresan en los dos tipos de insecto).[46] Los genes de la clase II del icneumónido *Campoletis sonorensis* pueden establecerse en familias de genes: *cys-motif*, de genes *rep*, de genes innexin *(vinnexin)* y de genes *ankyrin (vankyrin)*.[46] La secuenciación del genoma de los icnovirus *Campoletis sonorensis*, *C. chlorideae*, así como de los bracovirus

Tabla 1. Productos génicos del polidnavirus cuya función permite que el parasitoide sobreviva en el insecto huésped.

Producto génico del PDV y especie de parasitoide	Efecto sobre su insecto hospedador o huésped
Proteína homóloga CrV1 de *Cotesia congregata*	La proteína CrV1 regula la función de los hemocitos durante la parasitosis[51]
Proteína rica en cisteína de *Microplitis demolitor*	Los plasmatocitos pierden capacidad para extender filópodos. Esta proteína induce muerte celular ó apoptosis de granulocitos[80,81,83]
Proteína VHv 1.1 de *Campoletis sonorensis*	Esta glicoproteína es endocitada por los hemocitos. La proteína inhibe la respuesta de encapsulamiento[52,70]
Proteína CrV1 de *Cotesia rubecula*	Se produce ARN 4-8 horas después de la parasitosis. La proteína altera el citoesqueleto de actina del hemocito[5]
ARN de 2.0 kpb de *Cotesia kariyai*	Esta "proteína de inmunoevasión" se produce en los hemocitos cuando el sistema inmune se encuentra deprimido entre las dos y 10 horas después de la parasitosis[85,102]
Proteínas Hd Gorf f6 y Hd Gorf P30 de *Hyposoter didmator*	Estas proteínas inhiben la respuesta de encapsulamiento[34]
Proteínas TrIV1, TrIV2 y TrIV4 de *Tranosema rostrale*	Estas proteínas inducen muerte celular o apoptosis de las células del lepidóptero mantenidas *in vitro*[11]
Proteína BV1 de *Toxoneuron nigriceps*	Esta proteína tiene como presunta función, suprimir la respuesta inmune del insecto huésped. Se le ha localizado en las glándulas pro-torácicas, indicando que también puede modular el sistema endocrino y de desarrollo[47]
Proteína CiV12g2, CiV2g1, CiV16.8g1 de *Chelonus inanitus*	Estas proteínas previenen el encapsulamiento del parasitoide. Tienen presunta función en la regulación del desarrollo (detienen el desarrollo) y en mantener la cutícula suave, para que el parasitoide pueda emerger y alimentarse de su huésped[14]

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

Glyptapanteles indiensis, Toxoneuron (Cardiochiles) nigriceps, Microplitis demolitor y de *C. congregata* ha sido finalizada.[20,26] Se han encontrado diferencias en la estructura del genoma de los icnovirus y del genoma de los bracovirus indicando que ambos se originaron en distintos momentos evolutivos.[99]

Las investigaciones en curso, así mismo, estudian el mecanismo de expresión génica del PDV y cómo se produce la disfunción de los hemocitos del insecto huésped. La Tabla 1 muestra un resumen de los productos génicos del PDV cuya función permite que el parasitoide sobreviva con éxito. Strand[78] mostró que el PDV de *M. demolitor* (PDVMd) produce un ARNm de 1.6 kpb, el cual fue identificado por hibridación *in situ* en los hemocitos de insectos parasitados. El ARNm se produce a las dos horas después de la parasitosis y perdura hasta seis días. Strand[83] sugirió que el PDVMd modula la fisiología de los hemocitos. Estos investigadores habían identificado dos clases de ARNm del PDVMd en los hemocitos de larvas recién parasitadas de *Pseudoplusia includens*.[83] Las dos clases de ARNm presentaron un dominio que codifican para proteínas ricas en cisteína. Los investigadores construyeron bibliotecas de ADN complementario a partir del ARNm de los plasmatocitos y granulocitos (los dos tipos de hemocitos con función de defensa) infectados con el PDVMd.

Otros investigadores también han identificado productos génicos (ARN o proteínas) codificados en el genoma del PDV. Hayakaya y colaboradores[42] reportaron que al inocular el PDV de *Cotesia kariyai* en larvas del gusano soldado se detecta ADN viral, 48 horas después de la parasitosis, en hemocitos, cuerpo graso y cordón nervioso. La mayor cantidad de ADN y ARN viral se encuentra en los hemocitos. El PDV detiene el desarrollo de la larva huésped modulando el nivel de expresión de un péptido específico (GBP por sus siglas en inglés).[41] La modulación de la expresión de GBP produce un incremento en el nivel de dopamina que induce un descenso temporal en el nivel de hormona juvenil que circula en la hemolinfa. De esta manera, se modula el sistema neuroendocrino de metamorfosis y, por lo tanto, se suprime el desarrollo de la larva hacia su siguiente estado de pupa.[54] El PDV detiene el desarrollo en varias especies de orugas,[79] incluyendo a *M. sexta*[23] y alteran el sistema inmune del insecto huésped.

Las especies del género *Chelonus*, parasitoides de la fase de huevo-larva del insecto huésped, contienen PDV cuyos genes se traducen en fase tardía (días después de la parasitosis). Las proteínas de estos bracovirus no alteran el sistema inmune del insecto huésped, pero sí interrumpen su desarrollo.[11,101] Por lo tanto, el PDV de los parasitoides *Chelonus* sólo modulan el sistema endocrino.

En larvas de *Heliothis virescens* infectadas con el PDV de *Campoletis sonorensis* se expresa el gen VHv1.1 que codifica una glicoproteína rica en cisteína, la cual se pega, *in vitro* e *in vivo*, a los hemocitos.[13,16,21,33,46,87] Esta glicoproteína, de 34kDa, es ingerida por los hemocitos mediante endocitosis[52] y, es responsable de suprimir la respuesta inmune del insecto huésped. La glicoproteína se produce *in vitro* mediante la construcción de un baculovirus recombinante de poli-histidina que infecta larvas de *H. virescens*.[17,69,70]

En larvas parasitadas de *M. sexta* por *C. congregata*, el PDV induce la muerte celular o apoptosis de los hemocitos. Los signos patológicos en los hemocitos se observan en su morfología y tendencia a agregarse en la hemolinfa. Dos horas después de la parasitosis, son evidentes los agregados de hemocitos y, entre las 24 y 48 horas, existen múltiples agregados de hemocitos muertos o moribundos y sus membranas celulares apenas se aprecian.[48] Con el uso de anticuerpos monoclonales[100] se podría identificar los plasmatocitos y granulocitos que están dentro de los agregados celulares.

Los hemocitos de larvas recién parasitadas de *M. sexta* son incapaces de envolver partículas abióticas como los microcristales tipo Sefadex, la melanización y porcentaje de encapsulación por los hemocitos es más bajo en larvas parasitadas en comparación con lo que ocurre en larvas no parasitadas.[49] Esto indica que el PDV modula los dos mecanismos de respuesta inmune celular. El PDV modula la encapsulación de huevos del parasitoide *Hyposoter fugitivus* y de microcristales en larvas de *Malacosoma disstria*.[74] Las larvas parasitadas por un parasitoide con PDV e inoculadas con células de levadura *(Saccharomyces cerevisiae)* mueren antes de la emergencia del parasitoide. Así mismo, las larvas de *M. sexta* parasitadas mueren si se les inoculan bacterias. Sin embargo, esto no ocurre si la larva no está parasitada.[60] La infección con el baculovirus de *Autographa californica* (AcVPN, virus de la poliedrosis nuclear) se disemina rápidamente en los tejidos de las larvas si además se les inocula el PDV. En la naturaleza, *Heliothis zea* es un huésped refractario al baculovirus AcVPN. Sin embargo, si éste es parasitado por *C. sonorensis*, el insecto se vuelve susceptible al baculovirus.[90] El PDV de *C. congregata* invade los tejidos de larvas de *M. sexta* y, éstas no resisten la infección con el baculovirus AcVPN.[91] El PDV de *Hyposoter exigua* inmunodeprime a *Trichoplusia ni* y se vuelve sensible a otros tipos de virus.[76]

Una vez que las larvas de *M. sexta* son parasitadas, se producen altos niveles de proteínas denominadas "primarias" (el porcentaje de expresión de las proteínas primarias con respecto a la producción total de proteínas en la hemolinfa puede alcanzar el 15%).[6,10] El PDV de *C. sonorensis*, parasitoide de *H. virescens*, induce, de manera específica, una glicoproteína (proteína primaria).[18] Lo mismo ocurre con el PDV de *C. congregata*, parasitoide de *M. sexta*, es

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

decir, induce la producción de proteínas "primarias".[40] Una de estas proteínas está glicosilada, pesa 190 KDa y presenta sub-unidades en el rango de los 33-35 KDa. La síntesis del ARNm, que codifica esta proteína, se inicia en los primeros 30 minutos después de la parasitosis y continúa durante varios días. El cuerpo graso y los hemocitos contienen el ARNm de la proteína. La proteína puede ser detectada en la hemolinfa hasta seis días después de la parasitosis.[39,40] Así mismo, se producen otras dos proteínas que están en el rango de los 30 y 40 KDa,[40] y otros polipéptidos de peso molecular menor a los 20 KDa, los cuales se detectan en la hemolinfa de larvas recién parasitadas. No se conoce si alguna de estas proteínas tiene efecto determinante sobre la respuesta inmune del insecto huésped.

El fenómeno que se observa en larvas de *H. virescens* parasitadas por *C. sonorensis* podría indicar la función de las proteínas "primarias". Los huevos larvados y sin el PDV son encapsulados, inmediatamente, por los hemocitos.[25] Las proteínas del ovario del parasitoide son producidas por las células epiteliales que revisten el aparato reproductor.[53,94,95] Estas proteínas "primarias" protegen al huevo en las primeras horas después de la oviposición. Cuatro horas después, los genes del PDV empiezan a traducirse en proteínas que protegen al parasitoide. Sin embargo, los signos patológicos de los hemocitos se observan en los primeros 90 minutos, antes de que se inicie la traducción de genes del PDV.

Por el contrario, el PDV inhibe la traducción del gen que modula la producción de arilforin (una proteína de almacenaje) en la hemolinfa. Así mismo, el PDV inhibe la síntesis de otras proteínas propias del huésped, como la hormona juvenil en larvas de *H. virescens* parasitadas por *C. sonorensis*.[66-68] El PDV literalmente se apropia de la maquinaria traductora de la célula huésped y, por tanto, produce proteínas del PDV. El PDV "desvía" los recursos que tiene la larva huésped hacia el endo-parasitoide, asegurando su sobrevivencia. La síntesis de proteínas –por ejemplo, las proteínas que se unen al hierro (la transferrina y ferritina) y a la hormona juvenil– continúa a niveles normales, es decir, sin ninguna disminución.[67] No se conoce con exactitud el mecanismo de inhibición específico de la traducción de genes en ciertas proteínas.

En larvas de *Pieris rapae* parasitadas por *Cotesia rubecula*, el PDV regula, de manera temporal, la función de los hemocitos. Los hemocitos pierden capacidad (no existe polimerización del citoesqueleto de actina) para extender filópodos y, por lo tanto, son incapaces de adherirse a un sustrato y/o expandirse para envolver objetos extraños, incluyendo los huevos del parasitoide. Varias horas después, el comportamiento de los hemocitos recupera su condición natural indicando un efecto transitorio. El efecto se induce, posiblemente, por un solo gen del PDV que se traduce en los hemocitos entre las cuatro y ocho horas después de la parasitosis.[3-5,65]

Las larvas parasitadas de *Drosophila melanogaster* con *Leptopilina boulardi* presentan bajo nivel de lamelocitos (principal clase de hemocitos involucrado en el proceso de encapsulación en *Drosophila*).[62] Se presume que la lamelolisina, producto del fluido de la glándula accesoria de la avispa hembra, produce la muerte de los hemocitos.[56] Así mismo, en esta especie se encontraron virus, los cuales pueden causar inmunodepresión del insecto huésped.[57] A bajo nivel de lamelocitos, el proceso de encapsulación se altera y, por tanto, el parasitoide evita ser destruido.

EFECTO DEL POLIDNAVIRUS SOBRE FENOLOXIDASAS

El grado de melanización en la hemolinfa es modulado por el PDV. La ruta de melanización incluye conversión de tirosina a dopamina y, subsecuentemente, de dopamina a dopacrom y a melanina. El proceso de melanización en la hemolinfa de larvas de *M. sexta* parasitadas por *C. congregata* disminuye, de forma significativa, durante la parasitosis. También, se observó disminución de la tasa de melanización en insectos no parasitados a los que se les inoculó PDV de *C. congregata*.[8] La melanización es uno de los principales procesos de respuesta inmune humoral. En ausencia de melanización, los radicales tóxicos y compuestos intermediarios que reaccionan con oxígeno no se forman y, por lo tanto, se protege al parasitoide. Así mismo, los PDV de parasitoides modulan el nivel de fenoloxidasas en su huésped.[55] Stoltz y Cook[73] reportaron inhibición de la actividad de fenoloxidasas (responsable del oscurecimiento enzimático) en hemolinfa de la oruga *Hyposoter fugitivus* parasitada por una especie del género *Hyposoter* y en larvas *H. virescens* parasitadas por *C. sonorensis*.[71] Este fenómeno parece ser común entre los insectos parasitados y se le atribuye a la presencia del PDV. En la hemolinfa de la larva *Lacanobia oleracea* parasitada por *Eulophus pennicornis* se encontró una reducción de la actividad de fenoloxidasas. El veneno inoculado por el ectoparasitoide en el huésped no tiene efecto sobre el nivel de fenoloxidasas. Existen otros factores, aún no identificados, responsables de la reducción de la actividad de fenoloxidasas en la hemolinfa del insecto huésped.[55]

FUNCIÓN DEL VENENO DEL PARASITOIDE

El veneno de los parasitoides de la familia Braconidae hace sinergia con el PDV permitiendo que éste funcione a una dosis más baja de lo normal. Stoltz y colaboradores[77] sugirieron que el veneno de *Cotesia melanoscela* fomenta

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

la entrada y facilita la expresión de genes del PDV que modulan los hemocitos del insecto huésped. Guzo y Stoltz[38] encontraron que el PDV y veneno de *C. melanoscela* producen picnosis nuclear en los hemocitos, reducen su número y suprimen su función de encapsulamiento de huevos. Según Strand y Pech[80], el PDV es capaz de modular, por sí solo, la función de los hemocitos si se inocula a una dosis óptima. No obstante, si se inocula veneno y PDV, incluso a una dosis más baja de lo normal, se reduce aún más el número de hemocitos, permitiendo la sobrevivencia del parasitoide. En este contexto, Wago y Tanaka[89] reportaron sinergia entre el PDV y el veneno de *Apanteles kariyai*, los cuales modulan la función de los granulocitos de la larva *P. separata*. Sin embargo, no se aprecia efecto fisiológico del veneno sobre la larva *M. sexta* parasitada por *C. congregata*.

Webb y Summers[96] y Summers y Dib-Hajj[84] propusieron una explicación de esta sinergia al mostrar que existe similitud en secuencias de nucleótidos del PDV y del veneno de *C. sonorensis*. Anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la glándula del veneno reconocen epítopes conservados de varias proteínas del PDV. El veneno y PDV comparten funciones asegurando que el parasitoide sobreviva en su huésped. Posiblemente el PDV ha "copiado" genes del veneno o el veneno "imita" genes del PDV ya que ambos se producen en tejido epitelial. Webb y Summers[96] sugirieron un proceso evolutivo en el cual los genes del veneno se incorporaron al genoma del PDV produciendo genes homólogos. Este fenómeno indica que el parasitoide evolucionó empaquetando parte de su genoma en forma de PDV. Por tanto, el PDV sería una "secreción genómica" u organelo de la avispa,[28,29] que después de la parasitosis invade rápidamente los tejidos del insecto huésped.

El veneno de las avispas ectoparásitas podría deteriorar el sistema endocrino y funcionar de manera semejante a la acción del polidnavirus en las avispas endoparásitas. En estos casos, la paralización del desarrollo del huésped es provocado por los componentes del veneno y no por los genes del polidnavirus. Las proteínas codificadas por los genes de las células del ovario de la avispa podrían tener también una función de regulación fisiológica en el huésped.[92]

ESTRATEGIAS PASIVAS DE INMUNOEVASIÓN

Poco se conoce acerca de los mecanismos de evasión inmune pasiva. No obstante, existen algunos ejemplos de este proceso. Como ya se mencionó, la avispa *Venturia* (= *Nemeritis*) *canescens* contiene partículas proteicas que protegen, de manera pasiva, al parasitoide durante la respuesta inmune generada por su larva huésped *Ephestia kuehniella*.[43] Por otro lado, el insecto huésped *(Heliothis virescens)* no encapsula los huevos de *Toxoneuron* (= *Cardiochiles*) *nigriceps* ya que los huevos contienen una capa fibrosa que previene la activación de la respuesta inmune.[19] Una proteína del fluido del cáliz de *C. rubecula*, similar en su estructura a una proteína viral, se encuentra sobre los huevos del parasitoide. Esta proteína protege, de manera pasiva y temporal, al huevo hasta que el PDV suprime el sistema inmune del huésped.[2] Las larvas del estadio primero-tardío de *C. congregata* que son trasplantadas en *M. sexta* completan su desarrollo normal en su huésped.[1,49] El PDV no es necesario durante la fase final de la parasitosis ya que el parasitoide evade, de manera pasiva, la respuesta inmune del insecto huésped.

EFECTOS DEL POLIDNAVIRUS SOBRE LA FISIOLOGÍA DEL INSECTO HUÉSPED

El PDV puede inducir un retraso en el desarrollo, provocar la pérdida de apetito, el cese de la actividad alimenticia, inactividad general y/o detener el crecimiento del insecto huésped (Fig. 9).

El PDV produce, además, una pigmentación anormal del huésped. No se observan todos los efectos en las especies parasitadas. Sin embargo, la manifestación puede ocurrir a diferentes tiempos después de la parasitosis o inoculación con el PDV. Por ejemplo, si se inocula PDV en larvas de *M. sexta* se inhibe su desarrollo pero esto se manifiesta varios días después de la inoculación, el desarrollo se detiene en fase de larva-pre-pupa y, eventualmente ésta muere.[9,23] La inoculación del PDV inhibe, de manera temporal, la ingestión de alimento del insecto provocándole una pérdida significativa de peso si se compara con el peso de una larva no parasitada. El peso de la larva puede ser de hasta 17 g antes de pasar al estado de pupa. La larva no parasitada alcanza la fase de pupa después de obtener un peso promedio de entre nueve y 10 g. Así mismo, el PDV altera la pigmentación de la larva huésped. La larva con el PDV se torna de color rosado, mientras que las larvas no parasitadas son de color azul-verdoso. No se conoce cuál es la función de estos cambios fisiológicos inducidos por el PDV. Por otro lado, la encapsulación de *Cotesia flavipes* por un huésped no común, *M. sexta*, produce un retraso del desarrollo y disfunción metamórfica del huésped pero ninguno logra sobrevivir. El PDV de *C. flavipes* parece no tener efecto sobre el sistema immune del insecto huésped como sucedería si *C. congregata* parasitara a *M. sexta*. No se conoce si los receptores del PDV están ausentes en huéspedes resistentes o refractarios. Sin embargo, *C. flavipes* se desarrolla normalmente en varias especies de la familia Pyralidae. Por tanto, la asociación entre *C. flavipes* y *M. sexta* parece ser un buen modelo para estudiar el fenóme-

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

no de encapsulación que resulta en la muerte del insecto huésped y del parasitoide.[24,58,59] Es importante entender la función de los PDV dentro de la comunidad ecológica del parasitoide. Entender cómo éstos interactúan con sus respectivos huéspedes y cuál mecanismo define el rango de hospederos del parasitoide.[98]

POLIDNAVIRUS Y PROGRAMAS DE CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS PLAGA

En el futuro, los PDV tendrán utilidad en programas de manejo integrado de insectos plaga. Es posible construir, con tecnología de ADN recombinante, virus, bacterias u hongos con genes del PDV para producir agentes más virulentos como bioinsecticidas. Los insectos parasitados (que contienen el PDV) son susceptibles a la infección con estos microorganismos. Un bioinsecticida con genes del PDV podría reducir la contaminación ambiental que se genera por el uso de pesticidas químicos. En algún momento se esparcirán, en los campos agrícolas, parasitoides modificados mediante ingeniería genética. Estos parasitoides tendrán un rango amplio de hospederos y serán más efectivos en controlar insectos plaga. Una limitante de los programas de control biológico con parasitoides es que éstos son muy específicos en su ataque, es decir, presentan un rango estrecho de hospederos. Se requiere caracterizar los factores que determinan el rango de hospederos para la mayoría de las especies de parasitoides. El estudio del genoma del PDV puede permitir la manipulación genética del parasitoide y desarrollar un parasitoide que sea efectivo contra varios insectos.

Existen proyectos de secuenciación de genomas de PDV. Por ejemplo, ya se tiene la secuencia completa del genoma del PDV de *C. congregata*[26] y nuestras investigaciones en EE.UU. y México tienen como objetivo conocer el genoma del PDV de *C. flavipes*. El estudio del genoma permite conocer su organización y estructura, establecer la relación evolutiva entre genomas de bracovirus y de icnovirus,[46] e identificar nuevos genes que pueden ser de utilidad en la construcción de bioinsecticidas. Una vez que los genes del PDV estén caracterizados se requerirá de un sistema de liberación, a nivel de campo, que permita el control efectivo y eficaz de insectos plaga. Por ejemplo, se pueden usar baculovirus o plantas con genes del PDV o formulados de proteínas del PDV que puedan ser rociados, colocados en trampas o combinados con atrayentes de insectos plaga.

Una limitante en el uso de bioinsecticidas de tipo viral (i.e. baculovirus) es su baja capacidad para eliminar, en tiempo, al insecto plaga. Es decir, antes de que éste ocasione un daño económico. Uno de nuestros objetivos es construir un baculovirus (AcVPN) con genes (CrV1) del PDV de *C. congregata* para obtener un baculovirus más virulento como bioinsecticida.[91] Aunque, se ha reportado que un híbrido de este tipo (genes del PDV de *Toxoneuron nigriceps* en AcVPN) produce efectos citotóxicos en células de insectos usadas para la producción del baculovirus,[47] se debería de identificar y caracterizar otras proteínas del parasitoide, incluyendo las del veneno, que crean sinergia con las proteínas del PDV y determinar las condiciones necesarias que permitan la producción a gran escala. Estas moléculas serán de utilidad en el diseño de bioinsecticidas efectivos, basados en PDV.[7] A la fecha, no se ha evaluado, a nivel de laboratorio o de campo, un organismo modificado con genes del PDV como bioinsecticida. Esta es una línea de investigación que deseamos explorar en los próximos años. Un organismo virulento con genes del PDV como bioinsecticida debe ser aprobado para el control de insectos plaga bajo diferentes ambientes sin que éste produzca efectos adversos. Por tanto, será necesario evaluar el riesgo ambiental de cada bioinsecticida basado en PDV.

AGRADECIMIENTOS

Este material está basado en trabajo realizado gracias al financiamiento del Instituto México Estados Unidos de la Universidad de California (UC MEXUS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Los autores agradecen al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el apoyo brindado para llevar a cabo proyectos sobre polidnavirus y parasitoides. Así mismo, agradecemos al IPN-COTEPABE por facilitar la visita de Mario A. Rodríguez-Pérez a la UCR, quien es becario de la COFAA/IPN. Damos gracias a Olga Real Najarro (Universidad Autónoma de Nuevo León) por la revisión del manuscrito. Agradecemos a las siguientes personas que participaron en proyectos de polidnavirus y parasitoides en diversas instituciones: Jennifer Lenz y Kevin Amaya de UCR, Claudia Núñez y Cristian Lizarazo de IPN y Hugo Barrera de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

REFERENCIAS

1. Adamo, S.A., C.E. Linn & N. E. Beckage. 1997. Correlation between changes in host behavior and octopamine levels in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, parasitized by the gregarious braconid parasitoid wasp *Cotesia congregata*. J. Exp. Biol. 200:117-127.
2. Asgari, S. & O. Schmidt. 1994. Passive protection of eggs from the parasitoid Cotesia rubecula in the host Pieris rapae. J. Insect. Physiol. 40:789-795.
3. Asgari, S. & O. Schmidt. 2002. A coiled-coil region of an insect immune suppressor protein is involved in binding and uptake by hemocytes. Insect. Biochem. Mol. Biol. 32:497-504.
4. Asgari S., M. Hellers & O. Schmidt. 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. J. Gen. Virol. 77:2653-2662.

5. Asgari, S., O. Schmidt & U. Theopold. 1997. A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. J. Gen. Virol. 78:3061-3070.
6. Beckage, N.E. 1993. Games parasites play: the dynamic roles of peptides and proteins in the host-parasite interaction. En: N.E. Beckage, S.N. Thompson, and B.A. Federici, Eds. Parasites and Pathogens of Insects, Vol 1. Academic Press, N. Y. pp. 25-58.
7. Beckage, N.E. & D.B. Gelman. 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. Annu. Rev. Entomol. 49:299-330.
8. Beckage, N.E., J.S. Metcalf, D.J. Nesbit, K.W. Schliefer, S.R. Zetlan & I. de Buron. 1990. Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by a wasp polydnavirus. Insect. Biochem. 20:285-294.
9. Beckage, N.E., F.F. Tan, K.W. Schleifer, R.D. Lane & L.L. Cherubin. 1994. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 26:165-195.
10. Beckage, N.E., T.J. Templeton, B.D. Nielsen, D.I. Cook & D.B. Stoltz. 1987. Parasitism-induced hemolymph polypeptides in *Manduca sexta* (L.) larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata* (Say). Insect. Biochem. 17:439-455.
11. Béliveau, C., A. Levasseur, D. Stoltz & M. Cusson. 2003. Three related TrIV genes: comparative sequence analysis and expression in host larvae and Cf-124T cells. J. Insect. Physiol. 49:501-512.
12. Belle, E., N.E. Beckage, J. Rousselet, M. Poirie, F. Lemeunier & J.M. Drezen. 2002. Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. J. Virol. 76:5793-96.
13. Blissard, G.W., S.B. Vinson & M.D. Summers. 1986. Identification, mapping, and *in vitro* translation of *Campoletis sonorensis* virus mRNAs from parasitized *Heliothis virescens* larvae. J. Virol. 57:318-327.
14. Bonvin, M., D. Marti, S. Wyder, D. Kojic, M. Annaheim, & B. Lanzrein. 2005. Cloning, characterization and analysis by RNA interference of various genes of the *Chelonus inanitus* polydnavirus. J. Gen. Virol. 86:973-983.
15. Buron, de I. & N.E. Beckage. 1992. Characterization of a polydnavirus (PDV) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). J. Invertebr. Pathol. 59:315-327.
16. Cui, L. & B.A. Webb. 1996. Isolation and characterization of a new member of the cysteine-rich *Campoletis sonorensis* polydnavirus gene family. J. Gen. Virol. 77:797-809.
17. Cui L., Soldevila A. & Webb B.A. 1997. Expression and hemocyte-targeting of a *Campoletis sonorensis* polydnavirus cysteine-rich gene in *Heliothis virescens* larvae. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 36:251-271.
18. Cook, D.I., D.B. Stoltz & S.B. Vinson. 1984 Induction of a new haemolymph glycoprotein in larvae of permissive hosts parasitized by *Campoletis sonorensis*. Insect. Biochem. 14:45-50.
19. Davies, D.H. & S.B. Vinson. 1986. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochles nigriceps* of encapsulation *in vitro* by haemocytes of host *Heliothis virescens*: Possible role for fibrous layer in immunity. J. Insect. Physiol. 32:1003-1010.
20. DeBorde, S., W. Rattanadechakul, Y. Kim, J.A. Kroemer, B.A. Webb, L. Thoetkiattial, A. Witherell and M.R. Strand. 2002. Characterization of the *Microplitis demolitor* bracovirus genome Memorias del 50th Annual Meeting of the Entomological Society of America. November 17-20, Fort Lauderdale, Florida. USA, D0032.
21. Dib-Hajj, S.D., B.A. Webb & M.D. Summers. 1993. Structure and evolutionary implications of a "cysteine-rich" *Campoletis sonorensis* polydnavirus gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 3765-3769.
22. Drezen, J.M., B. Provost, E. Espagne, L. Cattolico, C. Dupuy, M. Poirie, G. Periquet & E. Huguet. 2003. Polydnavirus genome: integrated *vs* free virus. J. Insect. Physiol. 49:407-417.
23. Dushay, M.S. & N.E. Beckage. 1993. Dose-dependent separation of *Cotesia congregata*-associated polydnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. J. Insect. Physiol. 39:1029-1040.
24. Dumpit, R., M.A. Rodríguez-Pérez, M. Alleyne & N.E. Beckage. 2004. *Cotesia flavipes* and *Manduca sexta*: A model for studying parasitoid encapsulation in refractory hosts. Memorias del 52nd Annual Meeting of the Entomological Society of America. Noviembre 14-17, Salt Lake City, Utah. pág. 43.
25. Edson, K.M., S.B. Vinson, D.B. Stoltz & M.D. Summers. 1981. Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. Science. 211:582-583.
26. Espagne, E., C. Dupuy, E. Huguet, L. Cattolico, B. Provost, N. Martins, M. Poirié, G. Periquet & J.M. Drezen. 2004. Genome sequence of a polydnavirus: Insights into symbiotic virus evolution. Science 306:286-289.
27. Fedderson, I., K. Sander & O. Schmidt. 1986. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. Experientia. 42:1278-1281.
28. Federici, B.A. 1991. Viewing polydnaviruses as gene vectors of endoparasitic Hymenoptera. Redia 74:387-392.
29. Federici, B.A. & Y. Bigot. 2003. Origin and evolution of polydnaviruses by symbiognesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. J. Insect. Physiol. 49:419-432.
30. Fleming, J.G.W. 1992. Polydnaviruses: mutalists and pathogens. Annu. Rev. Entomol. 37:401-425.
31. Fleming, J.G.W. & P. Krell. 1993. Polydnavirus genome organization. En: N. E., Beckage, S.N. Thompson, and B.A. Federici, Eds. Parasites and Pathogens of Insects, Vol 1. Academic Press, NY. pp. 189-225.
32. Fleming, J.G.W. & M.D. Summers. 1991. Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:9770-9774.
33. Fleming, J.G.W., G.W. Blissard, M.D. Summers & S.B. Vinson. 1983. Expression of *Campoletis sonorensis* virus in the parasitized host, *Heliothis virescens*. J. Virol. 48:74-78.
34. Galibert L., J. Rocher, M. Ravallec, M. Duonor-Cérutti, B.A. Webb & A.N. Volkoff. 2003. Two *Hyposoter didmator* ichnovirus genes expressed in the lepidopteran host encode secreted or membrane-associated serine and threonine rich proteins in segments that may be nested. J. Insect. Physiol. 49:441-452.
35. Godfray, H.C.J. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.
36. Gruber, A., P. Stettler, P. Heiniger, D. Schumperli & B. Lanzrein. 1996. Polydnavirus DNA of the braconid wasp *Chelonus inanitus* is integrated in the wasp genome and excised only in later pupal and adult stages of the female. J. Gen. Virol. 77:2873-2879.
37. Gundersen-Rindal D.E. & Lynn D.E. 2003. Polydnavirus integration in lepidopteran host cells *in vitro*. J. Insect. Physiol. 49:453-462.
38. Guzo, D. & D.B. Stoltz. 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. J. Insect. Physiol. 33:19-31.
39. Harwood, S.H. & N.E. Beckage. 1994 Purification and characterization of an early-expressed polydnavirus-induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. Insect. Biochem. Mol. Biol. 24:685-698.
40. Harwood, S.H., A.J. Grosovsky, E.A. Cowles, J.W. Davis & N.E. Beckage. 1994. An abundantly expressed hemolymph glycopro-

tein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product. Virology. 205:381-392.
41. Hayakaya Y. 1995. Growth-blocking peptide: an insect biogenic peptides that prevents the onset of metamorphosis. J. Insect. Physiol. 44:1-6.
42. Hayakaya Y, I. Yuazaki, A. Yamanaka & T. Tanaka. 1994. Expression of polydnavirus genes from the parasitoid wasp *Cotesia kariyai* in two noctuid hosts. Insect. Mol. Biol. 3:97-103.
43. Hellers, M., M. Beck, U. Theopold, M. Kamei & O. Schmidt. 1996. Multiple alleles encoding a virus-like particle protein in the ichneumonid wasp endoparasitoid *Venturia canescens*. Insect. Mol. Biol. 5:239-249.
44. Krell, P. J. 1991. The polydnaviruses: multipartite DNA viruses from parasitic Hymenoptera. In: *Viruses of Invertebrates* (Ed. Krustak E.) pp. 141-177. Marcel Dekker, New York.
45. Krell, P.J. & D.B. Stoltz. 1980. Virus-like particles in the ovary of an ichneumonid wasp: purification and preliminary characterization. Virology. 101:408-418.
46. Kroemer, J.A. & B.A. Webb. 2004. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. Annu. Rev. Entomol. 49:431-456.
47. Lapointe, R., R. Wilson, L. Vilaplana, D.R. O'Reilly, P. Falabella, V. Douris, M. Bernier-Cardou, F. Pennacchio, K. Latrou, C. Malva & J.A. Olszewski. 2005. Expression of a *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus-encoded protein causes apoptosis-like programmed cell death in lepidopteran insect cells. J. Gen. Virol. 86:963-971.
48. Lavine, M.D. & N.E. Beckage. 1995. Polydnaviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. Parasitol. Today. 11:368-378.
49. Lavine, M.D. & N.E. Beckage. 1996. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. J. Insect. Physiol. 42:39-49.
50. Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect. Biochem. Mol. Biol. 32:1295-1309.
51. Le, N.T., S. Asgari, K. Amaya, F.F. Tan & N.E. Beckage. 2003. Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm. J. Insect. Physiol. 49:533-543.
52. Li, X. & B.A. Webb. 1994. Apparent functional role for a cysteine-rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response. J. Virol. 68:7482-7489.
53. Luckhart, S. & B.A. Webb. 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. Dev. Comp. Immunol. 20:1-21.
54. Noguchi, H., Y. Harakawa & R.G.H. Downer. 1995. Elevation of dopamine levels in parasitized insect larvae. Insect. Biochem. Mol. Biol. 25:197-201.
55. Richards E.H. & J.P. Edwards. 2000. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 127:289-298.
56. Rizki, R.M. & T.M. Rizki. 1984. Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6154-6158.
57. Rizki, R.M. & T.M. Rizki. 1990. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 8388-8392.
58. Rodríguez-Pérez, M.A., R. Dumpit, M. Hongskula & N. Beckage. 2004. Physiological consequences of the encapsulation of the parasitoid *Cotesia flavipes* in host larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Memorias del IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia, España, 18-23 Julio. pág. 637.
59. Rodríguez-Pérez, M.A., R.F. Dumpit, J.M. Lenz, E.N. Powell, S.Y. Tam & N. Beckage. 2005. Host Refractoriness of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*, to the Braconid Endoparasitoid *Cotesia flavipes*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 60:159-171.
60. Ross, D.R. & P.E. Dunn. 1989. Effect of parasitism by *Cotesia congregata* on the susceptibility of *Manduca sexta* to bacterial infection. Dev. Comp. Immunol. 13:205-216.
61. Rotheram S. 1973. The surface of the egg of a parasitic insect. I. The surface of the egg and the first instar larva of Nemeritis. Proc. R. Soc. London Ser. B. 183: 179-194.
62. Russo J., S. Dupas, F. Frey, Y. Carton & M. Brehelin. 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid *(Leptopilina boulardi)* eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. Parasitology. 112:135-142.
63. Salt, G. 1965. Experimental studies in insect parasitism XIII. The haemocytic reaction of a caterpillar to eggs of its habitual parasite. Proc. R. Soc. London Ser. B. 162:303-318.
64. Savary, S., N.E. Beckage, F. Tan, G. Periquet & J.M. Drezen. 1997. Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastrinae) at potential recombinase binding sites. J. Gen. Virol. 83:2035.
65. Schmidt, O., U. Theopold & M.R. Strand. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. BioEssays. 23:344-351.
66. Shelby, K.S. & B.A. Webb. 1994. Polydnavirus infection inhibits synthesis of an insect plasma protein, arylphorin. J. Gen. Virol. 75:2285-2292.
67. Shelby, K.S. & B.A. Webb. 1997. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. Insect. Biochem. Mol. Biol. 27:263-270.
68. Shelby, K.S. & B.A. Webb. 1999. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. J. Insect. Physiol. 45:507-514.
69. Soldevila, A.I. & B.A. Webb. 1996. Expression of polydnavirus genes under polydnavirus-promoter regulation in insect larvae infected with baculovirus recombinants. J. Gen. Virol. 77:1379-1388.
70. Soldevila, A.I., S. Heuston & B.A. Webb 1997. Purification and analysis of a polydnavirus gene product expressed using a poly-histidine baculovirus vector. Insect. Biochem. Mol. Biol. 27:201-211.
71. Sroka, P. & S.B. Vinson. 1978. Phenyloxidase activity in the hemolyph of parasitized and unparasitized *Heliothis virescens*. Insect. Biochem. 8:399-402.
72. Stoltz, D.B. 1993. The polydnavirus life cycle. In *Parasites and Pathogens of Insects*. (Eds Beckage N.E., Thompson S.N., and Federici B.A.), Vol 1, pp. 167-189. Academic Press, NY.
73. Stoltz, D.B. & D. Cook. 1983. Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid Hymenoptera. Experientia. 39:1022-1024.
74. Stoltz, D.B. & D. Guzo. 1986. Apparent haemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma disstria* larvae. J. Insect. Physiol. 32:377-388.
75. Stoltz, D.B. & J.B. Whitfield. 1992. Viruses and virus-like entities in the parasitic Hymenoptera. J. Hymenopt. Res. 1:125-139.
76. Stoltz, D.B. & A. Makkay. 2003. Overt viral diseases induced from apparent latency following parasitization by the ichneumonid wasp, *Hyposoter exiguae*. J. Insect. Physiol. 49:483-490.
77. Stoltz, D.B., D. Guzo, E.R. Belland, C.J. Cucarotti & E.A. MacKinnon. 1988. Venom promotes uncoating *in vitro* and persistence in vivo of DNA from a braconid polydnavirus. J. Gen. Virol. 69:903-907.
78. Strand, M.R. 1994. *Microplitis demolitor* polydnavirus infects and expresses in specific morphotypes of *Pseudoplusia includens* haemocytes. J. Gen. Virol. 75:3007-3020.
79. Strand, M.R. & B.A. Dover. 1991. Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the

Rev Latinoam Microbiol 2006; 48 (1): 31-43

calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 18:131-145.
80. Strand, M.R. & L.L. Pech 1995a. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annu. Rev. Entomol. 40:31-56.
81. Strand, M.R. & L.L. Pech. 1995b. Microplitis demolitor polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*. J. Gen. Virol. 76:283-291.
82. Strand, M.R., D.I. McKenque, V. Grassl, B.A. Dover & J.M. Aiken. 1992. Persistence and expression of *Microplitis demolitor* polydnavirus in *Pseudoplusia includens.* J. Gen. Virol. 73:1627-1635.
83. Strand, M.R., A. Witherell & D. Trudeau. 1997. Two *Microplitis demolitor* polydnavirus mRNAs expressed in hemocytes of *Pseudoplusia includens* contain a common cysteine-rich domain. J. Virol. 71:2146-2156.
84. Summers, M.D. & S.D. Dib-Hajj. 1995. Polydnavirus-facilitated endoparasite protection against host immune defenses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:29-36.
85. Tanaka K., S. Tsuzuki, H. Matsumoto & Y. Hayakawa. 2003. Expression of *Cotesia kariyai* polydnavirus genes in lepidopteran hemocytes and Sf9 cells. J. Insect. Physiol. 49:433-440.
86. Theilmann, D.A. & M.D. Summers. 1986. Molecular analysis of *Campoletis sonorensis* virus DNA in the lepidopteran host *Heliothis virescens*. J. Gen. Virol. 67:1961-1969.
87. Theilmann, D.A. & M.D. Summers. 1987. Physical analysis of the *Campoletis sonorensis* virus multipartite genome and identification of a family of tandemly repeated elements. J. Virol. 61:2589-2598.
88. Turnbull, M.W. & B.A. Webb. 2002. Perspectives on polydnavirus origin and evolution. Adv. Virus Res. 58:203-254.
89. Wago H. & T. Tanaka. 1989. Synergistic effects of calyx fluid and venom of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera:Braconidae) on the granular cells of *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera:Noctuidae). Zoolog. Sci. 6:691-696.
90. Washburn, J.O., B.A. Kirkpatrick & L.E. Volkman. 1996. Insect protection against viruses. Nature. 383:767.
91. Washburn, J.O., E.J. Haas-Stapleton, F.F. Tan, N.E. Beckage & L.E. Volkman. 2000. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. J. Insect Physiol. 46:179-190.
92. Weaber R.J., G.C. Marris, H.A. Bell & J.P. Edwards. 2001. Identity and mode of action of the host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps. In *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogen*. (Eds Edwards J.P., Weaver R.J.), pp. 33-58. Bios Scientific Publisher, Ltd, Oxford, UK.
93. Webb, B.A. 1998. Polydnavirus biology genome structure and evolution. En: A. Ball and L.K. Miller, Eds. The Insect Viruses. Plenum Press, New York. pp. 105-139.
94. Webb, B.A. y S. Luckhart. 1994. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 26:147-163.
95. Webb, B.A. & S. Luckhart. 1996. Factors mediating short- and long-term immune suppression in a parasitized insect. J. Insect. Physiol. 42:33-40.
96. Webb, B.A. & M.D. Summers. 1990. Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:4961-4965.
97. Whitfield, J.B. 1990. Parasitoids, polydnaviruses, and endosymbiosis. Parasitol. Today. 6:381-384.
98. Whitfield, J.B. 1994. Mutualistic viruses and the evolution of host ranges in endoparasitoid Hymenoptera. En: B.A. Hawkins and W. Sheehan, Eds. Parasitoid Community Ecology, Oxford University Press, Oxford. pp. 163-176.
99. Whitfield, J.B. & S. Asgari. 2003. Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. J. Insect. Physiol. 49:397-405.
100. Willott, E., T. Trenczek, L.W. Thrower & M.R. Kanost. 1994. Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. Eur. J. Cell. Biol. 65:417-423.
101. Wyder, S., F. Blank & B. Lanzrein. 2003. Fate of polydnavirus DNA of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* in the host *Spodoptera littoralis*. J. Insect. Physiol. 49:491-500.
102. Yamanaka, A., Y. Hayakawa, H. Noda, N. Nakashima & H. Watanabe. 1996. Characterization of polydnavirus-encoded mRNA in parasitized armyworm larvae. Insect. Biochem. Mol. Biol. 6:529-536.

Correspondencia:

Prof. Dr. Mario A. Rodríguez-Pérez
Centro de Biotecnología Genómica,
Instituto Politécnico Nacional
Blvd. del Maestro esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa Tamaulipas, 88710, México,
E-mail: mrodriguez@ipn.mx