

Virus como agentes de control biológico de poblaciones de mosquitos

Mariano N. Belaich¹
Juan D. Claus²

¹Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área Virosis de Insectos (AVI), Departamento Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes y CONICET. Quilmes, Buenos Aires.

²Laboratorio de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Santa Fe.

mbelaich@unq.edu.ar
jclaus@fbc.unl.edu.ar

Todos los organismos que habitan este planeta poseen enemigos naturales que los parasitan, y ocasionalmente, provocan su muerte. Entre ellos encontramos a los virus, entidades curiosas dispersas por todo el globo y sólo visibles utilizando los instrumentos más sofisticados, muchas veces peligrosas, pero en otras tantas, la base de soluciones tecnológicas para la humanidad.

Los virus: ubicación y rol en la biosfera

La evidencia acumulada en base a la constitución molecular de la materia viva sugiere fuertemente que todos los seres vivos descienden de una población ancestral de células, las cuales surgieron en los mares primigenios hace más de 4.000 millones de años una vez que se dio la interdependencia entre los ácidos nucleicos y las proteínas. Como hoy sabemos, todos los organismos almacenan la información en moléculas de DNA, la cual fluye transformándose en fenotipo (RNA y proteínas) atravesando tres mecanismos centrales que definen a la vida: la transcripción, la traducción y la replicación. Utilizando dichos procesos, las células transforman la energía y también la acumulan, empleándola para sostenerse, dialogar con el entorno, y perpetuarse con posibilidad de cambios generando así su descendencia.

Plantas, hongos, animales vertebrados e invertebrados, algas, amebas o ciliados, todos los

seres vivos comparten un diseño básico: contener un genoma que actúa como sistema operativo, el cual está conformado por numerosos circuitos informativos con la potencialidad de expresar el conjunto de funciones que construyen, mantienen y sostienen a esa materia viva. Pero también, los seres vivos tienen como característica común su rol de ser hospedadores para un tipo particular de parásitos, los virus. Estas entidades están conformadas por el mismo tipo de moléculas que construyen la vida, aunque la naturaleza química de su genoma incluye al RNA tanto simple como doble cadena. También, existen virus con genomas de DNA simple cadena. Lo interesante de estas moléculas es que si bien contienen información almacenada, ésta por sí sola no es suficiente para permitir a los virus sostenerse o perpetuarse, y por ello, requieren apropiarse de actividades centrales expresadas en los organismos.

Estas razones hacen que los virus sean considerados parásitos obligados de los seres vivos, prevaleciendo en la naturaleza gracias a procesos evolutivos donde los hospedadores presentan un rol central (Moreira y López-García, 2009). Así, la virosfera coexiste con la biosfera, ya que encontraremos virus en todo lugar del planeta donde haya vida. Junto a plásmidos y transposones, estas entidades también son reconocidas como miembros del moviloma, espacio contenedor de todos los ácidos nucleicos con capacidad de transferencia horizontal génica, los cuales posibilitan un diálogo molecular entre los genomas de las distintas especies de organismos (Siefert, 2009). De hecho, muchos seres vivos presentan relictos de virus en sus genomas revelando eventos de integración sucedidos hace milenios producto de ciclos infectivos incompletos. Estos elementos virales endógenos (EEV), que existen incluso en nuestra especie, fueron domesticados funcionalmente en algunos organismos. Sobresalen como ejemplos paradigmáticos el caso de polidnavirus insertados en el genoma de algunas avispas, los cuales son necesarios para la sobrevivencia y desarrollo de los huevos cuando estos son depositados dentro de las larvas de los insectos que parasitan, y ciertos retrovirus que han sido importantes en la evolución de la placenta en los mamíferos (Roossinck, 2011).

El ciclo de infección

En la naturaleza, el ciclo de multiplicación viral podría reducirse a: una etapa que involucra el reconocimiento específico del hospedador; el poste-

rior ingreso del material genómico viral a la célula susceptible; la transcripción y traducción de factores virales; la replicación del genoma viral; y finalmente

el ensamblado y la salida de la célula. Estas etapas presentan matices entre los distintos virus, y la consecuencia sobre la célula hospedadora puede ser variada, incluyendo la posibilidad de su muerte. Lo mismo vale para el organismo hospedador, que puede sobrevivir a la infección viral, o por el contrario, terminar con su vida.

En forma básica, un ciclo de infección incluiría entonces la suma de todos los procesos involucrados para que una partícula viral genere progenie viable. Y como se mencionó, para ello se requiere de células. Dado que no puede haber virus en ausencia

de sus hospedadores, estos también reciben el nombre de reservorio natural, porque forman parte obligada para su mantenimiento. Es oportuno destacar que muchos virus pueden circular por diferentes especies de organismos evidenciando una mayor promiscuidad y adaptabilidad de sus mecanismos, y en consecuencia, su evolución se ve condicionada por y para diferentes materias vivas. Incluso, algunos virus circulan por especies de hospedadores distantes evolutivamente, tales como invertebrados y mamíferos.

Diversidad viral y clasificación

Si suponemos que cada especie de organismo posee al menos un tipo de virus que lo infecta, el número de variantes virales sería mayor que la biodiversidad de seres vivos. Y si bien es aceptado que todos los virus que hoy circulan por el planeta no tendrían un ancestro compartido, sí es posible definir linajes. Para tales tareas, y con el fin de establecer orden dentro de la virosfera, el Instituto Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) se esfuerza en definir la especie, género y familia viral a la que pertenece cada aislamiento, siempre a propuesta de los investigadores que los descubren y caracterizan, y en base a los criterios vigentes que se proponen como puntos centrales para los agrupamientos. Como grandes conjuntos, el ICTV divide a estos patógenos en cuatro grandes fracciones de acuerdo al tipo de hospedadores donde circulan: virus de hongos y protistas (incluyendo nueve subgrupos); virus de plantas (con 20 subgrupos); virus de bacterias y arqueas (conteniendo cuatro subgrupos); y virus de animales vertebrados e invertebrados

(incluyendo 40 subgrupos). También, el ICTV clasifica a los virus en Órdenes, Familias, Subfamilias, Géneros y Especies, valiéndose para ello de los hospedadores donde circulan, de sus características morfológicas, del tipo de ácido nucleico que actúa como genoma, de las secuencias particulares que allí se encuentran, y del ciclo de infección en la naturaleza, entre otros criterios.

Es claro también que los procesos de evolución de cada grupo filogenético son diferentes. Mientras que los virus con genomas grandes de DNA doble cadena presentan patrones de evolución similares a los organismos (con fuerte influencia de las mutaciones estructurales que incluyen deleciones, inserciones, translocaciones o inversiones), en otras entidades, como las poseedoras de genomas de RNA, tienen alto impacto las mutaciones puntuales. De cualquier modo, los virus suelen presentar tasas de cambio mayores que la de los organismos donde circulan, surgiendo nuevas variantes exitosas con alta frecuencia.

Los virus como herramientas biotecnológicas: aplicaciones en el control de plagas

En general, los virus siempre han sido asociados a enfermedades, tal vez por su clara naturaleza parasitaria. Sin embargo, el ser humano ha podido encontrar en ellos una materia útil para el desarrollo de tecnologías. El sólo hecho de pensar que estas entidades afectan o incluso matan a sus hospedadores, y que muchos de esos seres vivos donde circulan son enemigos de nuestra especie, transforma a los virus en interesantes principios activos para la formulación de biocidas. Por ejemplo, existen numerosas bacterias que nos afectan cuando colonizan nuestros cuerpos, y que son difíciles de erradicar dada la alta tolerancia a los compuestos químicos utilizados como antibióticos. Considerando que existen descritos numerosos virus que parasitan bacterias (conocidos con el nombre de fagos),

muchos investigadores los han propuesto como estrategias bactericidas. Lo mismo ocurre con las plagas de invertebrados en nuestros cultivos. La búsqueda de virus específicos que ayuden a controlar las poblaciones de esos organismos dañinos para nuestra producción de alimentos se ha transformado en un camino transitado por numerosos científicos. Así es como desde hace años los baculovirus se emplean como bioinsecticidas, principalmente para el control de lepidópteros e himenópteros plaga (Haase *et al.*, 2015).

De este modo, una de las aplicaciones centrales de los virus es utilizarlos como principios activos de formulaciones en el control de plagas agrícolas y urbanas. Pero esta aproximación está sujeta al cumplimiento de una serie de condiciones y requisi-

tos, cuya satisfacción está dirigida a garantizar la eficacia, la efectividad y la seguridad de su uso. Así, debemos destacar que:

- en primer lugar, es condición *sine qua non* que un virus con potencial para ser utilizado como un agente de control debe tener una elevada capacidad de infección del insecto blanco;
- la infección debe desencadenar un proceso patológico que conduzca al establecimiento de una patología letal, cuya consecuencia sea una rápida reducción de la población del insecto blanco;
- alternativamente, un agente de menor virulencia, pero capaz de persistir en el insecto y alterar su fisiología, puede resultar útil si su introducción conduce a una reducción sostenida de la población blanco, manteniéndola por debajo del umbral de daño económico o sanitario;
- el agente viral debe poseer una elevada capacidad de resistencia a la inactivación por factores ambientales, inclusive persistiendo, sin menoscabo de su potencial infectivo, durante períodos prolongados de tiempo;
- en relación a la seguridad de su aplicación, el virus debe tener un rango de hospedador limitado, pudiendo resultar necesario que esté limitado a una única especie blanco;
- preferentemente, no debe estar emparentado filogenéticamente con otros virus capaces de infectar y replicarse en mamíferos;
- su genoma debe caracterizarse por su estabilidad, y además no debe integrarse al genoma del hospedador, total o parcialmente, ni debe recombinarse con los genomas de otros virus u otros organismos; y por último,
- se debe disponer de procesos de producción tecnológica y económicamente factibles que permitan asegurar el abastecimiento del agente viral a costos que resulten competitivos con otras alternativas de control, y en la escala que resulte necesaria.

Difícilmente un agente viral pueda cumplir satisfactoriamente con todas estas condiciones, pero aun así existen antecedentes de utilización exitosa de virus entomopatógenos sobre plagas de insectos lepidópteros en agricultura, como la aplicación del nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatilis* (AgMNPV) para el control de la oruga de las leguminosas en cultivos de soja, del granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) para el control de carpocapsa en manzanos, y del nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* (HearNPV) para el control del gusano de algodón, entre otros ejemplos (Haase *et al.*, 2015; Rohrmann, 2013).

Estos antecedentes muestran que estrategias similares podrían utilizarse para atacar invertebrados que comparten nuestro hábitat, y que a su vez son vectores de enfermedades para el ser humano, como los mosquitos.

El viroma asociado a mosquitos

Si bien no hay aún ejemplos concretos de aplicación de virus entomopatógenos para el control de mosquitos vectores de agentes infecciosos de importancia sanitaria, los cuales hayan podido superar las instancias preliminares de evaluación de factibilidad técnica y/o económica, existen descripciones de una variedad de virus que infectan y replican en ellos, e incluso algunos reúnen características que los hacen potenciales candidatos para el desarrollo de nuevas herramientas de control.

En vista de lo anterior, la caracterización de la colección de especies virales que circulan en mosquitos (viroma asociado) surge como un atractivo espacio de trabajo científico-tecnológico. Esto no solo para identificar potenciales estrategias que busquen afectar la salud de dichos organismos y así controlar su dimensión poblacional, sino también para caracterizar cuáles virus que multiplican en ellos también lo pueden hacer en vertebrados, siendo éstos los potencialmente peligrosos para el ser humano. Tales entidades se denominan arbovirus, derivado del inglés *arthropod-borne-viruses*, constituyendo un gran grupo de patógenos que incluyen al virus del dengue, al de la fiebre amarilla y a otros que provocan encefalitis en distintos mamife-

ros. Por tales razones es interesante descubrir y describir virus que sean sólo específicos de mosquitos, carentes de la capacidad de circulación en otros organismos, para propender a su empleo como bioinsecticidas (Bolling *et al.*, 2015).

Bajo las consideraciones anteriores, en la tabla 1 se describen algunos virus específicos de mosquitos con potencial aplicación para el control biológico, dado que no tendrían la capacidad de replicar en organismos vertebrados. En general, tales conclusiones derivan de evaluaciones experimentales que consisten en la exposición de células de mamíferos y roedores de laboratorio con dichas entidades, evaluando que no provoquen efectos citopáticos ni fisiológicos evidentes, y que el genoma viral no incremente su número de copias. Por otro lado y si bien no todos estos patógenos provocan la muerte del insecto infectado, o incluso muchas veces ni siquiera producen signos de patología, podrían de cualquier modo utilizarse para impedir que se multipliquen los arbovirus peligrosos para el ser humano, ya que se han observado efectos de incompatibilidad en la multiplicación de parásitos pertenecientes a distintas especies en un mismo hospedador.

Tabla 1. Virus de mosquitos que no afectan a los mamíferos.

Familia (genoma)	Género	Especie	Mosquito hospedador	Efecto en mosquitos	Referencia
<i>Flaviviridae</i> (1 RNAsc +)	<i>Flavivirus</i>	CFAV (<i>Cell fusion agent virus</i>)	<i>Aedes</i> spp. <i>Culex</i> spp.	Efectos citopáticos en cultivo celular (formación de sincicios) Aparentemente asintomáticos en mosquitos.	Cammissa - Parks <i>et al.</i> (1992)
		KRV (<i>Kamiti River virus</i>)	<i>Aedes</i> (<i>Neomelaniconion</i>) <i>macintoshi</i> Huang	Aparentemente asintomático en mosquitos.	Crabtree <i>et al.</i> (2003)
		CxFV (<i>Culex flavivirus</i>)	<i>Culex</i> spp.	Aparentemente asintomático en mosquitos.	Hoshino <i>et al.</i> (2007) Goenaga <i>et al.</i> (2014)
<i>Birnaviridae</i> (2 RNAdc)	<i>Entomobirnavirus</i>	CYV (<i>Culex Y virus</i>)	<i>Culex pipiens</i>	Efectos citopáticos en cultivo celular (aglutinación y estiramiento).	Marklewitz <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhabdoviridae</i> (1 RNAsc -)	No asignado	CTRV (<i>Culex tritaeniorhynchus rhabdovirus</i>)	<i>Culex</i> spp.	Efectos citopáticos moderados en cultivo celular.	Kuwata <i>et al.</i> (2011)
<i>Togaviridae</i> (1 RNAsc +)	<i>Alphavirus</i>	EILV (<i>Eliat virus</i>)	<i>Culex</i> spp.	Efectos citopáticos en cultivo celular (encogimiento, fusión o citólisis con desprendimiento de la superficie).	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>Tymoviridae</i> (1 RNAsc +)	<i>Maculavirus</i>	CuTLV (<i>Culex Tymoviridae-like virus</i>)	<i>Culex</i> spp.	Efectos citopáticos en cultivo celular (encogimiento, fusión o citólisis con desprendimiento de la superficie).	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>Reoviridae</i> (9 RNAdc)	<i>Dinovirnavirus</i>	APRV (<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>)	<i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>) <i>pseudoscutellaris</i> Theobald	Sin efectos citopáticos aparentes.	Attoui <i>et al.</i> (2005)
		FAKV (<i>Fako virus</i>)	Aparente rango de hospedador amplio en la naturaleza. <i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>) <i>albopictus</i>	Efectos citopáticos en cultivo celular (formación de sincicios y pérdida de adhesión a sustrato).	Auguste <i>et al.</i> (2015)
(10 RNAdc)	<i>Cypovirus</i>	UsCPV (<i>Uranotaenia sapphirina cypovirus</i>)	<i>Uranotaenia sapphirina</i> (Osten Sacken) <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>) <i>aegypti</i> <i>Aedes</i> (<i>Protomacleaya</i>) <i>triseriatus</i> (Say) <i>Anopheles</i> (<i>Nyssorhynchus</i>) <i>albimanus</i> Wiedemann	Poco sintomático en mosquitos.	Shapiro <i>et al.</i> (2005)
		AeDNV (<i>Aedes aegypti densovirus</i>)	<i>Aedes</i> spp. <i>Culex</i> spp. <i>Culiseta</i> spp.	Generalmente letal en larvas juveniles y virulento en adultos (dosis-dependiente).	Carlson <i>et al.</i> (2006)
<i>Parvoviridae</i> (1 DNAsc -/+)	<i>Brevidensovirus</i>	AaIDNV (<i>Aedes albopictus densovirus</i>)	<i>Aedes</i> spp.	Generalmente letal en larvas juveniles y virulento en adultos (dosis-dependiente).	Pham <i>et al.</i> (2013)
		AgDNV (<i>Anopheles gambiae densovirus</i>)	<i>Anopheles gambiae</i> Giles	Aparentemente asintomático en mosquitos. Replica preferentemente en adultos.	Ren <i>et al.</i> (2014)

Familia (genoma)	Género	Especie	Mosquito hospedador	Efecto en mosquitos	Referencia
(1 DNAsc -/+)	<i>Densovirus</i>	CpDNV (<i>Culex pipiens densovirus</i>)	<i>Culex pipiens</i>	Causa mortalidad en larvas de diferentes estadios.	Baquerizo-Audiot <i>et al.</i> (2009)
<i>Baculoviridae</i> (1 DNAdc)	<i>Deltabaculovirus</i>	CuniNPV (<i>nucleopoliedrovirus de Culex nigripalpus</i>)	<i>Culex</i> spp.	Generalmente letal en larvas de diferentes estadios.	Andreadis <i>et al.</i> (2003)
<i>Iridoviridae</i> (1 DNAdc)	<i>Chloriridovirus</i>	IIV-3 (<i>Invertebrate iridescent virus type 3</i>)	<i>Aedes</i> spp. <i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> <i>Culiseta annulata</i> (Schrank) <i>Culex (Neoculex) territans</i> Walker	Afecta en el estadio larval con enfermedad manifiesta y mayor tasa de muerte en el cuarto estadio.	Delhon <i>et al.</i> (2006)
		CpIV (<i>Culex pipiens iridescent virus</i>)	<i>Culex pipiens</i>	Afecta en el estadio larval. Asociado con el nematode <i>Strelkovimermis spiculatus</i> (Poinar y Camino).	Muttis <i>et al.</i> (2012)

RNAsc (RNA simple cadena); RNAdc (RNA doble cadena); DNAsc (DNA simple cadena); DNAdc (DNA doble cadena). Se indica el número de segmentos y la polaridad para la traducción con los signos + y -.

Cabe aclarar que muchos de los virus anteriores fueron caracterizados como parásitos crípticos de líneas celulares derivadas de mosquitos, sugiriendo

que provinieron de los insectos utilizados para su establecimiento. Sin embargo, algunos de ellos no han sido detectados aún circulando en la naturaleza.

Virus con potencial para el control de mosquitos

Entre todos los virus descritos de mosquitos, los baculovirus y los brevidensovirus, principalmente, y los iridovirus y los reovirus del género *Cypovirus*, en menor medida, se encuentran entre los que tienen mayores aptitudes. A continuación se revi-

sarán las características y propiedades de cada uno de ellos, enfatizando el tratamiento de aquellas cuestiones que resultan relevantes para su eventual aplicación en programas de control.

Baculovirus

Los baculovirus (familia *Baculoviridae*) poseen un conjunto de características que los colocan en una posición potencialmente relevante para el desarrollo de insecticidas, entre las que se deben destacar su especificidad por hospedadores invertebrados, elevada letalidad, estabilidad y persistencia ambiental. Además, su eficacia y seguridad han sido ya reiteradamente demostradas en el control de plagas de insectos lepidópteros en explotaciones agrícolas, hortícolas y forestales como antes se mencionó. Estos virus contienen un genoma de DNA doble cadena circular, cuyo tamaño varía entre 80 y 180 kpb, presente dentro de una nucleocápside de

simetría helicoidal (Rohrmann, 2013). Una de las características diferenciales es que durante su ciclo de replicación producen dos clases de viriones, con nucleocápsides idénticas, pero que difieren en el origen y la estructura de sus envolturas: por un lado los viriones brotados (BVs por *Budded Viruses*), que la adquieren al brotar en la membrana citoplasmática; y por otro los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs por *Occlusion Derived Viruses*), que la obtienen a partir de una membrana sintetizada de *novo* en el núcleo de las células infectadas (Fig. 1).

BACULOVIRUS

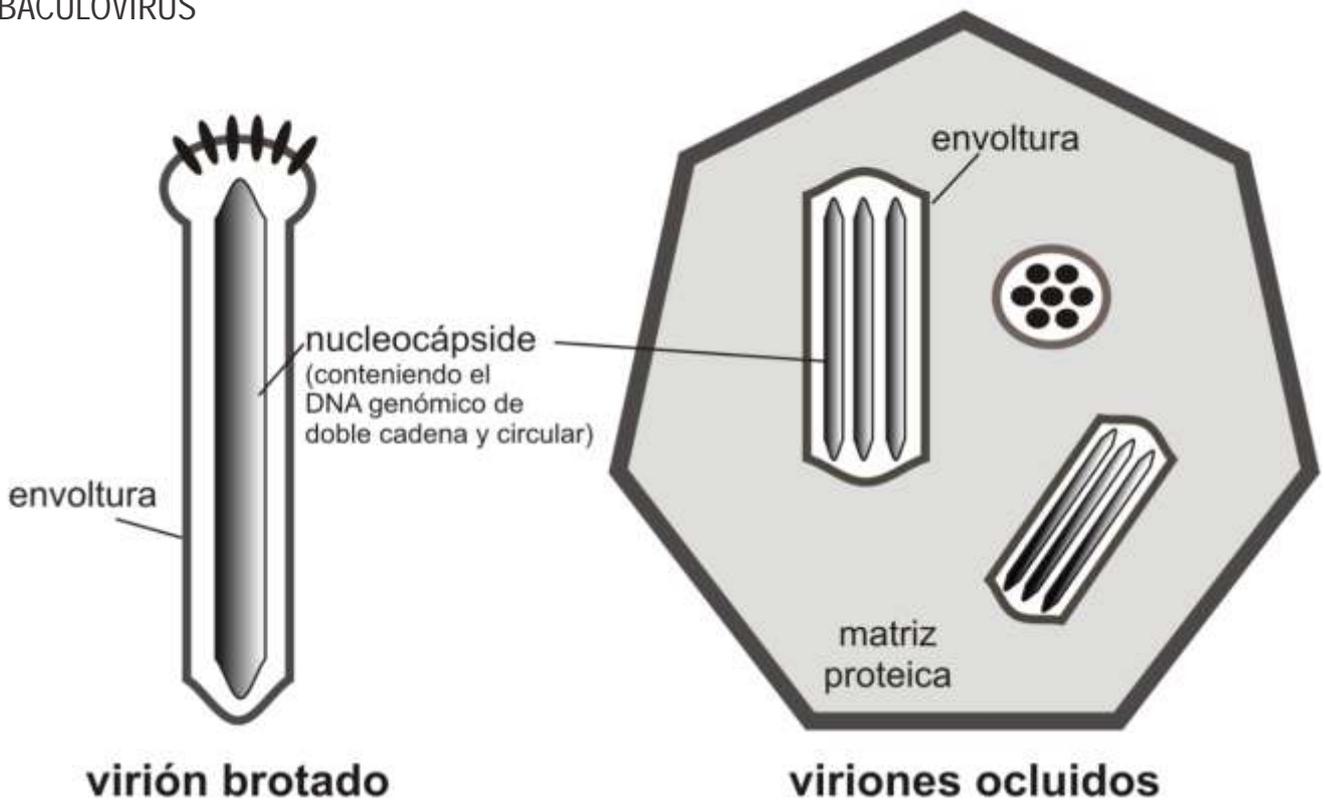


Figura 1. Representación de los fenotipos asociados a los viriones de los baculovirus del género *Deltabaculovirus*. Los viriones brotados y ocluidos no están en escala.

Además de presentar diferencias estructurales, los BVs y los ODVs cumplen distintas funciones. Mientras que los primeros transmiten la infección de célula a célula, los ODVs -viriones que son incluidos en estructuras proteicas cristalinas que les confieren resistencia a la inactivación ambiental, denominadas cuerpos de oclusión (OBs por *Occlusion Bodies*) son responsables de la transmisión viral entre hospedadores en el ambiente. Actualmente, en la familia *Baculoviridae* se distinguen cuatro géneros: *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- y *Deltabaculovirus* (Jehle *et al.*, 2006). En particular, los baculovirus que infectan dípteros están incluidos en el género *Deltabaculovirus*, dentro del cual la taxonomía vigente reconoce como única especie al nucleopoliedrovirus de *Culex nigripalpus* (Goenaga *et al.*, 2014) (CuniNPV) (ICTV, 2014). Sin embargo, se han descrito baculovirus en otras especies de mosquitos, incluidas en los géneros *Aedes* (Clark y Fukuda, 1971; Federici, 1980), *Anopheles* (Chapman, 1974), *Psorophora* (Chapman, 1974), *Uranotaenia* (Shapiro *et al.*, 2004) y *Wyeomyia* (Hall y Fish, 1974).

Por ser el mejor caracterizado hasta el presente, este apartado se enfocará en la revisión de la información existente sobre CuniNPV. Su genoma, ya secuenciado, es de 108.252 pb y contiene 109 genes putativos (Afonso *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2001). Está incluido en una nucleocápside de forma

bacilar, envuelta de manera individual en un virión cuyas dimensiones aproximadas son 200 nm de longitud y 40 nm de diámetro (Moser *et al.*, 2001). Los OBs, globulares y con un diámetro aproximado de 400 nm, contienen en promedio 4 ODVs cada uno, y carecen de la envoltura externa que poseen los OBs de los baculovirus que infectan insectos lepidópteros (Becnel y White, 2007). La homogeneidad de su tamaño y forma contrastan con la heterogeneidad descrita para los baculovirus aislados de *Aedes* (*Ochlerotatus*) *solicitans* (Walker) (Federici, 1980) y *Ur. sapphirina* (Shapiro *et al.*, 2004).

El ciclo de infección en un mosquito susceptible comienza cuando la larva ingiere los OBs que se encuentran en suspensión (Becnel y White, 2007). Luego, en el ambiente alcalino de la luz del intestino medio, se disuelven dando lugar a la liberación de los ODVs. Estos viriones atraviesan la membrana peritrófica, se adsorben sobre las microvellosidades, y su envoltura se fusiona con la membrana citoplasmática permitiendo que las nucleocápsides ingresen al citoplasma, para luego ser transportadas al núcleo en un evento que ocurre 2 a 4 horas después de la ingesta inicial. La expresión génica, regulada en forma de cascada, conduce primero al ensamblaje en el núcleo de nucleocápsides que migran al citoplasma, para brotar luego como BVs, que son liberados al espacio ectoperitrófico. Los BVs se adsorben

sobre las células del epitelio intestinal, en las que penetran luego por endocitosis. De esta manera, son responsables de propagar la infección en el intestino, afectando principalmente a las células del estómago posterior y los ciegos gástricos. Es curioso que la diseminación viral quede restringida al ámbito intestinal y no alcance a otros tejidos, como sí sucede con los baculovirus que infectan lepidópteros. En la fase final del ciclo, las nucleocápsides son retenidas en el núcleo de las células infectadas donde adquieren una envoltura sintetizada *de novo* y se ensamblan como ODVs, los cuales posteriormente quedan incluidos en la matriz proteica formando los OBs que se acumulan en el núcleo a partir de las 14 horas desde el inicio de la infección. Luego de la muerte de la larva infectada, los OBs son liberados al ambiente acuático y pueden ser ingeridos por nuevas larvas susceptibles, propagando así la infección.

Las larvas que son infectadas con CuniNPV sufren alteraciones severas de su aspecto y comportamiento, afectándose también su desarrollo (Moser *et al.*, 2001). A las 24 horas posteriores a la ingesta de OBs, las larvas presentan un tamaño menor que los controles no infectados, si bien continúan alimentándose activamente hasta después de 48 horas. A las 72 horas entran en letargo, quedan suspendidas de la superficie del líquido, y finalmente mueren a los 3 a 4 días. La transmisión viral no depende sólo de la susceptibilidad del insecto, sino que también es fuertemente dependiente de las características del ambiente acuático en el que entran en contacto la larva y el virus, y es especialmente influida por la composición salina. Becnel *et al.* (2001) determinaron que la eficiencia de infección con CuniNPV de larvas de *Culex quinquefasciatus* suspendidas en agua deionizada fue de sólo 0,2 %, pero se incrementó hasta 100 % cuando se adicionó una sal del catión magnesio (Mg II), a una concentración de 40 mM. El efecto del magnesio es inhibido por la adición de una sal de calcio (Ca), o de un quelante como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), demostrando la especificidad de su intervención como cofactor. Los mismos autores demostraron que las diferencias en la eficiencia de la infección en distintos tipos de efluentes se asocian con la relación de concentraciones Mg (II) / Ca (II) (Becnel *et al.*, 2001). Similar requerimiento fue demostrado para la infección con el baculovirus de *Ur. sapphirina* (Shapiro *et al.*, 2004).

La amplitud del rango de hospedadores de CuniNPV fue estudiado por Andreadis *et al.* (2003), quienes determinaron que la susceptibilidad está restringida a especies de mosquitos clasificados dentro del género *Culex*, subgénero *Culex*. Utilizando

Cx. quinquefasciatus como especie patrón, se determinó que la tasa de infección de larvas de tres a cuatro días con OBs purificados es dependiente de la dosis, alcanzándose un porcentaje de infección superior al 80 % a una concentración viral de $1,6 \times 10^7$ OBs/mL, a los dos días post-infección. Todas las larvas infectadas murieron a los cuatro días post-infección. La susceptibilidad de las larvas de *Cx. pipiens* y *Cx. pipiens f. molestus* Forskal resultó similar, pero la progresión del proceso resultó más lenta, alcanzándose porcentajes similares recién a los cuatro días. Las larvas de *Culex restuans* Theobald y *Culex salinarius* Coquillett resultaron menos susceptibles, obteniéndose tasas máximas de infección apenas superiores al 20 % para la primera especie, y de 48 % para la segunda. Por otro lado, los ejemplares de *Cx. territans* no resultaron susceptibles a CuniNPV. Tampoco se advirtieron signos de infección cuando los bioensayos se practicaron sobre larvas de *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen), *Aedes (Ochlerotatus) canadensis* (Theobald), *Aedes (Ochlerotatus) cantator* (Coquillett), *Aedes (Ochlerotatus) communis* (de Geer), *Aedes (Ochlerotatus) excrucians* (Walker), *Aedes (Hulecoeteomyia) japonicus* (Theobald), *Aedes (Ochlerotatus) stimulans* (Walker) y *Ae. triseriatus*.

El potencial de CuniNPV para ser utilizado como un agente insecticida ha sido revisado por Becnel (2006). Entre las propiedades favorables se debe mencionar que este virus ha demostrado poseer una elevada virulencia para la mayoría de las especies de *Culex* spp., incluso para aquellas que actúan como vectores de virus de importancia sanitaria, como *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV) y *West Nile virus* (WNV). CuniNPV es efectivo en ambientes acuáticos eutrofizados, donde además es capaz de persistir y reciclarse. El rango de temperaturas tolerado es amplio: los OBs son resistentes hasta 50 °C, y efectivos a temperaturas tan bajas como 17 °C. Desde el punto de vista de su producción, se han establecido procedimientos para su amplificación *in vivo* en larvas de mosquitos, donde se alcanzan elevados rendimientos específicos y altas productividades. Por otro lado, el producto viral preparado a partir del macerado de larvas infectadas, puede ser conservado a 4 °C en forma de suspensión, o alternativamente como polvo secado al aire. Como contrapartida, una de las limitaciones más severas es el requerimiento absoluto de la presencia de sales de magnesio (II) en los ambientes acuáticos en los que se debe aplicar el virus. Además, hasta el presente no se ha descrito el desarrollo de procedimientos que permitan multiplicar CuniNPV *in vitro* utilizando cultivos celulares.

Brevidensovirus

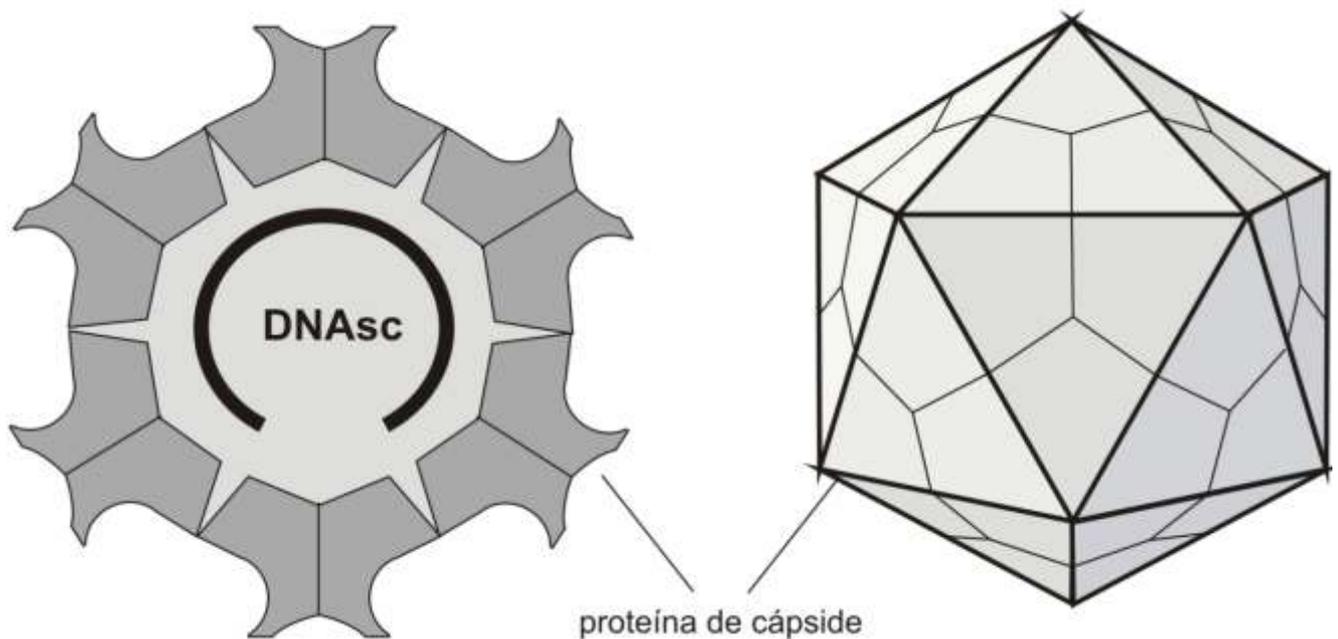


Figura 2. Representación del fenotipo asociado a los viriones de brevidensovirus (adaptado de viralzone.expasy.org).

Los brevidensovirus, como todos los miembros de la familia *Parvoviridae*, carecen de envoltura, son de simetría icosaédrica y tienen un diámetro de 21 a 22 nm (Berns y Parrish, 2007). La cápside está compuesta por 60 subunidades de la proteína denominada VP (por *Viral Protein*) (Fig. 2). El genoma de DNA de simple cadena tiene un tamaño de 4,1 kb, presentando en los extremos dos grandes secuencias con repeticiones invertidas en forma de horquilla (Afanasiev *et al.*, 1991). En el interior de la mayoría de las cápsides se incluyen genomas de polaridad negativa, aunque algunas partículas contienen moléculas de polaridad positiva. El genoma posee tres marcos de lectura abiertos, correspondientes a dos proteínas no estructurales denominadas NS1 y NS2 (por sus abreviaturas del inglés *Non-Structural*), y a la proteína de la cápside VP (Pham *et al.*, 2013). En AaeDNV se localizaría otro promotor sobre la cadena complementaria, cuyo producto de expresión no ha sido identificado (Afanasiev *et al.*, 1991).

Los brevidensovirus infectan específicamente células de mosquitos, en las cuales se replican de manera autónoma, sin requerir de la coinfección con virus auxiliares como sucede con otros parvovirus. Los viriones penetran en las células susceptibles por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores, dependiente de clatrina (Vendeville *et al.*, 2009). Una vez internalizados en los endosomas, atraviesan su membrana permeabilizada y son liberados al citoplasma, para ser luego transportados al núcleo, donde desnudan su genoma para replicarlo. Para

ello, es necesario que la célula se encuentre en multiplicación, ya que la replicación viral sólo se activa en la fase S del ciclo celular (Berns y Parrish, 2007). Este proceso comienza con la síntesis de la cadena de DNA de secuencia complementaria al genoma parental, con la participación de enzimas celulares (DNA polimerasa y DNA helicasa). Luego, se inicia la expresión de los genes virales, primero los correspondientes a las proteínas no estructurales y luego al polipéptido VP. Posteriormente, se producen copias del genoma por un mecanismo de horquilla rodante, con NS1 unida al extremo 5' de la molécula de DNA. Esta proteína es una endonucleasa, que además tiene función de helicasa. En tanto NS2, el otro polipéptido no estructural, no parece ser esencial para la replicación viral. Las moléculas de DNAsc sintetizadas pueden ser encapsidadas para formar nuevos viriones, o bien transformarse en DNAdc para la amplificación ulterior de los procesos de replicación y transcripción. Finalmente, el ensamblado se produce en el núcleo celular, el cual se hipertrofia (la característica distintiva de las infecciones por estos virus) y puede aparecer rebosante de cuerpos de inclusión debido a la acumulación de partículas virales, como sucede en la replicación de AaIDNV. En cambio, durante la multiplicación de AaeDNV los viriones de la progenie se acumulan en el citoplasma. La liberación posterior ocurre a consecuencia de la lisis celular.

La patogénesis en mosquitos ha sido estudiada mediante una serie de elegantes experimentos

empleando virus que expresan genes indicadores (Gu *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2001). Cuando larvas de primer estadio de *Ae. aegypti* se infectaron con AaIDNV, al cual son susceptibles, los primeros signos de expresión del genoma viral recombinante se advirtieron sobre la papila anal, por lo cual se considera probable que ese sea el sitio por el cual el virus ingresa al insecto (Ward *et al.*, 2001). También se ha demostrado actividad temprana de replicación en las células de las cerdas, que podrían constituir una vía alternativa de ingreso. Resultados similares se obtuvieron en larvas de *Ae. albopictus* (Gu *et al.*, 2010). En cambio las células del intestino medio, puerta principal para la invasión por parte de numerosos virus entomopatógenos, parecen ser refractarias a la infección, o al menos poco susceptibles. Dentro de los dos días posteriores el virus se disemina a las células del cuerpo graso, y posteriormente también a células de otros tejidos, como fibras musculares, neuronas, hipodermis, hemocitos, células traqueales y discos imaginales. A medida que progresa la infección, las larvas se muestran letárgicas, con abdomen anormalmente curvo, y a menudo se las encuentra colgando de la superficie del líquido. La muerte suele ocurrir entre los 7 y 10 días post-infección, antes de lo cual los insectos pierden su pigmentación y aparecen de color blanquecino.

Los brevidensovirus considerados no replican en animales vertebrados ni son capaces de infectar insectos lepidópteros u otros dípteros diferentes a mosquitos, pero el rango de hospedadores es variable, de acuerdo a la cepa viral que se considere. Por ejemplo, AaIDNV no sólo infecta larvas de *Ae. albopictus*, ya que puede transmitirse a larvas de *Ae. aegypti*, y también, mediante inoculación, a mosquitos adultos de la misma especie. Por otro lado, AaeDNV se transmite horizontalmente a larvas de *Ae. aegypti* y de *Ae. albopictus*, como así también a larvas de varias especies dentro de los géneros *Culex* y *Aedes* (*Ochlerotatus*). Por el contrario, la especificidad de AgDNV parece ser mayor, ya que sólo infecta y se replica eficientemente en ejemplares de *An. gambiae* y en cultivos de células derivados de esta especie o de otras relacionadas, alcanzándose niveles mucho más bajos de infección y replicación en mosquitos pertenecientes a otros géneros (Ren *et al.*, 2008).

La letalidad de la infección de larvas de mosquitos con brevidensovirus es dependiente de la dosis, y además resulta afectada por la influencia de diversos factores (Barreau *et al.*, 1996). La edad de los ejemplares es uno de ellos: mientras que casi el 100 % de las larvas de *Ae. aegypti* de un día mueren cuando son infectadas con un inóculo de AaIDNV preparado a partir de cultivos de células de mosquitos infectadas, la tasa de mortalidad se reduce, y una proporción de los ejemplares infectados alcanza la

adultez, si la inoculación se realiza sobre larvas de 3 a 4 días. La temperatura de incubación también afecta la tasa de mortalidad, que resulta máxima a 27 °C y declina a temperaturas inferiores o superiores. Otro factor que influye es la forma en que se suministra el inóculo viral: las larvas infectadas finamente trituradas son más efectivas, como fuente de infección, que las larvas infectadas sin triturar o que el agua en la cual se han criado, indicando que el virus ingresa al hospedador con mayor facilidad cuando es administrado en un soporte biológico de tamaño suficientemente pequeño. Las tasas de letalidad también son afectadas de manera directamente proporcional por la densidad de las larvas en el medio acuático de cría y por el tiempo de contacto con el inóculo. Por otro lado, se ha descrito que distintas cepas de brevidensovirus presentan diferencias en su capacidad patogénica para una misma especie de mosquitos, como así también que poblaciones de mosquitos de la misma especie, pero de diferente origen, presentan distintos niveles de susceptibilidad y mortalidad (Hirunkanokpun *et al.*, 2008). Inclusive, la infección con AgDNV no produce ningún efecto patogénico en larvas de *An. gambiae*, aunque este virus es patógeno en adultos de la misma especie (Ren *et al.*, 2008). Esta capacidad ha sido demostrada también para otras cepas, pero de manera menos virulenta (Barreau *et al.*, 1996).

Luego de ingresado el virus en la larva, la muerte del insecto ocurrirá en dicha etapa, o bien cuando los individuos afectados hayan alcanzado los estados de pupa o adulto. De hecho, los picos de mortalidad se concentran en el momento en que se produce la metamorfosis de larva a pupa, principalmente, pero también durante el desarrollo a adulto y en el momento de la oviposición en las hembras, probablemente por tratarse de instancias en las cuales los requerimientos energéticos se incrementan (Beckel y White, 2007). Además de la letalidad, estas infecciones se pueden manifestar de manera menos dramática pero afectando negativamente la longevidad, la fertilidad y la fecundidad de los insectos que permanecen persistentemente infectados (Suchman *et al.*, 2006). Estos mosquitos que sobreviven mantienen la circulación viral en la población y, si son hembras, constituyen además la fuente para la transmisión vertical del virus a su progenie, y para la transmisión horizontal por vía venérea durante la copulación. De esta manera, la persistencia de la infección en individuos adultos contribuye a sostener la circulación en el tiempo, además de favorecer su dispersión en el espacio. Este proceso ha sido relacionado con la generación de genomas defectivos, cuya emergencia contribuiría a modular la virulencia de la infección. Roekring *et al.* (2006) sometieron a generaciones sucesivas de una población de *Ae. aegypti* a infecciones seriadas con un lote de AaIDNV,

y determinaron un incremento progresivo de la tasa de supervivencia en cada nueva generación. En estos desafíos sucesivos se demostró la persistencia de la infección en una proporción de las hembras sobrevivientes, que de esta manera estarían en condiciones de transmitir el virus verticalmente a la progenie. El análisis de los genomas virales aislados de cada generación mostró un paulatino enriquecimiento en moléculas defectivas, las cuales podrían interferir con la replicación del genoma completo. Esto podría explicar la reducción en la tasa de mortalidad en las poblaciones de larvas persistentemente infectadas. La generación de estas partículas defectivas interferentes (DIPs) ha sido también demostrada en cultivos de células de mosquitos infectados persistentemente con brevidensovirus, caracterizados por una reducción del efecto citopático asociado, en comparación con los cultivos expuestos a poblaciones virales libres de genomas defectivos (Roerking *et al.*, 2006). Precisamente estos cultivos, que no muestran evidencias de actividad citolítica, han sido una de las fuentes para el aislamiento de algunas de las cepas actualmente conocidas de brevidensovirus.

Esta capacidad de establecer infecciones persistentes podría afectar la competencia del mosquito hospedador para replicar otros virus. En tal sentido, Wei *et al.* (2006) informaron que la persistencia de una cepa de AaIDNV en ejemplares adultos de *Ae. albopictus* interfirió con la replicación de virus dengue de tipo 2, que se replicó de manera menos eficiente en relación a un grupo control que no estaba infectado con el brevidensovirus. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en experimentos realizados *in vitro*, en cultivos de células de mosquitos infectados persistentemente con brevidensovirus, que ante la sobreinfección con virus dengue 2 (Burivong *et al.*, 2004) o dengue 3 (Mosimann *et al.*, 2011), exhibieron evidencias de limitación en la replicación del virus sobreinfectante. Por el contrario Kanthong *et al.* (2008), en experimentos de coinfección de cultivos celulares con AaIDNV y dengue 2, no pudieron demostrar la existencia de interferencias recíprocas significativas en la infección y la replicación de ambos virus. Por lo tanto, será necesario establecer con precisión las condiciones que podrían conducir al establecimiento de una efectiva interferencia de la infección con brevidensovirus

sobre la sobreinfección con flavivirus que se transmite a seres humanos, fenómeno que podría utilizarse con el propósito de limitar la competencia vectorial en mosquitos de importancia sanitaria.

Una de las limitaciones más importantes para la aplicación de brevidensovirus en el control de mosquitos es que su actividad es dependiente de la dosis aplicada, y que se requieren dosis relativamente elevadas para alcanzar un efecto insecticida relevante (Ledermann *et al.*, 2004). Barreau *et al.* (1996) determinaron que era necesario el producto viral obtenido de 50 larvas muertas para alcanzar una tasa de letalidad cercana al 90 % cuando 250 larvas de *Ae. aegypti* de primer estadio fueron infectadas con AaIDNV. Por otro lado, Gu *et al.* (2010) determinaron que el valor de la DL_{50} de AeDNV en larvas de primer estadio de *Ae. albopictus* es de 109,37 copias de DNA viral por mL. La necesidad de aplicar altas dosis de estos virus para alcanzar niveles significativos de control obliga a desarrollar sistemas de amplificación viral muy eficientes. En tal sentido, la producción de brevidensovirus se puede llevar a cabo en larvas de mosquitos o en cultivos de líneas celulares de mosquitos persistentemente infectados (Barreau *et al.*, 1994). En relación a la producción *in vitro*, se ha descrito la multiplicación de brevidensovirus en cultivos en suspensión de células de mosquitos en medios libres de suero fetal, una tecnología que haría asequible el objetivo de producir estos patógenos a gran escala (Suchman y Carlson, 2004).

Hasta el presente existe un único antecedente acerca del desarrollo de un producto de naturaleza viral para el control de mosquitos. *Viroden* fue una formulación basada en el brevidensovirus 1 AaeDNV, desarrollada en la Unión Soviética para el control de *Ae. aegypti*, que mostró una efectividad de 77 % en la reducción del número de larvas en ensayos de campo (Buchatsky *et al.*, 1987). La formulación pasó favorablemente los diferentes controles de toxicidad e inocuidad para otras especies, pero nunca se llegaron a realizar las pruebas de campo a mayor escala que hubieran permitido completar el desarrollo del producto y su consecuente aplicación (Becnel y White, 2007). La línea de desarrollo de este producto fue discontinuada luego de la desaparición de la U.R.S.S.

Iridovirus

Los iridovirus (Familia *Iridoviridae*) constituyen un amplio y diverso conjunto de virus, cuyo nombre se debe a la iridiscencia típica que caracteriza a los invertebrados infectados (Williams, 1996). Los viriones, que contienen un genoma de DNA doble

cadena lineal de entre 180 y 305 kb, son de forma poliédrica con un diámetro que oscila entre 120 y 350 nm. La cápside está recubierta por dentro por una membrana lipídica. En tanto, los viriones pueden poseer una envoltura externa, o carecer de la misma,

dependiendo de la forma en que abandonan la célula en que fueron ensamblados: la poseen si el egreso se produce por brotación en la membrana plasmática; pero se encuentran desnudos cuando se acumulan en el citoplasma y son liberados luego de la lisis celular (Fig. 3). El ciclo de replicación sucede en el núcleo celular, pero el ensamblaje de la progenie ocurre en

el citoplasma, donde se acumulan los viriones. Las características descritas permiten incluir a los miembros de esta familia dentro del grupo de los grandes virus con genoma de DNA, de replicación nucleocitoplasmática, para los cuales se ha propuesto el establecimiento del nuevo orden *Megavirales* (Colson *et al.*, 2013).

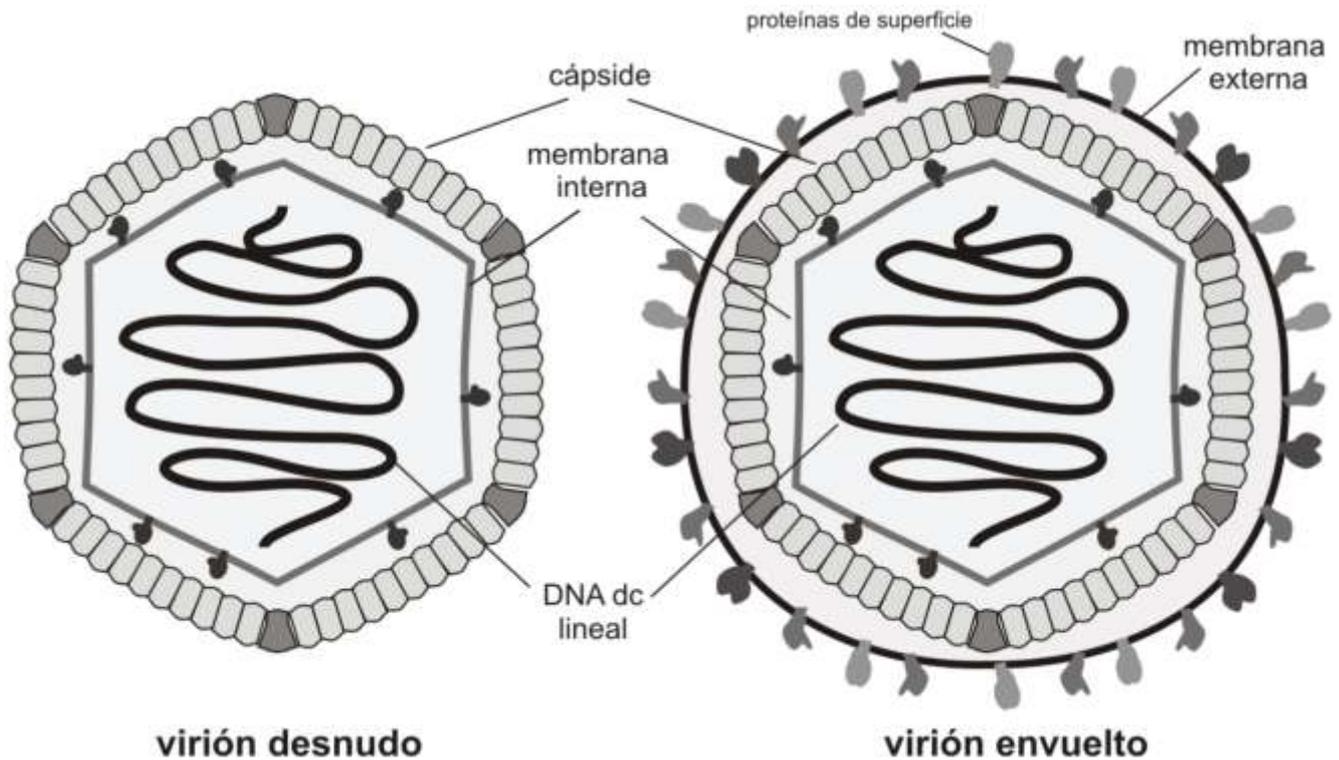


Figura 3. Representación de los fenotipos asociados a los viriones de iridovirus (adaptado de viralzone.expaasy.org).

Los iridovirus pueden infectar tanto animales vertebrados poiquilothermos como invertebrados. Aquellos que infectan invertebrados se clasifican en los géneros *Iridovirus* y *Chloriridovirus*, dos de los cinco reconocidos dentro de la familia (ICTV, 2014). En el primero de ellos, la clasificación vigente reconoce la existencia de dos especies (*Invertebrate iridiscient virus 1* e *Invertebrate iridiscient virus 6*), mientras que en el segundo se clasifica solo a *Invertebrate iridiscient virus 3*, también conocido como virus iridisciente de mosquitos (MIV). Las infecciones por MIV han sido descritas en ejemplares de los géneros *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Aedes (Ochlerotatus)* y *Psorophora* (revisados por Williams, 2008), y más recientemente también en *Anopheles* (Huang *et al.*, 2015).

En general las infecciones producidas por las especies del género *Iridovirus*, que pueden afectar a artrópodos de diferentes órdenes incluyendo dípteros, tienden a ser encubiertas (Williams, 1996; 2008). Sin embargo, pueden influir sobre la longevidad y la tasa de reproducción de los especímenes infectados. Por el contrario MIV exhibe un marcado tropismo por mosquitos, en los cuales tiende a produ-

cir infecciones con manifestaciones típicas (iridescencia verde-amarillenta, naranja o turquesa, localizada por debajo de la epidermis) y elevada letalidad (Williams, 2008), si bien se han descrito también infecciones con bajo porcentaje de letalidad (Marina *et al.*, 1999; Muttis *et al.*, 2013). La transmisión horizontal en mosquitos se produciría a través de cortes o discontinuidades en la cutícula o en la membrana peritrófica de las larvas (Williams, 1996); la coinfección con nematodos podría también facilitar el ingreso viral (Mullens *et al.*, 1999; Muttis *et al.*, 2013). En tanto, el canibalismo en condiciones de alta densidad larvaria, también ha sido propuesto como una vía alternativa de transmisión horizontal (Marina *et al.*, 2005), al igual que la vía transovárica que haría posible la transmisión vertical. Las larvas recién eclosionadas son más susceptibles, pero la mortalidad se incrementa cuando las mismas alcanzan el cuarto estadio de desarrollo. El órgano más afectado, y el primero en ser alcanzado es el cuerpo graso, para posteriormente llegar también a la epidermis, donde se hacen claramente visibles las manifestaciones de la infección.

A pesar de la comprobada patogenicidad de los iridovirus, se considera que su potencial como agentes de control biológico de mosquitos de importancia sanitaria es escaso (Williams, 2008). Esta consideración está basada, principalmente, en las dificultades para establecer infecciones, en el elevado porcentaje de infecciones encubiertas, y en el

amplio espectro de hospedadores que revelan los ensayos en laboratorio. Tampoco se han desarrollado procesos de producción viral, ni se han establecido mínimamente las condiciones de formulación y aplicación del virus para su utilización en acciones de control de plagas de mosquitos.

Cypovirus

La familia *Reoviridae* incluye varias especies de virus que infectan y producen patologías en insectos, en particular entre aquellos clasificados en los géneros *Dinovernavirus* (Auguste *et al.*, 2015) y *Cypovirus* (Becnel y White, 2007), incluidos en la sub-familia *Spinareovirinae*, y en el género *Seadornavirus* (Lv *et al.*, 2012), de la sub-familia *Sedoreovirinae*. Entre estos sólo los cypovirus, llamados así por producir cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos característicos, han recibido atención por su potencial utilización como agentes insecticidas aplicables al control de mosquitos. Actualmente, ICTV reconoce 16 especies dentro del género *Cypovirus* (*Cypovirus* 1 a 16), 15 de los cuales infectan insectos lepidópteros, y el restante himenópteros. Para los cypovirus que infectan mosquitos se ha propuesto el reconocimiento de una nueva especie (*Cypovirus* 17) (Green *et al.*, 2006), aún no reconocida formalmente en la última taxonomía viral difundida por ICTV (2014), denominado UsCPV o cypovirus de *Ur. sapphirina*. Se han descrito también evidencias de infección por cypovirus en otras especies de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Orthopodomyia*, *Psorophora* y *Uranotaenia* (Clements, 2012;

Federici, 1980).

Los viriones de cypovirus, que carecen de envoltura, tienen un diámetro de alrededor de 65 nm. La cápside, a diferencia de la de otros miembros de la misma familia *Reoviridae*, está formada por una única capa de la proteína viral VP1, y se caracteriza, además, por exhibir 12 protrusiones en cada uno de los vértices de los ejes de simetría quintuple de la nucleocápside (Fig. 4). El genoma es de RNA doble cadena, y consiste en diez fragmentos cuyos tamaños varían entre 1 y 4,2 kpb, codificando para la síntesis de 10 a 12 proteínas. Entre ellas se encuentra la poliedrina, cuya cristalización conduce a la formación de los cuerpos de inclusión. Estos, que se acumulan en el citoplasma de las células donde se replican, pueden ser de dos tipos diferentes: pequeños (0,1 µm) y regulares, de forma cuboide, conteniendo uno o unos pocos viriones; o grandes (hasta 3 µm) y de forma irregular, conteniendo muchos viriones (Zhang *et al.*, 1999). Los cuerpos de inclusión le otorgan resistencia frente a la acción de los distintos factores del medio y favorecen su persistencia ambiental.

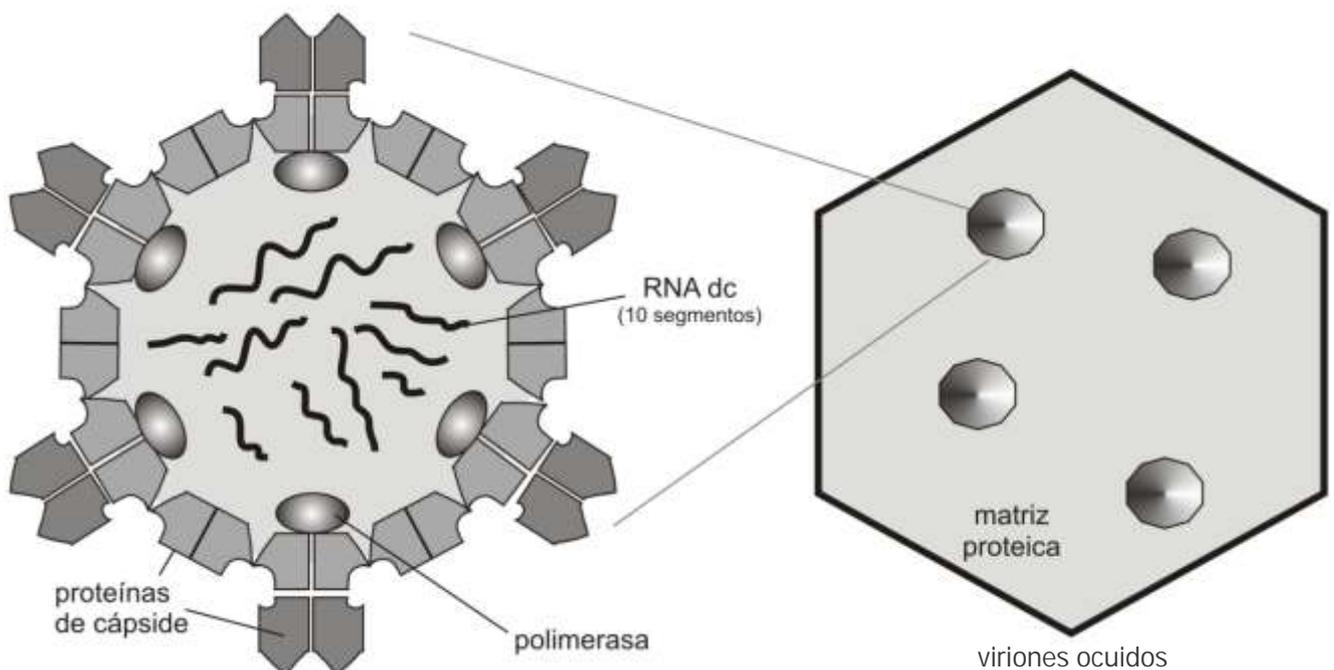


Figura 4. Representación del fenotipo asociado a los viriones de cypovirus (adaptado de viralzone.expasy.org).

Los cypovirus se replican en el citoplasma de las células que infectan. Luego de la adsorción y la internalización por endocitosis, la partícula es parcialmente desnudada en el interior del endosoma, y posteriormente liberada al citoplasma, de tal manera que las moléculas genómicas nunca quedan totalmente desnudas. Esto limita la activación de los mecanismos de respuesta celular intrínsecos estimulados por la exposición a RNA doble cadena, que podrían resultar en una inhibición de la replicación viral. La transcripción temprana del genoma por la RNA polimerasa viral se lleva a cabo en el interior de las partículas subvirales, dando origen a una molécula de RNA de polaridad positiva por cada fragmento genómico. Los transcritos son luego traducidos, dando origen a los polipéptidos virales, funcionales y estructurales. Posteriormente, el ensamblaje de los polipéptidos estructurales y las moléculas de RNAsc de polaridad positiva, que se lleva a cabo en factorías virales citoplasmáticas (estroma virogénico), conduce a la formación de partículas subvirales en cuyo interior la RNA polimerasa viral cataliza la síntesis de la cadena complementaria, dando origen a los fragmentos genómicos de la progenie. Las partículas virales, mientras aún se encuentran en el interior del estroma virogénico, quedan incluidas en los cuerpos de oclusión que se forman por la deposición, alrededor de ellas, de una matriz cristalina formada por la proteína poliedrina (Andreadis, 1986). Así, los cuerpos de oclusión conteniendo a los viriones quedan retenidos en el citoplasma hasta la muerte y poste-

rior lisis de la célula infectada.

El rango de hospedadores susceptibles de los cypovirus que infectan mosquitos es relativamente amplio. Por ejemplo, se ha demostrado que UsCPV es capaz de infectar larvas de mosquitos de otras especies dentro del mismo género, y también de otros géneros (Shapiro *et al.*, 2005). La transmisión horizontal, que se produce naturalmente *via per os*, para ser eficiente requiere de la presencia de sales de magnesio (II), y es inhibida por la presencia de Ca (II) (Shapiro *et al.*, 2005). La infección en las larvas, que alcanza sólo a las células localizadas en los ciegos gástricos y en la parte posterior del estómago, en la mayoría de los casos no resulta letal. Los síntomas incluyen la reducción de la ingesta, la disminución del crecimiento y el retardo en el desarrollo. Los insectos que sobreviven y alcanzan el estado adulto, en ocasiones deformes y con reducción de la fecundidad y la expectativa de vida, pueden quedar persistentemente infectados y constituir la fuente para la transmisión vertical de estos patógenos (Becnel y White, 2007).

Los cypovirus que infectan mosquitos, en condiciones adecuadas, son altamente infecciosos, y además tienen una elevada capacidad para persistir en el ambiente. A pesar de estas propiedades que favorecen su potencial utilización como insecticidas, se ha prestado escasa atención a esta posibilidad. La principal razón es que una alta proporción de los insectos infectados no manifiesta una patología aguda, sino más bien crónica (Clements *et al.*, 2012).

Antecedentes sobre virus patógenos específicos de mosquitos en Argentina y en América Latina

Entre los virus que son capaces de infectar mosquitos, sólo aquellos que son transmitidos a seres humanos u otros mamíferos (arbovirus) han sido objeto de considerable atención en la República Argentina. En cambio, no hay casi antecedentes acerca de investigaciones efectuadas sobre virus patógenos exclusivos de mosquitos. Recién en el año 2012 se identificó y caracterizó un iridovirus que infecta mosquitos del género *Culex*, el primer registro de un virus iridiscente que infecta naturalmente larvas de *Cx. pipiens* (Muttis *et al.*, 2012). La infección fue detectada por la típica apariencia iridiscente de una muestra de larvas que fueron colectadas en una zanja de los suburbios de la ciudad de La Plata. El 16 % de los 151 ejemplares analizados mostró signos típicos de infección, y la observación por microscopía electrónica de cortes del cuerpo graso de los mosquitos infectados reveló la presencia de partículas con un diámetro promedio de 158 nm, de forma hexago-

nal, con un núcleo central denso rodeado de una zona más clara. El análisis de la secuencia de un fragmento de aproximadamente 300 pb del gen que codifica para la proteína principal de la cápside (MCP), obtenido a partir de DNA viral extraído de las larvas infectadas, como así también de la secuencia aminoacídica deducida, permitió agruparlo con los miembros del género *Chloriridovirus*, dentro del cual se clasifican la mayoría de los iridovirus que producen infecciones sintomáticas en mosquitos. Posteriormente, se determinó que más del 80 % de las larvas de *Cx. pipiens* colectadas a campo e infectadas con este iridovirus, estaban simultáneamente infectadas con el nematodo *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino (Muttis *et al.*, 2013). En experimentos realizados en laboratorio se determinó, además, que la infección con el nematodo es un requisito para que las larvas resulten infectadas por el virus, postulándose que el parásito podría desem-

peñar un rol relevante en la invasión viral. En estos estudios, la mortalidad no superó el 10 % a las 72 horas; pero posteriormente, el 82,5 % de los individuos infectados murieron, mostrando la potencial utilidad de este virus.

Por otro lado, recientemente se han realizado ensayos dirigidos a evaluar el potencial de un flavivirus específico de mosquitos, el virus Nuhmirim (NHUV) (Pauvolid-Correa *et al.*, 2015), para interferir con la replicación de un arbovirus, WNV, en cultivos celulares, como así también sobre su replicación en mosquitos y su transmisibilidad (Goenaga *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos demuestran que NHUV efectivamente interfiere con la replicación de WNV en cultivos de dos líneas celulares diferentes, reduciendo significativamente los rendimientos del virus patógeno para humanos. En relación a la replicación en mosquitos, la coinfección con NHUV no redujo significativamente los rendimientos de WNV, tanto en *Cx. pipiens* como en *Cx. quinquefasciatus*. Sin embargo, en esta última especie se pudo verificar que la coinfección con NHUV reduce la concentración de WNV en saliva, y por lo tanto su potencial de transmisión por esa vía.

En el resto de los países de América Latina la situación es muy similar a la registrada en la República Argentina, con escasos registros de virus patógenos específicos de mosquitos. Araujo Coutinho *et al.* (2012) describieron la infección con un baculovirus, estrechamente relacionado con CuniNPV, en larvas de *Cx. quinquefasciatus* colectadas en la ciudad de Caraguatuba, en el Estado de San Pablo, Brasil. La prevalencia de las infecciones naturales con este baculovirus fue inferior a 0,01 %. Por otro lado, también en Brasil, se describió el aislamiento de un brevidensovirus a partir de un cultivo de la línea celular

C6/36 (Mosimann *et al.*, 2011). El análisis de la secuencia del genoma viral reveló una estrecha relación con AaeDNV. Una de las características de mayor interés descriptas para este aislamiento es su capacidad para interferir con la replicación del virus dengue.

Resulta obvio decir que la exigua información existente sobre virus patógenos específicos de mosquitos en América Latina no responde a su escasez, sino a la falta de estudios emprendidos para poner en evidencia su presencia, riqueza y abundancia. Si se considera que el subcontinente alberga algunas de las regiones de mayor biodiversidad del planeta, que incluye una amplísima diversidad de culícidos, resulta razonable suponer que es igualmente rico el espectro de virus que los utilizan como hospedadores para su replicación, entre los cuales seguramente se encontrarán nuevas entidades con propiedades aptas para ser utilizadas como agentes de control de mosquitos. Por otro lado, ni la Argentina ni el resto de América Latina han resultado escenarios para el emprendimiento de experiencias destinadas a desarrollar o implementar programas de control de mosquitos basados en el uso de virus patógenos específicos. Si bien esta carencia está relacionada con la ausencia de una tradición científico-tecnológica en la materia, resulta paradójico que este sea también el continente en el cual se han desarrollado algunas de las experiencias más exitosas de utilización de virus entomopatógenos para el control de plagas de insectos lepidópteros en la agricultura, experiencia cuya transferencia podría contribuir a abreviar el desarrollo de procesos de producción de virus patógenos específicos de mosquitos de importancia sanitaria, como así también su aplicación en programas de control.

Perspectivas

El uso clásico de virus como agentes de control de poblaciones de mosquitos está restringido por una serie de limitaciones biológicas, tecnológicas y económicas, que se discutieron previamente. Como consecuencia de ellas, todavía no han surgido formulaciones exitosas aplicadas en campo, aunque existen investigaciones dirigidas a mejorar algunos de los aspectos mencionados anteriormente como obstá-

culos. La factibilidad de modificar esta situación podrá depender, por un lado, del mejoramiento de los productos virales y las tecnologías insecticidas ya conocidas, pero además, y principalmente, de la generación de nuevos conceptos, nuevos productos y nuevas tecnologías.

A continuación se revisarán algunas de las líneas de investigación y desarrollo más promisorias.

Exploración del viroma específico de mosquitos

Como se ha descrito, el viroma específico de mosquitos es una fuente de potenciales principios activos para la producción de bioinsecticidas que colaboren en el control de estos organismos. Una exploración más profunda y extensa de ese viroma

con el objeto de identificar y aislar patógenos virales desconocidos hasta el momento, o de cepas más virulentas de especies ya conocidas, podría resultar en una fuente de nuevos agentes útiles para el control de mosquitos de importancia sanitaria (Bolling *et*

al., 2015b). A este respecto, no puede dejar de mencionarse que la gran mayoría de los virus patógenos de mosquitos que han sido descritos hasta el presente corresponden a aislamientos efectuados en USA y Europa (Federici, 1980; Williams, 2008), y que recién en los últimos años se han empezado a describir nuevos aislamientos procedentes de Asia, América Latina y África, en algunos casos de virus que presentan características novedosas, no descritas previamente (Schuster *et al.*, 2014), por lo cual el repertorio de patógenos virales de mosquitos no parece estar agotado, ni mucho menos. En particular, para algunos mosquitos cuyas poblaciones tienden a expandirse a escala global, como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, la exploración de sus respectivos ambientes de origen podría dar por resultado el hallazgo de patógenos virales específicos, no identificados hasta el presente, que podrían jugar roles relevantes en la regulación natural de las poblaciones de los culicidos ancestrales en dichos ambientes. Como es

bien sabido, cuando un organismo se expande desde su lugar original y se transforma en invasivo, una de las razones de su éxito radica en que los ambientes invadidos carecen de los enemigos naturales y patógenos que contribuyen al control de su población en el ámbito de origen. Si bien es cierto que los virus, por su condición de parásitos obligados, pueden acompañar las migraciones de sus hospedadores y coevolucionar con ellos, es posible también que los ambientes de donde éstos provienen originalmente puedan resultar aun reservorios de virus patógenos potencialmente útiles como agentes de control de los hospedadores en expansión. La búsqueda de estos patógenos virales ancestrales podría llevarse a cabo mediante metodologías clásicas, pero sin duda su identificación se acelerará mediante la aplicación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento que ya han demostrado su eficacia para contribuir a poner en evidencia la existencia de nuevos virus específicos de mosquitos (Bolling *et al.*, 2015a).

Procesos de producción viral y formulación

El desarrollo y la optimización de nuevas tecnologías para la producción de virus, y la posterior formulación de insecticidas de base viral, pueden también contribuir a tornar factible su utilización en el control de poblaciones de mosquitos. En relación a la producción viral, mientras que la amplificación en larvas, por las dificultades para su estandarización, no parece ser una opción factible, existe mucho terreno para trabajar en la optimización de procesos de amplificación de virus *in vitro* utilizando cultivos de células de mosquitos. Para esto será necesario establecer, en primer término y para cada uno de los virus cuya producción resulte de interés, si las líneas celulares de mosquitos disponibles son suficientemente productivas y poseen cualidades tecnológicas (capacidad de ser cultivadas en suspensión, adaptación a medios de cultivo libres de suero, entre otras) que las hagan aptas para sostener procesos de producción a gran escala, o de lo contrario si será necesario establecer nuevas líneas. Las disponibles actualmente son escasas, en comparación con la extensa variedad de líneas celulares establecidas a partir de lepidópteros, y además muy pocas de ellas están disponibles en bancos de células reconocidos (Walker *et al.*, 2014). Entre las líneas existentes, sólo C6/36 de *Ae. albopictus*, ha sido extensamente utilizada y ha demostrado poseer propiedades tecnológicas aptas para el desarrollo de procesos de producción viral (Suchmann y Carlson, 2004). Sin embargo, la elevada frecuencia de presentación de infecciones virales persistentes e inaparentes de esta línea celular obliga a evaluar cuidadosamente el

origen y la condición de los cultivos antes de aplicarlos al desarrollo de procesos de producción viral. Además, será necesario desarrollar nuevos medios de cultivo de bajo costo, como así también optimizar las condiciones de infección y establecer procesos de producción a gran escala robustos y confiables. Teniendo en cuenta la experiencia acumulada en el desarrollo de procesos para la producción a gran escala de otros virus de insectos, como los baculovirus específicos de lepidópteros, como así también de virus de mamíferos, estos desarrollos podrán transferirse rápidamente en el momento que estén disponibles virus que exhiban propiedades suficientemente atractivas por su potencial insecticida o de control.

Los deltabaculovirus se encuentran entre los virus patógenos de mosquitos que reúnen condiciones más favorables para ser utilizados como agentes de control, pero su uso, al igual que la de otros virus de mosquitos que también forman cuerpos de oclusión, como los cypovirus, ha sido limitada porque la infección larvaria requiere una concentración salina específica, una condición difícil de satisfacer cuando estos insecticidas virales se deben aplicar a campo. Para salvar esta limitación se ha propuesto el desarrollo de formulaciones que microencapsulan a los cuerpos de oclusión virales con una sal de magnesio (II), cuya función es suministrar *in situ* la concentración de este ion necesario para permitir que se produzca la interacción entre los viriones ocluidos y las células susceptibles del intestino medio de la larva (Becnel, 2006). Sin embargo, no se produjeron

avances posteriores en este aspecto, los que parecen estar supeditados a la disponibilidad de virus con

mejores propiedades insecticidas o capacidad de control que los disponibles actualmente.

Mejoramiento de las propiedades insecticidas de los virus mediante manipulación génica

Los virus pueden ser modificados genéticamente utilizando herramientas tradicionales de ingeniería genética (Suzuki *et al.*, 2014). Por ejemplo, el genoma de los brevidensovirus fue manipulado con el objeto de utilizarlos como vectores para la transferencia de genes heterólogos en larvas de mosquitos (Afanasiev *et al.*, 1994), o como vectores de expresión en cultivos de células de mosquitos (Afanasiev *et al.*, 1997). Estas tecnologías pueden aplicarse al objetivo de incrementar la virulencia, con un impacto insecticida directo. Gu *et al.* (2010) construyeron brevidensovirus recombinantes que expresan el gen de la toxina excitatoria específica de insectos BmK IT1, demostrando que el agente recombinante posee una virulencia superior al virus silvestre, y que esta estrategia podría resultar en una alternativa tecnológicamente factible para aumentar la eficacia de los brevidensovirus como agentes de control de mosqui-

tos. Sin embargo todavía no se han realizado, ni aún a nivel de laboratorio, los ensayos que permitan garantizar que el transgen no fluirá hacia otros organismos, o que la toxina no afectará a hospedadores no deseados.

Por otro lado, si bien la factibilidad de implementar esta estrategia ha sido también demostrada repetidamente para los baculovirus que infectan insectos lepidópteros (Lacey *et al.*, 2015), todavía no ha sido implementada como una vía para mejorar la capacidad insecticida de CuniNPV, o de algún otro baculovirus específico de mosquitos. En cualquier caso, la obtención de cepas virales más virulentas mediante modificación génica no representa hoy un problema técnico, y las limitaciones radican más bien en aspectos regulatorios, de seguridad y de aceptación pública ligados a la liberación al ambiente de organismos modificados genéticamente.

Virus específicos de mosquitos como antagonistas de arbovirus

Es posible que el futuro de la aplicación de virus al control de poblaciones de mosquitos no pase sólo por su uso como insecticidas clásicos, sino por la capacidad para antagonizar el rol de estos insectos como vectores de patógenos de importancia sanitaria. En los últimos años se han obtenido evidencias acerca de la capacidad de algunos virus específicos de mosquitos, como *Culex flavivirus* o algunos *brevi-densovirus*, para modificar la susceptibilidad a la infección del insecto, y/o su permisividad a la replicación de arbovirus patógenos (Kent *et al.*, 2010; Mosimann *et al.*, 2011). En este sentido, se ha propuesto que, dado que muchos de los virus que infectan espe-

cíficamente mosquitos se transmiten por vía vertical, sería posible establecer una población de mosquitos persistentemente infectada que resulte resistente a la sobreinfección con arbovirus patógenos, reduciendo así su competencia vectorial (Bolling *et al.*, 2015 b). Sin embargo, para que esta propuesta pueda trasladarse a la práctica deberán llevarse a cabo investigaciones exhaustivas, principalmente *in vivo*, sobre las condiciones bajo las cuales el fenómeno de interferencia se manifiesta, ya que en algunos modelos no se ha podido verificar su existencia (Kanthong *et al.*, 2008).

Virus específicos de mosquitos como vectores de paratransgénesis

La paratransgénesis es una estrategia de control que, a través de la manipulación génica de microorganismos simbioses o parásitos de un insecto que actúa como vector de un patógeno, reduce su competencia vectorial. Entre las condiciones que un microorganismo debe cumplir para ser usado con este propósito, además de su capacidad simbiótica o parasitaria, se deben mencionar la facilidad para su multiplicación, la capacidad para introducirse en la población de hospedadores, y la factibilidad de modificar establemente su genoma para expresar el gen

de interés sin detrimento de su capacidad simbiótica o parasitaria. Además, debería poder transferirse entre sucesivas generaciones del hospedador, e idealmente no debería afectar a otros organismos diferentes al hospedador blanco (Kean *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2008). Los brevidensovirus, por la simplicidad de los procedimientos requeridos para la modificación de sus genomas (Suzuki *et al.*, 2014), unida a su capacidad para establecer infecciones persistentes en mosquitos, relativa avirulencia (Ren y Rasgon, 2014) y habilidad para dispersarse en el am-

biente (Wise de Valdez *et al.*, 2010), son candidatos para ser utilizados como herramientas paratransgénicas en mosquitos involucrados en la transmisión vectorial de patógenos de gran relevancia sanitaria. Específicamente, AgDENV ha sido propuesto para ser utilizado como agente para reducir la competencia

vectorial de *An. gambiae* para la transmisión de malaria mediante una estrategia de paratransgénesis viral (Ren *et al.*, 2008). Es posible que en el futuro próximo, otros virus específicos de mosquitos pertenecientes a otras familias, puedan ser también utilizados con el mismo propósito.

Bibliografía

- Afanasyev BN, Galyov EE, Buchatsky LP, Kozlov YV. 1991. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densonucleosis* virus. *Virology*. 185: 323-336.
- Afanasyev BN, Kozlov YV, Carlson JO, Beaty BJ. 1994. Densovirus of *Aedes aegypti* as an expression vector in mosquito cells. *Exp Parasitol*. 79: 322-339.
- Afanasyev BN, Beaty B, Carlson JO, Higgins DR, Thibault KJ. 1997. *Aedes aegypti* densovirus expression system. US Patent N° 5627048.
- Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Balinsky CA, Moser BA, Becnel JJ, Rock DL, Kutish GF. 2001. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *J Virol*. 75: 11157-11165.
- Andreadis TG, Becnel JJ, White SE. 2003. Infectivity and pathogenicity of a novel baculovirus, CuniNPV from *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) for thirteen species and four genera of mosquitoes. *J Med Entomol*. 40: 512-517.
- Attoui H, Mohd Jaafar F, Belhouchet M, Biagini P, Cantaloube JF, de Micco P, de Lamballerie X. 2005. Expansion of family *Reoviridae* to include nine-segmented dsRNA viruses: isolation and characterization of a new virus designated *Aedes pseudoscutellaris* reovirus assigned to a proposed genus (Dinovernavirus). *Virology*. 343: 212-223.
- Auguste AJ, Kaelber JT, Fokam EB, Guzman H, Carrington CV, Erasmus JH, Kamgang B, Popov VL, Jakana J, Liu X, Wood TG, Widen SG, Vasilakis N, Tesh RB, Chiu W, Weaver SC. 2015. A newly isolated reovirus has the simplest genomic and structural organization of any reovirus. *J Virol*. 89: 676-687.
- Baquerizo-Audiot E, Abd-Alla A, Jousset FX, Cousserans F, Tijssen P, Bergoin M. 2009. Structure and expression strategy of the genome of *Culex pipiens* densovirus, a mosquito densovirus with an ambisense organization. *J Virol*. 83: 6863-6873.
- Barreau C, Jousset FX, Cornet M. 1994. An efficient and easy method of infection of mosquito larvae from virus-contaminated cell cultures. *J Virol Methods*. 49: 153-156.
- Barreau C, Jousset FX, Bergoin M. 1996. Pathogenicity of the *Aedes albopictus* parvovirus (AaPV), a denso-like virus, for *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Invertebr Pathol*. 68: 299-309.
- Becnel JJ. 2006. Transmission of viruses to mosquito larvae mediated by divalent cations. *J Invertebr Pathol*. 92: 142-145.
- Becnel JJ, White SE. 2007. Mosquito pathogenic viruses-the last 20 years. *J Am Mosq Control Assoc*. 23: 36-49.
- Becnel JJ, White SA, Moser BA, Fukuda T, Rotstein MJ, Undeen AH, Cockburn A. 2001. Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*. *J. Gen Virol*. 82: 275-282.
- Bergoin M, Tijssen P. 1998. Biological and molecular properties of densoviruses and their use in protein expression and biological control. En: Miller LK, Ball LA. Eds. *The Insect Viruses* NY Plenum Press. p 141-164.
- Berns K, Parrish CR. 2007. Parvoviridae. En: Knipe, DM., Howley, P.M. Eds. *Fields Virology* NY Lippincot Williams & Wilkins p. 2437-2778.
- Bolling BG, Vasilakis N, Guzman H, Widen SG, Wood TG, Popov VL, Thangamani S, Tesh RB. 2015a. Insect-specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence. *Am J Trop Med Hyg*. 92: 422-428.
- Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. 2015b. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses*. 7: 4911-4928.
- Boublik Y, Jousset FX, Bergoin M. 1994. Complete nucleotide sequence and genomic organization of the *Aedes albopictus* parvovirus (AaPV) pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. *Virology*. 200: 752-763.
- Buchatsky LP. 1989. Densonucleosis of bloodsucking mosquitoes. *Dis Aquat Org*. 6: 145-150.
- Buchatsky LI, Kuznetsova MA, Lehednits NN, Konoko AG. 1987. Development and basic properties of the viral preparation Viroden. *Voprosy Virusologii*. 32: 729-799.
- Burivong P, Pattanakitsakula S-N, Thongrunkiatb S, Malasita P, Flegel TW. 2004. Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with *Aedes albopictus* densovirus (AaDENV). *Virology*. 329: 261-269.
- Cammisa-Parks H, Cisar LA, Kane A, Stollar V. 1992. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*. 189: 511-524.
- Carlson J, Suchman E, Buchatsky L. 2006. Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. *Adv Virus Res*. 68: 361-392.
- Chapman HC. 1974. Biological control of mosquito larvae. *Ann Rev Entomol*. 19: 33-59.
- Clark TB, Fukuda T. 1971. Field and laboratory observations of two viral diseases in *Aedes sollicitans* (Walker) in southwestern Louisiana. *Mosquito News*. 31: 193-199.
- Clements AN. 2012. *The biology of mosquitoes Volume 3: The transmission of viruses and interactions with bacteria*. CABI. Oxfordshire, UK.
- Colson P, De Lamballerie X, Yutin N, Asgari S, Bigot Y, Bideshi DK, Cheng XW, Federici BA, Van Etten JL, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. 2013. "Megavirales", a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Arch Virol*. 158: 2517-2521.
- Crabtree MB, Sang RC, Stollar V, Dunster LM, Miller BR. 2003. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Arch Virol*. 148: 1095-1118.
- de Araujo Coutinho CJ, Alves R, Sanscrainte ND, de Barros Pinto Viviani A, Dos Santos PF, de Souza PA, de Carvalho-Melo IM, Becnel JJ. 2012. Occurrence and phylogenetic characterization of a baculovirus isolated from *Culex quinquefasciatus* in Sao Paulo State, Brazil. *Arch Virol*. 157: 1741-1745.
- Delhon G, Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Becnel JJ, Moser BA, Kutish GF, Rock DL. 2006. Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus). *J Virol*. 80: 8439-49.
- Federici BA. 1980. Virus pathogens of *Culicidae* (mosquitos). *Bul. WHO*. 55: 25-46.
- Goenaga S, Fabbri CM, García JB, Rondán JC, Gardenal N, Calderón GE, Enria DA, Levis SM. 2014. New strains of *Culex* flavivirus isolated in Argentina. *J Med Entomol*. 51: 900-906.
- Goenaga S, Kenney JL, Duggal NK, Delorey M, Ebel GD, Zhang B, Levis SC, Enria DA, Brault AC. 2015. Potential for co-infection of a mosquito-specific Flavivirus, Nhumirim Virus, to block West Nile Virus transmission in mosquitoes. *Viruses*. 7: 5801-5812.
- Gozziglia M, Botero L, Gil F, Esparza J. 1980. Preliminary characterization of virus-like particles in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line (Mos. 61). *Intervirol*. 13: 232-240.
- Green TB, Shapiro A, White S, Rao S, Mertens PPC, Carner G, Becnel JJ. 2006. Molecular and biological characterization of a *Cypovirus* from the mosquito *Culex restuans*. *J Invertebr Pathol*. 91: 27-34.
- Gu J-B, Dong Y-Q, Peng H-J, and Xiao-Guang Chen X-G. 2010. A recombinant AeDENV containing the insect-specific toxin, BmK IT1, displayed an increasing pathogenicity on *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg*. 83: 614-623.
- Gu J, Liu M, Deng Y, Peng H, Chen X. 2011. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its preliminary application in mosquito control. *Plos One*. 6: e21329.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. 2015. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*. 7: 2230-2267.
- Hall DW, Fish DD. 1974. A baculovirus from the mosquito *Wyeomyia smithii*. *J Invertebr Pathol*. 23: 383-388.
- Hirunkanokpun S, Carlson JO, Kittayapong P. 2008. Evaluation of mosquito densoviruses for controlling *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): variation in efficiency due to virus strain and geographic origin of mosqui-

- toes. *Am J Trop Med Hyg.* 78: 784-790.
41. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology.* 359: 405-414.
 42. Huang Y, Li S, Zhao Q, Pei G, An X, Guo X, Zhou H, Zhang Z, Zhang J, Tong Y. 2015. Isolation and characterization of a novel invertebrate iridovirus from adult *Anopheles minimus* (AMIV) in China. *J Invertebr Pathol.* 127: 1-5.
 43. Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol.* 151: 1257-1266.
 44. Jousset FX, Barreau C, I3oublik Y, Cornet M. 1993. A parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. *Virus Res.* 29: 99-114.
 45. Kanthong N, Khemnu N, Sriurairatan S, Pattanakitsakul S-N, Malasit P, Flegel TW. 2008. Mosquito cells accommodate balanced, persistent co-infections with a densovirus and Dengue virus. *Dev Comp Immunol.* 32: 1063-1075.
 46. Kuwata R, Isawa H, Hoshino K, Tsuda Y, Yanase T, Sasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. 2011. RNA splicing in a new rhabdovirus from *Culex* mosquitoes. *J Virol.* 85: 6185-6196.
 47. Kean J, Rainey SM, McFarlane M, Donald CL, Schnettler E, Kohl A, Pondville E. 2015. Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in *Aedes* Mosquitoes. *Insects.* 6: 236-278.
 48. Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR. 2010. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex Flavivirus* Izabal. *Plos Negl Trop Dis.* 4: e671.
 49. Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol.* 132: 1-41.
 50. Ledermann JP, Suchman EL, Black IWC, Carlson JO. 2004. Infection and pathogenicity of the mosquito densovirus AeDNV, HeDNV, and APeDNV in *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol.* 97: 1828-1836.
 51. Lv X, Jaafar FM, Sun X, Belhouchet M, Fu S, Zhang S, Tong S-x, Zhi Lv Z, Mertens PPC, Liang G, Attoui H. 2012. Isolates of Liao Ning virus from wild-caught mosquitoes in the Xinjiang Province of China in 2005. *Plos One.* 7: e37732.
 52. Marina CF, Arredondo-Jiménez J, Castillo A, Williams T. 1999. Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito. *Oecologia.* 119: 383-388.
 53. Marina CF, Fernández-Salas I, Ibarra JE, Arredondo-Jiménez JI, Valle J, Williams T. 2005. Transmission dynamics of an iridescent virus in an experimental mosquito population: the role of host density. *Ecol Entomol.* 30: 376-382.
 54. Marklewitz M, Gloza-Rausch F, Kurth A, Kümmerer BM, Drosten C, Junglen S. 2012. First isolation of an Entomobirnavirus from free-living insects. *J Gen Virol.* 93: 2431-2435.
 55. Moreira D, López-García P. 2009. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nat Rev Microbiol.* 7: 306-311.
 56. Moser BA, Becnel JJ, White SE, Afonso C, Kutish G, Shanker S, Almira E. 2001. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family *Baculoviridae*. *J Gen Virol.* 82: 283-297.
 57. Mosimann ALP, Bordignon J, Mazarotto GCA, Motta MCM, Hoffmann F, Duarte dos Santos CN. 2011. Genetic and biological characterization of a densovirus isolate that affects dengue virus infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106: 285-292.
 58. Mullens BA, Velten RK, Federici BA. 1999. Iridescent virus infection in *Culicoides variipennis sonorensis* and interactions with the mermitid parasite *Heleidomermis magnapapula*. *J Invertebr Pathol.* 73: 231-233.
 59. Muttis E, Miele SA, Belaich MN, Micieli MV, Becnel JJ, Ghiringhelli PD, Garcia JJ. 2012. First record of a mosquito iridescent virus in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Arch Virol.* 157: 1569-1571.
 60. Muttis E, Micieli MV, Garcia JJ. 2013. *Culex pipiens* affected by joint infection of a mosquito iridescent virus and *Streikovimermis spiculatus*. *J Invertebr Pathol.* 114: 295-297.
 61. Nasar F, Palacios G, Gorchakov RV, Guzman H, Da Rosa AP, Savji N, Popov VL, Sherman MB, Lipkin WI, Tesh RB, Weaver SC. 2012. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 14622-14627.
 62. Pauvolid-Correa A, Solberg O, Couto-Lima D, Kenney J, Serra-Freire N, Brault A, Nogueira R, Langevin S, Komar N. 2015. Nhumirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Arch Virol.* 160: 21-27.
 63. Pham HT, Jousset FX, Perreault J, Shike H, Szelei J, Bergoin M, Tijssen P. 2013. Expression strategy of *Aedes albopictus* densovirus. *J Virol.* 87: 9928-9932.
 64. Ren X, Hoiczky E, Rasgon JL. 2008. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.* 4: e1000135.
 65. Ren X, Hughes GL, Niu G, Suzuki Y, Rasgon JL. 2014. *Anopheles gambiae* densovirus (AgDNV) has negligible effects on adult survival and transcriptome of its mosquito host. *Peer J.* 2: e584.
 66. Roekring S, Flegel TW, Malasit P, Kittayapong P. 2006. Challenging successive mosquito generations with a densovirus yields progressive survival improvement but persistent, innocuous infections. *Dev Comp Immunol.* 30: 878-892.
 67. Rohrmann GF. 2013. *Baculovirus Molecular Biology: Third Edition.* National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>.
 68. Roossinck MJ. 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat Rev Microbiol.* 9: 99-108.
 69. Schiff LA, Nibert ML, Tyler KL. 2007. Orthoreoviruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM Eds. *Fields Virology NY* Lippincott Williams & Wilkins p. 1853-1916.
 70. Schuster S, Zirkel F, Kurth A, van Cleef KW, Drosten C, van Rij RP, Junglen S. 2014. A unique nodavirus with novel features: mosinivirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNA interference pathway. *J Virol.* 88: 13447-13459.
 71. Shapiro AM, Becnel JJ, White SE. 2004. A nucleopolyhedrovirus from *Uranotaenia sapphirina* (Diptera: Culicidae). *J Invertebr Pathol.* 86: 96-103.
 72. Shapiro A, Green T, Rao S, White S, Carner G, Mertens PP, Becnel JJ. 2005. Morphological and molecular characterization of a *Cypovirus* (Reoviridae) from the mosquito *Uranotaenia sapphirina* (Diptera: Culicidae). *J Virol.* 79: 9430-9438.
 73. Siefert JL. 2009. Defining the mobilome. *Methods Mol Biol.* 532: 13-27.
 74. Stiles B, Dunn PE, Paschke JD. 1983. Histopathology of a nuclear polyhedrosis infection in *Aedes epactius* with observations in four additional mosquito species. *J Invertebr Pathol.* 41: 191-202.
 75. Suchman E, Carlson J. 2004. Production of mosquito densovirus by *Aedes albopictus* C6/36 cells adapted to suspension culture in serum-free protein-free media. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40: 74-75.
 76. Suchman EL, Kononko A, Plake E, Doehling M, Kleker B, Black WC, Buchatsky L, Carlson J. 2006. Effects of AeDNV infection on *Aedes aegypti* lifespan and reproduction. *Biol Control.* 39: 465-473.
 77. Suzuki Y, Niu G, Hughes GL, Rasgon JL. 2014. A viral over-expression system for the major malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Sci Rep.* 4: 5127.
 78. Vendeville A, Ravallec M, Jousset FX, Devise M, Mutuel D, López-Ferber M, Fournier P, Dupressoir T, Ogliaastro M. 2009. Densovirus infectious pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J Virol.* 83: 4678-4689.
 79. Walker T, Jeffries CL, Mansfield KL, Johnson N. 2014. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit Vectors.* 7: 382.
 80. Ward TW, Jenkins MS, Afanasiev BN, Edwards M, Duda BA, Suchman E, Jacobs-Lorena M, Beaty BJ, Carlson JO. 2001. *Aedes aegypti* transducing densovirus pathogenesis and expression in *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* larvae. *Insect Mol Biol.* 10: 397-405.
 81. Wang L, Lv X, Zhai Y, Fu S, Wang D, Rayner S, Tang Q, Liang G. 2012. Genomic characterization of a novel virus of the family *Tymoviridae* isolated from mosquitoes. *Plos One.* 7: e39845.
 82. Wei W, Shao D, Huang X, Li J, Chen H, Zhang Q, Zhang J. 2006. The pathogenicity of mosquito densovirus (C6/36DNV) and its interaction with dengue virus type II in *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg.* 75: 1118-1126.
 83. Williams T. 1996. The Iridoviruses. En: Maramorosch K, Murphy F, Shatkin A, eds. *Advances in Virus Research.* New York: Academic Press. p 345-412.
 84. Williams T. 2008. Natural invertebrate hosts of iridoviruses (Iridoviridae). *Neotr Entomol.* 37: 615-632.
 85. Wise de Valdez MR, Suchman EL, Carlson JO, Black WC. 2010. A large scale laboratory cage trial of *Aedes* densovirus (AeDNV). *J Med Entomol.* 47: 392-399.
 86. Zhang H, Zhang J, Yu X, Lu X, Zhang Q, Jakana J, Chen DH, Zhang X, Zhou ZH. 1999. Visualization of protein-RNA interactions in cytoplasmic polyhedrosis virus. *J Virol.* 73: 1624-1629.