



Universidad de Guanajuato
Campus Irapuato – Salamanca
División de Ciencias de la Vida

Estudio de la interactómica *in vivo* del baculovirus SfNPV-Ar
en su hospedero *Spodoptera frugiperda*
(Lepidoptera:Noctuidae)

Tesis

Como requisito para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOCENCIAS

Presenta:

M.B. Jonatan Carmen Rangel Nuñez

Director de tesis:

Dra. María Cristina del Rincón Castro

Comité tutorial:

Dra. Ma. Fabiola León Galván

Dr. Jorge E. Ibarra Rendon

Dr. Gustavo Hernández Guzmán

Dr. José Eleazar Barbosa Corona

Irapuato, Gto.

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".

*"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a
garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"*

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

**"Estudio de la interacción *in vivo* del baculovirus SfNPV-Ar en su
hospedero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)"**

TESIS

QUE PRESENTA

Jonatan Carmen Rangel Nuñez

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOCIENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Cristina Del Rincón Castro

Irapuato, Gto. Julio de 2021.

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

ExHacienda El Copal, Km. 9.0 Carretera Irapuato-Silao

C.P. 36824 A.P. 311, Irapuato, Gto. México

Tel. y Fax 462 624 18 84

www.irapatoguanajuato.ugto.mx

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".

*"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a
garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"*

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0185/2021.

Asunto: TEMA DE TRABAJO.

DR. ROGELIO COSTILLA SALAZAR
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación del C. Jonatan Carmen Rangel Nuñez, me permito comunicar a Usted que el tema señalado fue:

**"Estudio de la interactómica *in vivo* del baculovirus SfNPV-Ar en su hospedero
Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae)"**

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

Dr. José Eleazar Barboza Corona
Dra. Ma. Fabiola León Galván
Dr. Gustavo Hernández Guzmán
Dr. Jorge E. Ibarra Rendón

Para que junto conmigo integren el Jurado.

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 29 de junio de 2021.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Cristina Del Rincón Castro

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
ExHacienda El Copal, Km. 9.0 Carretera Irapuato-Silao
C.P. 36824 A.P. 311, Irapuato, Gto. México
Tel. y Fax 462 624 18 84
www.irapatoguanajuato.ugto.mx

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".

"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0186/2021.

Asunto: REVISIÓN DE TESIS.

Irapuato, Gto., 2 de Julio de 2021.

DR. ROGELIO COSTILLA SALAZAR
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.


Habiendo revisado la Tesis del Pasante C. Jonatan Carmen Rangel Nuñez,
Titulada:

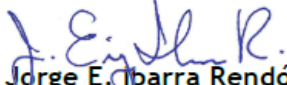
**"Estudio de la interactómica *in vivo* del baculovirus SfNPV-Ar en su
hospedero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)"**

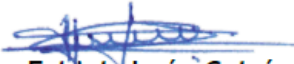
Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

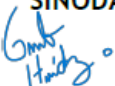
DIRECTOR

Dra. María Cristina Del Rincón Castro


Dr. José Eleazar Barboza Corona
SINODAL


Dr. Jorge E. Iparra Rendón
SINODAL


Dra. Ma. Fabiola León Galván
SINODAL


Dr. Gustavo Hernández Guzmán.
SINODAL

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
ExHacienda El Copal, Km. 9.0 Carretera Irapuato-Silao
C.P. 36824 A.P. 311, Irapuato, Gto. México
Tel. y Fax 462 624 18 84
www.irapatoguanajuato.ugto.mx



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".

"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DR. ROGELIO COSTILLA SALAZAR
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación del C. Jonatan Carmen Rangel Nuñez, nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: "Estudio de la interactómica *in vivo* del baculovirus SfNPV-Ar en su hospedero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)" que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. María Cristina Del Rincón Castro, profesora de la División de Ciencias de la Vida, ha sido terminado. El escrito fue revisado por el Dr. José Eleazar Barboza Corona, Dra. Ma. Fabiola León Galván, Dr. Jorge E. Ibarra Rendon, Dr. Gustavo Hernández Guzmán y se autorizó la impresión y empastado del mismo.

Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

Dr. José Eleazar Barboza Corona	PRESIDENTE
Dra. Ma. Fabiola León Galván	SECRETARIO
Dr. Jorge E. Ibarra Rendon	VOCAL
Dr. Gustavo Hernández Guzmán	VOCAL
Dra. María Cristina Del Rincón Castro	VOCAL

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 2 de julio de 2020.

Dra. María Cristina Del Rincón Castro
DIRECTOR

REVISOR

José Eleazar Barboza Corona

REVISOR

Dra. Ma. Fabiola León Galván

REVISOR

Dr. Jorge E. Ibarra Rendon

REVISOR

Dr. Gustavo Hernández Guzmán

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA CRISTINA DEL
RINCÓN CASTRO EN EL LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA Y VEGETAL DE LA DIVISIÓN
DE CIENCIAS DE LA VIDA, DEL CAMPUS IRAPUATO-
SALAMANCA, DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO.**

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para cursar el programa de Doctorado en Biociencias con el número de Apoyo 446157 (No. de becario 331756).

A la Universidad de Guanajuato por el apoyo para asistir a múltiples eventos de ampliación del conocimiento.

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado, por el apoyo brindado ante la situación de la pandemia derivada del SARS-CoV-2 bajo el oficio DAIP/DGP/293/20.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	vii
ÍNDICE	viii
INDICE DE FIGURAS	xii
INDICE DE TABLAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
Marco teorico.....	2
Maíz	2
Importancia económica del maíz (<i>Zea mays</i>).....	2
Plagas del maíz.....	2
Taxonomía de <i>Spodoptera frugiperda</i>	2
Distribución geográfica	3
Biología y ecología	3
Importancia económica de <i>Spodoptera frugiperda</i>	4
Control biológico	5
Baculovirus	7
Clasificación de los baculovirus	7
Ciclo de replicación y proteínas asociadas a los baculovirus	8
Regulación de la Transcripción y replicación viral	17
Implicaciones de la infección por baculovirus en el hospedero	22
Apoptosis	22

Respuesta inmune.....	23
Respuesta celular del hospedero a la infección	25
Interacción de proteínas	29
Técnicas para identificar expresión diferencial	31
Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH).....	35
Justificación.....	37
Hipótesis.....	38
Objetivo general	38
Objetivos específicos	38
Materiales y métodos	39
Colonia de <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
Cepa viral	39
Purificación del inóculo viral	39
Pruebas de infección en <i>S. frugiperda</i>	40
Determinación de expresión diferencial de genes en el tejido primario.	40
a) Infección de larvas de <i>S. frugiperda</i> y recolección del intestino	40
b) Extracción de ARN	41
c) Determinación de la calidad del ARN	41
d) Síntesis de la primera cadena	42
e) Síntesis de la segunda cadena.....	42
f) Purificación de productos génicos.	42
g) Digestión con enzima de restricción	43
h) Análisis de ligación de adaptadores	44
i) Primera hibridación	44
j) Segunda hibridación	45

k) Primera amplificación por PCR.....	45
l) Segunda amplificación por PCR.....	45
m) Clonación de fragmentos.....	46
Extracción de ADN plasmídico	46
Digestión con <i>EcoRI</i>	47
Macroarreglos.....	47
Secuenciación de las bibliotecas.....	49
Determinación de expresión diferencial de proteínas en el tejido primario.....	49
a) Obtención de material biológico y lisis.....	49
b) Cuantificación de proteínas solubles por el método de Bradford	50
Obtención del perfil de proteínas en una dimensión (SDS-PAGE).....	51
Obtención del perfil de proteínas en segunda dimensión (2DE-PAGE).....	52
Estrategia experimental.....	53
Resultados y discusiones.....	54
Mantenimiento de la colonia de <i>S. frugiperda</i>	54
Amplificación del inóculo viral.....	54
Pruebas de infección en <i>S. frugiperda</i>	54
Extracción de intestinos.....	57
Extracción de ARN y síntesis del cDNA	58
Digestiones con enzima de corte frecuente.....	61
Hibridaciones.....	61
Generación de las bibliotecas.....	65
Macroarreglos.....	66
Secuenciación de posibles genes expresados diferenciales por la infección de SfNPV-Ar en los intestinos de <i>S frugiperda</i>	75

Generación de oligonucleótidos para genes diferenciales completos	91
Amplificación de los genes diferenciales	94
Diseño de oligonucleótidos para qPCR	106
Expresión diferencial de proteínas en tejidos susceptibles a la infección primaria	109
Análisis de las proteínas presentes en el los VDO	109
Análisis del perfil de proteínas expresadas diferencialmente en 1D	112
Análisis del perfil de proteínas en dos dimensiones.	115
Identificación de proteínas diferenciales	122
Aminopeptidasa	131
Conclusiones.....	140
Bibliografía	142

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Daños ocasionados en el maíz por <i>S. frugiperda</i>	5
Figura 2.- Diferentes etapas de la colonia de <i>S. frugiperda</i>	54
Figura 3.- Infección por gota de una larva de <i>S. frugiperda</i>	56
Figura 4.- Extracción de intestinos de larvas de <i>S. frugiperda</i> ,.....	57
Figura 5.- Gel de agarosa con las muestras de ARN total.....	59
Figura 6.- Síntesis de ss cDNA.....	60
Figura 7.- Síntesis de ds cDNA.....	60
Figura 8.- Cortes del ds cDNA.....	61
Figura 9.- Segundo PCR (supresión).....	64
Figura 10.- Membrana de los genes apagados por la infección a las 6 hpi.....	67
Figura 11.- Membrana de los genes apagados por la infección a las 12 hpi.....	69
Figura 12.- Membrana de los genes encendidos por la infección a las 6 hpi.	70
Figura 13.- Membrana de los genes apagados por la infección a las 12 hpi.....	71
Figura 14.- Membrana de los genes encendidos por la infección a las 12 hpi.	72
Figura 15.- Membrana de los genes apagados por la infección a las 24.....	73
Figura 16.- Membrana de los genes encendidos por la infección a las 24 hpi.....	74
Figura 17.- PCR para el gen de Arp 2/3 relacionado.....	97
Figura 18.- PCR para el gen de la <i>ATPsintetasa subunidad 0 Mitochondrial</i>	98
Figura 19.- PCR para el gen de la <i>fostoproteina 32</i>	99

Figura 20.- PCR para el gen <i>proteína de unión a Acil-Co-A</i>	100
Figura 21.- PCR para el gen <i>HSP90</i>	100
Figura 22. PCR para el gen <i>proteína ribosomal L19</i>	101
Figura 23.- PCR para el gen de la <i>peroxiredoxina</i>	102
Figura 24.- PCR par el gen de la <i>proteína de unión a ácidos grasos</i>	102
Figura 25.- PCR para los genes de la <i>proteína MG17 y del complejo de proteínas reguladoras de la actina y citoesqueleto</i>	103
Figura 26.- PCR para el gen de la <i>proteína muscular específica</i>	104
Figura 27.- PCR para el gen de la <i>proteína ribosomal L7</i>	105
Figura 28.- PCR para el gen de la <i>proteína ribosomal L11</i>	105
Figura 29.- PCR para el gen de la <i>proteína no caracterizada</i>	106
Figura 30.- PCR del genes diferenciales completos	107
Figura 30.- Gel 1D SDS-PAGE de los cuerpos de oclusión	110
Figura 32.- Geles de 2D SDS-PAGE de los cuerpos de oclusión.....	110
Figura 33.- Análisis de 1D SDS-PAGE de proteínas reguladas por la infección	114
Figura 34.- Geles 2D de proteínas reguladas a las 6 hpi.....	117
Figura 35.- Geles 2D de las proteínas regualdas a las 12 hpi.	119
Figura 36.- Geles de 2D de las proteínas reguladas a las 24 hpi.	121
Figura 37.-Disposición de las proteínas a identificar	123
Figura 38.- PCR Con los oligonucleótidos de la aminopeptidasa completa.....	134
Figura 39.- PCR con los oligonucleótidos de la APN interna	135
Figura 40.- PCR purificado de las APN	136
Figura 41.- Alineamiento de APN Superior y APN inferior.....	137
Figura 42.- Diagrama de interacciones de las rutas celulares afectadas por la infección.....	140

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Proteínas de la envoltura de los viriones derivados de oclusión y factores de infectividad <i>per os</i>	9
Tabla 2.- Proteínas asociadas a las nucleocápsides.....	15
Tabla 3.- Proteínas asociadas al CO.....	17
Tabla 3 Concentraciones para generar la curva de calibración.....	50
Tabla 4.- Condiciones para el isoelectroenfoque.	52
Tabla 5.- Relación de las diferentes dosis probadas para determinar la concentración en CO/larva.	55
Tabla 7.- Relaciones para la primera hibridación	62
Tabla 8.- Relaciones para llevar a cabo la segunda hibridación.	63
Tabla 9.- Relación usada para el primer PCR (Normalización).....	63
Tabla 10.- Relación usada para realizar el 2° PCR (supresión).	65
Tabla 11.- Relación del número de colonias obtenidas para los genes regulados..	65
Tabla 12.- Membrana de genes apagados por la infección a las 6 hpi.	67
Tabla 13.- Membrana de los genes apagados por la infección a las 6 hpi.....	68
Tabla 14.- Membrana de genes encendidos por la infección a las 6 hpi.....	69
Tabla 15.- Membrana de genes apagados por la infección a las 12 hpi.	71
Tabla 16.- Membrana de genes encendidos por la infección a las 12 hpi.....	72
Tabla 17.- Membrana de los genes apagados por la infección a las 24 hpi.....	73
Tabla 18.- Membrana de los genes encendidos por la infección a las 24 hpi.	74

Tabla 19.- Genes apagados por la infección a las 6 horas.	76
Tabla 20.- Genes encendidos por la infección a las 6 horas.	80
Tabla 21.- Genes apagados por la infección a las 12 horas.	83
Tabla 22.- Genes encendidos por la infección a las 12 horas.	87
Tabla 23.- Genes apagados por la infección a las 24 horas.	88
Tabla 24.- Genes encendidos por la infección a las 24 horas.	90
Tabla 25.-Oligonucleotidos para extraer genes expresados diferencialmente.	93
Tabla 26- Genes diferenciales identificados.	95
Tabla 27.- Oligonucleótidos para PCR en tiempo real de los genes diferenciales.	108
Tabla 28.- Identidad de las proteínas diferenciales	124
Tabla 29.- Oligonucleótidos para la APN completa e interna.	134
Tabla 29.- Oligonucleótidos para realizar qPCR para APN.	138

RESUMEN

Spodoptera frugiperda es la plaga de mayor importancia para la producción de maíz en América; con el peligro de extenderse al resto del mundo. Actualmente el control de esta plaga está migrando hacia alternativas a las que no presente resistencia, dentro de las cuales se encuentra un baculovirus denominado SfNPV-Ar. Este microorganismo ha mostrado a nivel de laboratorio y campo su potencial para ser usado en el control del gusano cogollero *S. frugiperda*. La alta virulencia mostrada por el virus llevó a realizar un estudio transcriptómico y proteómico, para determinar el efecto del virus en las células columnares del intestino medio de *S. frugiperda*. Como resultado de la secuenciación e identificación de los genes y proteínas regulados por la infección a las 6, 12 y 24 hpi, se obtuvo que el virus induce un sistema de defensa basado en el aumento de la concentración de peróxido. Al mismo tiempo que se apaga la expresión de un modulador de la producción de especies reactivas de oxígeno, se determinó que el virus induce desde las etapas tempranas de la infección, un aumento en los genes relacionados al tráfico de lípidos en el citoplasma, el cual podría ser causado por el aumento de las necesidades energéticas de las células o bien por la oxidación lipídica que sufre la membrana celular al acumularse el peróxido. De igual manera se determinó una sobre expresión de genes involucrados en el rearrreglo del citoesqueleto, así como un arresto del ciclo celular, entre las 6 y 12 hpi, coincidiendo con las etapas previas al inicio del ensamble de las núcleo cápsides. Finalmente, a las 24 hpi, se determinó que la infección viral apagaba los procesos de rearrreglo del citoesqueleto, metabolismo y arresto del ciclo celular, mientras que genes y proteínas relacionadas con la activación de la apoptosis fueron sobre expresados. Esto último podría estar relacionado al fenómeno por el cual el intestino infectado por baculovirus es el único de los tejidos que se recupera de la infección. Esta investigación aporta nuevo conocimiento en el desarrollo del proceso de infección de los baculovirus y sus hospederos, y permitirá entender como estas relaciones co-evolutivas virus-huésped, inciden en la efectividad de los baculovirus como agentes de control biológico, para así poder optimizar en el futuro, su uso como tal.

ABSTRACT

The fall armyworm is the most important pest in the maize production in the Americas continent. The control of the pest is carried out primarily by chemical products, but alternatives of control are gaining importance, alternatives like the use of the entomopathogenic virus SfNPV-Ar, this virus shows high virulence against the fall arming worm in laboratory and field. The aims of this work were to identify the effect of the primary infection by the determination of the regulation of gens and protein in three times post infection (6, 12 and 24 h). As a result of the transcriptomic and proteomic identification we found an induction of cellular defense by the accumulation of peroxide; but at the same time, the virus down regulates the main productor system of reactive oxygen species. In the other hand the infection increases the expression of genes and proteins related with mobility of cytoplasm lipids and metabolism, the cytoskeleton reorganization and cell cycle arrest, all above between the 6 and 12 hours post infection; according with the beginning of the replication of the NC. Finally, 24 hours post infection the infected cells showed a down regulation of genes and proteins related with cytoskeletal, metabolism and cell cycle arrest; at this time, the cells showed an upper regulation of genes and proteins whose function was associated to the activation of the apoptotic prosses. All above showed how the virus took the control of the cellular machinery to control de cellular proliferation, grew up and activated defense mechanism against reactive oxygen species, in the first hours post infection, in the latest times all mechanism was shut down followed by an apoptosis signal. This could answer why the intestine was the only tissue that did recovery from de viral infection. This research brings new knowledge in the development of the infection process of baculoviruses and their hosts and will allow understanding of how these co-evolutionary virus-host relationships affect the effectiveness of baculoviruses as biological control agents so that they can optimize their use as such in the future.

INTRODUCCIÓN

El control químico es este método de control de plagas más usado a nivel de campo por su efectividad, sin embargo, no discrimina entre organismos benéficos o el insecto plaga; el abuso de este método de control ha propiciado la aparición de genotipos resistentes al control químico. Esta resistencia se ha registrado en poblaciones del gusano cogollero del maíz hacia los insecticidas más usados para su control como los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Lagunes-Tejeda & Villanueva-Jimenez, 1994; Pacheco-Covarrubias, 1993), así como a los piretroides (León-García et al., 2012). El desarrollo de resistencia por poblaciones del gusano cogollero, la contaminación que estos causan al ambiente y la necesidad de consumir alimentos libres de pesticidas, han generado la necesidad de estudiar y desarrollar a las alternativas que existen en la naturaleza para el control de plagas de probar como lo es el uso de virus entomopatógenos (CESAVEG, 2010; Lacey et al., 2001). Tal es el caso de una cepa altamente patogénica que a niveles de campo y laboratorio han demostrado su eficacia para el control del gusano cogollero en el bajío mexicano (Rangel et al., 2014; Media et al., 2016).

En este trabajo se analizaron los genes y proteínas expresados durante la infección temprana de una cepa de baculovirus aislado de *Spodoptera frugiperda* denominada SfNPV-Ar, a diferentes tiempos post infección: 6, 12 y 24 horas, con la finalidad de establecer las interacciones a nivel de genes y de proteínas, entre el virus causante de una infección y la respuesta causada por este en el hospedero. Con lo cual se estableció el mecanismo por el cual esta cepa de baculovirus es altamente eficiente en el control biológico de *S. frugiperda*.

Palabras Clave: *Spodoptera frugiperda*, Baculovirus, RNA, Proteínas, Expresión diferencial

Marco teorico

Maíz

Importancia económica del maíz (*Zea mays*)

El maíz es uno de los granos alimenticios de mayor producción a nivel global, pertenece a la familia de las Poaceas (Gramíneas) y tiene como centro de origen el continente americano (Paliwal, 2001). Anualmente la producción global asciende a 839 millones de toneladas en una superficie de 197 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2019). Según la secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno Federal, México se encuentra dentro de los principales productores de maíz ocupando el 7° lugar con 27 millones de toneladas anuales en una superficie de 7 millones de hectáreas (ha); siendo el estado de Guanajuato el quinto lugar en producción nacional al 2020 (SIAP, 2020).

Plagas del maíz

Las plagas de maíz se pueden clasificar dentro de los siguientes grupos: plagas que se alimentan del follaje, plagas que barrenan el tallo y plagas que atacan a la mazorca. De la clasificación anterior, existe una considerada como la de mayor importancia en México y Latinoamérica denominada: el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, la cual también es la única plaga del maíz que puede estar presente en todas las etapas fenológicas de la planta comportándose como trozador, defoliador, barrenador y elotero (CESAVEG, 2010, 2013; Vergara et al., 2001).

Taxonomía de *Spodoptera frugiperda*

El género *Spodoptera* pertenece a la Familia: Noctuidae, Orden: Lepidóptera, Clase: Insecta, Género y especie: *Spodoptera frugiperda*. Se le conoce en el lenguaje común como oruga militar tardía o gusano cogollero de maíz.

Distribución geográfica

El gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*, se encuentra distribuido por todo el continente americano, así como en prácticamente todo el mundo a excepción de Europa y Oceanía (Farias et al., 2008; Murua et al., 2006; Liu et al., 2020). En México según la secretaria de agricultura en el 2021 esta plaga tiene presencia en todas las regiones donde se siembra maíz, sin importar si las zonas son de temporal o regadío.

Biología y ecología

Los adultos de *S. frugiperda* exhiben comportamientos predominantemente nocturnos tanto para alimentarse, ovipositar, como para aparearse. La hembra normalmente oviposita en el envés de las hojas, aunque, cuando la densidad de población de adultos es sumamente alta, la oviposición se lleva a cabo de manera indiscriminada en cualquier parte de la planta. Los huevos son puestos en masa, protegidos por una capa de escamas, desprendidas del abdomen de las hembras, estos eclosionan de 2 a 4 días post oviposición, con temperaturas promedio de 20-30 °C, al eclosionar las larvas se alimentan del cascarón del huevo, posteriormente se alimentan de la planta huésped, consumiendo la epidermis de la hoja. Al alcanzar el segundo instar larval se alimentan principalmente del follaje, defoliando la planta hasta que migran al cogollo donde completarán sus seis instar larvales. El máximo tamaño alcanzado de las larvas es de 28-36 mm, las larvas pueden llegar a mostrar cambios de coloración entre cada uno de sus estadios, yendo desde un blanco transparente o gris verdoso, hasta el negro castaño (Rizzo & La Rossa, 1992; Sparks, 1979).

La larva del gusano cogollero tiene como característica una “Y” invertida al frente de su cabeza, visible a simple vista desde el 2° instar. Una vez alcanzado el 6° instar entra en una etapa de pre-pupa, en este periodo iniciará una migración del cogollo al suelo para finalmente pupar en la tierra. Este periodo puede variar de entre 7-37 días dependiendo de la temperatura del suelo, los adultos emergen de las pupas al anochecer e inician un rápido movimiento hacia la planta huésped, las hembras se aparean a diferentes tiempos, para lo cual se valen del uso de

feromonas, las cuales tienen como objetivo atraer al macho, tienen normalmente un periodo de pre-oviposición de 4-8 días a 30°C, llevando a cabo 4-5 oviposiciones en su vida, en total ovipositan alrededor de 1,280-1,450 huevos (Rizzo & La Rossa, 1992).

El número de generaciones producidas cada año aumenta conforme la latitud decrece. En regiones cálidas se observan hasta 5 generaciones o más de *S. frugiperda* por ciclo de cultivo, en México es más común encontrar la plaga en campos con maíz en las siembras de primavera-verano. Los factores de mortalidad natural causados por depredadores, parasitoides y patógenos (factores bióticos) combinados con el efecto del clima (factor abiótico), tienen grandes impactos en las fluctuaciones de las poblaciones de la plaga, pero solo en los primeros estadíos de las larvas y al inicio de la infestación del cultivo al inicio del ciclo, volviéndose insuficientes en etapas posteriores (Williams et al., 1999).

Importancia económica de *Spodoptera frugiperda*

S. frugiperda es considerada la plaga de mayor importancia del maíz en zonas tropicales y subtropicales de América debido a la pérdida en el rendimiento que provoca, , estos daños pueden llegar a ser tan intensos, ocasionando una defoliación lo suficientemente intensa (Fig. 1), como para provocar pérdidas en el rendimiento el cual puede oscilar entre 30 y 40% en poblaciones de maíz en México (Rodríguez & De León, 2008; Vergara et al., 2001, Chimweta et al., 2020).

Desde el año 2008 a la fecha, en México, se observó un fuerte incremento de la presencia de esta plaga en los cultivos de maíz y sorgo, provocando pérdidas económicas principalmente en los estados del centro de la república. En el año 2013 se registró un fuerte brote de la plaga que provocó crisis entre los productores de maíz pues el brote provocó cuantiosas pérdidas económicas, en parte por la pérdida del rendimiento causada por la defoliación, por otro lado, por la elevación en los costos para controlarla usando métodos químicos, en este rubro se invirtieron aproximadamente 40×10^6 dólares a nivel nacional solo para tratar de mantener bajo control a la plaga (CESAVEG, 2013).

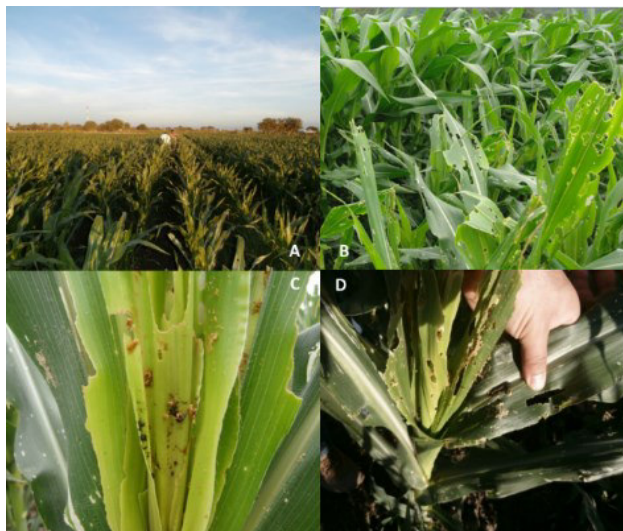


Figura 1.- Daños ocasionados en el maíz por *S. frugiperda*. A) Cultivo con infestación de *S. frugiperda*. B) Plantas de maíz con daño en el follaje causado por *S. frugiperda*. y D) Daño característico al cogollo del maíz por la larva de *S. frugiperda*. Fotos del autor.

La principal zona agrícola afectada por este brote de *S. frugiperda* fue la zona del Bajío mexicano, siendo los estados más afectados: Aguascalientes con 99,434.5 ha, Michoacán con 29,984 ha, Querétaro con 237,031 ha y el Estado de Guanajuato, en el cual se observaron los mayores niveles de infestación por esta plaga con un total de 480,000 ha de maíz dañadas (CESAVEG, 2013).

Control biológico

El termino plaga es un concepto creado por el hombre para hacer mención a cualquier organismo que perjudica la fuente o a su alimento, hogar, vestimenta o salud, por lo cual, estas “plagas” solo se encuentran en un hábitat modificado por el hombre, pues en la naturaleza tal termino no existe, únicamente existen consumidores y productores (Rodríguez del Bosque, 2012).

El control biológico se sustenta en el uso de estrategias encaminadas a mantener la población de un organismo plaga en un nivel en el cuál no sea perjudicial para el hombre o sus actividades, en este tipo de control a diferencia del control químico, se usan a los enemigos naturales de la plaga a controlar, dentro de los que se encuentran agentes de control macrobiológico (parasitoides y depredadores) y

microbiológicos (bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoarios). Estos agentes de control guardan en general una estrecha relación con el organismo plaga, es decir, la regulación es densidad dependiente de la plaga con su enemigo natural (Lacey et al., 2001; Rios-Velasco et al., 2012; Rodríguez del Bosque, 2012).

Uno de los primeros casos de éxito de control biológico fue el uso del depredador *Rodolia cardinalis* (mulsant) (Coleóptera:Coccinellidae) en campos de cultivo de cítricos en California, E.U.A. en 1889 para el control de la cochinilla acanalada de los cítricos *Icerya purchasi* (Maskell) (Homoptera:Margarodidae) lo que se cree salvo la industria citrícola en ese estado. En México se tienen registradas 82 especies de la familia Chrysopidae (Neuroptera) y 87 de la familia Coccinellidae, con posible potencial para el control de plagas (López Arroyo et al., 2012) sin embargo los parasitoides son los agentes microbiológicos más usados en campo para el control biológico con un 76% de las liberaciones (Bernal, 2012).

Dentro de organismos microbiológicos para controlar diversas plagas en campo, la bacteria *Bacillus thuringiensis* es la más usada con cerca del 90% de los productos formulados, este éxito se debe a dos cosas: 1 a que dentro de las principales plagas de la agricultura se encuentran los lepidópteros hacia los cuales los cristales tóxicos de la *B. thuringiensis* ejercen un excelente nivel de control y 2 que la toxicidad de estos cristales es elevada, sin embargo esta bacteria no es considerada un patógeno verdadero ya que no depende del insecto susceptible para replicarse y producir el cristal toxico (Lacey et al., 2001; Mireles Martínez, 2006; Ibarra R., 2012).

Los virus a diferencia de la mayoría de las bacterias son patógenos obligados, los cuales requieren de un hospedero vivo para poder replicarse. De entre la inmensidad de virus que afectan insectos, los más estudiados y con potencial para ser desarrollados como agentes de control biológico se encuentran los Baculovirus, Cypovirus, Entomopoxvirus e Iridovirus (Del Rincon Castro, 2012; Gallegos et al., 2003). De estos grupos de virus los baculovirus son considerados los candidatos más idóneos para el control biológico de plagas en campo, debido a sus características como: que a) se han aislado de más de 600 especies de insectos en

campo, b) en muchos de los casos causan-epizootias naturales, c) presentan un alto grado de especificidad hacia un solo huésped, d) poseen virulencias elevadas y son capaces de establecerse en el ecosistema manteniendo un constante control sobre la plaga (Moscardi, 1999; Lacey et al., 2001; Szewczyk et al., 2011).

Baculovirus

Según Theze y colaboradores en 2011, es posible que los baculovirus han estado ocasionado enfermedades en los insectos desde que estos existían en la prehistoria, lo que ha ocasionado que estos evolucionaran junto con sus hospederos volviéndose sumamente específicos y virulentos (Herniou et al., 2004; Theze et al., 2011). Actualmente los baculovirus son usados en programas de control biológico de plagas de importancia ecológica y económica en varias regiones del mundo, algunos ejemplos son el control de *Anticarsia gemmatalis* en Brasil, de *Cydia pomonella* en Francia, Suiza, Alemania y Rusia, *Phthorimaea operculella* en Perú, *Pieris rapae* en China, *Orgyia pseudotsugata* en bosques forestales en Canadá y *Lymantria dispar* en Canadá, USA, Europa, China y Rusia, los anteriores son solo algunos de los ejemplos del control aplicado de plagas en campo que han sido llevados a cabo con éxito (Moscardi, 1999; Szewczyk et al., 2011).

Clasificación de los baculovirus

De acuerdo con la composición de viriones dentro de los cuerpos de oclusión, los baculovirus se clasificaban anteriormente en nucleopoliedrovirus (NPV) y granulovirus (GV), los cuales están compuestos principalmente de poliedrina o granulina respectivamente. En el caso de los NPV estos pueden presentar diferencias en cuanto a la cantidad de nucleocápsides dando así lugar a los fenotipos simples (SNPV) los cuales tienen una sola nucleocápside por envoltura viral y a los múltiples que tienen varias nucleocápsides por envoltura (MNPV) (Jehle et al., 2006; Rohrmann, 2013d). Actualmente los baculovirus se clasifican de acuerdo con las relaciones filogenéticas presentes en sus genomas, dependiendo de la relación con las familias de insectos a los cuales infectan y al hecho de que sean NPV o GV. Esta

clasificación los agrupa en cuatro géneros: *Alfabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gamabaculovirus* y *Delta baculovirus* (Herniou et al., 2004; Jehle et al., 2006).

Los *Alfabaculovirus* engloban a todos los nucleopoliedrovirus (NPV) específicos de lepidópteros, con genomas de entre 100-180 kilopares de bases (kpb) cuyo virus tipo es el nucleopoliedrovirus de *Autografa californica* (AcNPV). Estos se subdividen en grupo I y II, el grupo uno se caracteriza por la presencia de la proteína GP64 en los viriones gemados y el grupo II, por carecer de la proteína GP64 y poseer a la envoltura de fusión unida a furina o proteína F. Sin embargo, algunos miembros del grupo I también tienen la proteína F, ambas están relacionadas con la diseminación de los viriones gemados de célula a célula sin embargo GP64 es capaz de reconocer una mayor gama de receptores que la proteína F (Herniou et al., 2001; Jehle et al., 2006; Park et al., 1999; Wang et al., 1997; Westenberg et al., 2007).

Los *Betabaculovirus* comprenden a los granulovirus específicos de lepidópteros con genomas que oscilan entre las 100-180 kpb cuyo modelo es el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV). El género *Gamabaculovirus* incluye a los nucleopoliedrovirus aislados de himenópteros con genomas de entre 82-86 kpb cuyo virus modelo es NPV de *Neodiprion lecontei* (NeleNPV). Los *Deltabaculovirus* abarcan a los NPV aislados de Dípteros como al nucleopoliedrovirus de *Culex nigripalpus* (CuniNPV) cuya proteína de oclusión no es homóloga a la de la poliedrina de los *Alfabaculovirus* o de los *Gamabaculovirus* ni a la granulina de los *Betabaculovirus* (Jehle et al., 2006).

Ciclo de replicación y proteínas asociadas a los baculovirus

La familia *Baculoviridae* presenta dos tipos de viriones: los viriones derivados de oclusión (VDO) y los viriones gemados (VG) ambos son genéticamente idénticos aunque existen diferencias en cuanto a morfología, sitio de ensamble, proteínas estructurales, fuente de la envoltura viral e infectividad (Kelly et al., 2016). En el caso de los VDO, los cuales son responsables de la infección primaria, estos son liberados del cuerpo de oclusión (CO) al ser degradado por las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto y proteasas presentes en él. Esta degradación libera

proteínas asociadas al CO como las enhancinas y proteasas, de las cuales las primeras están presentes solo en *Betabaculovirus* y posiblemente en algunos *Alfabaculovirus*. Su función es degradar la capa de mucina que junto con la quitina forman la membrana peritrófica, la cual recubre y protege a las células del intestino medio (Wang & Granados, 1997; Hashimoto et al., 1991). Las proteasas asociadas pueden ser producidas por el propio virus (catepsinas en el caso de AcMNPV) o propias del insecto, en ambos casos estas son atrapadas en el cuerpo de oclusión durante las fase de oclusión y su función es ayudar a la degradación total del mismo y de algunas proteínas asociadas a la membrana peritrófica (Slack et al., 1995).

Los VDO están compuestos por nucleocápsides virales cubiertas por una envoltura viral que tiene asociadas proteínas, las cuales, les permiten entrar a las células del intestino medio y poder llevar a cabo el proceso primario de la infección. El proceso de infección de las células columnares del intestino medio se lleva a cabo gracias a las proteínas asociadas a los VDO presentes tanto en la envoltura como en las nucleocápsides, estas son obtenidas cuando los viriones se arman y se ocluyen en el núcleo infectado (Rohrmann, 2013e, 2013f). Del mismo modo, en este momento de la infección, las nucleocápsides se asocian entre sí (MNPV) por acción de la P33 (Ac92) o se pueden mantener individuales, cualquiera que sea el caso, las nucleocápsides son cubiertas por una envoltura viral probablemente de la membrana nuclear a la cual se le asocian proteínas propias del virus las cuales se pueden clasificar en dos tipos: proteínas presentes en la envoltura (ODV-E) y factores de infectividad *per os* (PIF por sus siglas en inglés) (Rohrmann, 2013e, 2013f) estos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1.- Proteínas de la envoltura de los viriones derivados de oclusión y factores de infectividad *per os*. Consultado en Rohrmann, 2013, con modificaciones

Nombre/marco de lectura en AcMNPV	Presencia en la familia <i>Baculoviridae</i>
Proteínas de la envoltura de los viriones derivados de oclusión (ODV por sus siglas en inglés)	
BV/ODV-E26/Ac16	Alfabaculovirus grupo I
ODV-E25/Ac94	Alfabaculovirus grupo I y II, Betabaculovirus
ODV-EC43/Ac109	En todas las familias
ODV-E18/Ac143	Alfabaculovirus grupo I y II

Ac145 y Ac150	---
Factores de infectividad <i>per os</i>	
pif0/p74/Ac138	En todas las familias
pif1/Ac119	En todas las familias
pif-2/Ac22	En todas las familias
pif3/Ac115/Bm95	En todas las familias
pif4/Ac96	En todas las familias
pif5/ODV-E56/Ac148	En todas las familias
pif6/Ac68	En todas las familias
pif7/Ac110	Alfabaculovirus grupo I y II, Betabaculovirus
pif8/VP91/Ac83	En todas las familias
pif9/Ac108/Sf58	Alfabaculovirus, Betabaculovirus y gammabaculovirus.

Las primeras proteínas de los baculovirus asociadas en interaccionar con el huésped son VP-91, Ac145 y Ac150, las cuales tienen sitios de unión a quitina y se unen a las microvellosidades de las células columnares en las que se sintetiza la quitina presente en la membrana peritrófica para localizar a los VDO (Broehan et al., 2007; Zimoch et al., 2005). Por otro lado, las proteínas PIF (1, 2, 3, 4 y P74) funcionan como proteínas de anclaje al igual que VP-91, Ac145 y Ac150, lo cual sugiere que los factores PIF podrían ser necesarios para el anclaje a las microvellosidades y que trabajan juntos, lo que explica por qué al ser delatado alguno de los factores PIF, la infectividad *per os* se ve reducida. De manera interesante, se ha encontrado que los factores PIF: PIF2 y PIF3 interaccionan entre sí de manera muy estable, ambos a su vez, pueden interaccionar con la proteína ODV-E56 y Ac98 (38K) (Peng et al., 2010a).

Por otro lado, si se toma en cuenta la capacidad de E-56 de degradar condroitina, este podría ser un posible mecanismo de acción de un conjunto de proteínas para poder realizar la infección en un organismo susceptible (Ke Peng et al., 2010). E-56 también podría verse involucrada en el reconocimiento de los receptores y a la entrada de las nucleocápsides a las células (Vigdorovich et al., 2007; Sugiura et al., 2011;). En fechas recientes se encontró que, VP95 al igual que

E-56, interaccionan con el complejo PIF y al tener esta última dominios de unión a quitina, puede ayudar a estabilizar el complejo haciendo más fuerte la unión a los sitios de síntesis de quitina en las microvellosidades del intestino medio (Peng et al., 2012). La formación del complejo anterior podría facilitar la unión a receptores sensibles a proteasas y una vez unidos, la envoltura viral se fusionaría con la membrana celular y liberaría las nucleocápsides al interior de las células (Horton & Burand, 1993; K. Peng et al., 2010; Rohrmann, 2013f).

A continuación, se describen las principales funciones e interacciones de la mayoría de los ODV-E y de los factores PIF:

En el caso de la proteína ODV-E26 esta interacciona con PF25 (Ac61) formando un complejo a su vez, con actina, y Katsuma y colaboradores en el 2012 detectaron que una delección de E-26 puede causar una ligera disminución de los VB (Katsuma et al., 2012; Rohrmann, 2013e). En experimentos con ensayos de dos híbridos, se encontró que ODV-E26 interacciona con ODV-E56, la cual al estar relacionada con interacciones con complejo PIF podría estar jugando un papel dentro de la infección primaria (Ke Peng et al., 2010).

En el caso de ODV-E25 interacciona con ODV-E56 lo que la podría sugerir que es parte del complejo (Ke Peng et al., 2010). En la porción N-terminal en los primeros 24 aminoácidos (aa), E-25 posee una región altamente hidrofóbica relacionada con la penetración en la membrana celular. Una delección de la secuencia que codifica para esta proteína, causa una disminución de 100 veces la producción de VB y provoca una pobre oclusión de los viriones en la matriz de poliedrina en AcMNPV, lo cual sugiere que esta de algún modo regula el proceso de producción o ensamble de los VB (Chen et al., 2012).

En tanto ODV-EC43 (Ac109) se cree está involucrada en la señalización nuclear de los viriones, ya que al realizar un delección del gen de esa proteína, los viriones eran capaces de entrar al citoplasma pero no al núcleo, y los cuerpos de oclusión carecían de viriones (Alfonso et al., 2012). Mientras que ODV-E18 se cree es esencial para la producción de viriones gemados (McCarthy & Theilmann, 2008).

En cuanto a los factores de infectividad *per os* (PIF) estos son esenciales para la infección de las células columnares del intestino medio de los insectos sin ser necesarios para llevar a cabo el proceso de infección secundario. Existen 10 factores PIF codificados por AcMNPV descritos en la tabla 1, los cuales son: PIF0 (P74), PIF1 (Ac119), PIF2(Ac22), PIF3 (Ac115), PIF4 (Ac96), PIF5 (ODV-E56), PIF6 (Ac58), PIF7 (Ac110), PIF8(VP91) y SF58 (Ac108), todos poseen un dominio hidrofóbico transmembranal que les ayuda a adherirse a la membrana viral y una cantidad variable de cisteínas, cuyo papel es formar presuntamente los enlaces disulfuro entre proteínas para unir los complejos entre sí (Wang et al., 2017).

PIF0 fue el primer factor PIF en ser descubierto, es una proteína de 74 kDa (kilodaltones) asociada a la membrana de los ODV y posee un dominio C-terminal transmembranal expuesto (Faulkner et al., 1997). PIF1 es una proteína de 60 kDa, la cual es transcrita a las 12 hpi, con un dominio transmembranal en su porción N-Terminal, con 16 cisteínas conservadas (Gutierrez et al., 2004). PIF2 Es una proteína de 44 kDa, con un dominio transmembranal en su porción N-Terminal, con 12 cisteínas (Wang et al., 2017) y su expresión inicia a las 24 hpi, sin embargo su proteína se encuentra en las células infectadas hasta las 36 hpi (Fang et al., 2006).

PIF3 es una proteína de 23 kDa, con un domino transmembrana en su porción N-Terminal hidrofóbica, posee 12 cisteínas conservadas (Wang et al., 2017), se expresa a las 12 hpi y su proteína se encuentra a las 36 hpi y junto con P74, PIF1 y 2, se ha demostrado no interaccionan con la MP sino que lo hace directamente con las células epiteliales (Li et al., 2007; Song et al., 2008). PIF4 es una proteína de 20 kDa, con un dominio transmembranal en su porción N-Terminal, únicamente posee 2 cisteínas conservadas y se encuentra presente tanto en ODV como en VB (Fang et al., 2009; Wang et al., 2017). PIF5 es una proteína de 40 kDa, con un dominio transmembranal en su porción N-terminal, con 4 cisteínas conservadas (Wang et al., 2017), este gen es expresado desde las 16 hasta las 72 hpi, y como proteína se encuentra desde las 36 hpi (Braunagel et al., 1996) y está relacionado con la maduración del ODV (Braunagel et al., 1996; Braunagel & Summers, 2007).

PIF6 es una proteína de 16 kDa, con un dominio de transmembrana en el dominio C-terminal (Wang et al., 2017), no contiene cisteínas conservadas, se expresa desde las 3 hpi y como proteína se encuentra a partir de las 36 hpi (Li et al., 2008). PIF7 es uno de los factores PIF más recientes fue propuesto por Javed et al., 2017, como el más reciente factor *pif*, es una proteína de 7 kDa, con un dominio transmembranal en el extremo N-terminal, sin cisteínas conservadas. El gen se expresa desde las 12 hpi y desde las 18 se encuentra una leve señal de la proteína que es reforzada a las 24 hpi (Jiantao et al., 2016). PIF8 es una proteína de 115 kDa, con 13 cisteínas conservadas, su dominio transmembranal consta de 23 aa en la porción N-terminal (Wang et al., 2017). Se sabe que este gen en sus nucleótidos 1651-1850, son los responsables del ensamble de las nucleocápsides, su proceso de expresión inicia a las 24 hpi y la proteína se detecta a las 24 hpi (Javed et al., 2017; Zhu et al., 2013). SF28 ha sido propuesto como el 10° factor PIF (PIF9) es una proteína de 12 kDa con un dominio transmembranal a la mitad de la proteína (Wang et al., 2017), su expresión es detectada desde las 12 hpi incrementándose a las 48 y manteniéndose hasta las 144 hpi y se encuentran homólogos en los baculovirus que afectan lepidópteros (Simon et al., 2012).

Todos los factores PIF forman un complejo y se unen entre si gracias a las cisteínas conservadas, esta unión se lleva a cabo físicamente en la superficie del virión gracias a sus dominios de transmembrana (Wang et al., 2017). Entre las interacciones de los complejos PIF la de PIF-2 y PIF-3 se asume como el responsable de que los VDO reconozcan a las células del intestino, esto por el reconocimiento de las zonas ricas en producción de quitina en las células columnares, del mismo modo se ha observado que una delección de estos complejos puede causar una pérdida de la infección por parte de los VDO (Faulkner et al., 1997; Li et al., 2007; K. Peng et al., 2010; Rohrmann, 2013e).

El factor ODV-E56 puede estar directamente relacionado con la entrada de los VDO, pues un fragmento de 12aa en su porción N-terminal es capaz de unirse a las microvellosidades del epitelio en *Heliothis virescens* e inhibir una posterior infección por AcMNPV (Sparks et al., 2011). En cambio, una porción de 66aa en el

extremo N-terminal es capaz de degradar condroitina el cual es un componente semi abundante en las células de los insectos (Vigdorovich et al., 2007, Sugiura et al., 2011). Este factor E56 no solo interacciona con otros factores *per os*, sino que también se ha demostrado por experimentos de dos híbridos, que interacciona con ODV-E25, PF25, ODV-E26, VP39, PIF2 y PIF3, así como entre el factor PIF2 con PIF3, lo que está relacionado con la formación del complejo que permite el reconocimiento de los receptores, e interacciones entre PIF3 con ODV-E56 lo que podría sugerir que E56 forma parte del proceso del reconocimiento de las células columnares susceptibles a la infección por baculovirus (Ke Peng et al., 2010).

En el caso de Ac145 y Ac150 la delección de la primera causa una baja en la infección en *Trichoplusia ni* de seis veces, y para la segunda, una pérdida en la virulencia en *Spodoptera exigua*, *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. Así mismo, estas dos proteínas contienen dominios de unión a quitina y están relacionadas entre sí en un 23% de su secuencia de aminoácidos y un peso molecular entre los 9-11 kDa, por lo que podrían estar relacionadas en algún grado en el reconocimiento y anclaje a las microvellosidades (Lapointe et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Una vez que la envoltura viral se ha fusionado con la membrana celular varias proteínas asociadas a las nucleocápsides al igual que las proteínas de la envoltura ayudan a que las nucleocápsides entren a las células. Tal es el caso de las proteínas VP39 y VP95, las cuales interaccionan con ODV-E66 que a su vez interacciona con el complejo PIF. Una vez dentro de las células y que las nucleocápsides han sido liberadas al citoplasma, estas tienen que ser transportadas al núcleo debido a una polimerización de la actina, lo cual puede ser llevado a cabo por acción de la p78/83, ya que ésta es capaz de interaccionar con la actina (Goley et al., 2006). Posteriormente las nucleocápsides se alinean con los poros nucleares y entran a través de ellos al núcleo por las diferencias de diámetro entre los poros de 38-78 nm y de 30-60 nm para las nucleocápsides (van Loo et al., 2001; Alber et al., 2007; Au et al., 2013).

Las proteínas anteriores no son las únicas asociadas a las nucleocápsides, existen más proteínas que si bien no tienen hasta el día de hoy un rol en el transporte

de los VDO, si tienen un rol importante en la estabilización del ADN. Un ejemplo de éstas lo representa la proteína P6.9, las de arresto inicial del ciclo celular (Ac144) y aquellas que participan en la movilización de nucleocápsides ya formadas hacia la membrana celular para proseguir con el segundo ciclo de infección en los tejidos, graso, hemocitos, tráqueas, etc. Ejemplos de estas proteínas que se han reportado como asociadas a las nucleocápsides se muestran en la Tabla 2, lo anterior fue consultado en Rohrmann, 2013.

Tabla 2.- Proteínas asociadas a las nucleocápsides. Tomado de Rohrmann, 2013.

Nombre/marco de lectura en AcNPV	Presencia en la familia <i>Baculoviridae</i>
P6.9 unión a ADN/Ac100	Todas las familias
VP39 cápside/Ac89	Todas las familias
GP41 tegumento/Ac80	Todas las familias
38K/Ac98	Todas las familias
Ac142	Todas las familias
Ac144	Todas las familias
Ac66	Todas las familias
P33/Ac92	Todas las familias
VP1054/Ac54	Todas las familias
VLF-1/Ac77	Todas las familias
VP80/Ac104	Alfabaculovirus géneros I y II
PP78/83/Ac9	Alfabaculovirus géneros I y II
P24/Ac129	Alfabaculovirus géneros I y II Betabaculovirus

El proceso de infección secundaria es un proceso reiterativo con el cual se logra una infección completa de todos los tejidos de la larva, a través de una constante liberación de VB. Para poder facilitar este proceso, existen varias proteínas virales que causan modificaciones en el arreglo celular, provocando un aumento en el tamaño celular, tal es el caso de la P78/83 y la P10. En el primer caso, P78/83 se une a la actina, y junto con un complejo de siete proteínas llamado Arp2/3, participan en una polimerización dependiente de ATP de la G-actina (globular) a F-actina (filamentosa) lo cual provoca el re-arreglo de la morfología celular y permite la

movilidad del patógeno a través de las células. En el caso de la P10, esta interacciona con la tubulina y causa una modificación en los microtúbulos, contribuyendo a la reorganización del citoesqueleto y la morfología celular (Cheley et al., 1992; Goley et al., 2006; Wang et al., 2008).

El paso final de la infección viral es la oclusión de las nucleocápsides en una matriz de proteína, desde el punto de vista de la producción de éstas, la mayoría se mantiene en el núcleo de la célula y solo alrededor del 2.3% brotan para infectar nuevas células. Es decir que de 84,000 posibles nucleocápsides en una célula, solo 2,000 se convertirán en el BV (Rosinski et al., 2002). Los viriones que permanecen en el núcleo, obtienen una membrana derivada de la membrana nuclear, la cual ha sido modificada con proteínas de origen viral (Braunagel & Summers, 2007). En esta última etapa de la infección, varias proteínas son asociadas al CO, dichas proteínas se mencionan en la tabla 3, es el caso de las enhancinas y proteinasas alcalinas descritas anteriormente, Ac131, Ac8 (poliedrina) y Ac137 (P10). Ac131 o la proteína de la envoltura de la poliedrina, se asocia con la p10, y juntas parecen envolver el CO sellando las fisuras y estabilizando a la matriz de poliedrina (Rohrmann, 2013). En el caso de Ac8 (poliedrina) y Ac137 (P10) las cuales son híper-expresadas, la poliedrina es la proteína mayoritaria de los CO, tiene un peso de 30 kDa y es de los genes más conservados en los genomas de la familia *Baculoviridae*. Se acumula en el núcleo y en algún punto, inicia un proceso de cristalización, sin embargo, no es del todo claro si la oclusión de los viriones en esta proteína está guiada por la concentración de poliedrina o si los viriones actúan como ancla para la cristalización de ésta y la formación de los CO. Sin embargo, la proteína Ac68 conecta este proceso, pues si esta es escindida de BmNPV, los viriones no se incorporan en los CO (Xu et al., 2008). La proteína P10 participa en el re-arreglo celular, sin embargo, se ha detectado que las fibras de esta proteína se alinean con los CO y los recubren, generando una envoltura de P10 alrededor del CO, lo cual rellena los huecos que deja la poliedrina y actúa como un estabilizante de este (Cheley et al., 1992; Gross et al., 1994).

Tabla 3.- Proteínas asociadas al CO. Tomada de Tomado de Rohrmann, 2013, con modificaciones.

Nombre/marco de lectura en AcNPV	Presencia en la familia <i>Baculoviridae</i>
Poliedrina/Ac8	Todas las familias excepto CuniNPV
Envoltura de la poliedrina/Ac131	Todas las familias excepto CuniNPV
Enhancinas	Algunos NPV y GV
P10/Ac137	Alfa baculovirus grupo I y II, algunos GV
Proteasas alcalinas	Principalmente contaminantes
Ac68	Todas las familias

Regulación de la Transcripción y replicación viral

Una vez que los viriones de los Baculovirus liberan su material genético dentro del núcleo de las células permisivas, se inicia el proceso de transcripción de los genes del virus, que en el caso de los baculovirus es de dos tipos: genes tempranos y genes tardíos. Algunos autores lo dividen en cuatro etapas: genes inmediatos tempranos y tempranos, cuya expresión es entre las 6-12 horas post infección (hpi) y son dependientes de la ARN polimerasa del huésped: los genes tardíos se expresan entre las 12-18 hp y los muy tardíos a las 24 hpi siendo estos dependientes de la ARN polimerasa viral ((Chen et al., 2013; Grula et al., 1981; Rohrmann, 2013b). La transcripción temprana es llevada a cabo por la ARN polimerasa II del huésped y se ayuda de los factores de la transcripción (FT) del mismo, los cuales son elementos que se unen al ADN en secuencias conocidas como enhancers. Dichas secuencias están cercanas al promotor o sitio de unión de la ARN polimerasa en el ADN. Estas secuencias de unión de FT, propician un mayor acercamiento de estos factores a los sitios de iniciación de la transcripción (Huh and Weaver, 1990).

Los factores de transcripción pueden clasificarse en cuatro categorías dependiendo de su efecto en la transcripción como: a) FT usados para seleccionar el gen a transcribir; b) FT que atraen y estabilizan a la ARN polimerasa al promotor del gen a transcribir; c) FT que facilitan la síntesis de ARN y d) FT que elevan la cantidad de transcritos. Estos factores de transcripción coordinan el ensamble del

complejo de transcripción (diferentes tipos de FT) a los “enhancers” cercanos a los promotores de los genes a transcribir. Asimismo, estabilizan y aumentan los niveles de expresión de los genes virales, lo cual en las primeras etapas de expresión, lleva a la redirección del proceso celular, y por ello el virus asegura su propia replicación y produce una cascada de expresión de genes virales ordenada y controlada por los propios genes virales (Rohrmann, 2013c).

Los “enhancers” de los baculovirus son conocidos como regiones homólogas (RH), las cuales también tienen la función de ser orígenes de replicación (Guarino et al., 1986; Guarino & Summers, 1986; Pearson et al., 1993). Están compuestas por secuencias de 70 pb (pares de bases) con un segmento (palíndrome imperfecto) de 30 pb en el centro de la secuencia y estos palíndromes tienen en cada uno de sus extremos una secuencia de respuesta CRE (cAMP) y TRE (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato o TPA) a los cuales se les unen los FT y estimulan la transcripción de la ARN polimerasa II (Guarino et al., 1986; Rodems & Friesen, 1995). En el proceso de infección de AcMNPV, varias proteínas celulares se unen a estas secuencias CRE y TRE activando la transcripción de los genes Inmediatos tempranos (IT) (Landais et al., 2006). Las secuencias de las RH podrían ser únicas para cada cepa viral debido a que el FT IE1 (inmediato temprano) de AcMNPV no activa la transcripción en OpMNPV tan eficientemente como su propio IE1 (Theilmann & Stewart, 1991). Estas RH están presentes en ocho regiones distintas del genoma de AcMNPV con entre dos a ocho repeticiones de las secuencias RH en cada región, y guardan relación dentro de un mismo genoma y poca homología entre genomas diferentes (Rohrmann, 2013c).

La replicación del ADN viral en los baculovirus se lleva a cabo a las 12 horas post infección. En el caso de AcMNPV, una vez que se sintetizan las proteínas tempranas, cuya transcripción es regulada por IE1, los primeros fenómenos que ocurren para la replicación, es el poder diferenciar entre el ADN del hospedero y del propio virus. Esto se ha logrado gracias a que los virus tienen secuencias de inicio de replicación únicas llamadas orígenes de replicación (*ori*). Para que la transcripción se inicie, es necesario que una proteína de unión al *ori* interactúe con él, es

probable que esta proteína, sea IE1, pues esta proteína es capaz de unirse a los enhancers y varios orígenes de replicación están asociados a ellos. Sin embargo, existen orígenes de replicación que no tienen homología con los enhancers y a los cuales no se une IE1, por lo que lo anterior aún necesita más investigación (Choi & Guarino, 1995; Olson et al., 2003; Rodems et al., 1997). En el proceso anterior, la posible proteína de unión al ori causaría un desdoblamiento del ADN, lo cual provocaría la atracción de la helicasa, que para el caso de los baculovirus es la proteína temprana P143 (Ac95). Esta rompe los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas de ADN con un alto gasto de energía, proveída por un dominio de ATPasa en la propia helicasa. Esta interacciona con la proteína LEF-3 (Ac67), la cual es similar a las proteínas de unión a cadenas sencillas (SSB por sus siglas en inglés), que se unen a la cadena sencilla de ADN estabilizándola y evitando que se forme la doble cadena nuevamente (Hang et al., 1995).

Una vez separadas y estabilizadas las cadenas de ADN, se forman dos cadenas, la líder y la cadena retrasada, en la cadena líder se une la proteína LEF-1 (Ac14), la cual es una primasa, LEF-1 interacciona con un factor asociado llamado LEF-2, el cual se cree es una proteína de unión a ADN sin que su función sea clara (Mikhailov & Rohrmann, 2002). La síntesis de estos primers en la cadena líder es esencial para la replicación del ADN, pues la ADN polimerasa viral únicamente puede replicar a partir del extremo -OH en sentido 5'-3', en el caso de la hebra retardada esta no se replica de manera continua, se replica en fragmentos llamados fragmentos de Okasaki, los cuales pueden tener longitudes de entre 0.2-5 kb. Estos al inicio tienen primers de ARN sintetizados por LEF-1, donde se posicionará la ADN polimerasa y sintetizará ADN en sentido 5'-3'. Una vez que están sintetizados los primers, la unión de la ADN polimerasa es viable, esta se posiciona en el extremo 3' e inicia la polimerización hacia el sentido 5'. En relación a la hebra a replicar, otras actividades de la ADN polimerasa son su actividad de exonucleasa en sentido 3'-5', es decir, es capaz de regresar sobre la cadena recién sintetizada para reparar errores en la síntesis de la nueva cadena y tener actividad de exonucleasa en sentido 5'-3' con lo cual se remueven los primers de ARN (Shevelev & Hubscher, 2002).

Hasta este momento se ha estado hablando de la formación inicial del complejo de iniciación de la transcripción en los baculovirus y de cómo algunas proteínas y enzimas propias de éstos, están involucradas en los procesos de reparación del ADN y de la obtención de energía en forma de NAD⁺ y ADP. Sin embargo, el proceso por el cual el ADN se replica aun es sumamente incierto. Posiblemente los baculovirus usan dos estrategias: a) la combinación de la replicación clásica de los plásmidos de círculos rodantes iniciando en un punto y continuando hasta separar las dos cadenas nacientes, combinado con el método que siguen otros virus que se replican en el núcleo, es decir, b) una replicación dependiente de la recombinación. Lo anterior debido a que los baculovirus tienen un genoma de gran tamaño, lo que involucraría vario *ori* para poder coordinar en tiempo la replicación y el posterior empaquetamiento del ADN en las nucleocápsides. Esencial para la iniciación de este proceso, es la fijación de las proteínas SSB y LEF-3 al ADN, aunado al reconocimiento de éstas por una alfa nucleasa roja, la cual en otros virus de invertebrados que se replican en el núcleo resulta esencial para el inicio de la replicación (Li et al., 1998; Mikhailov et al., 2006).

El proceso de replicación en los baculovirus se da en un punto, probablemente, entre la expresión de los genes tempranos y los tardíos. En el momento que el ADN ha sido replicado, este tiene que ser procesado para ser empaquetado. Para ello participan tanto las proteínas propias del virus, como de los componentes del citoesqueleto, los cuales pueden ser modificados por proteínas propias del virus (Volkman, 1988). Entre las proteínas del virus que participan directamente en la maduración de los viriones, está el factor muy tardío 1 o VLF-1 el cual es esencial para la protección del ADN del ataque de DNAsas, contribuye a la expulsión de la pre cápside del estroma virogénico y posiblemente, también tiene un papel importante en la unión del ADN a la pre cápside (Vanarsdall et al., 2006). Estos factores, pueden actuar en conjunto para asegurar un empaquetamiento correcto del ADN, este proceso ocurre en el estroma virogénico en el momento en que la cápside está iniciando su ensamble. Es posible que conjuntos de proteínas reconozcan una secuencia en el ADN de los baculovirus y esta unión sirva de enlace entre la cápside y el ADN. Se han propuesto para esto a la proteína VP1054 (Ac54), por encontrarse

presente en la nucleocápside viral y por su capacidad de interactuar con una proteína llamada PUR α , gracias a la cual se da una unión entre VP1054 con el ORF 1629/p/78/83 (Ac9) el cual es rico en guanina (Marek et al., 2013). Una vez que se enlaza el ADN con las pre cápsides estas sufren un proceso de maduración el cual consiste en el crecimiento de la misma envolviendo al ADN en su interior (Kool et al., 1991).

El proceso de replicación y encapsulamiento del DNA de los Baculovirus se da en el lapso del cese de la transcripción de los genes tempranos y la activación de los tardíos, aproximadamente a las 12 hpi. En el caso de la activación de los últimos, no está completamente dilucidado como son activados; sin embargo, se ha observado que la RNA polimerasa del virus es la causante principal de la iniciación de la transcripción tardía, gracias a un reconocimiento de las secuencias reguladoras de la transcripción tardía, aunque algunos procesos alternos, como procesos físicos y FA, al final de la replicación también son necesarios para la transcripción de algunos genes con promotores tardíos y tempranos (Rapp et al., 1998).

La expresión muy tardía de los genes de baculovirus es de sumo interés e importancia para los mismos, ya que en esta etapa se lleva a cabo una de las mayores cascadas de expresión génica de dos proteínas del virus: la poliedrina y la P10, las cuales son necesarias para la inclusión de las partículas infectivas en la matriz de poliedrina y la formación del CO. El fenómeno de la alta producción de transcritos, se da gracias a los promotores de la poliedrina y p10, considerados como promotores muy fuertes. La transcripción de estos genes muy tardíos, se da en la etapa final del ciclo de replicación del virus, en el momento en que las nucleocápsides se ocluyen gracias al ADN que se empaquetó y a una serie de condiciones, tales como: a) la exposición de los promotores de la transcripción muy tardía al final de la replicación, b) el cese de la transcripción tardía, c) el reconocimiento de los promotores muy tardíos por la RNA polimerasa, d) las proteínas VLF-1 y PK-1, así como de la eficacia de LEF-4 en el “capping” del ARNm, (Gross & Shuman, 1998; Yang & Miller, 1999; Knebe-Morsdorf et al., 2006).

Implicaciones de la infección por baculovirus en el hospedero

Apoptosis

La apoptosis puede ser inducida por un daño en el ADN de la célula, o por una replicación y transcripción de ADN de manera independiente al ciclo celular, lo cual es característico de una infección por baculovirus. Estos son capaces de bloquear el ciclo celular. En experimentos en la línea celular Sf9 sincronizada entre la fase G2/M (Finalización de la fase de preparación para la división celular/Inicio de la mitosis), mientras que al realizar una infección, todas las células permanecieron en esta fase y al infectar células de la misma línea sincronizadas en G1, se observó el arresto en la fase S (fase de duplicación de los cromosomas) (Ikeda & Kobayashi, 1999). En otro estudio se reportó que si las células se infectaban entre la fase G2/M o S, estas mismas se arrestaban en G2/M y S respectivamente (Saito et al., 2002). El anterior arresto es conocido como fase S viral, en la cual los componentes del virus provocan que la maquinaria celular transcriba selectivamente los genes del baculovirus, a través del trans activador IE1, en combinación con los enhancers, para posteriormente poder sintetizar su propia maquinaria celular y usarla para su transcripción, replicación, regulación y encapsulación (Thiem, 2009).

La replicación del ADN de los baculovirus desencadena el proceso de apoptosis en células de *S. frugiperda* por la activación de serin proteasas llamadas caspasas, de las cuales existen dos tipos: las caspasas iniciadoras y las efectoras (Xing et al., 2005). Las primeras interaccionan con formas inactivas de las segundas, para activarlas, y que estas desencadenen la apoptosis. Algunas de estas caspasas efectoras tienen como blanco el citoesqueleto, provocando un cambio en la morfología celular, una posterior activación de las nucleasas y ataque a otros elementos estructurales, lo que trae consigo la subsecuente fragmentación celular (Xing et al., 2005). Con respecto a lo anterior, los baculovirus han desarrollado un mecanismo sumamente eficiente, con el cuál son capaces de inactivar el proceso apoptótico de forma muy exitosa. Dentro de este mecanismo participan una serie de proteínas como la P35, P49, factores anti apoptóticos (IAP por sus siglas en inglés) y el supresor apoptótico (Apsup por sus siglas en inglés).

P35 es una proteína que se encuentra presente en los *Alfabaculovirus* del grupo I, los cuales están estrechamente relacionados con AcMNPV. P35 se expresa entre la fase temprana y tardía de la expresión génica de los baculovirus, y tiene como característica que es capaz de unirse al sitio activo de la caspasa efectora 1, actuando como un inhibidor irreversible; y sorprendentemente, P35 es capaz de expresarse en el momento de que la célula expresa la caspasa 1 (Bump et al., 1995; Rohrmann, 2013a). P49 es una variante de P35 que se encuentra en los Alfa baculovirus del grupo II, que a diferencia de P35, inactiva tanto a las caspasas efectoras como a las activadoras. Esta proteína es expresada a los mismos tiempos post infección que P35 (Jabbour et al., 2002; Zoog et al., 2002).

Las proteínas anti-apoptóticas IAP, pertenecen a una familia de proteínas que están presentes en todos los genomas de baculovirus. Constan de cinco linajes, IAP 1 al 5, los cuales se distribuyen de la siguiente manera: IAP-1, se encuentran en los *Alfabaculovirus* del grupo I; IAP-2, se encuentran en los *Alfabaculovirus* del grupo I y II, IAP-3 se encuentran en los Alfa baculovirus del grupo I y II, (Ikeda et al., 2004; Mace et al., 2010). Las secuencias de IAP incluyen dominios específicos, tales como el dominio BIR de 70 aa con un núcleo de Zn. Este dominio está relacionado con la interacción proteína-proteína y la inactivación de las caspasas (Mace et al., 2010; Rohrmann, 2013a). Un dominio tipo anillo llamado RING de 40 aa en el extremo C terminal, el cual interacciona con las caspasas y les agrega ubiquitina a través de una enzima probablemente modificada por el virus (E3), lo que provocaría que la caspasa sufriera una degradación (Feltham et al., 2012).

Respuesta inmune

Los insectos han desarrollado un sistema de defensa contra las infecciones, este sistema funciona de manera similar al de los organismos superiores, incluye células especializadas llamadas hemocitos, capaces de hacer frente a una infección incluso viral. Estos se encuentran libres en la hemolinfa y desarrollan una actividad inmune como: fagocitosis, encapsulación y melanización (Clem, 2005). Estos hemocitos son infectados una vez que los BV son expulsados a la hemolinfa, y se ha determinado que en estos ocurre la replicación del ADN viral a las 24 hpi en muy

baja cantidad, con un pico medio a las 48 y el máximo nivel de replicación ocurre a las 72 hpi (Bao et al., 2010).

La melanización en los insectos es un proceso regulado por una cascada de serin proteasas, que activan profenol oxidasas, a fenol oxidasas que son capaces de oxidar fenoles y convertirlos en compuestos no aromáticos, llamados quinonas. Estas se polimerizan y forman melanina (Lemaitre & Hoffmann, 2007), las mismas fenol oxidasas también pueden llegar a tener un efecto antiviral en la hemolinfa de los insectos (Popham et al., 2004). Durante este proceso de melanización, se producen especies reactivas de oxígeno, las cuales tienen un efecto directo sobre patógenos. Una ruta que tiene que ser activada para que la melanización se lleve a cabo, es la ruta Toll, en la cual se reconocen moléculas asociadas a los patógenos que no son parte del organismo hospedero. En *Drosophila*, esta ruta depende de la remoción de un inhibidor de las serin proteasas (Serpina27A). Lo anterior es esencial para la inhibición de una infección viral (Makkonen et al., 2015; Zamboni et al., 2005). Por tanto, la inhibición de esta respuesta podría ayudar al virus a replicarse de manera óptima, y esto puede ser llevado a cabo por un inhibidor de serin proteasas (serpins por sus siglas en inglés), encontrado en el NPV de *Hemileuca sp.* Este inhibidor conocido como crmA, también se encuentra implicado en la inhibición de caspasas, funcionando como sustrato irreversible para caspasa-1, 4, 5, 9 y 10. Otro método que ayudaría a los baculovirus a sortear los sistemas de defensa del insecto, serían los miRNA encontrados en el genoma del nucleopoliedro virus de *Bombyx mori*, el cual codifica para 4 posibles miRNA, teniendo y uno de ellos como blanco las serin proteasas, las cuales son esenciales para activar las pro-fenol oxidasas y por ende el mecanismo de melanización (Singh et al., 2010).

Al invadir los hemocitos, los baculovirus activan un sistema de defensa capaz de destruir a patógenos, tal mecanismo es la producción de superóxido (Bergin et al., 2005). Para sopesar esto, los baculovirus codifican para una proteína, la Ac31, la cual tiene homología con una superóxido dismutasa, lo cual le daría al virus una herramienta para poder defenderse del estrés oxidativo del superóxido, degradándolo a agua y oxígeno (Tomalski et al., 1991).

Respuesta celular del hospedero a la infección

La respuesta que muestra el insecto hospedero contra una infección viral, no se restringe únicamente a los hemocitos; en cada una de las células existe una respuesta a la infección, como lo es el proceso apoptótico, desencadenado por una serie de reacciones mediadas por procesos controlados y coordinados de revisión celular, seguida de una expresión de ciertas proteínas, para lo cual el virus es capaz de desencadenar su propio proceso para bloquear la apoptosis.

En el momento en que el virus entra a una célula en los insectos, la expresión génica de ésta se ve completamente afectada, existiendo un cese masivo de la misma remarcado en el momento en que el ADN se replica, ya que entra en función la RNA polimerasa viral y se llega a la expresión de los genes muy tardíos. Esta respuesta por parte del hospedero limita seriamente la replicación del virus en la célula, sin embargo, el cese de la expresión génica que sufre el organismo durante una infección por baculovirus, es totalmente diferente al apagado global de defensa, lo cual, aunado al arresto celular e inhibición de la apoptosis, permite al virus secuestrar la maquinaria celular para replicarse. Los virus también son capaces de modular diferencialmente los genes en los insectos relacionados con el metabolismo, el estrés oxidativo, la etapa juvenil, muda, respuesta inmune y sistema endocrino, (Breitenbach et al., 2011; Monteiro et al., 2012). Lo anterior presenta una interesante diversidad cuando se analiza la infección de las diferentes cepas de baculovirus, con diferentes líneas celulares permisivas, diferentes hospederos, e incluso entre diferentes tejidos del mismo hospedero, lo que pone en relevancia la característica de los baculovirus de ser insecto-específicos y que implica que posiblemente algunos genes son más esenciales que otros, aunque se sigue considerando como modelo de estudio el caso de AcMNPV (Ikeda et al., 2013).

Dentro de las proteínas expresadas por los baculovirus que tienen un papel en el cese de la síntesis de proteínas de los insectos en las primeras horas post infección y algunas posiblemente en la especificidad se encuentran: HRF-1 (factor del rango de hospederos), es un factor viral que junto con HCF-1 son esenciales para producir una infección de NPV en las líneas celulares Ld652Y y Tn368. Con respecto

al gen *hrf-1* de *Lymantria dispar*, cuando este se introdujo en AcMNPV, MbNPV, HycuMNPV y SeMNPV y se infectó a la línea celular Ld652Y, estos virus lograron replicarse, y sin esta proteína, son incapaces de establecer la infección en esta línea celular (Ishikawa et al., 2004). También se observó que con la expresión de este factor de *Lymantria dispar*, se daba un cese de la síntesis proteica global en las células infectadas con los virus modificados (Ishikawa et al., 2003).

Por otro lado, HCF-1 (Ac70) o factor específico célula-hospedero, es necesario para el control del cese global de la síntesis de proteína. Este actúa regulando el nivel de la transcripción, ya que, si se realiza una supresión de este gen en AcMNPV, se observa un cese masivo de la síntesis de proteínas, tanto del huésped como del virus, y una disminución en la replicación del virus. Esta proteína no solo modula el cese de la traducción en el hospedero, sino que también tendría algún grado de control en la expresión génica del virus (Lu & Miller, 1996). Esta proteína también está relacionada con el control de la expresión de los genes tardíos del virus, funcionando como un factor de expresión tardía (*Ief*) en células Tn368, pero no en Sf21 (Lu & Miller, 1995) lo que podría sugerir una posible interacción con proteínas presentes en Tn368 y no en Sf21. Esto provoca un cese de los transcritos tempranos y activa los genes tardíos. Esta proteína también es necesaria para la replicación del ADN de los baculovirus HycuMNPV y OpMNPV, en la línea celular Tn368 (Ikeda et al., 2013).

Ep32 codificada por el baculovirus de *Hyphantria cunea* (HycuMNPV), causa un cese masivo de la síntesis proteica en la línea celular BmN-4. Esta proteína se expresa a las seis hpi, y al eliminar este gen en HycuMNPV, se observó que el cese de la síntesis proteica no se veía del todo afectada y no existía variación en la replicación del virus, por lo que se cree que el efecto de Ep32 es indirecto, o bien, es un auxiliar en dicho proceso en las células BmN-4 y Sf9-(Shirata et al., 2010).

P143 se ve involucrado en el cese de la síntesis global de proteínas de las células de BmN-4, al ser infectadas por AcMNPV entre las 5 y 24 hpi. Al modificar a AcMNPV con el gen p143 de BmNPV, este cese de la síntesis global se inhibe, lo cual podría ser un indicativo de que este gen está involucrado indirectamente en el

cese de la síntesis proteica y podría ser uno de los genes determinantes de la especificidad, también es capaz de unirse al ADN de doble cadena y tiene homología con las helicasas (Lu & Carstens, 1991; Laufs et al., 1997). P143 interacciona con LEF-3 para formar un complejo de activación de la replicación, dicho complejo se localiza en el estroma virogénico (Ito et al., 2004; Nagamine et al., 2006).

Durante el proceso de infección de los baculovirus, se ha observado que estos no solo son capaces de inducir el cese global de la síntesis de proteínas, afectando la expresión de éstas en el hospedero y la de el mismo, sino que también tienen la capacidad de sobre expresar algunos genes del hospedero, lo cual posiblemente es parte de la estrategia del virus para explotar la maquinaria celular y asegurar su replicación. Interesantemente, también se han encontrado algunos casos donde un transcrito se apaga por acción de la infección viral, aparentemente por la acción del virus, sin embargo, este apagado de un gen podría ser sinónimo de defensa de tejidos específicos.

Un ejemplo relacionado con lo que se mencionó en el párrafo anterior, se ha observado en la línea celular Tnmsn42, un derivado de la línea celular Hig Five de *Trichoplusia ni*, libre de nodavirus latentes. Esta línea celular fue infectada con dos baculovirus recombinantes para evaluar la tasa de glicosilación y expulsión al medio de las proteínas recombinantes. Se pudo observar que a las 48 hpi, las proteínas más hiper-expresadas después de la infección, fueron chaperonas y proteínas de choque térmico. Asimismo, se encontró que gran parte de las proteínas recombinantes expresadas, no eran glicosiladas ni expresadas al medio, debido a que al sobre expresar ciertos genes de los baculovirus (poliedrina), o a la sobre expresión de proteínas mal plegadas, se activa un sistema de respuesta al estrés, conocido como sistema de respuesta a las proteínas no plegadas (unfolded protein response, UPR por sus siglas en inglés). Este sistema funciona en el retículo endoplásmico, lo que podría causar un cese en la transcripción de las proteínas y activar la producción de chaperonas, con la finalidad de recuperar la normalidad en la célula y si esto no se logra, la respuesta UPR podría inducir apoptosis. La activación de este sistema podría deberse a que, durante la infección viral, no se

lleva a cabo una correcta glicosilación, lo que desencadenaría la UPR y explicaría por qué durante una infección viral, se sobre expresan chaperonas y proteína de choque térmico. Sin embargo, esto no explicaría en que beneficia al virus esta sobre expresión, o si este de alguna manera, responde al UPR (Koczka et al., 2018).

Hasta este momento sabemos que la infección por un baculovirus en un insecto causa una respuesta celular en la cual se sobre expresan o se apagan ciertos genes, así mismo sabemos que ciertos tejidos especializados realizan un proceso de defensa, el cual es apagado por el virus. En ocasiones este sistema es efectivo y se evita o impide la infección, ya sea por métodos físicos (Asser-Kaiser et al., 2011; Wang et al., 2016) o por la expresión de algunos genes que posiblemente bloquean la diseminación de la infección sin recurrir a la apoptosis (Bao et al., 2010; Wang et al., 2016) la cual es plenamente bloqueada por el virus. Está claro que los baculovirus ejercen un efecto sobre la expresión génica de sus hospederos, pues arrestan el ciclo celular, modifican la estructura celular y son capaces de redireccionar la maquinaria celular para sintetizar su propia maquinaria. Todo esto ha sido estudiado de diversas maneras entre las que se encuentran macroarreglos (Nguyen et al., 2013; Salem et al., 2011), secuenciación masiva de ARNm (Breitenbach et al., 2011; Chen et al., 2014; Choi et al., 2012), interrupción de genes (Shirata et al., 2010), supresión de genes (Lu & Miller, 1996), sobre expresión de genes (Laufs et al., 1997), intercambio de genes ligados a la especificidad (Ishikawa et al., 2004), aislamiento de proteínas blanco por inmunoprecipitación (Ishikawa et al., 2003), análisis proteómicos en geles de dos dimensiones y espectrofotometría de masas (Liu et al., 2010), creación de bibliotecas, secuenciación, y comparación con otras bibliotecas (Xue et al., 2012a) bibliotecas a partir de la técnica de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión y PCR en tiempo real (Bao et al., 2009; Bao et al., 2010; Chen et al., 2014; Wang et al., 2016). Con estas técnicas se obtuvieron genes de interés expresados y reprimidos durante el proceso de infección; en fechas más recientes se ha hecho uso del sistema de dos híbridos para tratar de dilucidar los mecanismos por los cuales las proteínas del virus interactúan entre sí para poder formar complejos, y se sabe que participaban en conjunto en el proceso de infección, como lo es el caso de ODV-E66. Esta es una proteína importante para la penetración

de los VDO en la infección primaria, la cual por ensayos de dos híbridos, se encontró que es capaz de interactuar con PIF-2 y PIF-3 (Ke Peng et al., 2010) dos factores de infectividad *per os*, que se unen a las microvellosidades del intestino medio. Debido a la capacidad de degradar condroitina, es posible que sea necesaria para poder poner en contacto a la membrana de la nucleocápsides con la membrana celular, que estas se fusionen y liberen las partículas infectivas en las células.

Interacción de proteínas

Las interacciones entre proteínas son intrínsecas a todas las células, es decir, todos los procesos celulares se llevan a cabo por dichas interacciones, siendo raras las ocasiones en que estas actúan por sí solas. De manera general el funcionamiento de las proteínas se basa en la formación de complejos que actúan como subunidades de una holoenzima, ejemplo de lo anterior es la formación del complejo de transcripción o replicación el cual involucra la unión y el trabajo coordinado de múltiples proteínas para llevar a cabo dichos procesos.

Analizando lo anterior es interesante observar que inclusive para que una sola proteína se active, necesita interactuar con otras para llevar a cabo su correcto plegamiento. Como ejemplo son interacciones con quinasas, fosfatasa, glicosil-transferasas, proteasas, proteínas de choque térmico, etc., muchas incluso solo después de haber sufrido una modificación post traduccional o la remoción de algún extremo son capaces de llevar a cabo su función de lo contrario se consideran inactivas, gracias a estos procesos de interacción de proteínas, es posible llevar a cabo de manera coordinada todos los procesos celulares tal como: el crecimiento celular, control de las rutas metabólicas, de la replicación, transcripción y traducción, expresión de genes específicos a través del reconocimiento de promotores específicos, la apoptosis e incluso en el caso de las infecciones virales por baculovirus los bloqueos o arrestos de los procesos anteriores, redirección de procesos celulares, control coordinado de la expresión viral y de la célula, etc.

Según (Phizicky & Fields, 1995) estas interacciones tienen 5 efectos principales sobre las proteínas:

1. Alteraciones en la cinética de las proteínas, lo que provocaría alteraciones en la afinidad por el sustrato, la catálisis o las propiedades alostéricas del complejo.
2. Canalizan el sustrato de una proteína a otra, lo que genera un flujo controlado.
3. Generación de un nuevo sitio activo, provocando una mejora o pérdida de la función.
4. Se puede dar una inactivación de la proteína.
5. Se puede cambiar la afinidad de la proteína por su sustrato.

Así mismo (Klotz et al., 1970) menciona que existen 3 ventajas de usar complejos de proteínas.

1. Para la célula es energéticamente mejor construir complejos con actividad a partir de múltiples subunidades que una sola secuencia para sintetizar dicha enzima completa.
2. La traducción de fragmentos de ARN muy grandes a proteínas aumenta la probabilidad de error y la falla de la función.
3. Las múltiples subunidades permiten la función en un sitio específico seguido de una difusión a otro sitio para continuar con otro proceso.

Estos procesos ponen en relevancia lo que significan las interacciones de las proteínas entre ellas, generando la necesidad de estudiar no solo sus propiedades individuales sino también con cual o cuales interactúan, cuál es su papel en cada una de estas interacciones, el efecto antes y después de la interacción sobre ambas y generar anotaciones sobre la posible función de estas, debido a las interacciones que se dan entre ellas (Phizicky y Fields, 1995).

Para estudiar estas interacciones se han creado sin fin de técnicas basadas en tres métodos según Phizicky y Fields, 1995: Métodos físicos, Métodos basados en librerías y Métodos genéticos; para el primer caso las metodologías más usadas son la cromatografía de afinidad, en la cual una proteína conocida se fija a una columna por la cual se hace pasar un lisado celular u alguna proteína purificada y si existe una interacción estas dos se unirán y será posible identificar su unión por SDS-

PAGE, la afinidad en manchas en la cual el resultado de un SDS-PAGE se migra a una membrana de nitrocelulosa donde se prueba la habilidad de un lisado celular por interactuar con alguna proteína de interés (esta prueba es similar a una detección inmunológica WesterBlot). Este método es ideal para analizar proteínas de membrana. La inmuno-precipitación es una técnica donde se usa un anticuerpo para identificar a una proteína específica en un lisado celular, precipitar al anticuerpo con la proteína de interés junto con la o las proteínas con las que interactúa, recuperación y análisis, esta técnica tiene la ventaja de que si no se tiene el anticuerpo para la proteína de interés se pueden usar antígenos comerciales, sin embargo, la proteína tiene que ser marcada para que sea reconocida por el anticuerpo, lo cual involucraría la producción de la proteína de interés de manera recombinante. Por último Phizicky y Fields, 1995 mencionan la metodología del Cross-Link en la cual se puede analizar desde un par de proteínas purificadas hasta un lisado celular, para esto se ponen a hibridar las proteínas con la finalidad de que estas interactúen, posteriormente se colocan en un gel de SDS sin condiciones desnaturizante donde las proteínas migran unidas y dan un peso molecular superior al que si estuvieran solas, el paso anterior es seguido de un gel de segunda dimensión para separar el complejo por el punto isoeléctrico seguido de una desnaturización en el gel de corrida donde se rompen los puentes disulfuro y las proteínas que interactúan migran como individuales hasta su peso molecular, quedando las que no interactúan como una diagonal.

Técnicas para identificar expresión diferencial

Los procesos de infección virales son sumamente complejos, se llevan a cabo de una manera coordinada y secuencial. Así mismo, durante el proceso infeccioso, se da un proceso de apagado selectivo de genes en las células infectadas llevado a cabo por la propia infección. Esto ha generado la necesidad de estudiar dichos procesos, tanto el apagado selectivo como aquellos que quedan encendidos, entender cuál es la finalidad de mantener o detener ciertos procesos, hacer anotaciones de los genes que intervienen en la infección y la búsqueda de nuevos genes que mejoren los procesos de infección o estén involucrados en mejorar dichos procesos.

Lo anterior puede ser llevado a cabo estudiando la expresión de genes durante el proceso infectivo, lo cual nos proporcionaría la información necesaria para conocer que genes se están encendiendo durante la infección y cuales se están apagando, en tiempos específicos de la misma, seguido de un entendimiento de cómo estos genes, que finalmente se convertirán en proteínas, interaccionan entre sí para lograr una exitosa infección.

Sabemos que de manera general los baculovirus llevan procesos de infección similares en tiempo y forma, lo que ayuda a este proceso, sin embargo, no todas las cepas virales expresan los mismos genes. Si bien el NPV de *Autographa californica* es el modelo de estudio, no es altamente virulento contra todas las plagas de importancia económica. Esto probablemente obedece a que los baculovirus son altamente específicos ante su hospedero, cada cepa expresa proteínas únicas que ayudan al proceso de infección y en el caso de las cepas virales altamente infectivas contra plagas de importancia económica, se vuelve sumamente relevante encontrar dichos genes nuevos para poder estudiarlos, aprender más del proceso de infección y lograr usarlos como herramientas para mejorar otras cepas.

La dilucidación de los genes que están involucrados en el fenotipo celular, en la defensa de los organismos hacia infecciones, el proceso del desarrollo del cáncer, así como descubrir nuevos genes de interés antropocéntrico, es uno de los mayores retos de ciencia, para esto se han desarrollado técnicas encaminadas a estudiar la expresión diferencial y encontrar nuevos genes, sin la necesidad de conocer completamente el genoma de los involucrados, estas se clasifican en dos Display diferencial e hibridación sustractiva (Byers et al., 2000).

El display diferencial es la técnica más usada sin embargo también en la que arroja más falsos positivos. Permite estudiar simultáneamente genes silenciados y encendidos, comparar más de dos poblaciones de ARN y al igual que la hibridación sustractiva, requiere pequeñas cantidades de ARN. Dentro de las limitantes se encuentra la insensibilidad para detectar genes raros, la necesidad de usar muchas combinaciones de oligonucleótidos y amplificaciones, junto con la alta probabilidad de obtener falsos positivos. De manera general esta técnica involucra 1) la

transcripción reversa usando oligonucleótidos de poli-T junto con más de dos oligonucleótidos para el extremo 3'; 2) la amplificación por PCR del cDNA usando un oligonucleótido para el extremo 3' y 5' de secuencias arbitrarias y 3) una electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE, donde se observarán bandas presentes en una condición y no en otra, representando la expresión diferencial, con las cuales se generan las bibliotecas (Byers et al., 2000).

Dentro de las técnicas más usadas en display diferencial se encuentran la del etiquetado de secuencias expresadas (ESTs) y el análisis seriado de expresión de genes (SAGE). La primera se basa en la clonación al azar del cDNA obtenido del ARNm de algún tejido o célula específico, esto genera cierto número de colonias para cada una de las secuencias en la población de genes, lo que evidencia su relativa abundancia en la muestra. La segunda técnica se basa en dos principios: 1) en que secuencias cortas de 9 a 10 nucleótidos, son suficientes para identificar un transcrito y 2) que los transcritos son analizados seriadamente debido a la concatenación de las secuencias cortas, seguido de una secuenciación de múltiples secuencias cortas de una sola clona. En este procedimiento, el cDNA es obtenido con un oligonucleótido de biotina de poli-T y cortado con una enzima de corte frecuente, de reconocimiento de 4 pb; posteriormente es aislado y ligado a un sitio de clonación, gracias al corte con la enzima, lo cual lo hace fácilmente secuenciable. De manera similar se cuantifica el número de copias de la misma secuencia corta, para determinar la abundancia relativa del gen en la población (Byers et al., 2000).

En cuanto a la hibridación sustractiva es menos usada, lo cual posiblemente se debe a la naturaleza complicada de la técnica. Dentro de las ventajas de esta técnica se encuentra la necesidad de muy pequeñas cantidades de ARNm, la habilidad de detectar poblaciones de ARNm raros y la habilidad de detectar genes nuevos y otros poco abundantes al generar las bibliotecas. Existen varias variantes de las hibridaciones sustractivas, sin embargo, la mayoría tienen en común la extracción de ARN de algún tejido o célula (de un control y una población problema), y el uso de un oligonucleótido de poli-T para aislar los ARNm. Posteriormente, este es transformado a cDNA con oligonucleótidos de poli-A por PCR. Una de las dos

poblaciones es marcada por fotobiotinilado (driver) en el cual, un grupo Acilo foto activo proveniente de la biotina, es capaz de unirse el cDNA gracias a la irradiación con luz UV de entre 260 a 475 nm. Posteriormente se da una desnaturalización del cDNA de doble cadena de las dos poblaciones (control y el problema), seguido de una hibridación entre ellas para eliminar todas las poblaciones de ARN que se encuentren presentes en ambas muestras y dejar solamente los genes expresados presentes en la población de interés o tester (Byers et al., 2000). Posteriormente todo el driver que no hibridó y el que sí, es retirado con estraptividina (una proteína con alta afinidad por la biotina) seguido de una extracción con fenol-cloroformo. Existen otros métodos para eliminar las secuencias comunes, como puede ser la ligación de secuencias en los extremos de alguna condición para después en las rondas de sustracción, eliminar las secuencias comunes y enriquecer las diferenciales. Cualquiera que sea el método en la primera ronda de sustracción por PCR, se remueven la mayoría de las secuencias presentes en ambas condiciones (40%). Las segunda y tercera ronda generan un enriquecimiento de las secuencias únicas y de las sobre-expresadas, dando una presencia de solamente el 5% de las poblaciones originales de ARN. Las dificultades de este tipo de técnicas radica en la naturaleza de las sustracciones derivada de las hibridaciones, en donde los genes abundantes hibridan con rapidez y los que se encuentran en menor proporción lo hacen lentamente; sin embargo, a pesar de esta complicación, estas técnicas generan una menor cantidad de falsos positivos comparado con el display. Otra de las complicaciones de esta técnica, es la elaboración de librerías y la búsqueda de genes en ellas que si bien no es complicado, si es laborioso y consume tiempo (Byers et al., 2000).

Existen varias técnicas derivas de las hibridaciones sustractivas entre ellas se encuentran:

- 1) Análisis de representación diferencial (RDA), originalmente diseñada para extraer secuencias genómicas que contuvieran mutaciones y que posteriormente fue adaptada por (Hubank & Schatz, 1994). Esta se basa en la obtención de cDNA, digestiones con una enzima de corte frecuente, ligación de adaptadores y tres rondas

de sustracción por PCR. El producto puede ser usado directamente para generar librerías. Este método enriquece los ARNm en orden del 10^6 requiriendo poca cantidad de materia inicial ((Hubank & Schatz, 1994), Byers et al., 2000).

2) Hibridación sustractiva directa, usando oligonucleótidos al azar (DROP). Se basa en el uso de oligonucleótidos degenerados para sintetizar el cDNA, es de mucha ayuda para encontrar genes expresados en poca abundancia y es muy rápido (Byers et al., 2000).

3) Hibridación sustractiva con secuenciación shot-gun. Esta sigue los mismos procedimientos de la hibridación sustractiva, con la modificación de que los productos sustraídos son amplificados por PCR, clonados y secuenciados por shot-gun y tiene en la desventaja de que el proceso de secuenciación necesita que los genes estén bien identificados en las bases de datos (Byers et al., 2000).

4) Hibridación sustractiva por supresión se basa en la capacidad supresora del PCR (Diatchenko et al., 1996) a la población de cDNA que fue digerida, se le ligan adaptadores con secuencias repetidas en los extremos que forman estructuras tipo paleta. Después de cada ciclo de desnaturalización en el PCR, cada uno es ligado por separado en la condición problema, es decir, se tienen dos poblaciones del tester, una con el adaptador I y otra con el II. Posteriormente se da el proceso de hibridación donde se agrega un exceso de driver y se somete a dos rondas de PCR en las cuales, si hubo una hibridación entre los genes similares del tester, sufrirán una amplificación exponencial en el segundo PCR, al tener los dos adaptadores en cada uno de sus extremos y una normalización en el primer PCR. Esta técnica es muy eficiente para enriquecer genes expresados diferencialmente con un solo ciclo de hibridación de hasta 100 veces (Diatchenko et al., 1996).

Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

La técnica de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión evalúa el cambio en el nivel de expresión génica de un organismo o tejido, cuando este se ve sometido a un estímulo, comparándolo con el mismo nivel de expresión del organismo o tejido, al estar en condiciones normales. Esta diferencia en cuanto al

nivel de expresión es eficientemente detectada bajo esta técnica en forma de ARNm. Este se denomina driver o testigo, cuando proviene del organismo que no ha sido sometido a ningún evento, que module su expresión génica; y una población llamada tester, la cual ha sido sometida al estímulo que se desea evaluar. Este ARNm debe de ser convertido en ADN de doble cadena (cDNA), posteriormente con estas dos poblaciones de cDNA, se realiza una digestión con una enzima de corte frecuente, seguido de una ligación de adaptadores (I y II) en forma individual y separada al tester, una desnaturalización, seguida de una hibridación, donde se agrega exceso del driver sin adaptadores. En este paso, los genes presentes en las dos condiciones se hibridan entre sí, generando secuencias con uno de los adaptadores, en solo unos de los extremos del híbrido, e híbridos con los dos adaptadores, en los dos extremos de las dos cadenas, que son los genes presentes únicamente en el tester. Estos serán los que por PCR se normalizan y amplifican exponencialmente. Posteriormente, se suprimen los genes expresados en las dos poblaciones y el enriquecimiento de estos, por acción de la reacción en cadena de la polimerasa, para enriquecer exponencialmente los transcritos expresados diferencialmente, al grado de poder ignorar a los transcritos comunes en las dos poblaciones. Posteriormente, estos cDNA son clonados en vectores de conservación para ser identificados por secuenciación, por lo que no es necesario que antes de llevar a cabo el experimento se tenga un conocimiento previo de los posibles genes a estudiar (Brosché et al., 2012; Diatchenko et al., 1996).

Esta técnica, tiene grandes ventajas comparadas con otras de hibridación sustractiva, ya que necesita ínfimas cantidades de ARNm para poder ser llevada a cabo, aunado a que la PCR amplifica notablemente los transcritos diferenciales, lo que reduce la posibilidad de un falso positivo y aumenta la posibilidad de extraer poblaciones raras de ARNm. Sin embargo, aunque presenta esta gran cantidad de ventajas son pocos los reportes del uso de la técnica, lo cual se debe en gran medida a las dificultades innatas de la misma (Brosché et al., 2012; Byers et al., 2000; Diatchenko et al., 1996)

Justificación

S. frugiperda es la plaga de mayor importancia para el cultivo de maíz en toda América, debido principalmente a la defoliación que producen las larvas sobre el cultivo, lo que trae una pérdida en el rendimiento de hasta un 40%, y pérdidas económicas considerables en México (CESAVEG, 2020). Esta plaga ha desarrollado resistencia a la mayoría de los grupos químicos usados para su control (Wood *et. al.*, 1981, Georghiou *et. al.*, 1983, Yu, 1992, Pacheco, 1993, Diez *et. al.*, 2001, Lagunes *et. al.*, 2009, CESAVEG 2013), por lo que es necesario el uso de alternativas. Una de estas alternativas la constituye el uso de una cepa de baculovirus denominada SfNPV-Ar caracterizada por Rangel Núñez *et al.*, 2014, la cual a nivel de bioensayos, demostró ser eficaz para el control de esta plaga. Esta misma cepa fue caracterizada por Medina *et. al.*, 2016 quien demostró que es posible detener el daño al cultivo al mismo nivel que el control químico, en el Bajío Mexicano. La virulencia mostrada por SfNPV-Ar, demostró el gran potencial que posee este virus para el control de una plaga tan importante. Asimismo, permitió demostrar que este virus posee mecanismos únicos, por los cuales eludió los sistemas de defensa del hospedero y logró causar la muerte con una alta eficiencia. Esto pudo deberse, a la expresión de proteínas propias del virus que interaccionen entre sí, o con las del hospedero para causar modificaciones en la expresión génica del mismo, así como la posible modificación de la morfología celular. Para corroborar esta hipótesis se decidió estudiar a la cepa viral SfNPV-Ar a través de dos metodologías, la primera fue la técnica de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión, la cual es puede dilucidar que genes se están expresando en los intestinos de los insectos susceptibles durante el proceso de infección. La segunda técnica se basó en la identificación y análisis de las proteínas expresada por el virus, a diferentes tiempos pos-infección usando geles de dos dimensiones e identificación de proteínas por mammas/masas con la cual es posible determinar que proteínas son expresadas diferencialmente durante la infección primaria de SfNPV-Ar en los intestinos de *S. frugiperda*. Con esta información es posible dilucidar algunos de los posibles mecanismos moleculares que son empujados por el baculovirus SfNPV-Ar para logran un eficiente control de *S. frugiperda*.

Hipótesis

El establecimiento de que genes y proteínas expresados diferencialmente entre el baculovirus SfNPV-Ar y su hospedero *S. frugiperda* permitiría dilucidar el mecanismo por el cuál esta cepa desarrolla una infección letal hacia este insecto.

Objetivo general

Determinar los genes y proteínas expresadas diferencialmente durante la infección temprana del baculovirus SfNPV-Ar en el tejido primario de *S. frugiperda*.

Objetivos específicos

1. Obtener intestinos infectados y sin infectar de *S. frugiperda* con el baculovirus SfNPV-Ar a las 6, 18 y 24 hpi.
2. Generar bibliotecas sustractivas de genes expresados diferencialmente por la infección viral en el intestino de *S. frugiperda*.
3. Identificar y caracterizar bioinformaticamente los genes diferenciales a los diferentes tiempos post infección de 6, 12 y 24 hpi.
4. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en intestinos de *S. frugiperda* infectadas por SfNPV-Ar y determinar proteínas diferenciales de interes, a los diferentes tiempos post infección de 6, 12 y 24 hpi.

Materiales y métodos

Colonia de *Spodoptera frugiperda*

Para instalar la colonia de *S. frugiperda* se partió de individuos en estado de pupa, se les mantuvo en condiciones de insectario en una cámara de cría (Percival modelo DR36VL) a una temperatura de 28 °C, fotoperiodo de 12:12 horas (Luz:oscuridad) y una humedad relativa del 60%, dentro de bolsas de papel estraza. Una vez que los adultos emergieron se les alimentó con una solución de agua destilada con miel de maíz al 10%. Los huevos se colectaron cada tres días y se colocaron en una caja Petri con dieta artificial para *S. frugiperda* (Agua destilada 1,000 ml, agar bacteriológico 12.5 g, maíz 120 g, levadura 50 g, germen de trigo 5g, polvo de espiga de maíz 25 g, ácido sórbico 2.5 g, ácido ascórbico 5 g, metil paraben (MPB) 3.125 g, mezcla de sales 8.75 g, frijol soya 62.5 g, formaldehído al 37% 3.125 ml, antibiótico .75 mg y mezcla de vitaminas 18.75 g) hasta que eclosionaron. Después de la eclosión, al llegar al 2° instar se individualizaron en vasos de plástico con dieta artificial, en estos vasos permanecieron hasta que puparon, bajo condiciones de insectario.

Cepa viral

Se utilizó la cepa viral donada por el Dr. Trevor Williams del INECOL, denominada SfNPV-Ar, la cual se amplificó en larvas de *S. frugiperda* de 3° instar por contaminación de la superficie de la dieta según lo descrito por Rangel et. al., 2014.

Purificación del inóculo viral

Cinco días después de la infección se siguió el protocolo descrito en Rangel et. al., 2014 para lo cual se colectaron las larvas de *S. frugiperda* y se homogenizaron en un mortero se lavaron con SDS al 0.5% a 21,000 g por 10 minutos, finalizados se resuspendió en ADE, se purificó por gradientes continuos de sacarosa del 66% al 40% peso/peso, en una ultracentrífuga marca Beckman a 24,000 rpm por 1.5 horas, posteriormente se recolectó la banda correspondiente a los virus y se le dio un lavado

con ADE para eliminar el exceso de sacarosa, posteriormente se realizó el conteo en una cámara de Neubauer, el promedio se multiplicó por el factor 2.5×10^5 y se almacenó a 4°C .

Pruebas de infección en *S. frugiperda*

Con la finalidad de determinar la dosis más adecuada para llevar a cabo la infección de larvas de 3° instar del gusano cogollero, se llevaron a cabo infecciones con diferentes concentraciones de CO, partiendo de 5×10^5 co/larva (cuerpos de oclusión por larva) hasta llegar a 8×10^6 co/larva. Lo anterior se realizó hambreado larvas de 3° instar por 24 horas se les alimentó con una solución de sacarosa al 10%, colorante y una concentración conocida de CO, se esperó aproximadamente 30 minutos, se les colocó en vasos con dieta artificial, 48 y 72 horas post infección (hpi). Se les realizó una punción para extraer hemolinfa y observarla en un microscopio Carl Zeiss en el objetivo 40X, para determinar si existía presencia de CO en los hemocitos, posteriormente a los 5 dpi se revisaron nuevamente las larvas y se determinó la mortalidad.

Los resultados de la mortalidad fueron analizados usando el programa STATGRAPHICS Centurión usando la comparación múltiple de medias y la prueba de Tukey, para comparar la efectividad entre dosis.

Determinación de expresión diferencial de genes en el tejido primario.

a) Infección de larvas de *S. frugiperda* y recolección del intestino

Se usó la técnica de infección en gota para infectar a 50 larvas de tercer instar de *S. frugiperda*, las cuales se consideraron como condición problema y 50 larvas más, usadas como control negativo. A ambas larvas se les dio de comer únicamente solución de sacarosa al 10% más colorante, posteriormente, se les extrajo el intestino a las 6, 12 y 24 hpi. Dicha extracción se realizó bajo un estereoscopio Carl Zeiss, la larva se colocó a 4°C por un minuto y posteriormente se colocó en una caja de disección con solución fisiológica a 4°C , se fijó la epidermis a la caja de disección con ayuda de alfileres, posteriormente se cortó el intestino y se separó de la larva,

posteriormente se colocó el tejido en una solución denominada RNAlater (Invitrogen®) y se almacenó a -20°C.

b) Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el método de Trizol® (Life Technologies) con algunas modificaciones:

1. Se colectaron los intestinos del RNAlater, se eliminó el exceso de este y se colocaron en la solución de Trizol.
2. Se agregó 1 ml de Trizol, se mezcló con ayuda de un vortex durante 1 minuto.
3. La mezcla anterior se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un paso de centrifugación a 21,000 g por 10 segundos, se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se le añadieron 0.2 ml de cloroformo y se agitó 15 segundos en un vortex.
4. Se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,000 g durante 15 minutos a 4° C; el sobrenadante se recuperó.
5. Al sobrenadante recuperado se le añadió 1 ml de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugó la mezcla anterior a 11,000 g por 10 minutos.
6. A la fase anterior se le agregó 1 ml de Etanol absoluto frío y se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos, tras la formación de una pastilla blanca se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla.
7. La pastilla se disolvió en agua calidad miliQ con Dietiyl pirocarbonato al 0.1% (agua DEPC).

c) Determinación de la calidad del ARN

Para determinar la calidad del ARN se siguió lo recomendado por (Wieczorek et al., 2012), para lo cual se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para hacer una evaluación visual del mismo, para lo que se cargaron en el gel 1 µl de cada extracción de ARN a 70 volts por 1 hora, posteriormente se visualizó el ARN en un foto documentador Bio Rad Imagin. Posteriormente se realizó un análisis en un Nanodrop Lite, para lo cual se usó un microlitro del ARN y se colectaron los valores

de la absorbancia a 260 nm, la relación 260/280 y la concentración de la muestra en ng/ μ l.

d) Síntesis de la primera cadena

Una vez extraído, cuantificado y determinada la calidad del ARN, se procedió a la síntesis de la 1era cadena de la muestra control y problema. Para cada una de las condiciones primeramente se realizó un tratamiento con DNasa I (Invitrogen®), para la cual se usó una unidad de enzima, el buffer de la enzima al 1X, un microgramo de ARN y el volumen se aforó a 10 μ l con ADE, la reacción se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se inactivó a 65°C por 20 minutos.

Una vez terminado el tratamiento con DNasa I, se le agregaron el oligonucleótido CDS (dT) 10 nM y el oligonucleótido Smart IIA 10 nM, la reacción se incubó a 70°C por un minuto, seguido de 68°C por un minuto y 65°C por un minuto más, posteriormente se dejó a 4°C por tres minutos y se le agregó la siguiente mezcla: 4 μ l del buffer 5X, 1 μ l de DDT (0,1mM), 1 μ l de dNTP's (10 mM) y una unidad de Super Script RT III (Invitrogen®), la reacción se incubó a 50°C por 40 minutos y se inactivó a 70°C por 20 minutos.

e) Síntesis de la segunda cadena

Para la síntesis de 2ª cadena, se llevó a cabo la siguiente reacción: se mezclaron 2 μ l de Cloruro de magnesio 50mM, 1 μ l de dNTP's 10 mM, Buffer de Taq polimerasa 1X, primer PCR IIA (10 mM) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), Taq polimerasa dos unidades, cDNA de la primera cadena 1 μ l y el volumen se completó a 50 μ l con ADE. Esta mezcla se colocó en un termociclador (BioRad) bajo las siguientes condiciones: 94°C por cuatro minutos, seguido del número de ciclos óptimos de 94°C por 30 segundos, 65 °C por 45 segundos, 68°C por seis minutos y finalmente un último ciclo de 72°C por 10 minutos.

f) Purificación de productos génicos.

Para la mayoría de los pasos se realizó previamente una purificación de las reacciones, para lo cual se agregó 200 μ l de TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM),

posteriormente se agregó un volumen de Fenol:Coloroformo:Alcohol isoamilico 25:24:1, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos, se colectó la fase acuosa y se le agregó dos volúmenes de Etanol Absoluto, se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos, se desechó el sobrenadante, se le agregó 1 ml de Etanol absoluto y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en ADE.

g) Digestión con enzima de restricción

Una vez sintetizada la 2ª cadena de los ADNc de las muestras control y problema, estas se purificaron y cuantificaron, posteriormente se digirieron con la enzima de corte frecuente *Afa* I (5'-GT AC-3'). Para la digestión, se preparó la siguiente mezcla: Buffer de la enzima 1X, enzima *Afa* I una unidad, cDNA entre 100 y 500µg y el volumen se completó con ADE a 20 µl esta mezcla se colocó a 37 °C por treinta minutos. Ligación de adaptadores

Se procedió a la ligación de adaptadores para su posterior hibridación y amplificación por PCR, para lo cual se diluyó únicamente el ds cADN de doble cadena digerido con la enzima *Afa* I de la muestra problema como a continuación se detalla: se colocaron 100 ng de cDNA de la muestra problema digerida, se les agregó el regulador de la ligación a 1X, una unidad de T4 ADN ligasa y se completó el volumen a 20 µl con ADE. A la mezcla anterior se le agregó el Adaptador 1 y 2 al “tester”, realizar las hibridaciones, el PCR de normalización y finalmente el PCR de supresión:

a)	Adaptador	uno	(5'-
CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCG			
CCCGGGCAGGTGGCCCGTCCA-5'),	b)	Adaptador	dos
(5'CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTGCCGGCTC			
CA-3').			

La ligación de los adaptadores al “tester” se realizaron en dos sentidos: en primera instancia se ligaron al ds cDNA del tejido infectado, con la finalidad de extraer los genes encendidos por la infección; en segunda instancia los adaptadores se ligaron al ds cDNA del tejido sano como “tester”, con lo cual se extrajeron los genes apagados por la infección. Esta mezcla se incubó toda la noche a temperatura

ambiente y al final se inactivó la enzima agregándole 1 μ l de EDTA 0.2 M pH 8.6 y se incubó a 72°C por 10 minutos.

h) Análisis de ligación de adaptadores

Par determinar si se realizó la ligación de adaptadores se sometió a PCR con los oligonucleótidos de GAPDH (Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa) se prepararon las siguientes reacciones: para analizar el adaptador uno se colocó en un tubo 1 μ L de la mezcla del adaptador uno, 1 mM del oligonucleótido de GAPDH directo (GGGTATTCTTGACTACAC) y 1 mM del oligonucleótido GAPDH reverso (CTGGATGTACTIONTATGAG), en otro tubo se colocaron un microlitro de la mezcla del adaptador uno, 1 mM del oligonucleótido GAPDH directo y 1 mM del PCR primer 1. Para el análisis del adaptador dos se realizaron dos mezclas iguales a las descritas anteriormente sustituyendo el cDNA ligado al adaptador uno por el ligado al adaptador 2. Posteriormente a cada uno de los cuatro tubos se les agregó la siguiente mezcla: buffer de PCR a 1X, un μ l de dNTPs a 1mM, 3 μ l de cloruro de magnesio a 50 mM, una unidad de Taq polimerasa y se completa el volumen con ADE a 25 μ l; y se les somete a PCR bajo las siguientes condiciones: 72°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por un minuto, finalmente un último ciclo de 72°C por 5 minutos.

i) Primera hibridación

Una vez corroborada la ligación de adaptadores se realizó la primera hibridación siguiendo lo recomendado por (Diatchenko et al., 1996), para lo cual se colocó un exceso de cDNA del tejido sin infección digerido "driver" al cDNA del tejido infectado ligado a los adaptadores "tester". Para esto se realizó una relación 30:1 driver:tester, se mezcló con un volumen del buffer de hibridación (50mM de HEPES pH8.3, 0.5M NaCl, 0.02mM EDTA pH 8.0, 10% peso volumen PEG 800), en otro tubo se repitió la misma mezcla para el cDNA ligado al adaptador dos. Para determinar los genes que están presentes en la condición control y no en el problema (genes apagados por la infección) se realizó el procedimiento anterior pero la ligación de

adaptadores se realizó al cDNA de los intestinos sin infectar como tester y el exceso de cDNA usado fue el de los intestinos infectados como driver. Las muestras anteriores se colocarán a 98°C por 1.5 minutos para desnaturalizar el cDNA y posteriormente a 68°C por 10 horas.

j) Segunda hibridación

Para la segunda hibridación se preparó nuevamente driver para lo cual se colocó cDNA digerido de la muestra sin adaptadores (150 ng), se mezcló con el mismo volumen del buffer de hibridación, tanto para genes encendidos como apagados, la muestra se desnaturalizó a 95°C por 2 minutos. Posteriormente las mezclas se colocaron a 68°C por 12 horas más. Terminada la segunda hibridación se agregó a cada una de las muestras 200 μ l de buffer de dilución (20 mM HEPES pH 8.3, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA) se calentó la mezcla por 7 minutos a 72 °C y se almacenó a -20°C.

k) Primera amplificación por PCR

Para poder amplificar los transcritos expresados diferencialmente y enriquecer la muestra con estos exponencialmente, al mismo tiempo que se suprimen los genes presentes en ambas condiciones, se sometió a dos rondas de PCR. Para la primera amplificación se realizó la siguiente mezcla: Cloruro de magnesio (50 mM) 2 μ l, dNTPs (10 mM) 1 μ l, buffer de PCR a 1X, una unidad de Taq polimerasa, oligonucleótido iniciador PCR I (5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') 10 mM 1 μ l, 1 μ l de la segunda hibridación y se completó a 25 microlitros con ADE. Esta mezcla se colocó a 72°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 94°C por 25 segundos, 56°C por 30 segundos, 68°C por un minuto y medio, y finalmente un último ciclo de 72° por siete minutos, este PCR se diluye 1:30 y se almacenó a -20 °C.

l) Segunda amplificación por PCR

Con la finalidad de reducir los transcritos amplificados linealmente y enriquecer los que se amplificaron exponencialmente se realizó un segundo ciclo de

PCR, para lo cual se realizó la siguiente mezcla: 1 µl de la primera reacción de PCR diluida 1:30, buffer de PCR a 1X, dNTPs (10 mM) 1 ul, PCR primer 1 (5TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3') (10 mM) 1 ul, PCR primer 2 (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3) (10 mM) 1 ul, cloruro de magnesio (50 mM) 2 ul, una unidad de Taq polimerasa y ADE a completar el volumen de 25 microlitros. La mezcla anterior se sometió a las siguientes condiciones: 94°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 68°C por un minuto y medio, seguido de un último ciclo de 72°C por siete minutos.

m) Clonación de fragmentos

Previo a la ligación de los fragmentos en el vector se realizó la obtención de células competentes siguiendo los siguientes pasos: a) la ligación de fragmentos se realizó en el vector TOPO TA Cloning Kit pCR 4 (Invitrogen®), para lo cual se realizó la siguiente mezcla: Buffer 1x, Vector 0.3 microlitros, ADN purificado 1 µl y ADE para completar cinco µl. Se dejó incubar por 30 minutos y se posteriormente se procedió a la clonación en *E. coli* Top 10, y b) la clonación de la ligación se realizó por choque térmico siguiendo el siguiente protocolo: Las células competentes se les adicionó 1 µL de la ligación y se mezclará suavemente, se dejaron 30 min en hielo, posteriormente se incubaron a 42°C por 1 min, se colocaron nuevamente en hielo tres minutos y se les adiciono 1 mL de LB, se dejaron en agitación una hora a 37°C y se plaquearon en LB más ampicilina (100 mg/mL), se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Extracción de ADN plasmídico

Las células se crecieron de manera individual en LB líquido más ampicilina en agitación a 37 °C por toda la noche, posteriormente se realizó una miniprep para extraer el ADN según lo siguiente: se centrifugó el medio LB líquido inoculado a 13,000 rpm durante 3 minutos la pastilla se resuspendió en 100 µL de buffer 1 (Tris-HCl a 50mM, EDTA a 10mM, 2 µg de RNasa), se le agregaron 200 µL de buffer 2 (NaOH a 200mM, SDS al1%) y se mezcló a temperatura ambiente, se le agregaron 150 µL de buffer 3 (Acetato de Potasio a3M y pH 5.5) y se centrifugaron a 13,000

rpm durante 7 a 10 minutos se transfirió el sobrenadante a 1 tubo eppendorf nuevo y se le agregaron 200 μ L de Isopropanol (1 volumen) o Etanol absoluto (2 volúmenes) para precipitar el DNA se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 30 μ L de TE.

Digestión con *EcoRI*

Para la corroboración de la ligación de los fragmentos en Topo se llevó a cabo una digestión con la enzima *EcoRI* con la cual se liberaron los fragmentos ligados, para esto se realizó una mezcla con el buffer para la enzima 1x, enzima *EcoRI* una unidad, ADN plasmídico a 100 ng y el volumen se completó a 10 μ l con ADE. Esta mezcla se colocó a 37°C por dos horas.

Macroarreglos

El proceso de los macroarreglos se llevó a cabo siguiendo el protocolo del Kit Roche Esay Dig Hib, para lo cual primero se realizó un etiquetado del cDNA, se tomaron 25 ng de cDNA purificado de cada una de las condiciones y se completó el volumen a 15 μ l con ADE, al mismo tiempo se realizó un control con el ADN del Vial 2 del kit (ADN sin marcar de pBR328) a una concentración de 25 ng y se completó el volumen a 15 μ l. Posteriormente se desnaturalizó el ADN a 95°C por 10 minutos, se colocó el ADN en hielo, se colocaron los siguientes componentes para el marcaje del cDNA: 2 μ l de vial 5 (exanucleótidos marcados con digoxigenina), 2 μ l del vial 6 (mezcla de dNTP's) y dos unidades de la enzima Klenow (vial 7), la mezcla anterior se colocó a 37°C con agitación suave por 20 horas, pasado el tiempo se detuvo la reacción con 2 μ l de EDTA 0.2 M pH8 y se calentó a 65°C por 10 minutos.

Una vez detenida la reacción se procedió a realizar una prueba para determinar la eficiencia del etiquetado, para lo cual se realizaron diluciones del cDNA marcado y del control de 1:10 y 1:100, estas se colocaron en una membrana de nylon, con ayuda de luz UV por cinco minutos por cada lado. Posteriormente la membrana se transfirió a un contenedor con 20 ml de solución de ácido maleico (NaCl 8.79g y Ac. Maleico 11.60g), incubándola por dos minutos a temperatura ambiente en agitación, con 10 ml de solución de bloqueo 1x (Roche®) (1 g del

reactivo de bloqueo (Roche®) en 100 ml de buffer de ácido maleico) donde se dejó 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Posteriormente se desechó la solución de bloqueo y se agregaron 10 ml de solución del anticuerpo anti digoxigenina-Ap (150 mu/ml o 2 ul de anti digoxigenina-Ap centrifugado por 5 min a 10,000 rpm en 10 ml de solución de bloqueo 1x), se incubó por 30 minutos, seguido de un lavado con 10 ml de solución de lavado (ácido maleico 0.1 M y NaCl₂ 0.1 M, twen 20 150 ul, pH 7.5) por 15 minutos. Se equilibró la membrana con solución de detección (Tris HCl 0.1 M, NaCl₂, pH 9.5) por 5 minutos, se desechó la solución anterior y se agregaron 2 ml de la solución de color-sustrato (40 ul del NBT/BCLP en 2 ml de solución de detección) se dejó incubar la membrana y la solución en una bolsa sellada por 30 minutos, hasta lograr la detección deseada por un máximo de 24 horas de incubación, la reacción anterior se detuvo lavando la membrana con TE (Tris HCl 0.01M, EDTA 0.001 M, pH8).

Una vez corroborada la eficiencia del marcado, se procedió a realizar las hibridaciones, para lo cual primeramente se cuantificó el ADN plasmídico a una concentración de 25 ng/ul. Posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 10 minutos y se colocó inmediatamente en hielo, una vez frío se transfirieron 2 ul de cada una de las muestras a una membrana de nylon y se fijó por exposición a luz UV por 5 minutos se procedió a realizar la hibridación, en una solución de hibridación (250 ml de solución SSC 20X (NaCl 175.3 g, Citrato de sodio 88.2 g, pH7), 100 ml de N-lauril sarcosina al 1%, 2 ml de SDS al 10%, 100 ml de solución de bloqueo 10X (10g de polvo de bloqueo (Roche®) en 100 ml de solución de ácido maleico) y se calentó a 65°C, se rehidrató la membrana por 30 minutos en agitación, el cDNA marcado se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos y se colocó inmediatamente en hielo. Una vez frío se mezcló con la solución de hibridación a 65°C (3.5 ml de la solución de hibridación por cada 100 cm² de membrana de nylon), se le agregaron los 3.5 ml del cDNA marcado con la solución de hibridación, y se colocó a 65°C con agitación constante por mínimo 6 horas.

Pasado el tiempo de hibridación se retiró la mezcla de cDNA marcado con la solución de hibridación y se almacenó a -20°C, se procedió a realizar los lavados de

astringencia, dos lavados de 5 minutos cada uno con la solución de SSC 2x (100 ml de solución SSC 20X, 10 ml de SDS 10%, aforado a 1,000 ml con ADE) a temperatura ambiente con agitación moderada, dos más de 15 minutos cada uno con la solución SSC 0.5X (25 ml de solución SSC 20X, 10 ml de SDS 10%, aforado a 1000 ml con ADE) calentada a 65°C con agitación constante. Posteriormente se procedió a la detección inmunológica se colocó la membrana en 100 ml de solución de bloqueo por 30 minutos, posteriormente se colocó en 20 ml de solución de anticuerpos (4 ul del vial de anticuerpo en 20 ml de solución de bloqueo 1X) por 30 minutos, posteriormente se dieron 2 lavados de 15 minutos cada uno en 100 ml de solución de lavado, después se equilibró la membrana con 20 ml de solución de detección por 5 minutos, y se agregaron 10 ml de solución color sustrato (mencionada anteriormente) protegiendo la reacción de la luz, se dejó reaccionando la membrana por toda la noche sin agitación, pasado este tiempo se detuvo la reacción con un lavado de 50 ml de TE por 5 minutos.

Secuenciación de las bibliotecas

Las librerías obtenidas de genes sustractivos obtenidas fueron secuenciadas por la empresa MACROGEN, Corea del Sur, usando la secuenciación de Electroforesis Capilar, SANGER. Las secuencias fueron ensambladas usando el programa SeqMan (DNASTAR) y las secuencias consenso obtenidas fueron usadas para realizar una búsqueda en el servidor BLASTn con la finalidad de dar identidad a las mismas.

Determinación de expresión diferencial de proteínas en el tejido primario.

a) Obtención de material biológico y lisis

Los intestinos infectados de *S. frugiperda* a las 6, 12 y 24 hpi fueron almacenados en la solución “english buffer” (50 mM de sacarosa, 2 mM de Tris HCl, 1 mM PMSF (inhibidor de proteasas)) a 4°C, una vez colectada la muestra se centrifugo a 2 g para evitar que las células se desintegren, manteniendo la temperatura de 4°C por 30 minutos en una centrifuga Fresco 21, Thermo Scientific,

se congeló la muestra a -20°C hasta su posterior uso. En total se analizaron 160 intestinos de las condiciones infectadas (40 intestinos por condición, 6, 12, 24 y 48 hpi) y el mismo número de intestinos de las condiciones control.

Una vez obtenidos intestinos infectados, se lisaron siguiendo el protocolo descrito por Chico 2017, donde la muestra de tejido se resuspendió en un buffer de lisis (8M Urea, 2M Tiourea, 0.5% CHAPS, 1mM DTT y 1mM PMSF) agitando el mismo hasta que se desintegrara el tejido. Se incubó a 4°C por 30 minutos con intervalos de agitación cada 10 minutos de 1 minuto de duración. Transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugó a 13,200 g por 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo.

b) Cuantificación de proteínas solubles por el método de Bradford

La cuantificación de las proteínas extraídas en el paso anterior se llevó a cabo por el de Bradford kit II Protein assay BioRad, siguiendo las recomendaciones del proveedor, utilizando una solución de 1.48 mg/mL de BSA (como estándar) con buffer de lisis (8M Urea, 2M Tiourea, 0.5% CHAPS, 1mM PMSF) (como diluyente).

Tabla 3 Concentraciones y volúmenes para generar la curva de calibración, tomada de Chico, 2017.

Tubo	Volumen de estándar (µL)	Fuente de estándar	Volumen de diluyente (µL)	Concentración final (µg/mL)
1 (Blanco)	-	Amortiguador de lisis	30	0
2	40	Tubo 3	40	125
3	40	Tubo 5	40	250
4	40	Tubo 7	40	375
5	27.1	Solución stock 1.48mg/mL	52.9	500
6	33.8	Solución stock 1.48mg/mL	46.2	625
7	40.6	Solución stock 1.48mg/mL	39.4	750

Se realizaron las diluciones necesarias de BSA para obtener la concentración final anotada en la tabla 3, una vez realizadas las diluciones se cargaron por triplicado 10 µL de estándar de cada tubo, en una placa de poliestireno sin tratar de 96 pocillos (MicroWell, NUNC) y se añadieron 200µL de reactivo Bradford (BioRad), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro de microplaca (xMark, BioRad), una vez obtenidos los datos se construyó la curva estándar.

Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 de las muestras de proteínas extraídas de células infectadas y sin infectar, se colocaron en una placa de poliestireno por triplicado, se les agregaron 200 μ L del reactivo de Bradford y se leyeron en el espectrofotómetro de microplaca (xMark, BioRad), con los datos obtenidos se calculó la concentración de proteína por muestra usando la curva estándar. Para el perfil de proteínas en una y dos dimensiones se utilizaron 20 y 200 μ g de proteína respectivamente, por muestra.

Obtención del perfil de proteínas en una dimensión (SDS-PAGE)

Para la electroforesis SDS-PAGE, se elaboró un gel discontinuo de poliacrilamida en una cámara vertical de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell de BioRad. El gel separador se preparó al (12%) y se usaron 2.607mL de agua destilada estéril, 1.5mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 1.8 mL de acrilamida (40%), 60 μ L de SDS 10%, 3 μ L de TEMED y 30 μ L de persulfato de amonio 10%. Cuando el gel polimerizó, se preparó en la parte superior el gel concentrador al 4%, con 1.518 mL de agua destilada estéril, 630 μ L de Tris 0.5 M pH 6.8, 312.5 μ L de acrilamida (40%), 25 μ L de SDS 10%, 2.5 μ L de TEMED y 12.5 μ L de persulfato de amonio 10%.

15 μ g de las muestras de proteínas obtenidas anteriormente se mezclaron en solución de Laemmli 4X (277.8 mM Tris-HCl pH 6.8, 44.4% (v/v) glicerol, 4.4% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 15% β -mercaptoetanol), utilizando 1 μ L de solución por cada 3 μ L de muestra. Las muestras de proteínas se analizaron en la cámara vertical Mini-Protean Tetra Cell de BioRad y se agregó el buffer de corrida SDS-PAGE (250mM Tris base, 1.92M Glicina, 1% SDS, pH 8.8) a 90 volts por 30 minutos y 120 volts por 1.5 h. Los geles se tiñeron con solución de Coomassie (0.25% azul brillante de Coomassie G-250, 45% metanol, 9% ácido acético, 46% agua) durante 10 minutos bajo agitación suave. se destiñeron con 7.5% ácido acético, 5% metanol, 87.5% agua. y se observaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imagen, BioRad).

Obtención del perfil de proteínas en segunda dimensión (2DE-PAGE)

Se realizó una nueva cuantificación de las proteínas purificadas, de las cuales se tomaron 150 μg y se completó el volumen de cada muestra con buffer de rehidratación (8M Urea, 2% CHAPS, 1%, Anfólitos pH 3- 10, 1% DTT) hasta completar 125 μL . Previo a la separación en la primera dimensión, se rehidrataron tiras de gradiente inmovilizado (ReadyStrip®, BioRad) de 7 cm y un rango de pH de 3-10, por 16 horas a 20°C con los 150 μg de proteína en un volumen de 125 μL de buffer de rehidratación. Las tiras se colocaron en la bandeja de rehidratación y se les agregaron 2 ml de aceite mineral para evitar que la muestra se evaporara. Luego de la rehidratación se llevó a cabo el isoelectroenfoque en el equipo PROTEAN (i12 IEF BioRad) según las condiciones descritas en la tabla 4 (reportadas por Chico, 2017), limitando la corriente a 50 μA por tira.

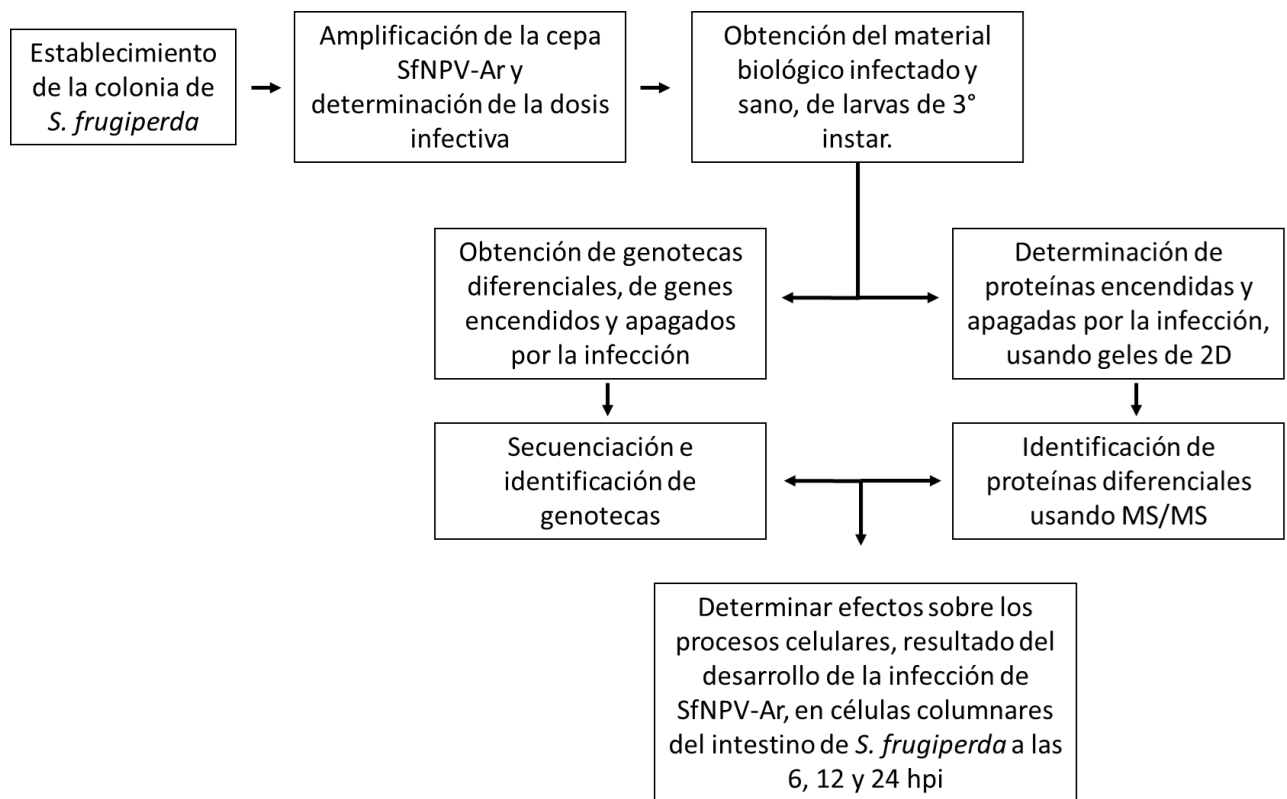
Tabla 4.- condiciones para el isoelectroenfoque reportadas por Chico, 2017.

Protocolo	Paso	Voltaje, V	Rampa	Tiempo	Unidades
7cm pH3-10 G	1	250	Rápido	0:20	HH:MMr
	2	4000	Gradual	1:00	HH:MM
	3	4000	Rápido	15,000	Vh
	4	500		Mantener	

Al final del isoelectroenfoque las tiras se sumergieron en solución de equilibrio (6M Urea, 2% SDS, 0.06 M Tris-HCl pH 8.8, 20% Glicerol) con DTT al 2% por 20 minutos. Posteriormente se sumergieron nuevamente en la solución de equilibrio con iodoacetamida al 2.5%, durante 20 minutos. Finalmente, las tiras se colocaron sobre un gel de poliacrilamida al 12% (2.607mL de agua destilada estéril, 1.5mL de Tris 1.5M pH8.8, 1.8mL de acrilamida (40%), 60 μL de SDS 10%, 3 μL de TEMED y 30 μL de persulfato de amonio 10%) previamente preparados en un sistema Mini-Protean III (BioRad) y se fijaron con solución de sellado (0.5% agarosa de bajo punto de fusión preparada en buffer de corrida SDS-PAGE 1X+Trazas de Azul de bromofenol) y las muestras se analizaron en una cámara vertical Mini-Protean Tetra Cell de BioRad, con el buffer de corrida SDS-PAGE (250mM Tris base, 1.92M Glicina, 1% SDS, no se ajusta el pH, debe ser cercano a 8.3) a 80 volts por 15 minutos, y 120 volts por 2 horas, se tiñó con azul de Coomassie y se observó en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imagen BioRad).

El análisis de los geles en 2DE se realizó utilizando la versión de prueba del software Delta2D 4.7 (DECODON), las proteínas diferenciales fueron aisladas con una pipeta estéril y colocados en ADE en un tubo eppendorf de manera individual, estos se mandaron identificar al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT). Los datos de la identificación de espectrofotometría de masas fueron analizados con el programa Mascot Matrix Science, bajo los siguientes parámetros: Tipo de búsqueda ms/ms ion search; enzima usada tripsina, modificaciones variables de carbamidometilo (C), de oxidación M, valor de masas sin restricciones, tolerancia de masa del péptido de ± 1.2 Da, tolerancia del fragmento de masas de ± 0.6 Da, max missed cleavages de 1. Lo anterior usando el instrumento de tipo ESI-QUAD-TOF y un número de “queries” de 521.

Estrategia experimental



Resultados y discusiones

Mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda*.

La producción mensual promedio de la colonia fue de 1,500 larvas, de las cuales aproximadamente 500 al alcanzar el 2° instar eran individualizadas en vasos de dieta para evitar el canibalismo como se puede observar en la figura 2 B. las larvas restantes eran destinadas a los diferentes experimentos que se llevan a cabo en el laboratorio, de las 500 larvas individualizadas cerca de 400 lograron llegar a pupas y adultos (figura 2 A).



Figura 2.- Diferentes etapas de la colonia de *S. frugiperda*. A) pupas, B) larvas individualizadas, C) huevos, D) adultos y E) colonia de *S. frugiperda* en la cama ambiental.

Amplificación del inoculo viral

Una vez purificados los CO se realizó un conteo en una cámara de Neubauer en cinco cuadrantes, el promedio de dicho conteo se multiplico por el factor de 2.5×10^5 obteniendo una concentración de 2.3×10^9 CO/ml en un volumen de 15 ml dando un total de 3.45×10^{10} CO.

Pruebas de infección en *S. frugiperda*

Otro punto que se monitoreo fue la mortalidad de las larvas a los cinco días post infección en larvas de *S. frugiperda* de tercer instar, para lo anterior se partió de la dosis más alta probada por Rangel et al 2012 para la misma cepa viral junto con otras cinco dosis las cuales fueron: 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 y 8×10^6 CO/larva (tabla 5), en total se probaron 50 larvas las cuales se infectaron con las concentraciones anteriores, pasados 7 dpi se determinó la mortalidad.

Para las dosis de 5×10^5 y 1×10^6 CO/larva se usaron 40 larvas por dosis; en al analizar la presencia de CO en hemocitos de las larvas infectadas solo entré el 10 y 30 % de la población a las 72 hpi presento dichas estructuras en el nucleo de las células. Para ambas condiciones se detectó una mortalidad de entre 10 y 20% a los 7 dpi respectivamente las cuales fueron reflejadas en la tabla. Las siguientes dosis evaluadas fueron 2, 4, 6 y 8×10^6 CO/larva cuyos resultados se registraron en la tabla 5, y son descritos por dosis como sigue: para la dosis de 2×10^6 se probaron 40 larvas en total, de las cuales el 52.5% de ellas presentaron CO en los hemocitos a las 72 hpi; de las 40 larvas infectadas el 65% murió por la infección viral a los 7 dpi. En relación con la dosis de 4×10^6 CO/larva se probaron en total 40 larvas de las cuales el 57.5% presentaron CO en los hemocitos a las 72 hpi y del total de larvas el 75% murió por la infección a los 7dpi. En relación con la dosis de 6×10^6 CO/larva se probaron 40 larvas, de estas el 87.5% presentaron CO en los hemocitos a las 72 hpi y del total de las larvas el 100% murió a los 7 dpi. Para finalizar en relación con la dosis de 8×10^6 CO/larva se probaron 40 larvas, de las cuales el 90% presentaron CO en los hemocitos a las 72 hpi y del total de las larvas el 100% murió a los 7 dpi.

Tabla 5.- Relación de las diferentes dosis probadas para determinarla concentración idónea en CO/larva.

Dosis	Dosis CO/larva	Número de larvas probadas	Presencia de CO a las 72 hpi %	Larvas muertas a las 120 hpi %
1	0	40	0	0 (0%) ^a
2	5×10^5	40	10	4 (10%) ^d
3	1×10^6	40	30	8 (20%) ^d
4	2×10^6	40	52.5	26 (65%) ^c
5	4×10^6	40	57.5	30 (75%) ^c
6	6×10^6	40	87.5	40 (100%) ^b
7	8×10^6	40	90	40 (100%) ^b



Figura 3.- A) infección por gota de una larva de *S. frugiperda*. B) larvas infectadas con sacarosa al 10% y colorante 5 dpi y C) larvas infectadas con 6×10^6 CO/larva, colorante y sacarosa al 10% 5 dpi.

Los resultados de la mortalidad mencionadas en el párrafo anterior y en la tabla 5, junto con las diferentes concentraciones de CO/larva fueron analizados usando el programa STATGRAPHICS Centurión, para lo cual se usó la comparación múltiple de medias y la prueba de Tukey. Como resultado del análisis se obtuvo un valor de P menor a 0.05 lo que nos indicó que existen diferencias significativas entre las diferentes dosis evaluadas, lo que se denoto por diferentes literales entre las dosis probadas, siendo la dosis 2 y 3 de la tabla 5 similares entre ellas, el mismo resultado fue observado para las dosis 4 y 5; así como para las dosis 6 y 7. En los resultados anteriores la dosis 6 y 7 causaron el 100% de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* de 3° instar a los 7 dpi, siendo estas dosis estadísticamente similares entre sí y diferentes a las demás dosis probadas, la dosis 6 de 6×10^6 CO/larva fue seleccionada como la más idónea para infectar las larvas para los estudios posteriores. Como resultado del análisis estadístico, comparando el efecto de las diferentes concentraciones en las larvas de *S. frugiperda* usando la prueba de Tukey, se obtuvo que las dosis 6 y 7 causaban un 100% de mortalidad a los 7 dpi y al ser estadísticamente diferentes al resto, se determinó que la concentración 6 sería la óptima para infectar las larvas para los estudios posteriores.

Estos resultados guardan similitud con lo reportado por Rios Velasco y colaboradores en el 2011, así como por Martínez y colaboradores en el 2003, quienes dentro de sus observaciones notaron que con forme aumentó el instar larvar de *S. frugiperda* también se registró un aumento en la concentración de CO necesarios para lograr una CL_{50} , es decir, con forme aumentó el instar de *S.*

frugiperda aumentó significativamente la CL_{50} calculada. Estos mismos autores mencionan que con forme el instar larvar incrementó, el tiempo letal medio (TL_{50}) lo hizo de igual manera. Dicho aumento en el TL_{50} alcanzó según Rios Velazco en el 2011 hasta los 6.55 días para el tercer instar de *S. frugiperda* infectada con un baculovirus nativo altamente agresivo en los primeros instar de las larvas analizadas. Lo anterior al ser contrastado con las observaciones de este trabajo, explican el efecto de un aumento de la concentración de CO para lograr una mortalidad del 100% de las larvas y a su vez un aumento en tiempo letal de hasta 7 días.

Extracción de intestinos

Los intestinos se extrajeron en forma secuencial sin rebasar una ventana de +/-15 minutos cumplido el tiempo analizado de 6, 12 y 24 hpi.



Figura 4.- Extracción de intestinos de larvas de *S. frugiperda*, A) larva fijada a la caja de disección con alfileres, B) Intestino separado del cuerpo de la larva aun con alimento en su interior, C) en la parte superior de la imagen se observó el intestino sin el alimento que se encontró en la parte inferior.

Para cada uno de los tiempos se dejaron 10 larvas (10 infectadas y 10 sin infección) para monitorear su evolución hasta las 120 horas, tiempo en el cual las larvas tratadas con SfNPV-Ar murieron y las larvas a las que se les dio solo sacarosa al 10% con colorante permanecían sin síntomas de infección. Lo anterior se representó en la figura 3B, donde se observó que las larvas infectadas con sacarosa al 10% y colorante a los 7 dpi, las mismas estaban sanas y continuaban creciendo. En la misma figura en 3C se observó las larvas tratadas con el virus, las cuales estaban con el cuerpo reblandecido, indicativo de una muerte por infección por baculovirus. En la figura 4 se observó el proceso de extracción de los intestinos,

donde en A se observó la disección de una larva, posteriormente la extracción y limpieza del mismo (fig. 4B), finalmente en Fig. 4C al centro se observó el tejido limpio sin traqueas y alimento en el interior del mismo.

Extracción de ARN y síntesis del cDNA

Para determinar la calidad del RNA usando electroforesis se corrió un gel de agarosa al 1.5% (no desnaturalizante) el cual podemos observar en la figura 5 A en el carril 2 se observó el ARN total de los intestinos de 24 horas sin infectar (hsi), en el carril 3 se observó el ARN total de los intestinos 24 hpi, en la misma figura en B se observó en el carril 2 el ARN de los intestinos a las 6 hsi, en el carril 3 a las 6hpi, en el carril 4 de los intestinos a las 12 hsi y finalmente en el carril 5 el ARN de los intestinos a las 12 hpi. En todos los casos se observó un barrido a lo largo de cada uno de los carriles con poca concentración al final del mismo, la relación del ARN ribosomal 28S y ARN ribosomal 18S se observó una relación 1:2 (28S 18S) según lo expuesto por Wieczorek y colaboradores en el 2012, este debería localizarse entre el rango de 2:1, en este trabajo la relación obtenida es de aproximadamente 1:1 lo que podría ser un indicativo de una ligera degradación del ARN, sin embargo, Wieczorek y colaboradores en el 2012 mencionan que de igual manera que los valores de la absorbancia para estas muestras deben estar para 260 nm en valores ínfimos a 30 y para la relación 260:280 nm entre un valor de 1.7 a 2.0, para las muestras aquí analizadas para el ARN total de los intestinos a las 6 hsi se obtuvo una concentración de 1,25 ng/ul, una Absorbancia a 260 nm de 6 y una relación 260/280 de 31, para las 6 hpi se obtuvo una concentración de 1,215 ng/ul, una absorbancia a 260 nm de 12.15 y una relación 260/280 nm de 1.7, para las 12 hsi se obtuvo una concentración de 1,807 ng/ul, una absorbancia a 260 nm de 16 y una relación 260/280 nm de 1.8, para las 12 hpi se obtuvo una concentración de 1,070 ng/ul, una absorbancia a 260 nm de 21 y una relación de 260/280 nm de 1.8, para las 24 hsi se obtuvo una concentración de 789 ng/μl, una absorbancia a 260 nm 15.25 y una relación de 260:280 nm de 1.8. En el caso de ARN de las 24 hpi se obtuvo una concentración de 760 ng/μl, una absorbancia a 260 nm de 15.75 y una relación 260:280 de 1.7.

Derivado de lo anterior y tomando en cuenta lo expuesto por Wieczorek y colaboradores en el 2012, los valores de la absorbancia a 260 nm se encuentran en un rango bajo en las dos extracciones de ARN lo cual es un indicativo de la estabilidad del mismo y que este puede ser usado para estudios posteriores.

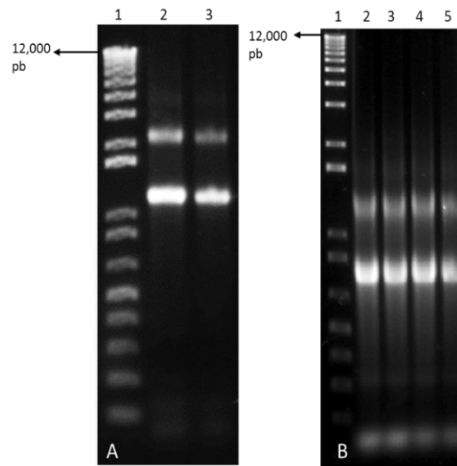


Figura 5.- Gel de agarosa al 1.2% con las muestras de ARN total A) carril 1 marcador de peso molecular 1 kb plus, carril 2 RNA de las 24 hsi, carril 3 RNA de las 24 hpi. En B) carril 1 marcador de peso molecular 1kb plus, carril 2 RNA de las 6 hsi, carril 3 RNA de las 6 hpi, carril 4 RNA de las 12 hsi y carril 5 RNA de las 12 hpi.

Una vez obtenido el RNA de buena calidad según Wieczorek y colaboradores en el 2012, mencionado en el párrafo anterior, se realizó la síntesis de la primera cadena o ss cDNA, como resultado se obtuvo la figura 6 A, en la cual en el carril 2 se observó el ss cDNA de las 6 hsi, en el carril 3 de las 6 hpi, en el carril 4 de las 12 hsi, en el carril 2 de las 24 hpi y en el carril 3 de las 24 hpi. Se destacó la eficiente síntesis de la primera cadena debido al barrido constante que se observó en los carriles, la falta de degradación y la evidente falta de un manchón brillante debajo de las 100 pb, este barrido en el carril corresponde a híbridos de ADN-ARN ya que en esta etapa no se amplifica el material genético sino solamente se realizó la síntesis de una sola cadena de ADN complementaria al ARN y gracias a la tecnología Smart en los extremos 3' y 5', se añadió una secuencia que será usada para amplificar exponencialmente esta cadena simple en forma de segunda cadena.

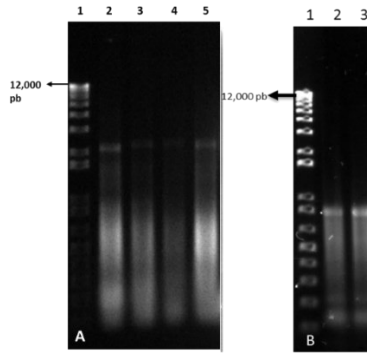


Figura 6.- Síntesis de la primera cadena A) carril 2 de las muestras 6 hsi, carril 3 de las 6 hpi, carril 4 de las 12 hsi, carril 5 de las 12 hpi, B) carril 2 de las 24 hsi y carril 3 24 hpi.

Una vez que se sintetizó la primera cadena se procedió a la síntesis de la segunda cadena o ds cDNA, los resultados de esto se registraron en la figura 7 A donde en el carril 2 se observó el ds cDNA de las 6 hsi, en el carril 3 el ds cDNA de las 6 hpi, en el carril 4 el ds cDNA las 12 hpi y en el carril 5 el ds cDNA de las 12 hsi, en la misma figura 8, pero en B se observó la síntesis de la ds cDNA de las 24 hsi en el carril 4 y en el carril 5 se observó el ds cDNA de las 24 hpi. Lo anterior evidenció las diferencias que existían entre la expresión de genes entre dos poblaciones. Lo cual se observó en el patrón de bandeo que difería completamente entre las 6 condiciones (6, 12 y 24 hpi y sus testigos) de la figura 7 tanto en A como en B, esto probablemente debido a la infección viral que está llevando a cabo una modificación en la expresión génica de las células infectadas.

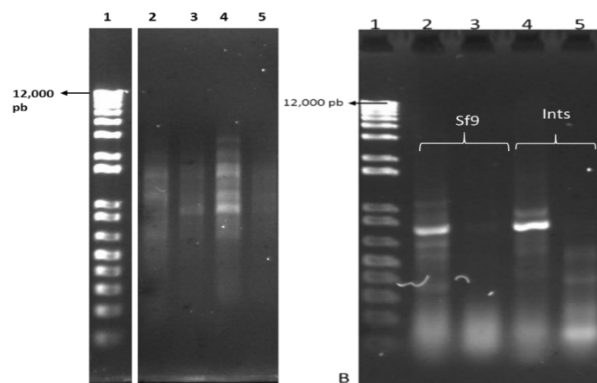


Figura 7.- Síntesis de la segunda cadena, A) carril 2 segunda cadena muestras 6 hsi, carril 3 a las 6 hpi, carril 4 a las 12 hsi, carril 5 a las 12 hpi, B) carril 4 a las 24 hsi, carril 5 a las 24 hpi, carril 2 y 3 del ARN de muestras de células Sf9 sin infectar e infectadas 120 hpi respectivamente.

Digestiones con enzima de corte frecuente

El ds cDNA fue cortado con la enzima Afa I, los cortes fueron observados en la figura 8 A, donde en el carril 2 se observaron los cortes del ds cDNA de las 6 hsi, en el carril 3 el ds cDNA de las 6 hpi, en el carril 4 el ds cDNA de las 12 hsi y en el carril 5 el ds cDNA de las 12 hpi. En tanto en la figura 8 B en el carril 2 se observó la digestión con la enzima Afa I del ds cDNA de las 24 hsi y en el carril 3 el ds cDNA de las 24 hpi. Como se observó en la figura 8 al contrastarla con la figura 7, existió una pérdida en el peso molecular del barrido que se presentó al sintetizar la segunda cadena el cuál partió de las 2,000 pb en todas las condiciones en la figura 7 a estar por debajo de las 1,000 pb en la figura 8.

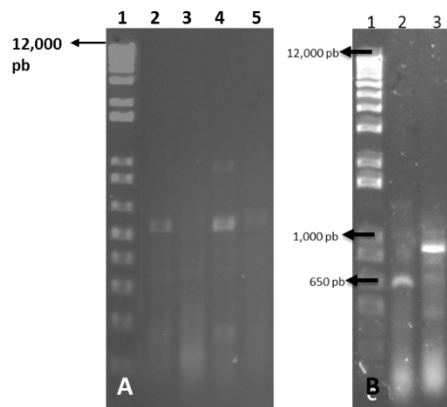


Figura 8.- Cortes con Afa I a la segunda cadena purificada, A) Carril 2 segunda cadena muestras 6 hsi, carril 3 a la segunda cadena purificada de las 6 hpi, carril 4 de las 12 hsi, carril 5 de las 12 hpi. B) cortes con Afa I carril 2 a la segunda cadena purificada de la muestra de las 24 hsi y carril 3 a las 24 hpi.

Hibridaciones

Anterior a la hibridación se realizó la ligación de adaptadores a las condiciones infectadas y sin infectar. Las hibridaciones se llevaron a cabo como se muestra en la tabla 7. Según lo mostrado en la tercera columna de la tabla 7 una vez que se tuvieron las mezclas se colocó un volumen de la solución de hibridación, seguido de una desnaturalización a 98°C por 1:30 minutos.

Una vez completado el tiempo se llevó a cabo la segunda hibridación para lo cual se mezclaron los resultados de la primera hibridación según lo mostrado en la tabla 8, donde se observa que los tester del mismo tiempo post infección que tenían

ligados los adaptadores I y II por separado se juntaron en el mismo tubo, se les agregó un exceso de su respectivo driver usado en la primera hibridación, pero esta vez en una concentración de 150 ng, previa desnaturalización del driver fresco a 98°C por 2 minutos junto con un volumen de solución de hibridación. Con esto se pretendió agregar un exceso de driver para asegurarnos que todos los genes del tester que tenían algún adaptador ligado y que a su vez estuvieran presentes en el Driver hibridaran entre sí, lo que generaría poblaciones donde en una de sus cadenas tendría adaptadores y en la otra cadena no, evitando la expresión exponencial durante los PCR posteriores. De igual manera en este paso se generaron poblaciones que solo estarían presentes en el tester las cuales hibridarían entre sí y tendrían ligados en una cadena el adaptador I y en la otra cadena el adaptador II. Estas poblaciones descritas son exclusivas del tester, las cuales sufrieron una expresión exponencial al realizar los PCR lo cual generó poblaciones de genes presentes solamente en el tester sea de las 6, 12 o 24 hpi para los genes que se encienden o para las mismas horas para los genes que se apagan, esto dependiendo del Driver usado.

Tabla 7.- Relaciones para llevar a cabo la primera hibridación entre el Tester ligado a algún adaptador y un exceso de driver sin ligar a un adaptador.

Tubo #	Driver:Tester	Relación Tester:Driver (ng)	Genes buscados
1.6	6 hpi:6 hsi-Adaptador 1	165 ng:72 ng	Apagados 6 hsi
2.6	6 hpi:6 hsi-Adaptador 2	165 ng:45 ng	Apagados 6 hsi
3.6	6 hsi:6 hpi-Adaptador 1	115 ng: 53 ng	Encendidos 6 hsi
4.6	6 hsi:6 hpi-Adaptador 2	115 ng:59 ng	Encendidos 6 hsi
1.12	12 hpi:12 hsi-Adaptador 1	115 ng:47 ng	Apagados 12 hsi
2.12	12 hpi:12 hsi-Adaptador 2	115 ng: 37 ng	Apagados 12 hsi
3.12	12 hsi:12 hpi-Adaptador 1	185 ng: 70 ng	Encendidos 12 hpi
4.12	12 hsi:12 hpi-Adaptador 1	185 ng: 53 ng	Encendidos 12 hpi
1.24	24 hpi:24 hsi-Adaptador 1	250 ng:86 ng	Apagados 24 hsi
2.24	24 hpi:24 hsi-Adaptador 2	250 ng: 96 ng	Apagados 24 hsi
3.24	24 hsi:24 hpi-Adaptador 1	290 ng:28 ng	Encendidos 24 hpi

4.24	24 hsi:24 hpi-Adaptador 1	290 ng: 46 ng	Encendidos 24 hpi
------	---------------------------	---------------	-------------------

Tabla 8.- Relaciones para llevar acabó la segunda hibridación.

Tubo #	Mezcla de tubos	Exceso de Driver (ng)	Genes buscados
5.6	1.6 con 2.6	150 ng 6 hpi	Genes que se apagan 6 hpi
6.6	3.6 con 4.6	150 ng 6 hsi	Genes que se encienden 6 hpi
5.12	1.12 con 2.12	150 ng 12 hpi	Genes que se apagan 12 hpi
6.12	3.12 con 4.12	150 ng 12 hsi	Genes que se encienden 12 hpi
5.24	1.24 con 2.24	150 ng 24 hpi	Genes que se apagan 24 hpi
6.24	3.24 con 4.24	150 ng 24 hsi	Genes que se encienden 24 hpi

El proceso anterior se realizó sin perder la temperatura de hibridación y una vez desnaturalizado el respectivo driver se agregó a la mezcla de la primera hibridación y se dejó por 12 horas hibridando a una temperatura de 68°C. Concluido ese tiempo se les agregaron a cada una de las muestras 100 ul del buffer de dilución, se calentó la mezcla a 72°C por 8 minutos y se almacenó a -20°C.

El proceso anterior fue fundamental para permitir la hibridación entre fragmentos de genes similares y obtener poblaciones de genes diferenciales que poseían en cada uno de sus extremos cada uno de los adaptadores. Una vez que se concluyó la hibridación se procedió a realizar los PCR para amplificar los fragmentos diferenciales. El primer PCR o de normalización se realizó usando la dilución 1:10 de los productos de la segunda hibridación según lo observado en la tabla 9.

Tabla 9.- Relación usada para el primer PCR (Normalización)

Tubo #	Muestra de la 2° hibridación usada para el primer PCR (# tubo)	Genes buscados
7.6	5.6	Genes que se apagan 6 hpi
8.6	6.6	Genes que se encienden 6 hpi
7.12	5.12	Genes que se apagan 12 hpi
8.12	6.12	Genes que se encienden 12 hpi
7.24	5.24	Genes que se apagan 24 hpi
8.24	6.24	Genes que se encienden 24 hpi

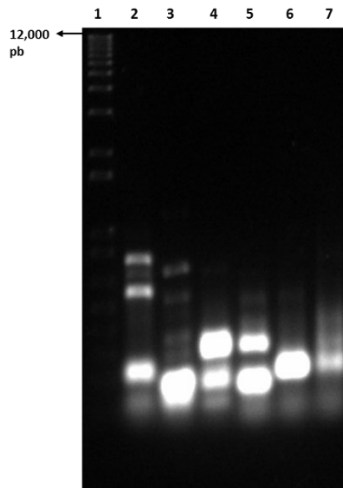


Figura 9.- Segundo PCR (supresión) carril 2 genes apagados a las 6 hpi, carril 3 genes encendidos a las 6 hpi, carril 4 genes apagados a las 12 hpi, carril 5 genes encendidos a las 12 hpi, carril 6 genes apagados a las 24 hpi, carril 7 genes encendidos a las 24 hpi.

Una vez terminado el primer PCR se realizó una dilución 1:10 con la que se realizó el segundo PCR o de supresión, el cual fue realizado según las anotaciones de la tabla 10. Terminado el segundo PCR el resultado se analizó en un gel de agarosa, el cual se registró en la figura 9, donde se observaron múltiples amplificaciones entre las 100 pb hasta las 1,000 pb, para cada uno de los experimentos realizados, en dicha figura, en el carril 1 se observaron los genes apagados por la infección a las 6 hpi donde 4 bandas definidas fueron detectadas, en el carril 3 se observaron los genes encendidos por la infección las 6 hpi donde se observaron 6 bandas de pesos moleculares totalmente diferentes a las observadas en el carril 2, en el carril 4 se obtuvieron los genes apagados por la infección a las 12 hpi en este se observaron 5 bandas definidas, en el carril 5 se observaron los genes encendidos por la infección a las 12 hps donde se visualizaron 4 bandas definidas, en el carril 6 se observaron los genes apagados por la infección a las 24 hpi donde se observaron 4 bandas definidas y finalmente en el carril 7 se observaron los genes encendidos por la infección a las 24 hrs donde se observaron 4 bandas de diferente peso molecular a la condición control del carril 6.

Tabla 10.- Relación usada para realizar el 2° PCR (supresión).

Tubo #	Muestra del 1° PCR diluido usado para el 2° PCR (# tubo)	Genes buscados
9.6	7.6	Genes que se apagan 6 hpi
10.6	8.6	Genes que se encienden 6 hpi
9.12	7.12	Genes que se apagan 12 hpi
10.12	8.12	Genes que se encienden 12 hpi
9.24	7.24	Genes que se apagan 24 hpi
10.24	8.24	Genes que se encienden 24 hpi

Generación de las bibliotecas

Con los resultados del PCR de supresión se procedió a realizar la ligación de estos en el vector de conservación Topo4. Los resultados obtenidos de las clonaciones se observan en la tabla 11, en la cual se observó que para los genes apagados por la infección a las 6 hpi se obtuvieron 112 colonias con fragmento, para los genes encendidos por la infección a las 6 hpi se obtuvieron 21 colonias con fragmento, para los genes apagados por la infección a las 12 hpi se obtuvieron 34 colonias con fragmento, para los genes encendidos por la infección a las 12 hpi se obtuvieron 6 colonias que liberaron fragmento, para los genes apagados por la infección a las 24 hpi se obtuvieron 11 clonas que liberaron fragmento y para los genes encendidos por la infección a las 24 hpi se obtuvieron 36 clonas con fragmento. En total se obtuvieron 226 clonas con fragmento de las diferentes condiciones, es de sumo interes que el número de clonas con genes apagados disminuyo mientras la infección avanzó, mientras que los genes encendidos se observó un aumento a las 6 hpi, una disminución a las 12 hpi que concuerda con la replicación del ADN viral y un aumento de colonias con genes encendidos por la infección a las 24 hpi.

Tabla 11.- Relación del número de colonias obtenidas para cada condición, colonias que liberaron fragmento y colonias que hibridaron en los macro arreglos.

Condición	# colonias que liberaron fragmento
Genes apagados a las 6 h	112

Genes encendidos a las 6 h	21
Genes apagados a las 12 h	34
Genes encendidos a las 12 h	6
Genes apagados a las 24 h	11
Genes encendidos a las 24 h	36
Total	226

Macroarreglos

Para la primera condición se analizaron los genes apagados por la infección viral a las 6 hpi, se realizaron dos membranas las cuales se plasmaron en las figuras 12 (A) y 12 (B). Para la primera membrana (figura 12 A) contenía el DNA plasmídico de genes apagados por la infección viral plasmados en la tabla 12, se hibridó con el cDNA marcado de las 6 hsi; en esta condición se obtuvieron un total de 38 muestras que hibridaron, lo cual se enmarcó por la presencia de color a diferentes concentraciones, lo cual fue un indicativo indirecto de la cantidad de copias de ese gen que estaba presente a las 6 horas en la condición control.

Dichas muestras de genes apagados por la infección a las 6 hpi fueron de acuerdo al orden de la tabla 12, los observados en la figura 10 A y B de la columna I la numero 32, 17, 18, 6, 86. Columna II fueron las muestras 20, 13, 94, 83, 95, 45, 37. Columna III las muestras 3, 35, 32, 12 y 36. Columna IV fueron las 7, 22, 54, 3, 47 y 10. Columna V fueron las 51 y 42. Columna VI fueron las 73, 28, 64 y 7. columna VII la muestra 23, 30, 89, 5, 74, 33, 63 y 99. Finalmente de la columna VIII las muestras 2, 73 y 57. Al contrastar los resultados de esta membrana con la presente en la misma figura 11 en B, hibridada con el cDNA de las 6 hpi. Se observó que 22 de las marcas presentes en A no se encontraron en B, lo cual fue un indicativo que estos genes fueron apagados presuntamente por la infección viral. Estos posibles genes apagados fueron de la: columna I el 32, 17 y 18, columna II el número 20, 94, 83 y 95, columna III el número 3, 35 y 36, Columna IV los números 7, 22, 54 y 3. Columna V los números 51 y 42, Columna VI 73, 28 y 7. Columna VII 5 y 74 y finalmente para la columna VIII el número 2. En cuanto a los 17 puntos restantes estos estuvieron presentes en la figura 11 B estos resultaron ser de menor intensidad

que los observados en A lo cual nos indicó que estos genes estaban siendo regulados negativamente por acción de la infección viral.

Tabla 12.- Orden de la membrana 1 donde se fijaron los DNA plasmídicos de genes apagados por la infección a las 6 hpi.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
A	58	20	3	7	30	99	23	2
B	97	34	35	93	51	73	30	73
C	32	13	79	22	82	28	89	57
D	17	94	26	54	35	64	5	88
E	31	83	18	19	92	68	74	Vial 2 marcado
F	18	95	32	3	42	20	33	
G	6	45	12	47	100	7	63	Vial 2 sin marcar
H	86	37	36	10	68	24	99	Vial 4 marcado

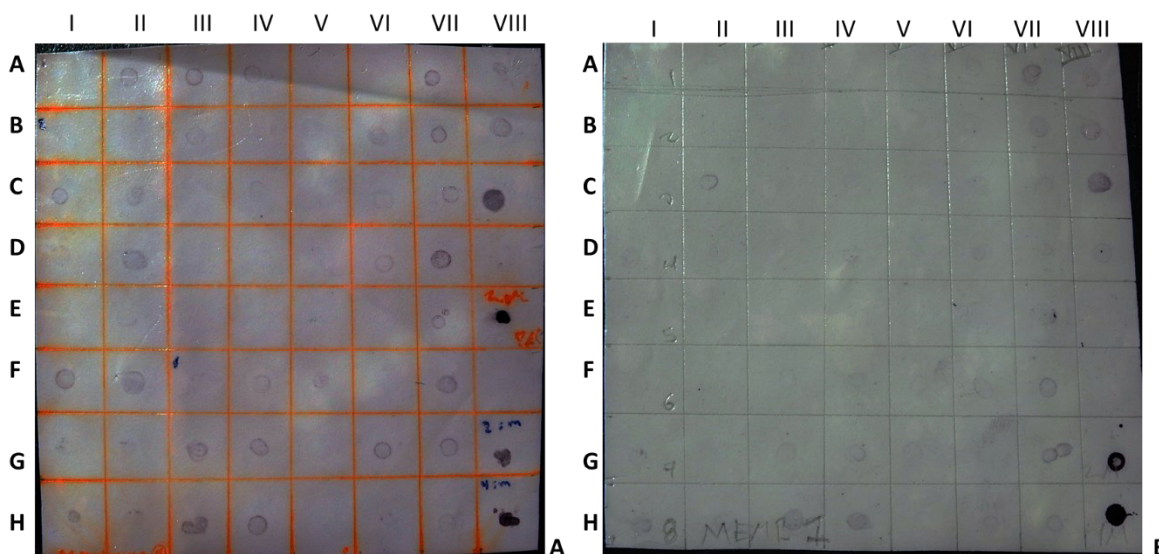


Figura 10.- Membrana 1 con el ADN plasmídico de los genes apagados por la infección viral, A) hibridadas con el cDNA marcado de las 6 hsi y B con el cDNA marcado de las 6 hpi.

La segunda membrana de la primera condición figura 11 A la cual contenía fijados los ADN plasmídicos los genes apagados por la infección, según lo reportado en la tabla 13, se hibridó con el cDNA marcado de las 6 hsi. Como resultado se observaron 38 coloraciones con diferente intensidad lo cual indicó que esos genes están presentes a las 6 horas en los intestinos sin infectar en diferente proporción.

Estos genes fueron para la columna I los números 34, 4, 73 y 48, columna II los 1, 19, 13, 55, 42 y 17, columna III fueron el 24, 62, 91 y 29, columna IV todos los ADN plasmídicos fijados hibridaron, columna V los 86, 76, 66 y 16 columna VI los 77, 3 y 57, columna VII los 29, 13, 94, 83, 95, 35 y 79; finalmente en la columna VIII hibridaron los números 26 y 18. Al comparar esta membrana con la observada en la figura 12 B que coincidió el mismo orden del mismo ADN de la tabla 15; se hibrido con el cDNA marcado de las 6 hpi, se observó que 20 de las marcas presentes en la membrana de la figura 12 A no se encontraron presentes en B lo que fue un indicativo de que esos genes fueron apagados por el proceso de infección viral. Dichas marcas fueron para la columna I los números 34, 4 y 73, columna II el 1 y 19, columna III el 24, columna IV los 41, 28, 65, 41, 90 y 67, columna V el 76, columna VII los 13, 94, 95, 35 y 79; y para la columna VIII el número 26 y 18. El resto de las marcas se encontraron presentes en la figura 11 B al igual que en B pero su coloración fue menor que la observada en A lo que pudo indicar de estos genes si bien estaban siendo expresados de manera normal en el control su nivel de expresión fue modificada por la infección viral y en su mayoría según la coloración fueron regulados negativamente.

Tabla 13.- Orden de la membrana 2 donde se fijaron los DNA plasmídicos de los genes apagados por la infección a las 6 hpi.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
A	26	1	74	41	86	77	4	26
B	34	91	24	28	76	90	29	18
C	4	19	62	65	8	36	13	
D	73	13	91	67	18	22	94	
E	24	55	5	41	22	81	83	Vial 2 marcado
F	21	42	95	90	66	3	95	
G	48	17	29	67	4	57	35	Vial 2 sin marcar
H	78	37	21	45	16	47	79	Vial 4 marcado

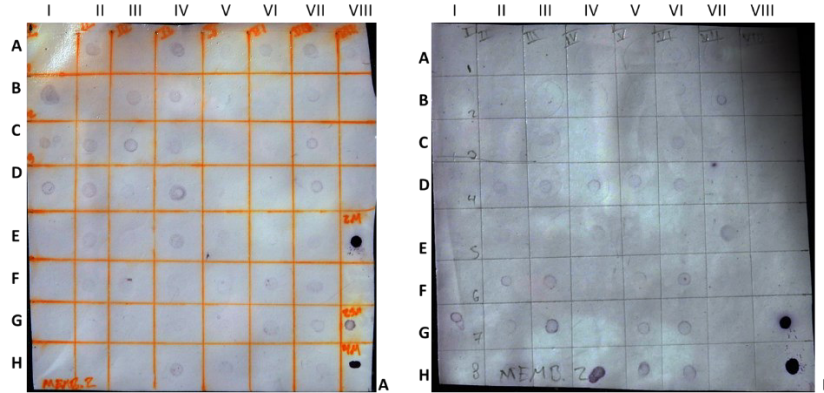


Figura 11.- Membrana 2 con el ADN plasmídico de los genes apagados por la infección a las 6 hpi. A) hibridados con el cDNA de las 6 hsi y B) hibridados con el cDNA de las 6 hpi.

Para el caso de la membrana 3 en la cual se fijaron los ADN plasmídicos de los genes que se encendieron por la infección viral a las 6 hpi. Esta membrana se hibridó con el cDNA marcado de las 6 hpi (figura 12 A) y con el de las 6 hsi (figura 12 B), según el orden que se observa en la tabla 14. Para el primer caso se obtuvieron 19 marcas de color con diferente intensidad, lo cual fue un indicativo de que esos genes estaban presentes en las células del intestino medio a las 6 hpi. Dichos genes fueron según el orden de la tabla 13 en la columna I los números 25, 33 y 9, columna II todos los ADN plasmídicos hibridaron al igual que para la columna II, IV y V. Al contrastar las figuras 12 A y B las cuales contenían los mismos ADN plasmídico en el mismo orden hibridadas con diferente cDNA marcado, se encontró que 4 muestras hibridaron en la membrana A de la figura 12 no se encontraban presentes en la membrana B de esa misma figura. Dichos genes fueron los números 33, 17, 83 y 29, ubicados en las columnas I, II y IV. El resto de las marcas que hibridaron en la membrana A de la figura 13 se encontraron también en la B aunque en menor intensidad, indicando que estos genes probablemente se estaban sobre expresando en la condición infectada.

Tabla 14.- Orden de la membrana 3 donde se fijaron los DNA plasmídicos de genes encendidos por la infección a las 6 hpi.

	I	II	III	IV	V	VI
A	4	6	4	4	11	
B	6	4	6	9		Vial 2 marcado
C	25	5	4	83		

D	33	4	4	9		Vial 2 sin marcar
E	9	6	17	29		Vial 4 marcado

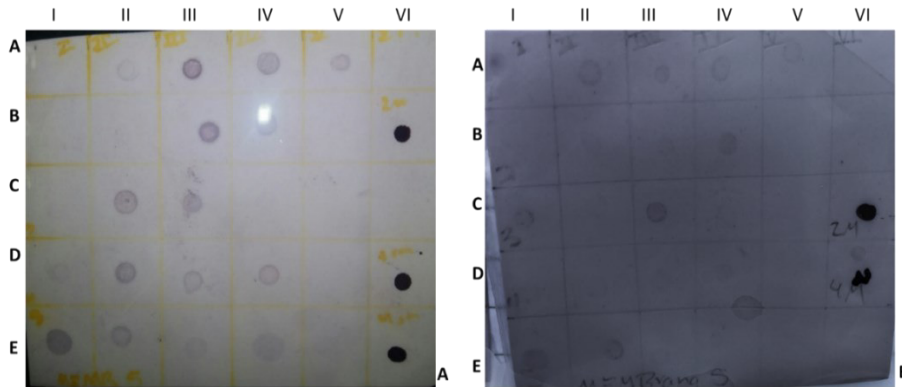


Figura 12.- Membrana 3 con el ADN plasmídico de los genes encendidos por la infección a las 6 hpi. A) hibridados con el cDNA de las 10 hpi y B) hibridado con el cDNA de las 10 hsi.

Para el caso de la membrana 4 (figura 13) en la cual se fijaron el ADN plasmídico de los genes que se están apagando por la infección viral a las 12 hpi según lo reportado en la tabla 15. Al hibridarlos con el cDNA de las 12 hsi se obtuvieron 19 marcas de color como se observó en la figura 13 A. Dichos genes fueron, según los registros de la tabla 15, de la columna I los números 5, 147, 5 y 10, columna II el 7 y el 15, columna III el número 2, 2, 108, 104 y 18, columna IV el número 1, 12 y 149, columna V el 13, 10, 5 y 49; y por último de la columna VI el número 10. Al contrastar esa imagen con la figura 13 B se observó que 8 marcas no se encontraban presentes y 10 marcas se encontraron presentes en ambas condiciones. Las que no se encontraron en las dos membranas fueron las marcas con el número 5, 5, 15, 2, 2, 18, 49 y 10. La ausencia de dichas marcas fue un indicativo que se apagaron por acción de la infección viral. En cuanto a las 10 marcas que se encontraron en ambas condiciones las presentes en la figura 13 B son menos intensas que las presentes en A lo que indica que posiblemente sufrieron alguna regulación negativa por acción de la infección viral.

Tabla 15.- Orden de la membrana 4 donde se fijaron los DNA plasmídicos de genes apagados por la infección a las 12 hpi.

	I	II	III	IV	V	VI
A	3	12	2	1	13	7
B	5	10	15	12	104	6
C	12	6	6	12	10	10
D	13	7	2	108	16	Vial 2 marcado
E	147	7	108	6	10	
F	5	149	104	149	5	Vial 2 sin marcar
G	10	15	18	18	49	Vial 4 marcado

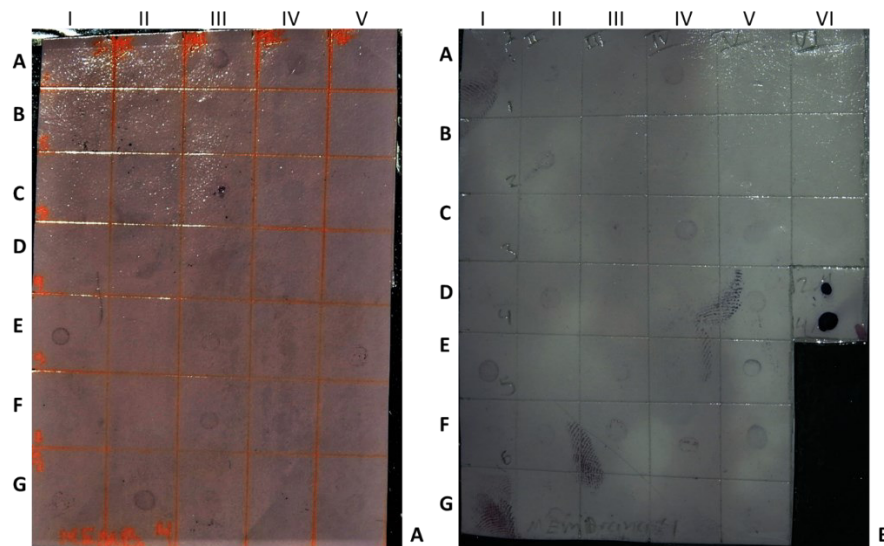


Figura 13.- Membrana 4 con el ADN plasmídico de genes que se apagaron por la infección a las 12 hpi. A hibridada con el cDNA de las 12 hsi y B con el cDNA de las 12 hpi.

Para los genes que se encendieron por la infección viral a las 12 hpi se llevó a cabo una fijación de los ADN plasmídicos en la membrana y se hibridó con el cDNA marcado de las 12 hpi lo cual se observó en la figura 14 A y en la figura 14 B. El orden en que se colocaron los ADN plasmídicos se registró en la tabla 16. En el primer caso se observó que 5 de los 6 DNA plasmídicos habían dado coloración, indicando que se encontraban presentes en el cDNA marcado de las 12 hpi. Dichos genes fueron los números 1, 216, 1, 3 y 2 de las columnas I y II respectivamente. Lo anterior indicó que estaban presentes en los intestinos infectados a las 12 hpi. Al

contrastar la imagen anterior con la de la figura 14 B se observó que esos genes estaban presentes en los intestinos medios sin infectar, aunque la coloración de B indicaba contrastada con A fue un indicio de que estos se encontraban sobre expresado por la infección viral. En el caso de la celda I G de la figura 14 A no hibridó en la membrana de la figura 14 B (celda II A) lo que nos indica que este gen se encendió por acción de la infección viral ya que no estuvo presente en la condición control.

Tabla 16.- Orden de la membrana 5 donde se fijaron los DNA plasmídicos de genes encendidos por la infección a las 12 hpi.

	I	II
A		3
B		2
C		
D	3	Vial 2 marcado
E	1	Vial 4 marcado
F	216	Vial 2 sin marcar
G	1	Vial 4 marcado

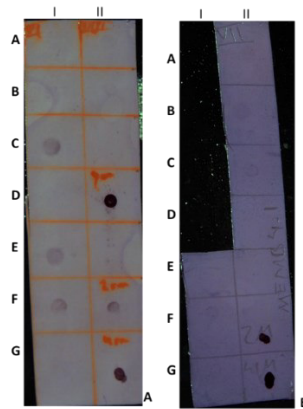


Figura 14.- Membrana 5 fijada con el ADN plasmídico de genes encendidos por la infección a las 12 hpi, A hibridada con el cDNA marcado de las 12 hpi y B Hibridada con el cDNA marcado de las 12 hsi.

La relación con la condición a los ADN plasmídicos de los genes apagados por la infección a las 24 h, estos fueron fijados según el registro de la tabla 17. En la figura 15 en A se realizó la hibridación con el cDNA de las 24 hsi, en esa membrana se obtuvieron 6 marcas de color, las cuales fueron: en la columna I las muestras número 104, 139, 156, 125 y 118; y para la columna II el número 121. Al contrastar

esta imagen con la figura 16 B, en la cual se había hibridado con el cDNA de las 24 hpi, se observó que solo tres muestras de la columna I las número 139, 125 y 118, se encontraban presentes en ambas condiciones, aunque en la membrana de la figura 15 B en mucho menor intensidad. Lo anterior era indicativo que esos 3 genes estaban siendo regulados negativamente por acción de la infección viral. En cuanto al resto de los posibles genes estos estuvieron presentes en la membrana de la figura 15 A pero no en B, lo cual indicó que estos genes se estaban apagando por acción de la infección viral.

Tabla 17.- Orden de la membrana 6 donde se fijaron los DNA plasmídicos de los genes apagados por la infección a las 24 hpi.

	I	II
A	104	121
B	139	121
C	156	137
D	114	104
E	142	
F	125	
G	118	
H	152	

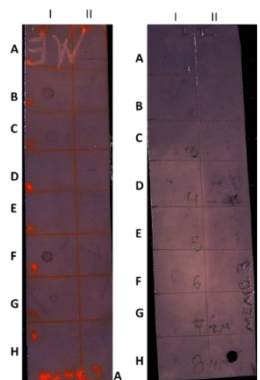


Figura 15.- Membrana 6 con el ADN plasmídico de los genes apagados por la infección a las 24 hrs, A Membrana hibridada con el cDNA marcado de las 24 hsi y B membrana hibridada con el cDNA marcado de las 24 hpi.

En relación con la última condición cuyo orden de la membrana de la figura 16 A y B cuyos registros se encuentran en la tabla 18, se observaron 26 marcas de

colar al hibridar con el cDNA de las 24 hpi. Indicando que estos 26 genes se encontraban en el tejido infectado. Los genes anteriores fueron: columna I número 45, 29, 22, 30, 11 y 134, columna II el 34, 2, 37, 34, 30, 34 y 6, columna III el 21, 20, 19, 4, 30 y 9, columna IV los números 15, 26, 37, 17, 25 y 22; y finalmente para la columna V los números fueron: 34, 104, 6 y 2. Al contrastar esta imagen con la figura 17 B hibridada con cDNA marcado de las 24 hsi se observó que 5 de las 26 marcas estaban únicamente en A indicando que se encendieron por acción de la infección viral. Dichas marcas fueron: la número 37 columna II, 30 y 9 de la columna III y la número 17 y 22 de la columna IV. El resto de las marcas se encontraron presentes en ambas condiciones, posiblemente esto último debido a que la infección viral necesitaba esos genes presentes a las 24 hsi para llevar el proceso de infección a las 24 hpi.

Tabla 18.- Orden de la membrana 7 donde se fijaron los DNA plasmídicos de los genes encendidos por la infección a las 24 hpi.

	I	II	III	IV	V	VI
A	30	34	24	15	34	
B	45	45	22	3	104	
C	29	2	21	12	6	
D	2	37	20	26	2	
E	22	34	19	37		Vial 2 marcado
F	30	30	4	17		
G	11	34	30	25		Vial 2 sin marcar
H	134	6	9	22		Vial 4 marcado

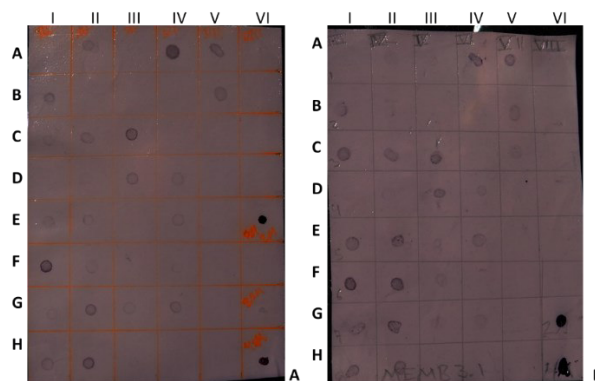


Figura 16.- Membrana 7 con el ADN plasmídico de los genes encendidos a las 24 hpi, A hibridada con el cDNA marcado de las 24 hpi y en B con el cDNA marcado de las 24 hsi

De manera global de las 1,116 colonias obtenidas, 226 liberaron fragmento después de la digestión con la enzima EcoR I, de las cuales 151 hibridaron en los macroarreglos. De esas 151 clonas, 101 se encontraron como resultado del análisis de los posibles genes que se apagaban por la infección de las cuáles 48 sufrieron una regulación negativa y 53 se apagaron según los macro arreglos. Las 50 clonas restantes correspondientes a los genes encendidos por la infección, 40 sufrieron una sobre expresión debido a la infección y 9 se encendieron exclusivamente por acción de la infección viral. Estos últimos con un 50% de probabilidad de ser genes propios del virus o de la larva.

Secuenciación de posibles genes expresados diferenciales por la infección de SfNPV-Ar en los intestinos de *S frugiperda*.

Como parte del proceso posterior a los macroarreglos, se procedió a secuenciar los fragmentos obtenidos por secuenciación capilar SANGER, en la empresa MACROGEN. Una vez secuenciados se procedió a realizar el alineamiento de la secuencia directa y reversa con ayuda del programa SeqMan, como resultado del alineamiento se obtuvo una secuencia consenso la cual fue usada para realizar alineamientos BLASn y BASTp en la plataforma de NCBI.

Una vez realizado el alineamiento se determinó la identidad de los diversos fragmentos los cuales fueron registrados en la tabla 19, donde se observó que para los genes apagados por la infección a las 6 hpi se identificaron 4 genes diferentes. Siguiendo el orden de la tabla 19, el primer gen identificado fue el correspondiente a una peroxiredoxina de *Spodoptera litura* con una similitud del 98%, este gen fue identificado en las secuencias de los fragmentos 96420, 96730, 963, 965, 9668, 9693, 9613, 9632, 9641, y 96451 registrados en la tabla 12 y 13. La peroxiredoxina 1 (Prx-1) está relacionada con la degradación del H₂O₂ generado por estrés celular; y actúa como un represor negativo de la proteína ASK1 (quinasa reguladora de la señal apoptótica 1) quien es capaz de inducir la apoptosis si se encuentra en forma activa (Kim et al., 2008). Prx-1 actúa como un represor de ASK1 en el momento en que el peróxido se produce en las célula gracias a las cys52 y cys173 de Prx-1, esto

provoca que la señal apoptótica desencadenada por ASK1 no se emita aún y cuando existen especies reactivas de oxígeno en las células (Kim et al., 2008).

El gen Prx-1 quien dentro de sus principales funciones es la degradación de peróxido, por lo que el apagado de este gen, aumentaría la concentración de peróxido el cual característico de las primeras hpi documentado previamente tanto por Michel y Subramanyam en el 2013 como por Vassaro-Silva y colaboradores en el 2019. Interesantemente a nivel molecular Huang et al., 2018; Yu et al., 2016 y Wu et al., 2009, detectaron un aumento en los genes relacionados al estrés oxidativo, lo que aparentemente se contrapone a lo descrito en es este trabajo, sin embargo, si tomamos en cuenta que el apagado de Prx-1 tendría un efecto sobre el aumento de peroxido celular, sería un nuevo acercamiento de como el apagado de ciertos genes poría ser usado por las células como metodo de defenza ante la infección viral, este sistema ha sido explorado por Jakubowska y colaboradores en el 2010 quienes descubrieron que el apagado del gen de la quitin-desacetilasa en intestinos de *H. armígera* infectados con el nucleopoliedrovirus HeNPV, protegía a las larvas de la infección viral. Por lo que el apagado de Prx-1, pueda suponer un mecanismo de defensa similar a lo detectado Michel y Subramanyam en el 2013 así como por Vassaro Silva en el 2019.

Tabla 19.- Genes apagados por la infección en los intestinos de *S. frugiperda* a las 6 horas.

Similitud	Cantidad	Accesión	Max score	Total score	Consulta (%)	Valor de e	Identidad (%)
Peroxiredoxina	10/14	XM_022973939.1	260	260	50%	5e-65	98
Proteína disulfuro isomerasa	2/14	XM_022974152.1	254	254	74%	1E-62	97.3
Proteína ribosomal L19	2/14	XM_022965735.1	8.7	8.7	55%	2E-11	5.83
Proteína muscular especifica 20	1/14	XM_022959000.1	193	193	67%	2E-45	92.54

Siguiendo el orden de la tabla 19, el segundo gen identificado con un porcentaje de similitud del 97.3% fue el de la proteína disulfuro isomerasa de *Spodoptera litura*, este gen fue detectado en los fragmentos identificados como 9673 y 9694 de la tabla 12 y 13. Dentro de las funciones para el disulfuro isomerasas (PDI) se ha detectado que pueden tener: actividad de chaperonas, ya que son capaces de propiciar el plegamiento correcto a través de la formación de enlaces disulfuro (Irvine et al., 2014). PDI tiene un efecto sobre el complejo de la NADPH oxidasa actuando como regulador positivo (Fernandes et al., 2009). Este complejo se encuentra en forma transmembranal en los organelos intracelulares de las células eucariotas y es el responsable de la mayor fuente de estrés oxidativo para las células aunque (Banerjee et al., 2011). En algunos casos se tiene información de un efecto positivo de PDI durante el desarrollo de las infecciones celulares como es una modulación de la fagocitosis por parte de los patógenos en las células, lo anterior mediado por reducciones de los enlaces disulfuro de estos últimos en sus hospederos, lo cual causa que la célula hospedera fagocite al agente infeccioso (Santos et al., 2009). En otros casos esto es debido a las interacciones de PDI con la cys374 de la B-actina, que causa un reacomodo y cambio de la estructura del citoesqueleto (Sun et al., 2015).

Dentro de las funciones del gen Pdi una de ellas está relacionada con la activación de las rutas de producción de especies reactivas de oxígeno, específicamente en la activación del complejo NADPH oxidasa, quien es el principal productor de especies reactivas de oxígeno, por lo que nuestra teoría es que la infección viral responde molecularmente al aumento de peróxido, regulando rutas de activación de sistemas productores de especies reactivas de oxígeno, este efecto de defensa ante la producción de estrés oxidativo ha sido detectado tanto por Michel and Subramanyam (2013) como por Vassaró-Silva y colaboradores (2019), quienes detectaron un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y super oxido dismutasa, inmediatamente después de la sobreproducción de peróxido, este efecto de protección ante un daño por el exceso de especies reactivas de oxígeno es atribuido típicamente al hospedero, sin embargo es posible un enfoque diferente, en el cual es el virus es quien promueva los mecanismos moleculares

necesarios para regular el efecto oxidativo valiéndose de múltiples estrategias. Sin embargo, este punto necesita ser profundizado para lograr tener claro estos efectos.

Un penúltimo gen apagado por la infección fue identificado por secuenciación como el gen de la proteína ribosomal 60s L19 (L9) en las secuencias de los fragmentos 9612 y 9667 de la tabla 12 y 13. L19 Las proteínas ribosomales, por su abundancia en todas las células y alto nivel de conservación, son fuertes candidatos para realizar otras actividades extra ribosomales (Warner & McIntosh, 2009). Se ha detectado que L19 al ser sobre expresada en una línea celular cancerosa (MCF7), se da una preactivación el sistema celular UPR (sistema de respuesta a proteínas no plegadas), dicho sistema, es una respuesta celular de estrés provocada por el exceso de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (Hong et al., 2014). Aunque bien este sistema no es propiamente un sistema de defensa contra una infección viral, tiene la capacidad, si no es sopesado o apagado, de activar una señal pro apoptótica, la cual puede desencadenar la muerte celular por apoptosis (Hong et al., 2014). Al detectar a L19 como apagada a las 6 hpi, podría ser un intento del virus para evitar una respuesta celular apoptótica en las primeras etapas de expresión de genes viral (6 horas), sin embargo, no es posible en este punto detectar o identificar los mecanismos por los cuales el virus es capaz de modular este proceso y más importante aún, porque regular negativamente una proteína que es necesaria para la estructura de los ribosomas.

Para el ultimo gen secuenciado de los apagados por la infección a las 6 horas con una similitud del 92.5% con el gen de la proteína muscular específica 20 de *Spodoptera litura*, el cual se identificó a partir del fragmento 9668 de la tabla 12 y 13, dicha proteína posee un dominio similar al de la proteína calponina (accesión COG5199). Las calponinas son proteínas de reconocimiento de actina que tienen como función primordial controlar la formación del citoesqueleto por interacciones con la actina, estabilizando esta última (Rozenblum & Gimona, 2008). Sin embargo, estas mismas proteínas se cree tienen un papel en otros procesos regulatorios dentro de la célula, ya que existen tres variantes de esta (calponina ácida, neutra y básica), las cuales se concentran en regiones específicas de las células. Las

calponinas básicas se unen a los microtúbulos de actina, las neutras se concentran en el núcleo de las células y las ácidas se restringen a las neuronas donde se cree tienen un papel en la diferenciación celular (Rozenblum & Gimona, 2008). Aunque en un sentido estricto su actividad fisiológica no ha sido revelada, podría estar relacionada con la movilidad celular (Gimona et al., 2003). En este trabajo se encontró al gen de la proteína muscular específica como regulado negativamente en el tejido infectado a las 6 horas, tomando en cuenta las posibles funciones de esta proteína, no es posible inferir si el apagado es guiado por el virus o por la propia célula, ya que carecemos de información al no encontrar una función que se acople a lo esperado como es el caso de los genes anteriores.

Dentro de los posibles genes encendidos por la infección de SfNPV-Ar en las células columnares del intestino medio de *S. frugiperda*, se identificaron 4 genes diferentes, los cuales fueron detallados en la tabla 20. Siguiendo el orden de dicha tabla el primer gen identificado con una identidad del 91% fue el de la proteína de unión a acyl-Co-A de *S. litura* (ACBP) el cual correspondió al fragmento fue 1064 de la tabla 14. Esta proteína está relacionada primordialmente con el transporte de lípidos (Acil-CoA) (Knudsen et al., 2000). Sin embargo, se han encontrado que no solo se une a las cadenas largas de los ésteres de Acyl-CoA, sino que también podría actuar como activadores de los μ -calpains (van Gurp et al., 2003, Melloni et al., 2000). Este proceso de activación de calpaínas podría relacionarse indirectamente como una posible respuesta apoptótica (Sato and Kawashima, 2001), aunque este método de activación de la apoptosis no es de alguna manera convencional, ya que no requiere de la intervención de las caspasas para poder llevarse a cabo según lo reportado por Chen y colaboradores en el 2001, sin embargo, no se cuenta con información precisa para poder sustentar esta hipótesis. Tomando en cuenta en qué condiciones se aisló este gen, es decir, genes que se encendieron por la infección a las 6 horas, podría tratarse de un gen de respuesta ante la infección viral y no propiamente un gen que el virus indujo, pues si llegase a corroborarse que ACBP está relacionada con una señal apoptótica directa no mediada por caspasas, indicaría que las células del intestino medio de *S. frugiperda* están respondiendo a la infección primaria, activando la apoptosis.

Tabla 20.- Genes encendidos por la infección en los intestinos de *S. frugiperda* a las 6 horas.

Similitud	Cantidad	Accesión	Max score	Total score	Consulta (%)	Valor de e	Identidad (%)
<i>Spodoptera litura</i> proteína de unión a la acyl-CoA	1/9	XM_022964505.1	182	182	82	5e-42	91
Sub unidad 2 del complejo de la proteína 2/3 relacionada a la actina	3/9	XM_026890508.1	286	286	89	2e-73	98
Proteína de unión a ácidos grasos	1/9	JF896323.1	113	113	100	8e-22	87.38
Proteína ribosomal L11	1/14	AF400182.1	374	374	34	3e-99	100

El segundo gen encendido por la infección a las 6 hpi se identificó como el gen de la Subunidad 2 del complejo de la proteína 2/3 (ARP 2/3) relacionada a la actina el cual correspondió a los fragmentos 1064, 10623 y 106411 de la tabla 14. mostraron una alta similitud con, dicho gen en los macro arreglos se encontró presente en el tejido infectado en mayor intensidad que en el tejido sano. Esta proteína (Arp 2/3) es la encargada de realizar la polimerización de la actina F fibrosa a G globular en el citoplasma (Pollard and Beltzner, 2002). Sin embargo, los baculovirus son capaces de modificar la función de esta proteína para que funcione en el núcleo de la célula para provocar un rearrreglo que es vital para su replicación y formación de nucleocápsides. Este proceso es mediado por la proteína viral p78/83, que es una proteína de la cápside la cual es capaz de interactuar con ARP 2/3 y activar esta última para que sea funcional en el núcleo de las células infectadas (Goley et al., 2006). Este proceso de activación de Arp 2/3 es vital para una correcta replicación viral de AcMNPV, ya que si no se da una activación correcta de Arp 2/3, se observan fallas en la organización de los viriones, viriones sin una membrana viral o se producen membranas virales sin viriones en su interior (Pollard and Beltzner, 2002). Sin embargo, para que este proceso de activación se lleve a cabo, primeramente, es necesario una acumulación de la proteína Arp2/3 en el núcleo de las células, lo cual se logra gracias a la inhibición del receptor-transportador exportina-1 (CRM1), quien es inhibido por Ac34 provocando una acumulación de Arp

2/3 en el núcleo (Mu et al., 2016), lo que causa la activación de la proteína y el rearrreglo nuclear de la actina.

Siendo ARP/2/3 detectado por Goley y colaboradores (2006) como el blanco de la proteína viral p78/83, quien es capaz de activar a esta proteína en el núcleo de las células infectadas propiciando el rearrreglo del citoesqueleto, el cual según Pollard y Beltzner (2002) es esencial para una correcta formación de las nucleocápsides a las 12 hpi, punto en el cual detectamos la sobre expresión de dicho gen y de la proteína de la cadena pesada de la miosina. Estas observaciones en cuanto a la sobre expresión de genes y proteínas relacionados al citoesqueleto o morfología celular han sido reportadas por (Nayyar et al., 2017), quienes encontraron que al infectar la línea celular Sf21 con el baculovirus SpltNPV, se propiciaba un aumento en la cantidad de proteínas relacionadas con la polimerización de la actina. Algo similar a lo anterior fue observado por Xue y colaboradores en el 2012 quienes al infectar la línea celular Bm5 con BmNPV T3 también detectaron un aumento significativo en la cantidad de transcritos relacionados con la regulación del citoesqueleto en las primeras horas post infección. En este trabajo encontramos como sobre expresado el gen de ARP 2/3 en el lapso de las 6-12 hpi, en concordancia con lo expuesto por diversos autores, quienes mencionan un efecto de sobre expresión de genes y proteínas relacionadas con el re arreglo del cito esqueleto, sin embargo en este estudio resalta el tiempo en el que inicia su sobre expresión, ya que desde las 6 hpi se determinó que molecularmente se dan las condiciones necesarias para iniciar el rearrreglo necesario para la correcta formación de las nucleocápsides a las 12 hpi, tiempo en el cual este gen continua sobre expresándose. Sorpresivamente, el gen ARP 2/3 y una proteína relacionada con la polimerización de la actina (proteína muscular específica 20) es apagado por el proceso de infección a las 24 horas, tiempo en el cual se sobre expresan genes y proteínas relacionados directa o indirectamente con la apoptosis.

Siguiendo con los genes encendidos por la infección a las 6 hpi se identificó como el gen de la proteína de unión a ácidos grasos 2 (FABP) el cuál correspondió al fragmento 1024122 de la tabla 14, dicho gen se encuentra relacionada con el

transporte de los ácidos grasos; éstas pueden estar unidas a la membrana celular o libres en el citosol de las células. Una de sus principales funciones es transportar los ácidos grasos al interior de las células (Knudsen, 1990), sin embargo, algunos autores hablan de que estas proteínas por ser el medio de contacto con los esteroides de algunas cadenas lipídicas como de la Acyl-CoA, podrían tener un papel como receptores celulares o bien jugar un rol en el desarrollo celular o proliferación de las mismas células (Chmurzynska, 2006).

Por último, para las 6 horas post infección, se detectó un fragmento con similitud con la proteína ribosomal L11 del complejo 60S. En primera instancia la sobreproducción de L11 provocaría de manera indirecta, la activación de p53 (Bhat et al. 2004) quien, a su vez, podría inducir un arresto del ciclo celular a las 6 hpi, mientras que a las 12 hpi la proteína Pin-1 podría relacionarse con un mantenimiento del arresto celular en la etapa G2, pues esta proteína según Lu (1996) y Samanta (2018) se relaciona con una regulación del ciclo celular y arresto de este en la etapa (G2). Este fenómeno de arresto en G2 es característico de la infección viral en las etapas tempranas de la infección, lo cual también es esencial para lograr la replicación y secuestro de la maquinaria celular por parte del virus según lo reportado por Saito y colaboradores (2002). Este efecto de la regulación de factores relacionados con el ciclo celular fue reportado por Nguyen y colaboradores en el 2013, quienes determinaron que la infección de la línea celular BCIRL-HZ-AM1 con el baculovirus HearNPV, regularon la ruta de señalización Notch, la cual se encarga de evitar el arresto celular, el cual al ser inhibido, promovería el arresto del ciclo celular a las 12 hpi. En este trabajo se detectó una sobre expresión de L11 y Pin-1, en el transcurso de las primeras 12 hpi, lo que nos señala el lapso en el que el virus induce el arresto del ciclo celular y que mecanismos moleculares usa para ello, mientras que Nguyen y colaboradores en el 2013 determinaron este efecto a las 12 horas por el apagado de genes, lo observado en este trabajo sugiere la activación de rutas que activarían el proceso de arresto celular desde las 6 hpi, siguiendo este efecto hasta las 24 h, donde de manera sorpresiva, el análisis transcriptómico arrojó que L11 fue apagado por la infección, fenómeno similar a lo observado con el

rearrreglo del citoesqueleto y el aumento del metabolismo, lo que nuevamente, coincide con el aumento de genes pro apoptóticos a las 24 hpi.

Para las 12 horas después de la infección de un total de 16 genes secuenciados, 7 fueron apagados por la infección, el resumen de estos se describe en la tabla 21.

Tabla 21.- Genes apagados por la infección en los intestinos de *S. frugiperda* a las 12 horas.

Similitud	Cantidad	Accesión	Max score	Total score	Consulta (%)	Valor de e	Identidad (%)
Proteína MG17	2/16	JF96495 4.1	405	405	81	8e-109	85.12
Complejo de proteínas reguladoras de la actina y citoesqueleto	4/16	XM_0229 63939.1	377	377	78	2e-100	84.56
Proteína ribosomal L7	5/16	AY07228 8.1	270	270	51	2e-68	98.68
Proteína disulfuro isomerasa	1/16	XM_0229 74152.1	246	316	43	5e-61	95.45
Proteína no caracterizada	1/16	XM_0229 59916.1	226	226	36	6e-55	94.65
Proteína de unión a ácidos grasos	1/16	JF89632 3.1	134	134	61	1e-27	86

Dos fragmentos los identificados como 1212 y 91222 de la tabla 15, fueron identificados como la proteína MG17 de *Spodoptera litura* con un porcentaje de identidad del 85% según lo reportado en la tabla 23. Al comparar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de estos genes, se encontró que dichas secuencias eran similares a las de otros 4 fragmentos que fueron identificados como elementos del complejo de proteínas reguladoras de la actina y citoesqueleto. Todos estos fragmentos fueron encontrados en los macro arreglos como genes apagados por el proceso de infección a las 12 horas, dichos genes están relacionados con la organización del citoesqueleto para llevar a cabo la endocitosis. Los dos tipo de genes muestran similitud con PAN1, esta proteína es parte de un complejo cuya función es llevar a cabo la endocitosis, su localización se encuentra en las zonas endocíticas, las cuales son ricas en actina (Bradford et al., 2015). El proceso de

endocitosis se puede dividir en cuatro etapas: el marcaje de la carga, la invaginación de la membrana, escisión de la membrana y marcaje de la vesícula (Kaksonen et al., 2005). PAN1 probablemente es una proteína de marcaje localizada en el sitio de invaginación, que actúa como puente entre las proteínas de revestimiento (necesarias para la formación del endosoma), con las proteínas adaptadoras y proteínas reguladoras del citoesqueleto, sin embargo, en este último caso, PAN1 no actúa como un regulador de la polimerización de la actina, sino más bien, un como un regulador de proteínas que propician la polimerización, actuando como activador e inhibidor a la vez según las observaciones de Bradford y colaboradores en el 2015. Dentro de estos reguladores de la polimerización se encuentra ARP2/3, cuya activación podría ser fundamental para la formación de la estructura de invaginación y la posterior vesícula (Goley et al., 2006). Dicha polimerización podría localizar la maquinaria de invaginación en la membrana celular, teniendo la actina el papel de transportador de la maquinaria y participando también en el transporte de la vesícula al interior de la célula (Qualmann et al., 2000).

Los fragmentos L7 9123, 9126, 91261, 91266, 912121, 91221 de la tabla 15 fueron identificados como la proteína ribosomal L7 (tabla 21), la que fue detectada como apagada a las 12 horas, dicha proteína es parte de la estructura de los ribosomas, aunque como muchas de estas proteínas, presenta actividad extra ribosomal (Warner & McIntosh, 2009). Esta proteína ribosomal en eucariotas presenta una alta similitud con la proteína de 15.5 kD del complejo snoRNP (complejo de proteínas-RNA pequeño nuclear). Este complejo tiene como función regular la maduración del RNAr, también se tiene evidencia de que estos complejos de proteínas-RNAsn tienen como blanco diversos tipos de RNA como el RNAm, el RNA no codificante, en estos últimos puede actuar no solo como modificante de los nucleótidos, sino también como una chaperona que les ayuda a plegamiento e incluso, como una agente de control de calidad del RNA (Bertrand & Fournier, 2000-2013).

Este gen ribosomal fue encontrado como apagado por la infección viral a las 12 horas, en 5 fragmentos diferentes, es decir, por macro arreglos estos 5

fragmentos fueron detectados en el tejido sano, pero no en el infectado, indicando que la infección viral pudo apagar la expresión de dichos genes, sin embargo dada la función principal y secundaria de este gen, no podemos dar una explicación de este fenómeno en este momento, por lo que es necesario realizar una investigación profunda de dicho efecto.

Otro fragmento apagado por la infección a las 12 h fue 912108 de la tabla 15, el cual mostró similitud con un disulfuro isomerasa (tabla 21), la cual había sido detectada como un gen apagado a las 6 horas. Este apagado podría ser parte de una estrategia del virus para mantener algunos sistemas que podrían desencadenar la apoptosis como apagados, ya que como se describió anteriormente, esta proteína tiene un papel en el control positivo del complejo NADPH oxidasa, que es la principal fuente de estrés oxidativo en las células y tomando en cuenta el apagado celular de la peroxiredoxina a las 6 horas, los sistemas de degradación de peróxido estarían diezmados, provocando fácilmente que este tipo de estrés celular creciera. Por lo que mantener a este gen apagado sería crucial para mantener a la célula en condiciones viables para la replicación del virus. En este trabajo se encontró un disulfuro isomerasa sufriendo una reducción en el número de transcritos presentes en el tejido infectado. Tomando en cuenta las múltiples funciones que tienen estas proteínas en las células eucariotas, podríamos argumentar que este apagado sería una respuesta influenciada por el virus para evitar una respuesta oxidativa, ya que como se mencionó anteriormente, esta proteína modula la NADPH oxidasa, quien a su vez es la principal fuente de peróxido en las células.

Dentro de los transcritos apagados por la infección a las 12 horas, el identificado en la tabla 15 como 912108 se determinó como el gen de una proteína no caracterizada (Tabla 21), dicho gen presenta en un dominio de ZnF-BED family, el cual corresponde a una de las múltiples familias de proteínas dedos de zinc. Las secuencias de estas proteínas son de las más abundantes en los genomas eucariotas y también llevan a cabo una gran variedad de funciones como: reconocimiento del ADN, empaquetamiento del RNA, activadoras de la transcripción, regulación de la apoptosis, plegamiento de proteínas, ensamble de proteínas y unión

a lípidos (Laity et al., 2001). Dentro de su diversidad encontramos que se encuentran presentes en el genoma de los baculovirus, ya que los genes anti apoptóticos (IAP), presentan regiones repetidas denominadas BIRs las cuales están asociadas con una inhibición de la muerte celular programada por inactivación de las caspasas (Laity et al., 2001), lo que incrementa el interés en el estudio de este tipo de transcritos. El dominio encontrado en la secuencia de la proteína no caracterizada es un dominio ZnF-BED. Este tipo de dominio son característicos de unión a ADN, los cuales podrían estar relacionados con una regulación de algún proceso aun no identificado (Aravind, 2000). Esta proteína no caracterizada fue encontrada como apagada por la infección viral a las 12 horas, sin embargo, la información relacionada a la misma no va más allá de su función general, que es el posible control de transcripción al tener un dominio de unión a ADN y homología con otras proteínas que presentan esa función. El apagado de esta proteína en este tiempo, por lo tanto, podría hablar de una regulación de la expresión de genes, principalmente negativa, al estar apagando un posible regulador de la transcripción, sin embargo, no es posible identificar dichos efectos en este momento.

Por último, para los genes apagados por la infección a las 12 horas, el fragmento de la tabla 15 identificado como 912149 dio similitud con el gen de la proteína de unión a ácidos grasos 2 (FABP), dicha proteína se encuentra relacionada con el transporte de los ácidos grasos. Estas pueden estar unidas a la membrana celular o libres en el citosol de las células. Una de sus principales funciones es transportar los ácidos grasos al interior de las células (Knudsen, 1990), sin embargo, algunos autores hablan de que estas proteínas por ser el medio de contacto con los esterios de algunas cadenas lipídicas como de la Acyl-CoA, podrían tener un papel como receptores celulares o bien, jugar un rol en el desarrollo celular o proliferación de las mismas células según Chmurzynska y colaboradores en el 2006. Aparentemente este gen es apagado por la infección viral para disminuir la concentración de FABP, lo cual podría estar reflejando algún método de defensa no tradicional, para tratar de reducir la cantidad de energía que usa la célula y así evitar la replicación del ADN y formación de NC.

En cuanto a los genes encendidos por la infección a las 12 horas, el resumen de estos se detalló en la tabla 22, siguiendo el orden de dicha tabla el primer gen identificado fue el del gen de la subunidad 2 de ARP 2/3, que había sido encontrado como encendido por la infección a las 6 horas, dicho gen se encontró en los fragmentos identificados como 10121, 10121 y 10123 de la tabla 16. Dicha activación podría sugerir un proceso de expresión constante. Esto debido a la necesidad viral de reorganizar el núcleo de la célula para la replicación del ADN y posterior ensamble de las NC para formar los VB, siendo ARP 2/3 esencial para modificar el citoesqueleto, como ya se mencionó.

Tabla 22.- Genes encendidos por la infección en los intestinos de *S. frugiperda* a las 12 horas.

Similitud	Cantidad	Accesión	Max score	Total score	Consulta (%)	Valor de e	Identidad (%)
Sub unidad 2 del complejo de la proteína 2/3 relacionada a la actina	3/4	XM_026890508.1	281	281	72	7e-72	94.12
ATPsintetasa subunidad 0 Mitochondrial	1/4	XM_022972498.1	217	217	52	2e-52	91.77

Otro gen encontrado como encendido por la infección viral a las 12 horas, es el que codifica para la subunidad 0 de la ATP sintetasa mitocondrial el cual fue identificado al secuenciar el fragmento 1012216 de la tabla 16, dicha subunidad forma parte de la ATPasa sintasa, la cual es una enzima transmembranal que cataliza la síntesis del ATP a partir de ADP y fosfato, usando como fuente de energía un flujo de protones, siendo esa su función principal. Sin embargo, actualmente se ha dilucidado un posible mecanismo de esta enzima en la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT por sus siglas en inglés); y en la formación del complejo de permeabilidad del poro de transición (PTPC por sus siglas en inglés), esos dos procesos involucran un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a pequeños solutos, lo que ocasiona un desequilibrio celular e influye en la muerte celular, esto probablemente debido a que la ATP sintetasa interacciona con reguladores del MPT, ya que sufre una inhibición similar por los fármacos que atacan al sistema PTPC. La subunidad C de esta enzima, al ser sobre

expresada, puede predisponer a la mitocondria a sufrir MPT y a una posible regulación por parte del ATP sintetasoma hacia algunas proteínas aún desconocidas, que, físicamente dañen la integridad de la membrana interna de la mitocondria (Bonora et al., 2015). Esta proteína fue detectada como encendida por la infección viral a las 12 horas, lo que podría ser un indicativo de un intento de la célula por inducir la apoptosis, a través del aumento de la permeabilidad de la mitocondria; sin embargo, la subunidad encontrada fue la subunidad 0, estando ésta involucrada con el flujo de protones en la membrana lipídica, siendo la subunidad C la encargada de aumentar la sensibilidad de la membrana interna al MPT. Por lo que esta idea de defensa celular en este periodo necesita una mayor investigación.

A las 24 horas se encontraron tres genes que habían sido apagados por la infección, en la tabla 23 esta denotado un resumen de estos, seguido de una descripción de su posible función en el tejido: el primer gen identificado según la tabla 25 fue el determinado con similitud a la proteína ribosomal L11 el cual correspondió al fragmento de número 924125 de la tabla 17, como ya se mencionó en los genes encendidos por la infección a las 6 horas. Este transcrito está relacionado con la activación de P53, al ser encontrado apagado por la infección a las 24 horas, podría ser un indicativo de una apagado del proceso de regulación del ciclo o la defensa celulares. Este gen fue sobre expresado a las 6 horas, como un posible efecto en la regulación del ciclo celular, su apagado a las 24 horas, podría estar relacionado con un cese del arresto celular o bien el inicio de la muerte celular de las células columnares.

Tabla 23.- Genes apagados por la infección en los intestinos de *S. frugiperda* a las 24 horas.

Similitud	Cantidad	Accesión	Max score	Total score	Cons ulta (%)	Valor de e	Identidad
Proteína ribosomal L11	2/6	AF40018 2.1	329	329	91	4e-57	97
Proteína de unión a ácidos grasos	3/6	JF89632 3.1	69.4	69.4	66	1e-8	92
Sub unidad 2 del complejo de la proteína 2/3 relacionada a la actina	1/6	AHV9027 5.1	118	118	57	5e-30	82.09

Un segundo transcrito que se encontró apagado por la infección a las 24 h fue uno identificado como el gen que codifica para la proteína de unión a ácidos grasos, este gen perteneció a las secuencias de los fragmentos 924118, 924125 y 924203 de la tabla 17, este mismo gen había sido identificado como apagado por el proceso de infección a las 12 horas. Al igual que el caso anteriormente descrito, muestra que el evento que ocasiona el apagado de dicha proteína se mantiene activo en las células del intestino medio, desde las 12 hasta las 24 horas después de la infección, sin embargo, en este momento no es posible determinar el posible efecto que puede tener este apagado constante de genes específicos durante la infección.

Otro gen que había sido encontrado como apagado por el proceso de infección en el intestino a las 24 h, fue el gen de la subunidad 2 de la ARP 2/3 identificado con el número 924156 de la tabla 17, según las funciones descritas anteriormente de este gen en el rearrreglo del citoesqueleto a las 12 hpi, este apagado podría significar, que estamos ante un sistema de defensa, ya que como es bien sabido, el intestino medio de los insectos es el único tejido capaz de sobrevivir al proceso infectivo. Tomando en cuenta esto último, empieza a tener alguna idea no tan descabellada este hecho, convirtiendo a este gen en un candidato de estudio para tratar de dilucidar si el apagado de este gen, de alguna manera tiene que ver con que no se dé una oclusión de los VB en una matriz de poliedrina en el intestino y que este tejido se recupere de la infección.

En el caso de los genes encendidos por la infección a las 24 hpi, se identificaron 3 genes diferentes, según el orden de la tabla 24, el primer gen identificado como encendido por la infección viral a las 24 horas fue gen de la proteína ribosomal L19, el cual correspondió a dos fragmentos identificados con los números 102430 y 102415 de la tabla 18, este mismo gen fue descrito como parte de los genes apagados por la infección a las 6 horas, L19 es parte del complejo que forma la subunidad 60S ribosomal (Hong et al., 2014), y como se mencionó anteriormente al ser sobre expresada suele pre activar el sistema UPR (sistema de respuesta a proteínas no plegadas), y es capaz de activar una señal pro apoptótica,

la cual desencadena la muerte celular programada (Hong et al., 2014). En este trabajo, los macroarreglos mostraron que este posible gen se encontraba en altas concentraciones en el tejido infectado. Si se considera lo expuesto por Hong et al., 2014, estaríamos ante un posible sistema de defensa de las células del intestino medio, las cuales aparentemente responden a la infección viral de forma tardía tratando de activar el sistema UPR, esto con la sobre expresión de L19, quien podría estar pre activando el sistema, para de esta manera enviar una señal pro apoptótica a las células.

Tabla 24.- Genes encendidos por la infección en los intestinos de *S. frugiperda* a las 24 horas.

Similitud	Cantidad	Accesión	Max score	Total score	Cons ulta (%)	Valor de e	Identidad
<i>Spodoptera litura</i> 60S proteína ribosomal L19	2/9	XM_0229657	93	93	70	2e-15	96%
Fosfoproteína nuclear 32 rica en leucina	4/9	XM_0229587	460	460	60	2e-125	93.22
HSP90	1/9	HM046610.2	167	167	100	1e-37	86

El segundo gen identificado como encendido por la infección a las 24 hpi según la tabla 24 fue el de la fosfoproteína nuclear 32 rica en leucina, el cual correspondió a la secuencia de los fragmentos 102434, 102425, 102441 y 102429 de la tabla 18. Esta familia de proteínas está conformada por 32 miembros, cuyas secuencias están conservadas y su principal función es servir de señalizadores celulares. Esta gran diversidad de funciones se ve reflejado en los miembros más estudiados de esta familia, como lo son la proteína Lanp y Cpd1, en el primer caso, esta proteína está relacionada con múltiples funciones que van, desde el reconocimiento y modificación de los microtúbulos, arresto del ciclo celular, hasta ser promotoras de apoptosis, al acelerar la activación de la caspasa 9 (Matilla & Radrizzani, 2005). Esta familia de proteínas es sumamente amplia y sus funciones complejas, por lo que dar una posible función al fragmento encontrado no es posible, sin antes saber a qué miembro corresponden específicamente, al saber esto podríamos tener un mejor entendimiento de si está participando en la regulación de expresión de genes en la célula infectada o está teniendo algún papel en la

regulación del ciclo celular en etapas avanzadas de la infección o bien, tiene algo que ver con la muerte celular.

Según la tabla 26 el último gen identificado como encendido por la infección a las 24 hpi fue el de la proteína de choque térmico HSP90 el cual correspondió a la secuencia del fragmento 102430 de la tabla 18. La sobre expresión de genes o proteínas de choque térmico se observa de manera habitual durante el proceso de infección de los baculovirus en las células susceptibles en etapas avanzadas de la infección (Bao et al., 2010; Breitenbach et al., 2011; Huang et al., 2018; Koczka et al., 2018; Salem et al., 2011). Sin embargo, ninguno de los autores ha propuesto una posible función durante el proceso de infección de dicha proteína, la cual es reconocida como una proteína chaperona que ayuda al correcto plegamiento de las proteínas, esto según Koczka y colaboradores en el 2018, podría ser un método del virus para sopesar el estrés que la replicación del mismo causa a la célula, ya que estos autores estudiaron dicho estrés a través del del sistema UPR, que se desencadena cuando existe un exceso de proteínas mal plegadas en los ribosomas, lo cual puede desencadenar apoptosis. Dicho sistema a las 24 horas aparentemente estaba siendo activado por la sobre expresión del gen de L19, quien es capaz de activar esa respuesta celular, si esto es consistente, el virus estaría tratando de sopesar esa respuesta celular tardía a la infección activando una sobre expresión de HSP90 para tratar de hacer frente a UPR, ya que este último, puede ser sopesado y evitar así la apoptosis.

Generación de oligonucleótidos para genes diferenciales completos

Una vez conocida la identidad de los fragmentos obtenidos se procedió a descargar las secuencias que correspondieran a cada posible gen identificado de la base de datos de NCBI, teniendo como restricción que, dichos genes pertenecieran a miembros de la clase Insecta (preferentemente relacionados con lepidópteros), ya que al estar trabajando con un lepidóptero, las secuencias analizadas arrojaron una alta identidad con secuencias de otros lepidópteros u otros insectos plaga con los que se ha trabajado previamente por otros autores. Las secuencias que se seleccionaron debían corresponder a secuencias de RNAm, ya que los insectos son

organismos eucariotas y estos sufren modificaciones postraduccionales de sus RNAm.

Una vez que se descargaron las secuencias de la base de datos, se determinó el codón de paro ATG y el primer sitio de paro. Una vez, se removieron las secuencias que se encontraban fuera del marco de lectura, la secuencia de nucleótidos ya limpia fue sometida a un Blast (blastx). Este procedimiento arrojó como resultado un marco de lectura de cada uno de los genes descargados de la base de datos.

En base al proceso anterior, se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 25, donde observamos el posible gen identificado como regulado por la infección en células del intestino medio de *S. frugiperda*, el oligonucleótido directo (representado con una D) con el primer codón correspondiente al ATG, el reverso (identificado por una R) cuyo último codón incluyo a alguno de los tres codones de paro posibles.

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de los extremos de la secuencia consenso, para los dos juegos de oligonucleótidos generados para cada secuencia, todos cumplieron con la condición de una longitud mínima de 18 nucleótidos la longitud máxima. Después de este punto, se la determinó la temperatura de alineamiento, la cual en algunos casos, como el de la proteína ribosomal L11, la temperatura el nucleótido directo por la naturaleza de la secuencia, arrojó una longitud de 18 nucleótidos con un porcentaje de G y C de 66%, una temperatura de alineamiento de 60.5°C y una óptima (la cual es calculada por las plataformas tomando en cuenta 100 ng de DNA blanco y condiciones estándar de dNTP's, cloruro de magnesio, enzima de alta fidelidad) de 70.6, lo cual contrasta con su oligonucleótido reverso que consta de 24 nucleótidos con un % de G y C de 30.4% temperatura de alineamiento de 53°C y una óptima de 57°C, lo que nos genera una diferencia de temperaturas de 12 °C, sin embargo, en el extremo 3' no es posible agregar más nucleótidos a menos que sean degenerados porque la secuencia consenso es variable en el extremo 3' después del nucleótido 24.

A excepción del caso anterior, la mayoría de los oligonucleótidos registrados en la tabla 25 cumplieron con lo estipulado para ser usados incluso algunos para qPCR, ya que aunque aparentemente forman estructuras secundarias, se diseñó a los mismos para que su ΔG fuera menor a -5kCal/mol , lo que se tradujo en una temperatura necesaria para romper dicha estructura secundaria, más baja que la temperatura óptima, aun así nos topamos con secuencias como las de los oligonucleótidos Actin 2/3D, ATPSNTsaR, PMM D y R, PR17R, PR19 D y R, PNC D y R, que nos arrojaron temperaturas para romper estructuras secundarias muy altas, algunas incluso superiores a los 47°C , lo cual es un problema para usar estos oligonucleótidos para PCR y más aún para qPCR.

Tabla 25.- Oligonucleótidos diseñados para extraer los genes expresados diferencialmente.

Posible gen	oligonucleótido 5'-3'	% G y C	Tm (°C)	Harping ΔG (kCal/mol)	Tm harping (°C)	Temperatura óptima (°C)
Sub unidad 2 del complejo de la proteína 2/3 relacionada a la actina	Actin 2/3 D ATGATCTTACTCGAGATCAAT	33.3	52	3.04	47	56.3
	Actin 2/3 R TCAGTCTCGCCTCACAAA	50	53.7	1.5	7.5	60
Proteína de unión a acyl-CoA	AcylCoa D ATGTCTCTCGACGAGCAA	50	53.7	-0.58	32.6	62
	AcylCoa R TTATGCGTATTTAGGGGCTAG	42.9	55.9	-0.2	27.6	59.9
ATP sintetasa subunidad 0	ATPSNTsa D ATGTGCGTCATAAAGGGAAAT	38.1	54	-0.31	29.6	59.9
	ATPSNTsa R TTAAACWGCAGCACTGATGAG	42.9	55.9	-0.71	35.7	60
Proteína disulfide isomerasa	Disulf D ATGAGAGTTATCTTATTACG	28.6	50.1	-0.1	27.1	52.5
	Disulf R TTATAACTCGTCTCTGGATGG	42.9	55.9	0.09	24.1	59.2
Fosfoproteína 32	FosP D ATGAGCACCAATGAAAATAAC	33.3	52	-0.22	28.7	57.3
	FosP R TTACGCATCCTCCTCCTC	55.5	56	NONE	NONE	63
HSP90	HSP90 D ATGAAGTATTTGTTTTGGTCGG	34.8	55.3	0.92	2.5	59.2
	HSP90 R CTACAGCTCGTCGTGGTC	61.1	58.2	0.29	19.3	64.3
Peroxiredoxina	Pox D ATGCCTCTCCAGCTGACC	61.1	58.2	-0.08	26.1	66.9

	Pox R TTAGTTGGCGTCGATGAAGTA	42.9	55.9	0.94	7.2	61.7
Proteína de unión a ácidos grasos	PDAcG D ATGGCTTTCCTTGGTAAAACT	38.1	54	-0.33	29.7	60.7
	PDAcG R TTATGCAGCTTTGTAGAATCTC	36.4	54.7	0.26	20.6	58.2
Proteína MG17	Mg17 D ATGAAATCCTTCGTTGCCCT	45	55.3	0.25	21.6	63.3
	Mg17 R TTAGTTGAGTTCATCGGGGAG	47.6	57.9	0.64	13.4	62.2
Proteína muscular específica 20	PMM D ATGCCTGGACGTCCTATTT	47.4	54.5	-0.73	34.3	62.8
	PMM R TCACTTGCCGAGAATGATTTT	38.8	54	-0.56	33.6	60.7
Proteína ribosomal L7	PR17 D ATGGTTGCGACTACAGACA	47.4	54.5	0.2	22.2	62.7
	PR17 R TTAGACCATTCTCCTCAGGAG	47.6	57.9	-1.38	40.4	61.4
Proteína ribosomal L11	PR11 D ATGGCGCGTGTACCACCG	66.7	60.5	-0.38	30.7	70.6
	PR11 R TTACTTTTTGCTGTAAAGGATGA	30.4	53.5	-0.2	22.9	57.9
Proteína ribosomal L19	PR19 D ATGAGTTCCTCAAGCTACAG	47.6	57.9	-1.44	41.4	62.3
	PR19 R TCACTTCTGGCGGTGAC	55.6	56	-1.08	36.6	64.5
Proteína no caracterizada	PNC D ATGAAGAAATGTTTCGTCAGTG	38.1	54	-1.34	35.5	58.8
	PNC R CTATACTTCTGTATCAACCTCATTAC	34.6	58.5	-1.04	34.8	57.3

Amplificación de los genes diferenciales

Una vez sintetizados los oligonucleótidos, se procedió a probar uno a uno los pares de oligonucleótidos en cada una de las condiciones que se estaban analizando, es decir, 6 hsi, 6 hpi, 12 hsi, 12 hpi, 24 hsi y 24 hpi. Para la realización de lo anterior, para cada uno de los pares de oligonucleótidos diseñados para cada gen, se procedió a realizar una estandarización de las condiciones de la PCR, entre los que se encuentran temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y la concentración de MgCl₂.

Usando ds cDNA de las diferentes condiciones 6, 12 y 24 hsi, así como de las hpi, como molde se realizaron los PCR con los oligonucleótidos específicos para

cada uno de los genes diferenciales usando la segunda cadena del cDNA, todos los resultados se resumen en la tabla 26.

Tabla 26- Resumen de genes diferenciales identificados por PCR en las diferentes condiciones con y sin infección.

Gen	6hsi	6hpi	12hsi	12hpi	24hsi	24hpi	observaciones
1.- Sub unid. 2 del complejo 2/3 relacionada a la actina	no	si	si	si	no	no	No se observó amplificación
2.- ATPsintetasa subunidad 0 Mitocondrial	si	si	si	si	si	si	
3.- Disulfuré isomerasa	si	si	si	si	si	si	Inespecificidades
4.- Fosfoproteína nuclear 32 rica en leucina	no es clara	si	si	si	si	si	Con un posible doblete
5.- Proteína de unión a Acil-CoA	si	si	si	si	si	si	
6.- HSP90	si	si	si	si	si	si	Con inespecificidades y debajo del peso
7.- Peroxiredoxina	si	si	si	si	si	si	
8.-Proteína de unión a ácidos grasos	si	si	si	si	si	si	Con un posible doblete
9.- Proteína MG17	si	si	si	si	si	si	Con inespecificidades
10.- Proteína muscular específica 20	si	si	si	si	si	si	Con inespecificidades
11.- Proteína ribosomal L17	si	si	si	si	si	si	
12.- Proteína ribosomal L11	si	si	si	si	si	si	Con inespecificidades
13.- Proteína ribosomal L19	si	si	si	si	si	si	Con inespecificidades

14.- Proteína no caracterizada	si	si	si	si	si	si	
--------------------------------	----	----	----	----	----	----	--

El primer gen que se analizó por PCR fue el de la Subunidad 2 del complejo Arp 2/3 relacionado con la actina, el cual se plasmó en la figura 17 y en el #1 de la tabla 26, se usaron las siguientes condiciones volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 52°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min. En la figura 17 se observó que la amplificación se obtuvo en el carril 2, 3 y 4, que correspondieron al cDNA de las 6 hpi, 12 hsi y 12 hpi, respectivamente, este gen en los macro arreglos se mostró como encendido por el proceso infectivo a las 6 horas, regulado tanto positiva como negativamente a las 12 horas y apagado por la infección a las 24 horas. En el análisis con los oligonucleótidos para aislar el gen en cuestión, se observó amplificación de este gen o presencia de este en el cDNA de las 6 hpi y no en las 6 hsi (figura 17 carril 2 y 1), respectivamente. Esto mostró concordancia con lo obtenido en los macro arreglos donde se identificó al gen como encendido por la infección a las 6 horas; en el caso de las 12 horas, en ambas condiciones, el PCR mostró amplificación de dos fragmentos de peso molecular muy similar (Figura 17 carriles 3 y 4), aunque cabe recalcar que la intensidad de las bandas es inversa, la de mayor intensidad y menor peso molecular en el cDNA de las 12 hsi, es la de menor intensidad en el cDNA de las 12 hpi.

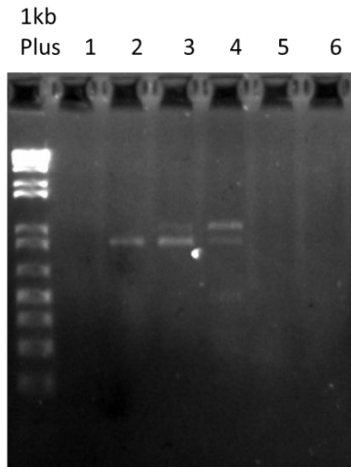


Figura 17.- PCR para el gen de la Subunidad 2 del Complejo Arp 2/3 relacionado a actina, carril 1 al cDNA de las 6 shi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi y carril 6 al cDNA de las 24 hpi.

El segundo juego de oligonucleótidos a probar fueron los del gen de la *ATP sintetasa subunidad 0 Mitochondrial* bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2 mM de $MgCl_2$, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 54°C/30 seg, 72°C/30 seg y una extensión final de 72°C/10 min Como resultado de estas condiciones se obtuvo la amplificación de la figura 18, donde fue posible observar en todos los carriles del 1 al 6, correspondiente a las 6, 12 y 24 hsi y hpi una amplificación de 300 pb.

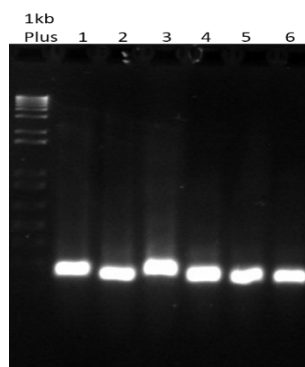


Figura 18.- PCR para el gen de la *ATP sintetasa subunidad 0 Mitocondrial*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi y carril 6 al cDNA de las 24 hpi.

El tercer juego de oligonucleótidos utilizados fue el diseñado para el gen de la *Disulfuro isomerasa*, para la que se establecieron las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 54°C/30 seg, 72°C/2 min y una extensión final de 72°C/10 min, con lo que se obtuvo la amplificación observada en la figura 19 en los carriles 7 al 12, que correspondieron: carril 7 a las 6 hsi, carril 8 a las 6 hpi, carril 9 a las 12 hsi, carril 10 a las 12 hpi, carril 11 a las 24 hsi y carril 12 a las 24 hpi, donde se observaron inespecificidades en la amplificación por lo que se sugiere elevar la temperatura de alineamiento a entre los 55 a 60°C, para eliminar esas bandas de peso molecular bajo, pues el peso correcto del gen ronda los 1485 pb

El cuarto gen que se analizó fue el gen de la *fosfoproteína nuclear 32 rica en leucina*, para la cual se usaron las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 52°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min, con lo que se obtuvo la figura 19 los primeros 6 carriles, donde en todos se observó una amplificación cercana a los 348 pb, a excepción de los últimos dos carriles donde se apreció lo que puede ser un doblete, por lo que en esta condición es necesario realizar un aumento de la temperatura de alineamiento para eliminar ese comportamiento.

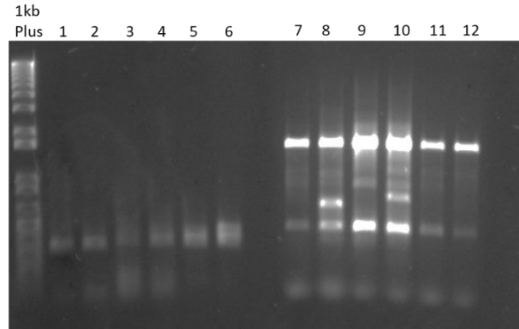


Figura 19.- PCR en el cDNA de las condiciones analizadas con los oligonucleótidos para el gen de la *fosfoproteína 32* carriles 1 al 6 y para el gen de la *disulfuré isomerasa* carriles 7 al 12. 6 hsi carriles 1 y 7, 6hpi carriles 2 y 8, 12 hsi carriles 3 y 9, 12 hpi carriles 4 y 10, 24 hsi carriles 5 y 11, 24 hpi carriles 6 y 12.

Como quinto gen identificado se usaron los oligonucleótidos del gen de *proteína de unión a Acil-CoA*, para lo que se usaron las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2 mM de $MgCl_2$, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 53°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min. Como resultado se observó en la figura 20 una amplificación constante cercana a los 258 pb, en todos los cDNA, la función principal de la proteína para la que codifica este gen está relacionada primordialmente con el transporte de lípidos (Acil-CoA) (Knudsen et al., 2000). Este gen se identificó regulado positivamente por la infección a las 6 horas. Al usar oligonucleótidos específicos para este encontramos que está presente en todos los tiempos, posiblemente por la función vital para el transporte de Acil-CoA vital para la obtención de energía celular.

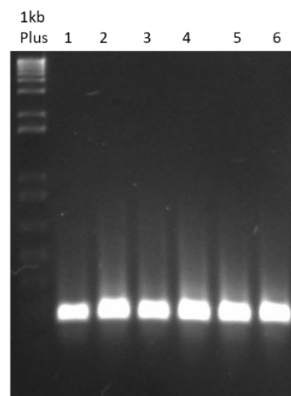


Figura 20.- PCR con los oligonucleótidos del gen *proteína de unión a Acil-Co-A*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi y carril 6 al cDNA de las 24 hpi.

Como sexto gen juego de oligonucleótidos se usaron los de HSP90, el gen de una proteína de choque térmico bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min, como se observó en la figura 22 esta amplificación aun presenta múltiples inespecificidades, las cuales se trataron con gradientes de temperatura y de MgCl₂ siendo que hasta el momento no hemos podido lidiar con estas, así mismo el peso esperado para la amplificación que debería ser de 2,199 pb, se encuentra en el rango de las 800-900 pb, siendo que en control positivo con ADN de *S. frugiperda* figura 21 carril 7, se observó una amplificación cercana a las 2,000 pb.

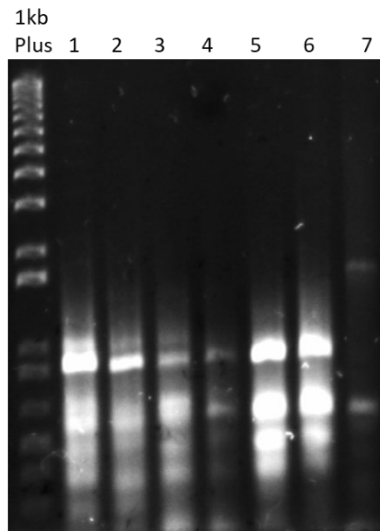


Figura 21.- PCR con los oligonucleótidos del gen *HSP90*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi, carril 6 al cDNA de las 24 hpi y carril 7 al DNA de *S. frugiperda*.

Siguiendo con los resultados anteriores se probaron los oligonucleótidos para el gen de la *proteína ribosomal L19*, bajo las siguientes condiciones: volumen final

de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 53°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min. Como puede observarse en el resultado se obtuvo la figura 22, se obtuvo donde se apreció una amplificación con inespecificidades en todos los carriles de un fragmento de 399 pb, con un marcado pronunciamiento en el carril 5 y 6 que correspondieron a las 24 horas sin y con infección respectivamente, como observación es necesario seguir jugando con la temperatura tanto de alineamiento como con el MgCl₂ para optimizar la amplificación de este gen

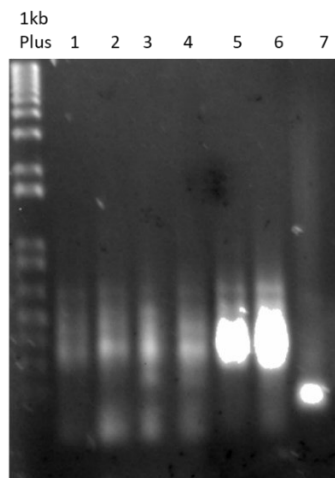


Figura 22. PCR con los oligonucleótidos del gen *proteína ribosomal L19*, carril 1 en el cDNA de las 6 hsi, carril 2 en el cDNA de las 6 hpi, carril 3 en el cDNA de las 12 hsi, carril 4 en el cDNA de las 12 hpi, carril 5 en el cDNA de las 24 hsi, carril 6 en el cDNA de las 24 hpi.

El 8vo juego de oligonucleótidos probados fue para el gen de la *peroxiredoxina* bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min.-Como resultado del proceso anterior de obtuvo una amplificación constante de aproximadamente 624 pb en todas las muestras de cDNA como se muestra en la figura 23.

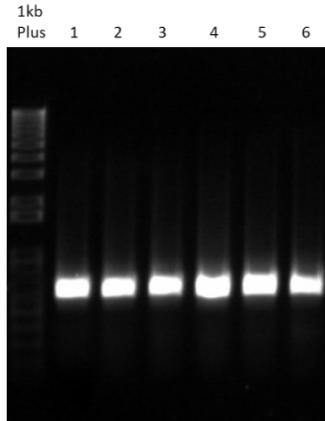


Figura 23.- PCR con oligonucleótidos para el gen de la *peroxiredoxina*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi, carril 6 al cDNA de las 24 hpi.

El décimo juego de oligonucleótidos usados fueron los diseñados para el gen de la *proteína de unión a ácidos grasos 2* bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 58°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min, lo anterior quedo plasmado en la figura 24 donde en todas las condiciones se observó una amplificación de una banda de aproximadamente 405 pb, a excepción de las 24 hsi, donde hay aparentemente un doblete, que podría ser la explicación a que a las 24 horas con y sin infección, por macro arreglo encontráramos este gen.

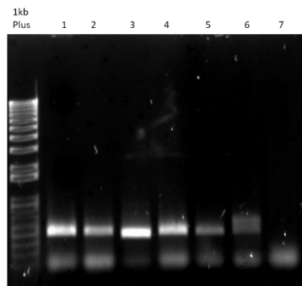


Figura 24.- PCR con los oligonucleótidos del gen de la *proteína de unión a ácidos grasos 2*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi, carril 6 al cDNA de las 24 hpi y carril 7 al DNA de *S. frugiperda*.

El 10° juego de oligonucleótidos usados fue el diseñado para amplificar los genes de la *proteína MG17* y del *Complejo de proteínas reguladoras de la actina* y

citoesqueleto, el juego de oligonucleótidos se usó bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min, como resultado se obtuvo lo que se observó en la figura 25, de manera general se observaron amplificaciones de los 459 pb, aunque con algunas inespecificidades de peso molecular elevado, lo que podría indicar un exceso de catalizador (Mg), por lo que se deben realizar ajustes junto con un ajuste de la temperatura de extensión. En este punto se observó una amplificación en las 459 pb (aprox.) en el cDNA de las 6 hsi, 6 hpi, 12 hsi y 12 hpi, carriles 1, 2, 3 y 4 de la figura 25 respectivamente, siendo los carriles 5 y 6 donde no se observó una amplificación clara en los 459 pb, sino una marcada sobre los 850 pb. Para determinar si esto es parte de la presencia de genes puntuales se necesita realizar una adecuación del PCR en cuestión, modificando las condiciones actuales.

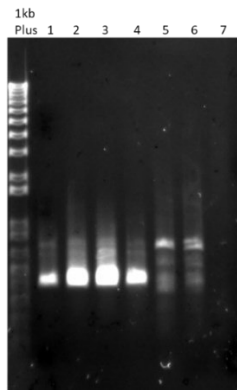


Figura 25.- PCR con los oligonucleótidos para los genes de la *proteína MG17* y del *complejo de proteínas reguladoras de la actina y citoesqueleto*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi, carril 6 al cDNA de las 24 hpi y carril 7 al DNA de *S. frugiperda*.

El 11° juego de oligonucleótidos usados fue el diseñado para los genes de la *proteína muscular específica*, los cuales se usaron bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 54°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min,

como resultado se obtuvo lo observado en la figura 26 donde en los carriles 1-4, 6 hsi, 6 hpi, 12 hsi y 12 hpi respectivamente, se observó la amplificación cercana a los 393 pb, correspondiente al RNAm de este gen, aunque en todos los carriles se observaron cierto nivel de inespecificidades, lo que requiere un ajuste de las condiciones de la PCR, a las 24 horas, no se registró una amplificación tan marcada de la banda de las 393 pb, pero al estar presente en ambas condiciones, probablemente se deba a un efecto fisiológico más que al proceso de infección en sí.

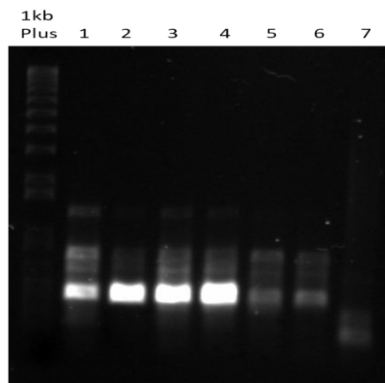


Figura 26.- PCR al gen de la *proteína muscular específica*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi, carril 6 al cDNA de las 24 hpi y carril 7 al DNA de *S. frugiperda*.

El 12° juego de oligonucleótidos usados fueron los correspondientes al gen de la *proteína ribosomal L7* bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.2 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min.-Como resultado se obtuvo lo observado en la figura 27, donde se observó una amplificación constante del gen en el cDNA de todas las condiciones, 6, 12, 24 hsi y hpi.

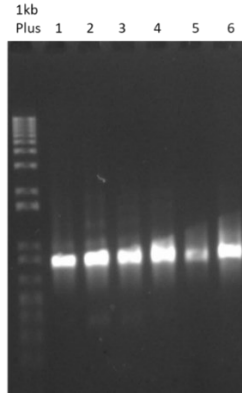


Figura 27.- PCR con los oligonucleótidos del gen de la *proteína ribosomal L7*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi y carril 6 al cDNA de las 24 hpi.

El penúltimo juego de oligonucleótidos usados fue el del gen de la *proteína ribosomal L11* bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 54°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min,–con las cuales se obtuvo lo observado en la figura 28, donde en todas las condiciones se detectó la amplificación del fragmento de 585 pb, aunque se usó una temperatura de alineamiento elevada, la gran concentración de Mg puede influir en las inespecificidades observadas, por lo que sería conveniente mejorar la mezcla para obtener una amplificación de mejor calidad.

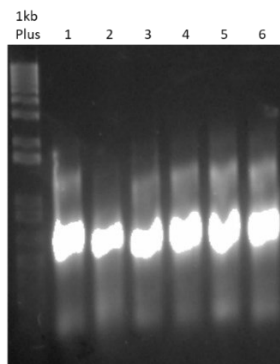


Figura 28.- PCR con los oligonucleótidos para el gen de la *proteína ribosomal L11*, carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi y carril 6 al cDNA de las 24 hpi.

Como último juego de oligonucleótidos probados se usaron los diseñados para el gen de la *proteína no caracterizada* bajo las siguientes condiciones: volumen final de reacción de 50 ul, con 1x de buffer de la enzima, 2.5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 1 mM de oligos D y R, 2 unidades de taqDNApol y 1 ul de cDNA bajo una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, y 30 ciclos de 95°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/45 seg y una extensión final de 72°C/10 min, con lo que se obtuvo lo observado en la figura 29, en donde en casi todas las condiciones se obtuvo una amplificación sustancial del fragmento de 929 pb, esto en el carril 2, 3, 5 y 6, que corresponden a las 6 hpi, 6 hsi, 24 hsi y 24 hpi respectivamente, en el caso del carril 1 y 4 de la figura 29 que correspondieron a las 6 hsi y 12 hpi, la amplificación no se observa sustancial, sin embargo esto no nos garantiza nada, hasta no ser sometido a PCR en tiempo real.

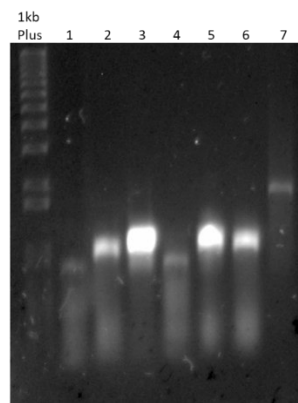


Figura 29.- PCR con los oligonucleótidos para el gen de la *proteína no caracterizada*, <carril 1 al cDNA de las 6 hsi, carril 2 al cDNA de las 6 hpi, carril 3 al cDNA de las 12 hsi, carril 4 al cDNA de las 12 hpi, carril 5 al cDNA de las 24 hsi, carril 6 al cDNA de las 24 hpi y carril 7 al DNA de *S. frugiperda*.

Diseño de oligonucleótidos para qPCR

Una vez que se amplificaron los genes de *S. frugiperda* detectados como posibles diferenciales durante el proceso de infección en los intestinos por parte de la cepa viral SfNPV-Ar, se procedió a la secuenciación de estos. Como se muestra en la figura 30, donde se observó para el carril 2 al gen de la proteína Acil Co-A, carril 3 para el gen de la proteína de la Sub unidad 2 del complejo de la proteína 2/3 relacionada a la actina, carril 4 para el gen de la proteína muscular específica, carril 5 para el gen de la fosfoproteína nuclear 32, carril 6 para el gen Desulfuré isomerasa,

carril 7 para el gen de la ATPsintetasa sub unidad 0, carril 8 para el gen de la proteína no codificante, carril 9 para el gen de la proteína ribosomal L19, carril 10 para el gen de la proteína ribosomal L11, carril 11 para el gen de la peroxiredoxina, carril 12 para el gen de la proteína MG17, carril 13 para el gen de la proteína de unión a ácidos grasos, carril 14 para el gen de la proteína de choque térmico 90, carril 15 para el gen de la proteína ribosomal L7.

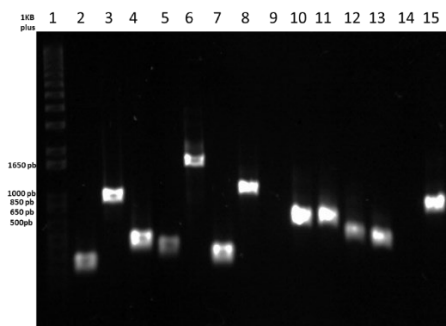


Figura 30.- PCR del genes diferenciales completos, carril 2 gen de la proteína Acil Co-A, carril 3 gen de la proteína de la Sub unidad 2 del complejo de la proteína 2/3 relacionada a la actina, carril 4 gen de la proteína muscular específica, carril 5 gen de la fosfoproteína nuclear 32, carril 6 gen Desulfuré isomerasa, carril 7 gen de la ATPsintetasa sub unidad 0, carril 8 gen de la proteína no codificante, carril 9 gen de la proteína ribosomal L19, carril 10 gen de la proteína ribosomal L11, carril 11 gen de la peroxiredoxina, carril 12 gen de la proteína MG17, carril 13 gen de la proteína de unión a ácidos grasos, carril 14 gen de la proteína de choque térmico 90, carril 15 gen de la proteína ribosomal L7.

Una vez realizado lo anterior se procedió a realizar el diseño de oligonucleótidos utilizando los softwares Real Time qPCR Assay de IDT y Primer3web versión 4.1, en los cuales se deposita la secuencia y se programan los comandos para poder ejecutar el análisis de las mejores regiones para realizar un PCR en tiempo real (qPCR). Los oligonucleótidos que arrojaron los programas anteriores fueron analizados en los programas OligoAnalyzer de IDT y Oligonucleotide Properties Calculator de NUBIC, para calcular todos los parámetros y comparar entre los oligonucleótidos generados. Con los datos obtenidos se decidió por un solo juego de oligonucleótidos (los mejores valorados) los cuales se plasmaron en la tabla 27.

Tabla 27.- Oligonucleótidos para PCR en tiempo real de los genes diferenciales.

Gen	Oligonucleótido Directo/reverso	Amplificación pb	Tm °C	% GC	ΔG hairping (Kcal/mol)	Tm hairping °C	ΔG homodimero (Kcal/mol)	ΔG heterodimero (Kcal/mol)
Actin2/3								
D	CGAGAGTAGGCGACAATATCAG	142	61.7	50	-0.17	27.5	-3.91	-5
R	ACACCTTGGAGCACTTGATG		62.4	50	0.39	17.8	-3.14	
AcilCoA								
D	GCAATTCTCCAAAGTCGCCA	165	59.12	50	0.69	14.5	-5.36	-5.09
R	TGGTCCATGCCTTGAACCTG		58.38	50	-0.14	26.8	-5.38	
ATPSintasa								
D	ATGAAACTCTCCAGCTCACAG	79	61.9	47.6	0.76	11.9	-6.34	-5.5
R	ACGTACTTGTACCAATGGAG		62	47.6	-0.19	28.5	-6.3	
Disulfure								
D	TAGGGCTGCCGTTCTAGAAG	250	58	55	-0.09	26.6	-11.2	-4.67
R	ACTCCTGCTGCTCAAATCCT		58.4	50	0.91	7	-3.14	
Fosfop								
D	CGCCAAAAGTGACCCAAAAGG	139	62	50	0.09	23.4	-3.61	-6.61
R	CGCCTTCTCCTTCTAAGTCTTC		61	50	0.35	20.3	-3.61	
POX								
D	CTCGTTCAGCACTCCGTATC	136	61	55	0.4	19	-3.61	-3.17
R	CTTCAGAGATGTCACCTCACAC		62	50	-0.7	35	-3.3	
Prot.unipon								
D	ATCGTGTCTGGTGCTTTAGG	138	61.8	50	1.35	-7.7	-3.61	-4.7
R	CTTAGCGGTCTGAGTAACTGTG		62.1	50	0.33	19.5	-3.61	
MG17								
D	GTGCACGTCGTCGATGAG	156	62	61	-1.71	46.8	-9.73	-5.13
R	CAGACAACGGCTCAGGATC		61	57	1.29	5.3	-4.62	
PMM								
D	CAGTTCCAAAAGGCGGTATAAAG	142	62	41.7	1.32	6.2	-3.61	-5.02
R	ATTCTGGGTGCTTGTAGGC		62	52	-0.13	26.9	-3.14	
PRL17								
D	CTCAAGAGGCGTTCATCAGC	161	58.9	55	-0.5	25.7	-3.61	-4.73
R	GCGAGTTTAGCTTCACCAGG		58.9	55	0.23	21.6	-6.34	
PR11								
D	CCCGCGTTGAAGAAAGACAA	210	59	50	0.74	14.5	-10.36	-3.61
R	ACCGAAAGACCTGACAGTGT		58	50	0.88	3.4	-3.61	
PNC								
D	TGCAACATAGAAGCCGGGTA	167	59	50	0.01	24.8	-9.75	-7.05
R	TGGTCAGACAAATGCATGCC		59	50	0.59	15.7	-11.6	

Expresión diferencial de proteínas en tejidos susceptibles a la infección primaria

Análisis de las proteínas presentes en el los VDO

Las proteínas presentes en los VDO se analizaron en geles SDS-PAGE al 12%, como resultado se obtuvo la imagen representada en la figura 30, donde se observó en el carril 2 el perfil de proteínas de la cepa AcMNPV donde se detectaron entre 24-25 bandas de proteínas. Esta cepa presentó bandas que están ausentes en las cepas SfNPV, las cuales fueron: una banda de más de 60 kDa, dos bandas de 40 kDa, 3 bandas de entre 20 y 25 kDa (dos de ellas se observaron tenuemente en la cepa SfNPV-Ar), 3 bandas de entre 15 y 20 kDa y una última de aproximadamente 10 kDa.

En lo relacionado con las cepas de SfNPV, estas mostraron los siguientes patrones de bandeo en el gel de 1D SDS-PAGE: para la cepa SfNPV-AR (figura 30 carril 3) se observaron dos bandas de alto peso molecular (70 kDa y más de 100 kDa) que aparentemente no están presentes en las cepas SfNPV ni en AcMNPV, 2 bandas de entre 20 y 25 kDa que están presentes en el estándar pero no en Fx ni en Ho, así mismo aparentemente carece de 2 bandas que están presentes en Fx y Ho entre los 40 y 50 kDa, al igual que carece de 2 bandas de entre 30 y 40 kDa de la cepa Fx. Para la cepa SfNPV-Fx (Figura 30 carril 4), esta presentó 2 bandas de entre 30 y 40 kDa que no están presentes en el estándar ni en la cepa SfNPV-Ar u SfNPV-Ho, así mismo comparte dos bandas de entre 40 y 50 kDa con la cepa Fx pero no así con la cepa Ar al igual que una banda de entre 15 y 20 kDa que comparte con SfNPV-Ar pero no con Ho, por último aparentemente carece de las dos bandas de alto peso molecular presentes en Ar y ausentes el estándar.

Por último, para la cepa SfNPV-Ho (figura 30 carril 5) esta aparentemente carece de dos proteínas que están presentes en la cepa Fx de entre 30 y 40 kDa, compartiendo esta característica con Ar, carece de las dos proteínas de entre 20 y 25 kDa presentes en Ar, característica que comparte con Fx, carece de la proteína de entre 15 y 20 kDa presente en Ar y Fx, por último, la banda de aproximadamente 30 kDa tiene una marcada mayor intensidad que las otras dos cepas SfNPV.

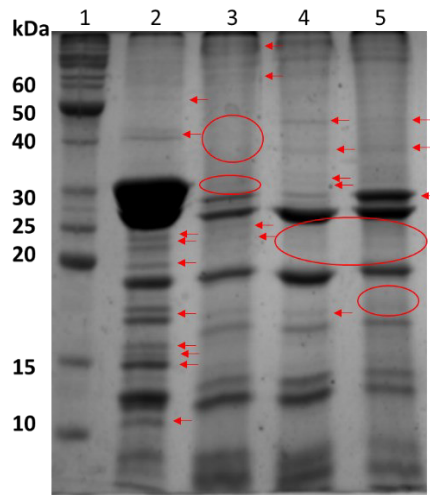


Figura 30.- Gel 1D SDS-PAGE para las muestras de proteínas totales de los CO, carril 1 marcador de peso molecular Bench Mark, perfil de proteínas de los CO de AcMNPV (carril 2), de SfNPV-Ar (carril 3), de SfNPV-Fx (carril 4), de SfNPV-Ho.

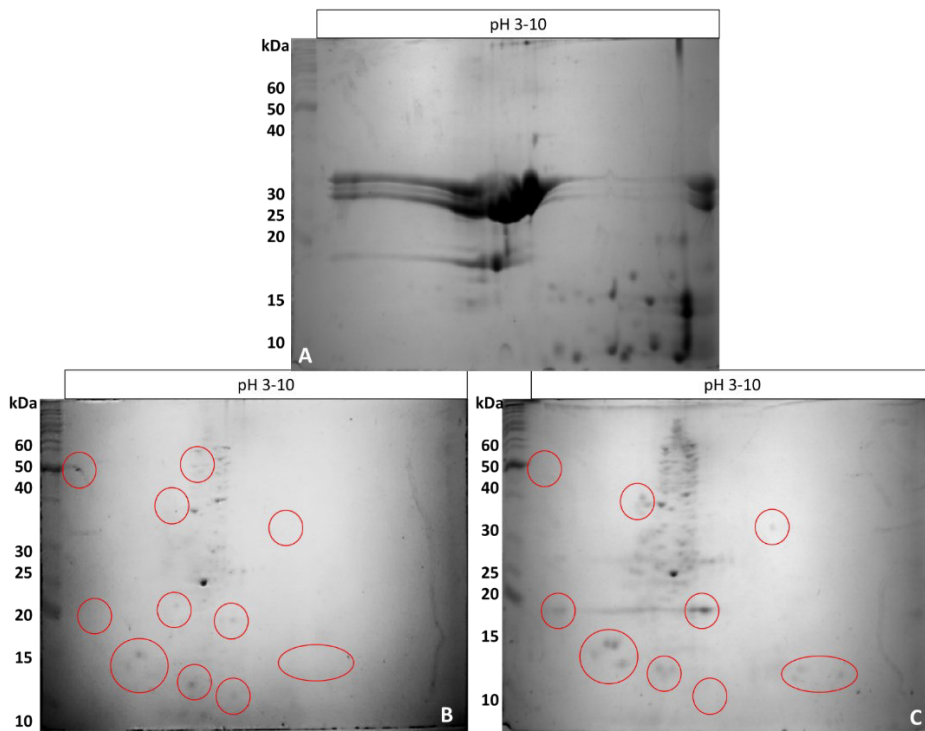


Figura 32.- Geles de 2D SDS-PAGE de los cuerpos de oclusión. A.- de AcMNPV, B.- SfNPV-Ar y C.- SfNPV-Fx.

Una vez que se realizaron los geles de 1D SDS-PAGE y se encontraron diferencias en el patrón de bandeo de las diferentes cepas, se procedió a analizar esas proteínas en geles 2D. Como resultado del proceso anterior se obtuvieron las imágenes en la figura 32, donde se observa el resultado del isoelectroenfoque y la posterior separación de las proteínas por peso molecular de las cepas AcMNPV (fig. 32 A), SfNPV-Ar (fig. 32 B) y SfNPV-Fx (fig 32 C). En primera instancia podemos comparar las cepas SfNPV con el estándar AcMNPV donde en los geles de segunda dimensión se observó que las proteínas presentes en los VDO y CO del estándar difieren mucho de las cepas SfNPV, pues la mayoría de las proteínas observadas en la fig 32 A se encuentran en gran cantidad en el pH de entre 6 y 10, lo que se contrapone con las cepas SfNPV cuya concentración mayoritaria de proteínas se encuentra entre los pH 4 a 7, otra diferencia que fue muy notable es el spot de aproximadamente 30 kDa y pH cercano a 7, este corresponde a la poliedrina, se encuentra marcado en AcMNPV, sin embargo, en las cepas de SfNPV, un posible spot de 25 kDa en un pH cercano a 5, podría ser su contraparte en los virus de *S. frugiperda*. Otra marcada diferencia es el spot de entre 15 y 20 kDa de pH cercano a 7, que se encuentra muy abundante en el estándar (figura 32 A), pero no así en la figura 32 B ni en 32 C. Otra marcada diferencia entre el estándar y las cepas SfNPV, fue la presencia de proteínas de alto peso molecular presentes en las cepas virales de *S. frugiperda*, las cuales están totalmente ausentes en el estándar AcMNPV. De manera empírica por la simple observación de los geles, aparentemente se aprecian más proteínas presentes en las cepas SfNPV que en el estándar.

Al comparar las dos cepas de SfNPV (Ar y Fx) e la figura 32 B y C encontramos que estas presentaron un patrón de distribución de proteínas muy similar, lo cual es consiente al hablar de dos cepas que atacan a la misma especie. Sin embargo, analizando la intensidad y distribución de algunos spots específicos, encontramos que la cepa SfNPV-Ar presentó entre el pH 3 y 5 a los 50, 20, 15 y 10 kDa aproximadamente 6 spots ausentes en SfNPV-Fx. En contraparte, la cepa Fx presentó entre pH 4-5, 8-9 y entre los 10-15 kDa ocho spots ausentes en la cepa Ar, así mismo, entre el pH 5-6 y 7-8 entre los 30-40 kDa se encontraron tres spots que solo estuvieron presentes en la cepa Fx.

Análisis del perfil de proteínas expresadas diferencialmente en 1D

Una vez purificadas y cuantificadas las muestras de proteínas, se procedió a realizar el análisis de estas en una dimensión con geles SDS-PAGE, los cuales fueron preparados siguiendo lo descrito en materiales y métodos. Los resultados se observan en la figura 33. En esta figura en II se observó el análisis visual de gel I, donde se recalcaron en recuadros rojos diferenciados por literales y se encontró que para las 6 hsi, una banda de entre 80-90 KD que no estaba presente a las 6 hpi (Fig. 33, B), a las 6 hpi se detectó una banda de 200 KD que no estaba presente a las 6 hsi (Fig. 33, A), estas pocas diferencias podría correlacionarse con lo reportado por Carinhas et al., 2011, quienes en un análisis proteómico de la infección de células Sf9 encontraron que a las 6 hpi solo 8 transcritos virales estaban presentes como proteínas (P143, DBP, ME53, IEF3, P35, HE65, 39K y GP69) de las cuales sus genes son tanto tempranos como tardíos. Aunque no podemos asemejar el proceso de infección de una línea celular que asemeja el proceso secundario con el resultado del intestino medio donde se lleva a cabo el proceso primario, lo podemos usar como punto de referencia para el total de proteínas con el que nos podríamos topa. Del mismo modo esto podemos relacionarlo con lo encontrado con Xue et al., 2012b quienes determinaron que a las 6 hpi existían tanto transcritos tempranos como tardíos en una línea celular de *B. mori*, ambos asemejan el proceso de infección secundaria, aunque hay que aclarar que las 6 hpi no se considera el pico de expresión de los RNAm de los baculovirus (Xue et al., 2012b). Estas pocas diferencias en cuanto al nivel de transcritos a las 6 hpi también fue detectada en intestinos de larvas infectadas con baculovirus por Donly et al., 2014 y Donly et al., 2016, quienes no consideran este periodo como donde más transcritos virales son expresados. Por lo que según lo expuesto con anterioridad al comparar sistemas *in vitro* e *in vivo*, en cuanto a expresión de proteínas y transcritos en el transcurso de la infección viral observamos que existen diferencias notables en algunas de las proteínas y transcritos detectados *in vitro* (que guardan relación en su sistema) con los encontrados *in vivo*, donde detectamos hasta 12 horas de diferencia en la expresión de un gen (39k).

Los mayores resultados en cuanto a diferencias observadas en una dimensión (SDS-PAGE) se encontraron entre las 12 horas sin y con infección. Como se observa en la figura 34 carriles 4 y 5 se observó una banda de entre 70-80 KD (fig. 33, D) presente en la condición infectada y ausente en la condición sin infectar, del mismo modo se encontraron dos bandas una de aproximadamente 43 KD (fig.33, E) y otra de aproximadamente 35 KD (fig. 33, F) ambas presentes en la condición sin infección y aparentemente ausentes en la condición infectada. Al analizar la condición infectada y compararla con la sin infección se encontró una banda de 200 KD (fig. 33, C) la cual también se encontró presente a las 6 hpi, por lo que nos podría indicar una proteína viral de alto peso molecular que se está expresando por acción de la infección viral, otra proteína de aproximadamente 80 KD (fig. 33, D) se observó menos intensa en la condición infectada que en la condición control, sin embargo no es posible determinar si es efecto de la infección viral o resultado de alguna falla en la cuantificación o posiblemente algún error técnico. Relativo a este tiempo Nayyar et al., 2017 menciona que en la línea celular Sf21 solo el 0.5% de las proteínas eran sobre expresadas y 0.02% sufrían una regulación negativa a las 12 hpi, siendo las 72 hpi el punto donde se observó que el 50% de las proteínas eran reguladas negativamente y 7% eran sobre expresadas, quedando el 43% sin cambios, todo esto en una línea celular que nos podría dar una idea general de lo que esperaríamos en este punto, pero como ya se discutió anteriormente puede haber grandes diferencias entre sistemas *in vitro* y sistemas *in vivo*. Dentro de las proteínas encontradas por Nayyar et al. 2017, se encuentran algunas involucradas en la transcripción, plegamiento, degradación y metabolismo., a las 12 hpi, pudiendo ser algunas que encontremos en este tiempo, ya que no están relacionadas con la producción de BV o VDO. A nivel transcriptómico en intestinos medio de larvas infectadas por baculovirus se ha observado un incremento en cuanto al nivel de expresión de genes virales tanto con promotores tempranos como tardíos por Donly et al., 2014 y Donly et al., 2016; quienes observaron este efecto a las 12 hpi. Lo cual podría estar relacionado con un cambio en el proteoma presente en las células ya que como se mencionó anteriormente algunos RNAm virales pudieran ser traducidos

inmediatamente al ser transcritos, pero otros podrían sufrir un desface, cuyas proteínas estarían presentes en el tejido entre las 6 hasta 12 horas después.

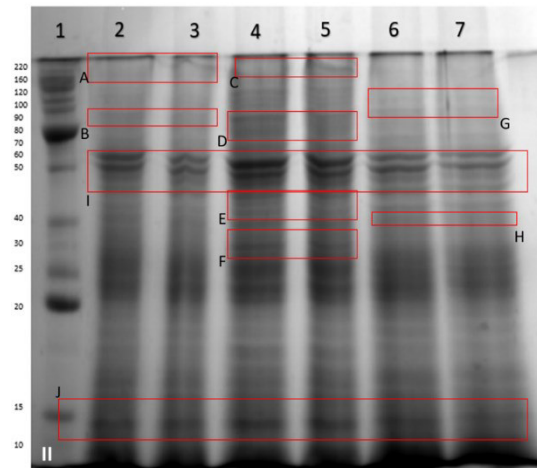


Figura 33.- Análisis de SDS-PAGE de proteínas reguladas por la infección, carriles 2 y 3 correspondieron a las 6 hsi y hpi. Los carriles 2 y 3 a las 12 hsi y hpi. Los carriles 4 y 5 a las 24 hsi y hpi. Carril 1 marcador de peso molecular.

Para la condición de las 24 hpi, se observaron dos proteínas presentes a las 24 hsi, las cuales se encuentran ausentes en la condición infectada. Estas son de aproximadamente 95 y 40 KD (figura 33 carril 6 y 7). En este tiempo p.i., en experimentos con líneas celulares donde se analizan los transcritos se encuentran que el número de transcritos disminuyen, en comparación con la expresión observada entre las 0-8 hpi y la de las 12 hpi (Xue et al., 2012). Analizando dos estudios realizados por Donly y colaboradores en el 2012 y 2016 se infectaron se identificó que a las 12 hpi las larvas infectadas con baculovirus expresaron pocos genes sorpresivamente estos autores detectaron un solo transcrito sobre expresado, el cual fue *p6.9* (una proteína de unión a ADN) que típicamente se expresa entre las 18 a 36 hpi, ellos determinaron que este gen se mantiene sobre expresado en los intestinos desde las 18 hasta las 48 hpi (Donly et al., 2016). En nuestro estudio en una dimensión no detectamos la presencia de la poliedrina que típicamente es detectado 24 hpi como el gen más abundante, lo cual concuerda con lo esperado para un tejido primario.

Análisis del perfil de proteínas en dos dimensiones.

Para el perfil de dos dimensiones de las 6 hpi se analizaron al mismo tiempo, pero en geles separados, las proteínas de la condición infectada y sin infectar, tal y como se puede apreciar en la figura 34. Esto se realizó por triplicado, para esta condición se encontraron en promedio 174 spots para la condición control, distribuidos en peso molecular entre los 10 y 220 kDa y en relación con el pH entre 3 y 10, según se observa en la figura 34 superior e inferior izquierda (A, B y C). En cada una de las repeticiones técnicas, para la condición infectada a las 6 horas, se encontraron en promedio 196 spots distribuidos entre los 10-220 KD y entre pH 3-10 (figura 34, derecha, A, B, C). Con este análisis visual se determinó parcialmente, que en las 6 hpi se observaron las mayores diferencias entre el pH3-4 con 20-110 KD y entre el pH 5-6 con 50-80 KD aproximadamente. Para la condición control y para el problema se encontraron spots diferenciales localizados entre el pH 5-7 con 10-15 KD y entre pH 6-7 con 25-35 kDa aproximadamente, las cuales posiblemente fueron encendidas por la infección viral.

Esto guarda relación con lo expuesto anteriormente en relación con las correlaciones que realizamos de los estudios proteómicos de Carinhas et al 2011 y transcriptómico de Xue et al., 2012b, ambos en líneas celulares, donde se observamos al comparar las 6 hpi de ambos que algunas proteínas descritas por Carinhas et al., se encontraban siendo transcritas al mismo tiempo post infección según Xue et al., y otras su proceso de transcripción iniciaba 3 horas antes de que estuvieran presentes las proteínas para las que codificarían. Sin embargo si comparamos el trabajo de Carinhas et al., con lo descrito por Donly et al., 2012 y 2016 quienes analizan el proceso de expresión de genes en un sistema *in vivo* durante la infección primaria, más similar a nuestro trabajo, encontramos que existen similitudes como ocurrió en las correlaciones de los sistemas *in vitro* ya que existen proteínas expresadas en el sistema *in vitro* que son transcritas en los intestinos al mismo tiempo post infección, otras cuyo RNAm se expresa entre 3-6 horas antes (en los intestinos infectados) y que la proteína fue encontrada en la línea celular; y la discrepancia se encontró a con una proteína que *in vitro* se encontró a las 6 hpi e *in*

vivo se encontró el RNAm entre las 36-48 hpi con un alto grado de sobre expresión. Esto nos indica dos cosas:

1.- Que algunas proteínas podrían tardar tiempo en expresarse o incluso expresarse mucho después de lo que podría estar descrito en un sistema *in vitro* o en una infección secundaria *in vivo* con lo que queda claro que es necesario complementar este trabajo con un estudio proteómico.

2.- Que la cantidad de diferencias encontrada a nivel de proteínas en este trabajo (12 proteínas en la condición infectada ausentes en el control y 9 presentes en el control y ausentes en la condición problema) se asemeja a lo observado por Carinhas et al., 2011 quien reporto que el virus a las 6 hpi en la línea celular había expresado 6 proteínas.

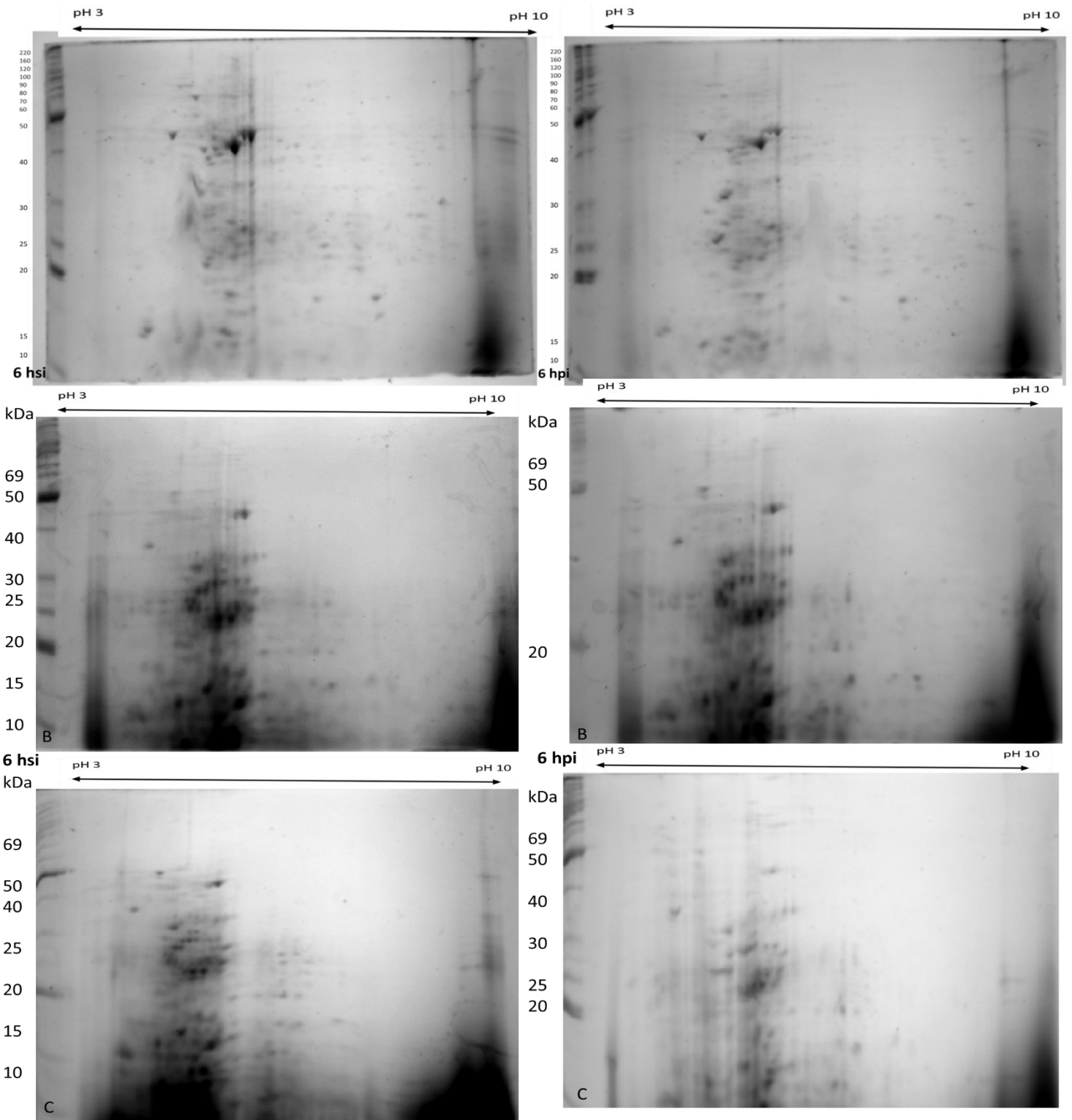


Figura 34.- Geles de doble dimensión de las 6 hsi (izquierda) y 6 hpi (derecha). En cada figura A,B y C son las repeticiones técnicas.

En lo relacionado con las 12 horas, se puede apreciar en la figura 35 el resultado de los geles de 2-DE de las 12 hsi y 12 hpi. Para la condición problema se observaron diferencias en cuanto al nivel de expresión de proteínas en el pH de 3-4 entre los 40-70 kDa, pH5-7 entre los 10-25 kDa, entre pH 8-10 entre los 20-50 kDa. En los puntos anteriores se observaron proteínas que estaban presentes únicamente en la condición infectada, indicando que la infección viral pudiera estar activando la transcripción de genes del insecto o propios y traduciendo esos genes a proteínas.

Según Xue et al., 2012b y Donly et al., 2016, las 12 horas después de la infección es el punto donde el proceso de transcripción viral así como la traducción de estos a proteínas alcanza sus niveles de expresión más altos, es el momento donde el virus empieza a replicar su ADN, para lo cual previamente ya ha expresado la maquinaria celular necesaria para dicho proceso, también es el punto de partida del encapsulamiento del ADN recién replicado en las NC, cuyos genes a las 12 horas empiezan a ser expresados por el virus. Es de esperar que en este punto exista un mayor número de diferencias a nivel proteómico en un tejido infectado comparándolo con un tejido sano.

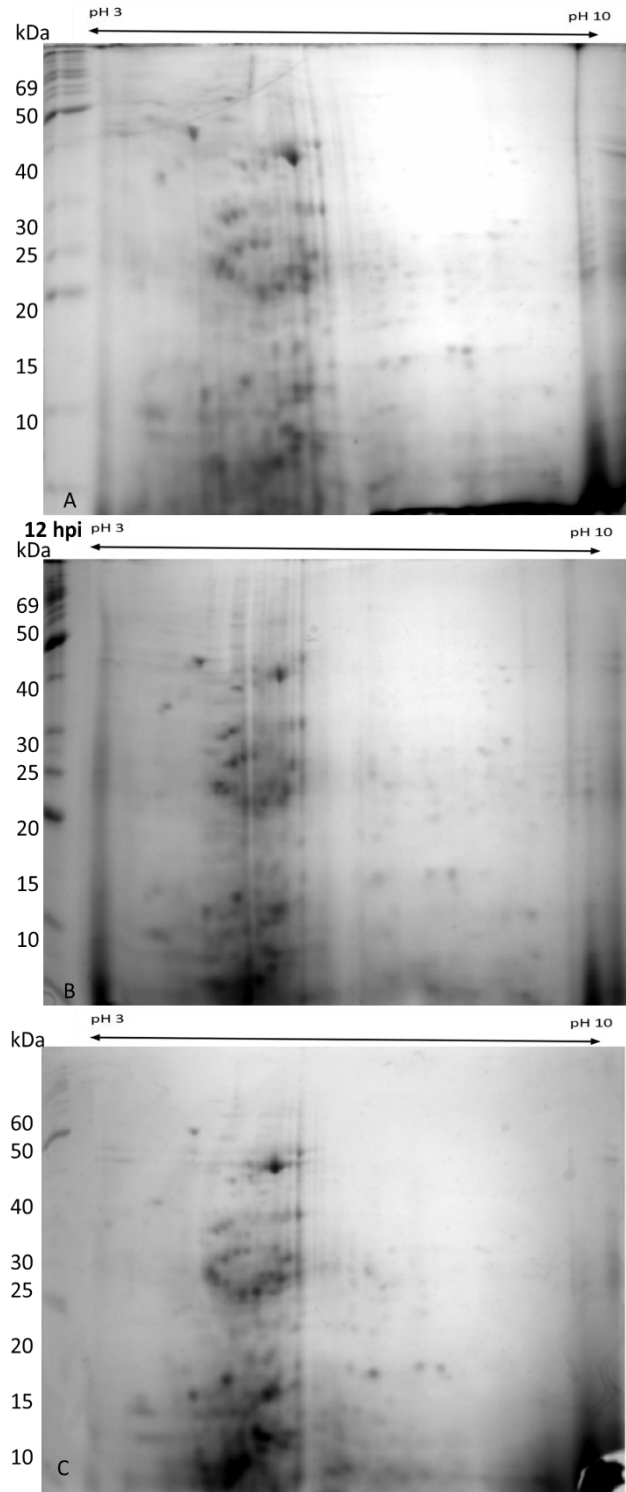
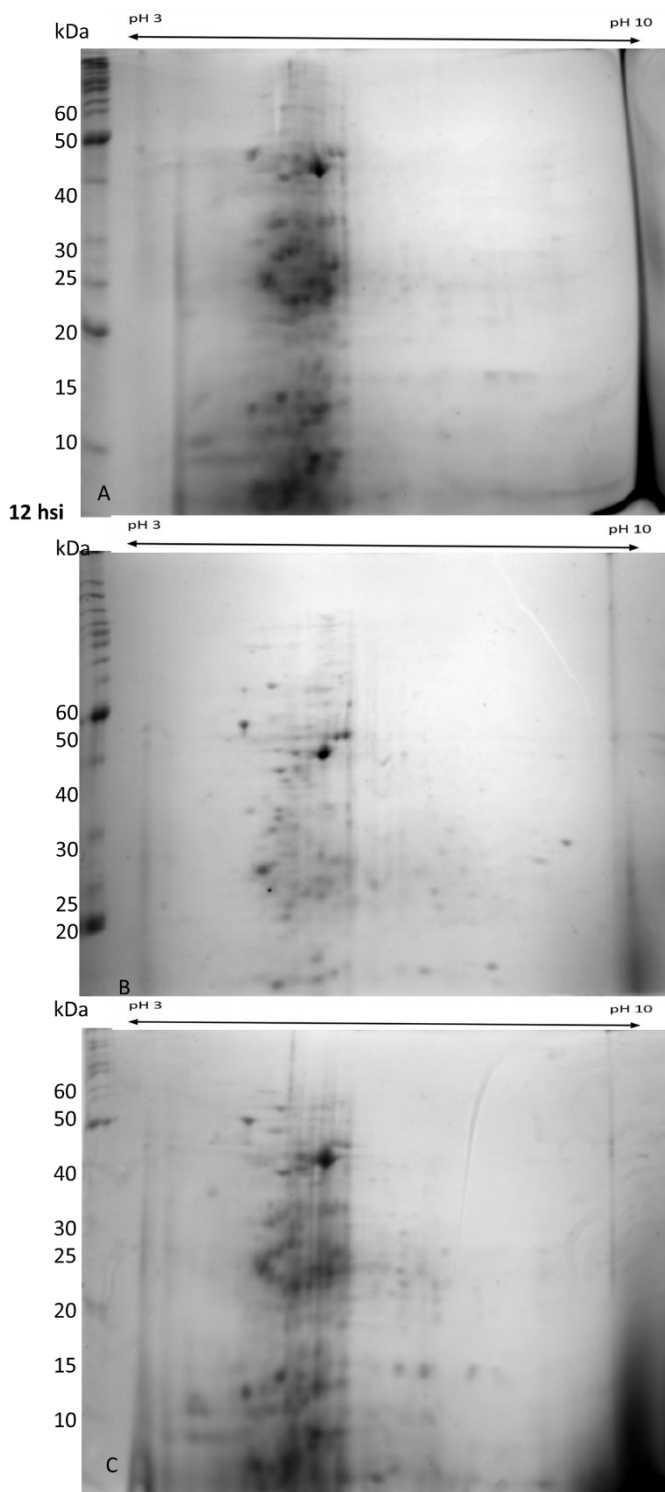


Figura 35.- Geles de doble dimensión de las 12 hsi (izquierda) y 12 hpi (derecha). En cada figura ABC son las repeticiones técnicas.

Para el caso de las 24 horas, se puede apreciar en la figura 36 el resultado de los geles de proteínas de 2-DE de las 24 hsi y 24 hpi, en el primer caso se encontraron visualmente en promedio 89 spots en la condición control, los cuales se encontraron distribuidos en el pH 3-10 con pesos moleculares desde los 10 KD hasta los 220 KD, para la condición problema la distribución se observó similar al control. Un análisis visual de estos geles nos mostró que en la condición control a las 24 horas se observan algunos spots presentes en el tejido sano con una distribución entre pH 6-7 entre los 110-220 KD y pH 4-6 con pesos entre 20-50 KD (fig. 36, Izquierda A). Para la condición problema al compárala con el control se encontraron marcas que estaban presentes en la condición infectada y ausentes en el control, indicando que probablemente se habían encendido por la infección viral, las distribuciones de estos fueron entre pH 3-4 con pesos de entre 20-50 KD, pH10 con pesos de entre 60-100 KD y en pH 8-9 con peso molecular entre los 20-40 KD (fig. 36 A derecha parte inferior). Las proteínas observadas en los geles de la condición problema podrían haber sido encendidas por la infección viral pudiendo ser del tejido o del virus.

Estos resultados preliminares de las 24 horas exhiben similitud con los resultados de las 6 hpi, lo cual si es visto desde lo expuesto por Xue et al., 2012b, en estudios *in vitro* y Donly et al., 2016 en estudios en intestinos de insectos, determinaron que las 24 horas después de la infección era un punto donde disminuía la sobre expresión de transcritos comparada con las 12 horas, donde se daba un pico en el proceso de expresión viral. En este sentido Donly et al., mencionan que en este punto en los intestinos hay niveles insignificantes de los genes muy tardíos *pol* y *p10* indicando que el proceso de oclusión de los baculovirus no se lleva a cabo en los intestinos medios, en este punto los mismo autores comentan que solo el 3.7% de los transcritos de ese tejido son de origen viral, una menor cantidad si se compara con el de las 48 hpi que es de más del 8%, aunque este 8 % se caracteriza por una sobre producción del gen *p6.9* seguida de la fuerte expresión del gen *39k* quien es detectado como proteína en ensayos *in vitro* a las 6 hpi (Carinhas et al., 2011). Por lo que es posible que a las 24 hpi no encontremos gran cantidad de diferencias.

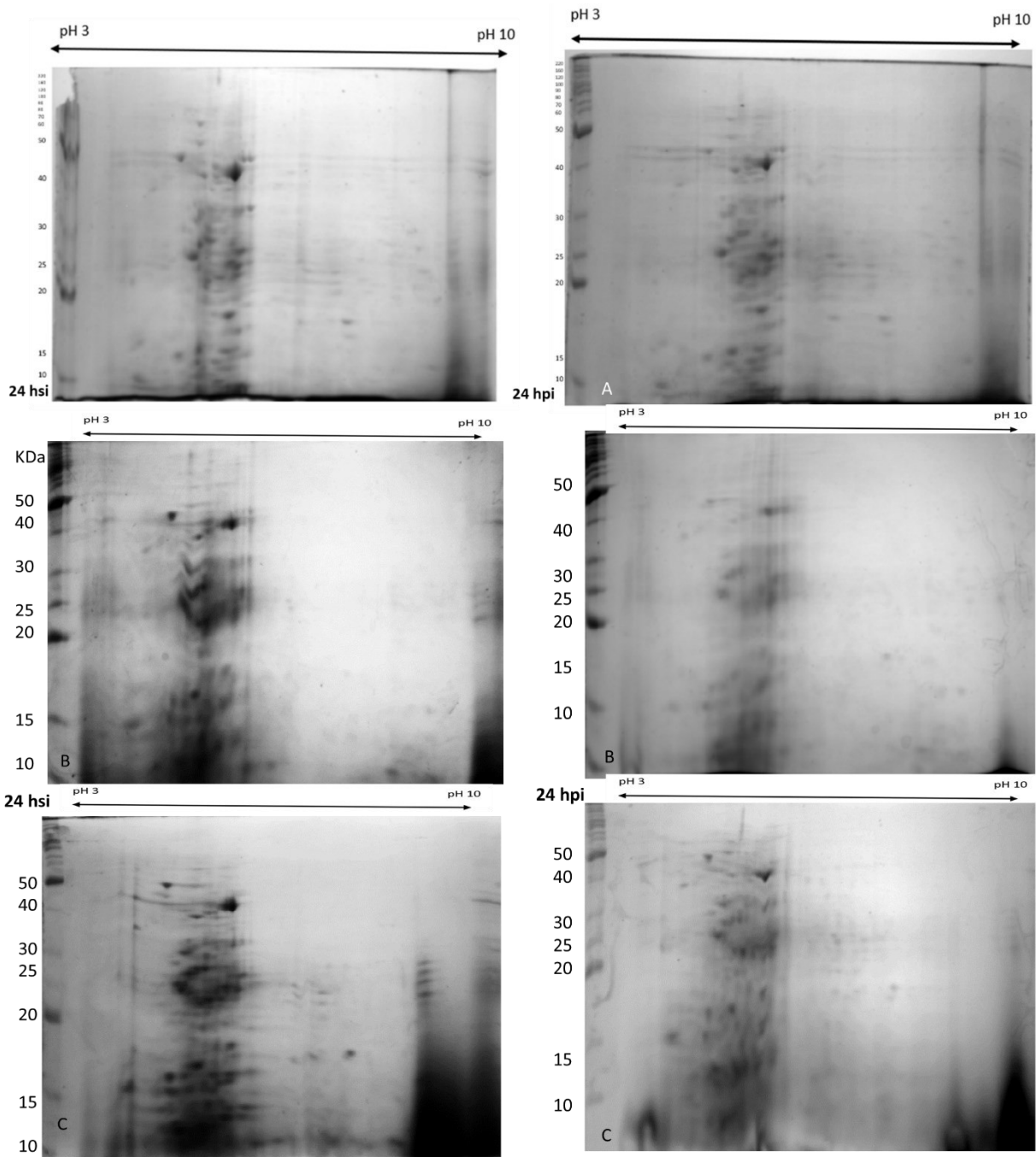


Figura 36.- Geles de doble dimensión de las 24 hsi (izquierda) y 24 hpi (derecha). En cada figura ABC son las repeticiones técnicas.

Identificación de proteínas diferenciales

Una vez determinado lo anterior, se procedió a picar cada uno de los spots diferenciales con puntas adaptadas de 200 μ l, con las cuales se picaba la acrilamida donde se encontraba el spot, se succionó y se colocó el fragmento de acrilamida con el spot en un tubo eppendorf con agua miliQ Grado 4 estéril con una concentración de iones menor a 1 μ g/l, como se muestra en la figura 37. Una vez colectados y etiquetados todos los spots se enviaron para su identificación al laboratorio de proteómica y expresión génica del IPICYT. La distribución de los spots quedó asentada en la figura 37 y fue la siguiente: para las 6 horas en el control se seleccionaron 3 spots (A) de mediano y alto peso molecular con pH entre 4-5, para el problema se seleccionaron 4 spots de alto y bajo peso molecular de pH entre 4-8. Para las 12 horas en el tejido sin infección se seleccionaron 7 spots de mediano y alto peso molecular, con pH entre 4-8, para este mismo tiempo en la condición infectada se seleccionaron 3 spots de bajo y medio peso molecular de pH entre 4 a 9. Por último, para las 24 horas en las proteínas del tejido sano se seleccionaron 4 proteínas de alto peso molecular con pH entre 6-8 y para las 24 hpi se seleccionó un spot de aproximadamente 40 kDa y pH 8.

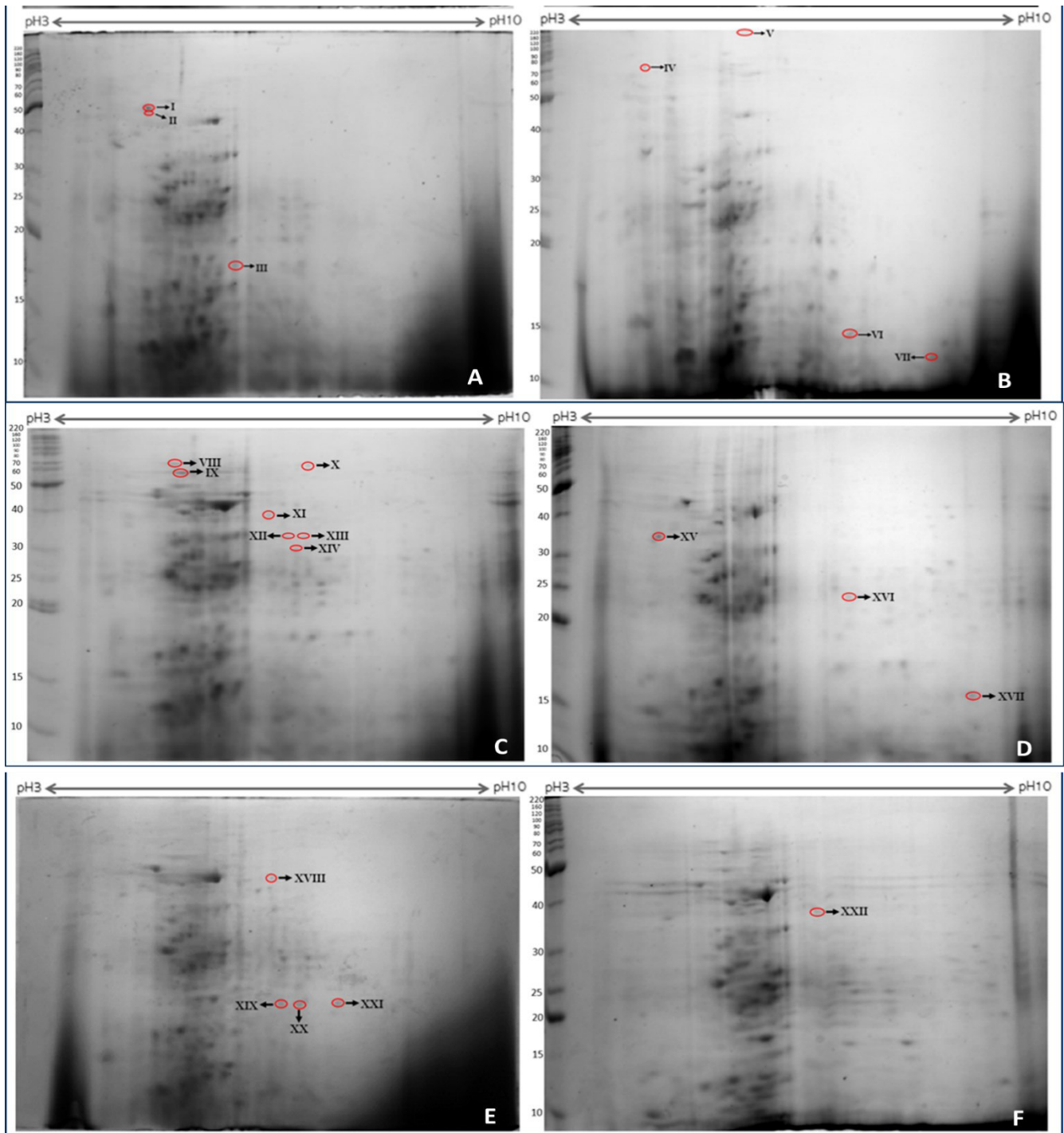


Figura 37.- disposición de los spots en gels de 2D enviados a identificar, A spots seleccionados de las 6 hsi, B spots seleccionados de las 6 hpi, C spots seleccionados de las 12 hsi, D spots seleccionados de las 12 hpi, E spots seleccionados de las 24 hsi, F spots seleccionados de las 24 hpi.

Como resultado de la identificación de los spots anteriores se originó la tabla 28, donde se observan las secuencias de las proteínas resultantes junto con su posible identidad, así como los parámetros para validar la misma, parámetros arrojados por el software MASCOT.

Tabla 28.- Identidad de las proteínas usando el programa MASCOT

Identificador	Identidad	Prot score	Prot matches	Prot cover	Prot pi	Pep miss	Pep expect	EmPAI
12HSI (XII)	protein disulfide-isomerase A3 [Spodoptera litura]	120	3	8.4	5.59	0	5.10E-05	0.2
12HSI (XIII)	protein disulfide-isomerase A3 [Spodoptera litura]	190	4	11.4	5.59	0	1.90E-05	0.31
12HSI (XIV)	vesicle-associated membrane protein-associated protein B isoform X1 [Spodoptera litura]	120	2	8.6	6.97	0	2.90E-05	0.24
12HPI (XV)	myosin heavy chain, muscle isoform X7 [Spodoptera litura]	101	2	1	5.44	0	0.00028	0.03
12HPI (XVI)	enoyl-CoA hydratase, mitochondrial [Spodoptera litura]	65	1	3.8	8.87	0	9.50E-06	0.11
12HPI (XVII)	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase isoform X2 [Spodoptera litura]	114	3	14.5	8.44	0	4.20E-05	0.45
24HSI (XVIII)	midgut class 3 aminopeptidase N [Spodoptera exigua]	57	1	0.9	5.19	0	0.00015	0.03
24HSI (XIX)	heat shock cognate 70 protein [Spodoptera frugiperda]	51	1	1.8	5.2	0	0.00056	0.05
24HSI (XX)	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Spodoptera litura]	40	1	2.4	5.23	0	0.00069	0.05
24HSI (XXI)	muscle-specific protein 20 [Spodoptera litura]	92	2	13	8.45	0	0.00035	0.39
24HPI (XXII)	14-3-3 protein epsilon [Spodoptera litura]	42	1	7.6	4.74	0	0.0026	0.12

Para las 9 primeras proteínas que correspondieron a las 6 hsi, 6 hpi y a las 12 hsi, el analizador no arrojó significancia indicando que la concentración de muestra era demasiado endeble o sufrió algún proceso de degradación derivado del

procedimiento de extracción del spot, durante el almacenamiento o transporte, así mismo pudo existir un error al momento de la extracción y eso hacer que no se colectara muestra para ser detectada.

En relación a las 12 horas el primer spot detectado marcado con el número XII de aproximadamente 40 kDa en gel, con p_i (punto isoelectrico) según el análisis de pH 5.59 y peso de 37 kDa, dio similitud con una desulfuro isomerasa, lo mismo sucedió con el spot XI a las 12 hsi, el cual tiene un peso molecular de menos de 40 kDa y el p_i calculado es de 5.59, estos dos spots fueron identificados por MS/MS como las mismas proteínas, los genes de esta proteína por PCR y macroarreglos fueron detectadas como reguladas negativamente por el tejido infectado a las 6 y a las 12 horas, es decir la cantidad de transcritos presentes en el tejido estaba bajando en este tiempo post infección, pero los niveles de expresión seguían presentes, esto se ve traducido en la detección de este spot como “ausente” en las proteínas del tejido infectado y detectado por MS/MS en el tejido sano, lo que indica que la baja en el nivel de expresión del gen está repercutiendo en la concentración de esta proteína en el tejido infectado, comparado con el tejido sano.

La proteína anterior la relacionamos previamente con una función de defensa celular ante el proceso de infección dado su papel en la regulación del complejo de la NADPH oxidasa, ya que el disulfuro isomerasa actúa como regulador positivo, es decir, aumentando su actividad (Fernandes et al. 2009) y tomando en cuenta que este sistema es la mayor fuente de estrés oxidativo, serian un candidato idóneo para desencadenar una apoptosis por estrés oxidativo en las células infectadas. Aunque para probar todo esto aun es necesario realizar más estudios.

La tercera proteína que se determinó su identidad es la XIV correspondiente al tejido sano analizado a las 12 horas con un peso molecular cercano a las 30 kDa, la cual correspondió con una proteína asociada B, asociada a las vesículas asociadas a la membrana (VAPB por sus siglas en inglés) esta proteína no fue detectada por el proceso de expresión diferencial con la técnica de SSH por lo que no fue analizada por macro arreglos ni se han desarrollarlo oligonucleótidos hasta el día de hoy, sin embargo a las 12 horas fue determinada como una proteína presente

en el tejido sano que no se encontró en el tejido infectado, por lo que podría haber sido apagada por el proceso de infección, esta proteína se localiza normalmente en el retículo endoplásmico sin una función primaria clave hasta hoy en día sin embargo se le ha asociado con la esclerosis lateral amiotrófica, así como se le ha relacionado con una disrupción de la permeabilidad al Ca^{+} por parte de la VAPB sin la mutación que causa la enfermedad mencionada anteriormente, lo que provoca la muerte celular por una permeabilidad al calcio por parte de la mitocondria, e incluso se la relacionado con el estrés del retículo endoplásmico (De Vos et al., 2012; Langou et al., 2010; Morotz et al., 2012) tomando en cuenta las funciones en la regulación de la homeostasis y el estrés del retículo endoplásmico, podría ser posible que esta proteína esté involucrada en la muerte de las células columnares del intestino medio durante el proceso de infección primaria de los baculovirus como un sistema de defensa celular a la infección.

Lo anterior por estar siendo encontrada en el tejido sano y no en el infectado, sin embargo, podría estar llevando a cabo otras funciones dentro de las células, que no tengan que ver con lo descrito anteriormente, por lo que determinar el nivel de expresión de estas en el tejido infectado comparándolo con el tejido sano podría dilucidar más información acerca de que beneficio para el virus tiene deshacerse de esta proteína.

La cuarta proteína identificada fue la cadena pesada de la miosina (proteína número XV) de entre 30 a 40 kDa en el gel pero que según la literatura tiene un peso cercano a 224 kDa (Carlsson et al., 2017), la cual está relacionada con el movimiento muscular, esta misma proteína durante su etapa de expresión genética sufre múltiples procesos de splicing alternativo que da origen a 7 proteínas como variantes (Feher, 2017), la literatura nos marca que cada uno de las variantes se expresa en células específicas y que incluso algunas variantes de estas proteínas se encuentran únicamente en tejidos específicos, sin embargo todas estas variantes se tienen la característica de unirse al a actina y gracias al motor de ATPasa que poseen pueden regular los movimientos musculares por la degradación de ATP, de estas variantes, recientemente se encontró que la variante alfa de esta sub unidad, estaba

relacionada con la muerte de células cardiacas durante etapas de estrés (Carlsson et al., 2017), sin embargo no se ha encontrado que esta sub unidad sea expresada por lo insectos ni mucho menos en el intestino medio de los mismos. Por lo que la función de que se exprese dicha proteína en el intestino infectado a las 12 horas queda sin respuesta, aunado a la observación que el peso molecular no corresponde con lo identificado.

La quinta proteína identificada fue la enoyl-CoA hidratasa, mitocondrial identificada como el número XVI para la cual se identificó por masas un posible peso de 31 kDa y el gel arrojó una de aproximadamente entre 25 a 30 kDa, así mismo el isoelectroenfoque la colocó en un pi de aproximadamente 8 y el análisis le da un pi de 8.87. Dentro de la función primaria de esta proteína encontramos que participa en la beta oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria, sin embargo, esta proteína tiene un importante papel en la formación de carcinomas ya que se ha encontrado que al momento de desarrollarse dicho fenómeno, el nivel de expresión del gen de la *Enoyl Coenzima A hidratasa* sufre una reducción, esos mismos estudios también plantean que la Enoyl Coenzima A hidratasa interacciona con la proteína HBs, lo que cause que este complejo afecte la localización del complejo ECHS1 teniendo como consecuencia la apoptosis por perdida de permeabilidad de la mitocondria (Fratelli et al., 2003; Xiao et al., 2013).

En este trabajo se encontró la proteína enoyl-CoA hidratasa mitocondrial en forma abundante en el tejido infectado en el estudio proteómico, sin embargo, por su función primaria debe estar presente en el tejido sano, que para confirmarlo es necesario generar oligonucleótidos específicos para este gen y aislarlo, así mismo determinar su nivel de expresión relativa, con lo que podríamos corroborar que el proceso de infección altera la cantidad de transcritos de este gen, lo que podría explicar por qué lo detectamos como una proteína presente en el tejido infectado y que aparentemente no está en el tejido sano, esto nos indicaría que desde las 12 horas hay un daño a la mitocondria que podría desencadenar desde las 12 horas apoptosis en las células infectadas, lo que probablemente está siendo inhibido por la infección viral pero aún no se ha descubierto dicho mecanismo molecular.

La sexta proteína identificada fue la Peptidyl-Prolyl cis-trans-isomerasa (Pin-1) la cual fue identificada con el número XVII, esta proteína se le calculo un peso molecular de 17 kDa, en el gel de 2D se encontró con un peso entre las 15-20kDa, el punto isoeléctrico calculado fue de 8.44, en cuanto al observado queda entre el pi de 8 -9. Esta proteína fue encontrada en el tejido infectado a las 12 horas y aparentemente se encontraba ausente o en muy baja cantidad en el tejido sano, dentro de las múltiples funciones que tiene esta proteína, recientemente se ha encontrado que una sobre expresión de esta en la línea celular HeLa está relacionada con un arresto del ciclo celular en la etapa G2 y es esencial para la progresión del ciclo celular (Lu et al., 1996; Samanta et al., 2018).

Con lo descrito anteriormente podríamos deducir que la posible sobre expresión esta proteína está siendo controlada por el virus, pues está bien documentado que los procesos de infección viral desencadenan un arresto del ciclo celular en la fase G2 (Saito et al., 2002), este arresto es crucial para el desarrollo correcto de la infección vira y la expresión de los genes virales, en este trabajo se encontró como una proteína que no era por lo menos visible en el tejido sano a las 12 horas, indicando un proceso de sobre expresión del mismo, lo que aun debe ser investigado, esta sobre expresión concuerda con lo reportado por Lu et al., 1996 y Samanta et al., 2018, quienes detectaron que una sobre expresión de la peptidyl-prolil cis-trans isomerasa se relaciona con el arresto del ciclo celular. En este punto tenemos una prueba de un posible mecanismo celular que controla el arresto del ciclo celular en el intestino medio a las 12 horas durante la infección por baculovirus.

La séptima proteína identificada con el número XIII, se determinó su identidad como la aminopeptidasa del intestino medio, el peso calculado de esta proteína fue de 114 kDa, y un pi de 5.19, en gel el peso molecular fue de más de 50 kDa y el pi de entre 5-6, esta proteína tiene como función principal digerir alimento y como función secundaria se ha determinado que es el sitio de reconocimiento de las toxinas Cry, en la familia de los lepidópteros (Nakanishi et al., 2002; Ningshen et al., 2013). Esta proteína fue encontrada como apagada por el proceso de infección a las 24 horas, lo que no queda claro es cuál puede ser el beneficio de apagar esta

proteína durante el proceso de infección por baculovirus en el intestino medio en este tiempo.

La octava proteína encontrada fue una proteína de choque térmico HSP 70 identificada con el número XIX, con un peso molecular calculado de 7 kDa y uno que ronda los 15 kDa en gel, el pi calculado es de 5.2 y en gel se encuentra entre 5-6, esta proteína fue encontrada en el tejido sano a las 24 horas y ausente en el tejido infectado. Este fenómeno lo reconocemos como extraño pues las proteínas de choque termino normalmente son sobre expresadas por la infección viral en las etapas tardías del proceso (Koczka et al. 2018, Salem et al. 2011, Huang et al. 2018, Breitenbach et al. 2011, Bao et al. 2010), este proceso bien podría ser un error de identificación pues este tipo de proteínas es de importancia para el virus en etapas tardías para sopesar el sistema UPR y el correcto plegamiento de las proteínas, más sin embargo encontramos por PCR y macro arreglos a las 24 horas que el gen de la proteína HSP 90 se sobre expreso en el tejido infectado, lo que contrasta con lo observado en esta proteína.

La novena proteína codificada como XX, encontrada correspondió a la subunidad A catalítica de la ATPasa de tipo V (protón) la cual mostro un pi calculado de 5.23 y un peso de 6 kDa, en el gel de la figura 37 E se encontró alrededor de las 15 kDa y un pi entre 5-6, esta subunidad corresponde a la parte catalítica de la ATPasa de tipo V (vacuolar) que está relacionada con un control del tráfico vesicular dentro y fuera del citoplasma celular en las células eucariotas por una acidificación de las vacuolas (Marshansky & Futai, 2008), esta misma holoenzima está relacionada en *Manduca sexta* con un flujo de K⁺, que combinado con la estequiometria de K⁺/2H⁺ se encargan de mantener un pH elevado en el intestino de los insectos y un potencial electrico en las células Golbet (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Jefferies et al., 2008). Otra función que se le asociado a esta proteína es ser un motor de entrada de las vacuolas que usan ciertos virus y toxinas para entrar en las células (Marshansky and Futai, 2008, Jefferies et al., 2008, Beyenbach and Wieczorek, 2006).

En este trabajo la proteina identificada como subunidad A catalitica fue encontrada como apagada, pues solo se encontro en el tejido sano a las 24 horas,

debido a sus funciones y como lo menciona Beyenbach y Wieczorek, este efecto puede deberse a la falta de alimento, ya que ellos encontraron que al dejar de alimentarse algunas porciones de la ATPasa de tipo V eran encendidas de las células Globet, indicando algún tipo de control de estas células para mantener el potencial básico en el intestino (Beyenbach y Wieczorek, 2006), sin embargo no podemos precisar que las larvas infectadas dejen de alimentarse a las 24 horas, ya que aun a los 3-4 días después de la infección siguen alimentándose. Es posible que la función de este gen este relacionada con el transporte dentro de las células o bien, sea un indicativo de la pérdida del potencial de membrana lo que aunado a lo descrito en los genes sobre expresados y proteínas apagadas a las 24 hpi, sería un fuerte indicativo de las primeras etapas del inicio de la muerte celular programada ya que podría provocar una disminución del pH celular interno (Gottlieb et al., 1995), sin embargo en este punto no es posible definir esto.

La décima proteína encontrada fue el enumerado como XXI, que correspondió a la proteína muscular específica 20, dicha proteína tiene un peso molecular calculado de 20 kDa y en gel mostró un peso similar, en cuanto al pI calculado es de 8.45, lo que concuerda con el observado que es en promedio de 8-9. Esta proteína fue encontrada como apagada por el proceso de infección a las 24 horas, pues solo se encuentra en el tejido sano; el gen de dicha proteína fue encontrado a las 6 horas por SSH y macroarreglos como apagado por el proceso de infección, sin embargo, por PCR con los oligonucleótidos de este gen, tenía presencia en todas las condiciones, por lo que es necesario determinar su nivel de expresión relativa por PCR en tiempo real para conocer realmente su comportamiento.

La proteína anterior como ya se discutió no ha sido estudiada en ningún nivel por lo que no existe información suficiente para discutirla, salvo el dominio que comparten con las calponinas las cuales se cree tienen un papel en procesos regulatorios dentro de la célula, como el reconocimiento de actina, la polimerización de esta y la asociación con metaloproteasas lo que puede causar degradación de proteínas (Gimona et al., 2003, Rozenblum and Gimona, 2008) sin embargo la familia de las calponinas es demasiado amplia y con funciones variadas lo que hace poco

probable anotar una posible función de esta proteína sin un correcto conocimiento de la misma.

Por último, la proteína con el identificador XXII que se encontraba en el tejido infectado a las 24 horas, fue identificada como la 14-3-3 proteína épsilon, dicha proteína tiene un peso calculado de 29 kDa, mostrando un peso en gel de entre 30-40 kDa, el pI calculado es de 7.6 mientras que el pI observado se encuentra entre 7-8. Estas familias de proteínas 14-3-3 se encuentran ampliamente distribuida en los eucariotas y procariotas contando con múltiples isoformas (β , γ , ϵ , η , σ , τ , and ζ) controlando procesos celulares variados (Pennington et al., 2018), en cuanto a la subunidad épsilon que fue la que detectamos en este tiempo post infección, encontramos que esta reportada como una inhibidora en su porción C-terminal, de la quinasa C (Jones et al., 1995), esta acción inhibitoria de la 14-3-3 proteína épsilon también ha sido encontrada en células cancerosas donde una inhibición de esta proteína tiene como consecuencia la apoptosis celular (Liou et al., 2007).

Con la información encontrada anteriormente podemos afirmar que la expresión de 14-3-3 proteína épsilon a las 24 horas podría estar relacionada con un intento de la infección viral de inhibir el proceso apoptótico descrito anteriormente con los genes sobre expresados a las 24 horas, como el gen de la *fosfoproteína* y la *proteína ribosomal L19* quienes podrían estar activando la apoptosis en etapas tardías del proceso infectivo por una regulación de la caspasa 9 por la fosfoproteína y del sistema UPR por L19.

Aminopeptidasa

En este mismo trabajo en la parte de proteómica a las 24 horas, se detectó una proteína apagada por la infección, figura 37 spot XVIII de la sección de “identificación de proteínas diferenciales”. Esta proteína al ser identificada por masas/masas en el IPICT presentó un péptido con similitud a la aminopeptidasa del tipo N de la clase 3 (APN3 por sus siglas en inglés) con un EmPAI cercano a cero de 0.03. Estas aminopeptidasas se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos, las del tipo N se encuentran a su vez localizadas en las células del

intestino medio de los lepidópteros (Crava et al., 2010) cumpliendo la función principal de ayudar a degradar alimentos en el intestino medio de los insectos.

Una de las funciones secundarias de las APN está estrechamente relacionado con el mecanismo de acción de las toxinas *Cry*, pues entre las proteínas que sirven de anclaje para las toxinas de *Bacillus thuringiensis* son de gran relevancia las APN (Da Silva et al., 2018). Estas proteínas están divididas entre 7 clases (Crava et al., 2010) o 9 clases diferentes (7 ya comprobadas y dos posibles nuevas clases) (Angelucci et al., 2008). Sin embargo, los porcentajes de identidad entre los miembros de una misma clase varían en grandes proporciones desde un 56% para los miembros de la clase 5, como la identidad más baja, hasta 67% como rango más alto de la clase 4. Aunado a lo anterior si se comparan los % de identidad entre las diferentes clases de APN se observa que este no sobre pasa el 38% como máximo entre todas las clases, ese valor se encuentra entre APN1 y APN3 (Pigott & Ellar, 2007) quienes están reportadas en la literatura como las que más similitud guardan entre si (Hughes, 2014).

Esta reportado que un mismo organismo puede expresar hasta 7 clases diferentes de APN como es el caso de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Angelucci et al., 2008) y es muy posible que estas varíen entre los 900 y más de 1,000 aminoácidos. En cuestión del peso Angelucci y colaboradores en el 2008, no hace referencia al posible peso molecular de éstas, pero si a que puede oscilar entre los 90 a 140 kDa según lo reportado por Pigott y Ellar en el 2007 o bien podría darse el caso como lo reportado por Da Silva y colaboradores en el 2018 quienes sugieren que es posible que algunas APN sean de menor peso molecular alrededor de los 50 kDa debido a posibles degradaciones y a la gran abundancia de las APN en el instestino de los insectos. Estos mismos autores mencionan que las posibles APN involucradas en el reconocimiento de las toxinas *Cry* podrían ser APN1, APN2, APN3 y APN4 (Da Silva et al., 2018).

En este trabajo gracias al analisis previo de la expresión diferencial de proteínas en el instestino medio de larvas de *S. frugiperda*, sometidas al efecto de la infección primaria por parte del baculovirus SfNPV-Ar, se encontró a las 24 horas en

el tejido infectado por el baculovirus SfNPV-Ar por masas/masas, un fragmento de una proteína de aproximadamente 50 kDa que había sido apagada por el proceso de infección. La identidad de dicho fragmento de la proteína correspondió a la aminopeptidasa de clase 3 (APN3) de *Spodoptera exigua*.

Al descargar las secuencias de las aminopeptidasas reportadas por Carava et al., 2010, se procedió a realizar la búsqueda del marco de lectura abierto iniciando en el ATG y terminando en alguno de los tres posibles codones de paro, para lo cual se usó el programa UGEN UNIPRO, una vez determinados los marcos de lectura se procedió a realizar el alineamiento múltiple con el programa MEGA-X, al realizar el alineamiento visualizamos que la identidad entre las secuencias era cercano al 38%, lo que concuerda con lo reportado por Pigott y Ellar, 2007, resultando la zona central la región más conservada, en cambio hacia los extremos se observó el porcentaje de identidad es casi nulo.

Debido a esto se buscó la zona conservada reportada por Crava et al., 2010 quien refiere dos posibles secuencias repetidas en los motivos de las proteínas las cuales fueron: AFPCYDEP y AGAMENWG. Dichas secuencias fueron traducidas a sus múltiples posibilidades resultando las secuencias GCGTTCCTTGCTACGATGAACCT y GCTGGTGCTATGGAAAACCTGGGGC las que correspondían a estas secuencias respectivamente, según UGEN. Una vez determinado lo anterior se procedió a realizar una búsqueda en la base de datos de BIPAA donde un gen de aproximadamente 3201 pb presentaba las dos posibles regiones (>GSSPFG00025752001.1-RA gene=GSSPFG00025752001). Al alinear esta secuencia con las reportadas por Crava et al., 2010 las secuencias mostraban baja similitud lo que corresponde con lo dicho por Pigott y Ellar, 2007. Debido a eso se utilizó como molde la secuencia reportada en BIPAA para diseñar dos juegos de oligonucleótidos los cuales se observan en la tabla 29. El primer par (APN D y R) se diseñó con el objetivo de extraer el gen completo. Al realizar PCR con la enzima de alta fidelidad SuperFi invitrogen con los oligos en el ADN de *S. frugiperda* no se observó amplificación. Al tratar de realizar el mismo procedimiento en el cDNA de las diferentes condiciones nuevamente no se observó amplificación (figura 38).

Tabla 29.- Oligonucleótidos para la APN completa e interna.

Gen	Oligonucleótido Directo/reverso	Amplificación	Tm °C	%GC
APN				
D	ATGTCGACTTATCTTCTGGCT	3201 pb	53.3	42.9
R	TTACAATAAAATTACATACCTGTAGGTT		51	25
Apn interno				
D	CCTTGCTACGATGAACCTGGC	410 pb	58.3	57.5
R	CAGTTTTCCATAGCACCAGCG		56.5	52.4

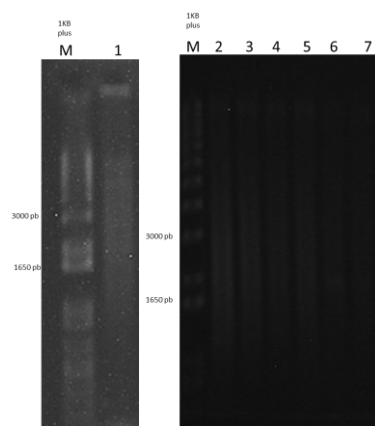


Figura 38.- PCR Con los oligonucleótidos de la aminopeptidasa completa. carril 1 PCR con el ADN de *S. frugiperda*, carril 2 PCR con el cDNA de las 6 hsi, carril 3 PCR con el cDNA de las 6 hpi, carril 4 PCR con el cDNA de las 12 hsi, carril 5 PCR con el cDNA de las 12 hpi, carril 6 PCR con el cDNA de las 24 hsi y carril 7 PCR con el cDNA de las 24 hpi.

Debido a la falta de amplificación con los oligonucleótidos APN D y R, se decidió diseñar un nuevo par de oligonucleótidos enfocados en las zonas conservadas dictadas por Crava et al., 2010 haciendo una transcripción inversa de estos sitios conservados. Para lo cual se partió de la secuencia de aminoácidos AFPCYDEP como directa al encontrarse en el extremo N-terminal y se tomó en consideración la secuencia AGAMENWG como reverso al encontrarse en el extremo C-terminal. En base a dichas secuencias predijó la secuencia de nucleótidos con ayuda del programa Ugen quedando: GCGTTCCTTGCTACGATGAACCT para el fragmento de aminoácidos AFPCYDEP y la secuencia de nucleótidos GCTGGTGCTATGGAAAAGTGGGGC para el fragmento de aminoácidos AGAMENWG. Las secuencias de nucleótidos predichas fueron la base para

desarrollar los oligonucleotidos Apn interno D y R, mencionados en la tabla 29, con los cuales se amplificó una region de aproximadamente 410 pb (figura 39 carril 1) donde se observó un amplicón de aproximadamente 1,000 pb correspondiente al la región interna del APN del ADN de *S. furiéperda*. En el carril 2 de la figura 39 se observó el PCR con los mismo cebadores pero al cDNA de las 24 hsi observandose un amplicon menor al del amplicon anterior, siendo este de aproximadamente 500 pb, ambos con la polimersa recombinante (invitrogen Taq DNA Polymerase, recombinant). Lo anterior a una temperatura de alineamiento de 60°C cercana a la temperatura optima para los cebadores diseñados según la tabla 29. En la figura 39 para todos los carriles se utilizó la polimerasa de alta fidelidad SuperFi II (Invitrogen Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase) y los oligonucleótidos APN int D y R a una temperatura de alineamiento de 65°C; en el carril 3 se observó la amplificación del fragmento interno para el cDNA de las 6 hsi de aproximadamente 300 pb y uno superior de aproximadamente 500 pb, este fenomeno fue observado en los carriles 5, 6 y 7, que correspondieron al cDNA de las 12 hsi, 12 hpi y 24 hsi, sin embargo, en el carril 4 y 8 correspondientes al cDNA de las 6 hpi así como las 24 hpi respectivamente, no se observó dicho fenómeno.

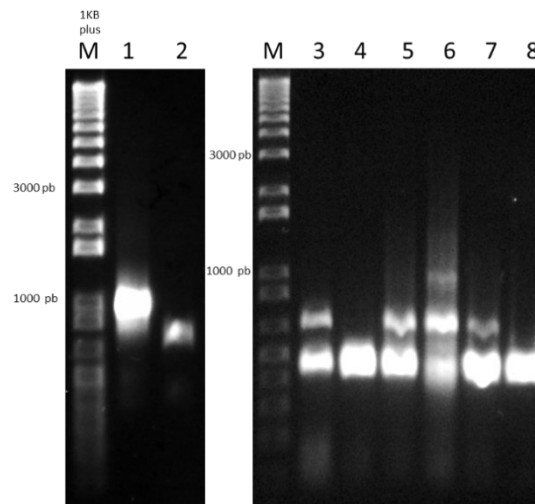


Figura 39.- PCR con los oligonucleótidos de la APN interna, carril 1 al DNA de *S. frugiperda*, carril 2 al cDNA de las 24 hsi, carril 3 al cDNA de las 6 hsi, carril 4 al cDNA de las 6 hpi, carril 5 al cDNA de las 12 hsi, carril 6 al cDNA de las 12 hpi, carril 7 al cDNA de las 24 hsi, carril 8 al cDNA de las 24 hpi.

El fragmento de aproximadamente 500pb observado en la figura 39 en los carriles 3, 5, 6 y 7 correspondientes a las 6 hsi, 12 hsi, 12 hpi y 24 hpi, sobresale pues como mencionan Pigott y Ellar en el 2007 y Da silva et al en el 2010, los lepidopteros son capaces de expresar múltiples isoformas de APN, las cuales pueden afectar la unión o no de la toxina *Cry*. Por ese motivo se purificaron estos dos fragmentos de APN denominándolos APN Superior e Inferior en función a su peso molecular de 500 y 300 pb aproximadamente, los resultados se observaron en la figura 39, donde en el carril 1 se observó la APN superior de aproximadamente 500 pb y en el carril 2 se observó la APN inferior de aproximadamente 300 pb. Estos fragmentos purificados se digirieron con la enzima ANZA 19 (*BglII* invitrogen), liberando un fragmento de aproximadamente 300 pb (figura 40 carril 3) similar al observado en el carril 4 que corresponde a la APN inferior, la cual no fue digerida por *BglIII*. El paso posterior fue la secuenciación de los fragmentos completos para determinar su identidad usando los oligonucleótidos APN int D y R mencionados en la tabla 29, las muestras purificadas se enviaron para este proposito a Corea, a la empresa MacroGen.

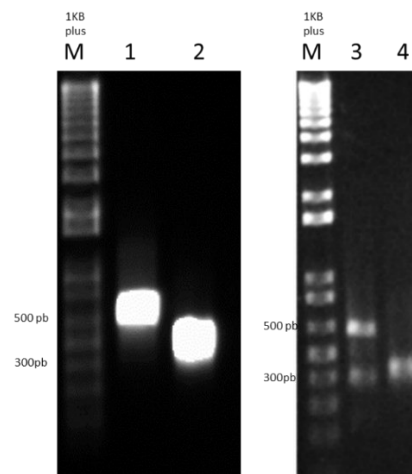


Figura 40.- PCR purificado de las APN superiores (carril 1) y APN inferior (carril 2), digestión de APN superior con *BglIII* carril 3 y digestión con *GblIII* de APN inferior.

Una vez que se obtuvieron las secuencias tanto directas como reversas de la APN superior (500 pb) y APN inferior (300 pb) estas fueron ensambladas usando el programa SeqMan, una vez ensambladas las secuencias concensose alienaron con ayuda del programa MEGA-X usando el algoritmo MUSCLE, donde se determinó

que el porcentaje de similitud entre la APN superior e inferior fue de aproximadamente 99%. Por lo cual realizamos un nuevo alineamiento de esas dos secuencias, pero ahora con el programa SnapGen, lo que determinó un porcentaje de similitud entre las dos secuencias de APN del 99%. en la figura 41 se puede observar el último alineamiento en el programa SnapGen, donde se observó que los extremos de la secuencia del APN superior son diferentes a APN inferior, al realizar la búsqueda interna de la secuencia de corte de BgIII, esta no se encontró en la secuencia amplificada de APN superior. Se esperaba encontrar esta secuencia de corte, en la parte interna, de igual manera se esperaba encontrar un fragmento interno como producto de las modificaciones post-transcripcionales extra en APN superior. Sin embargo, no fue así, indicando que tanto el sitio probable de corte de BgIII como el resto de la secuencia que no está presente en APN inferior, se encuentra en los extremos tanto 5' como el 3' de la APN superior.

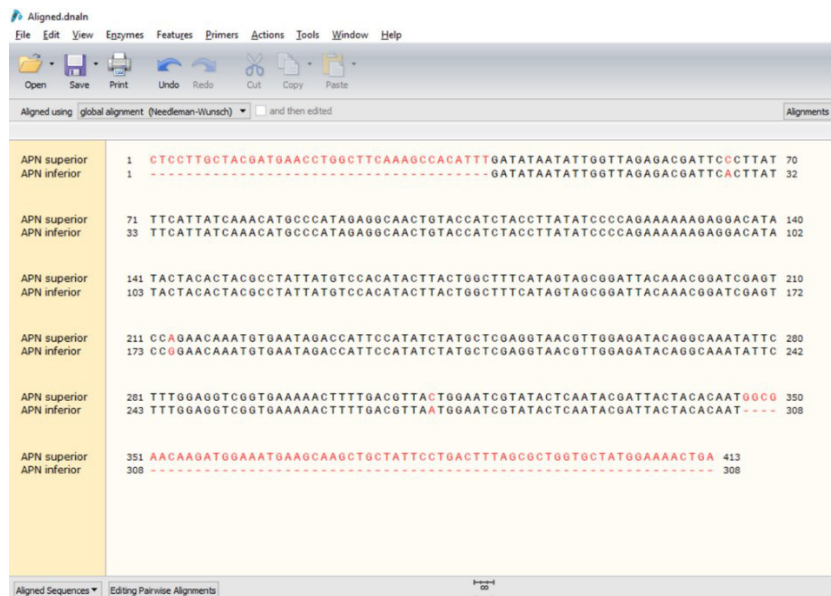


Figura 41.- Alineamiento de APN Superior y APN inferior en el programa SnapGen

Sin embargo, aún y con estos resultados, al tener la secuencia consenso de una zona conservada de la APN, se observó que tanto el fragmento superior como el inferior, poseían un 99% de similitud, y por ello se decidió diseñar los oligonucleótidos para PCR en tiempo real, cuya secuencia se puede observar en la

tabla 29, junto con sus propiedades, estos oligonucleótidos podrían dilucidar el nivel de expresión de este gen en los intestinos infectados.

De igual manera las secuencias obtenidas de los fragmentos internos ayudaría junto con el uso de la técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) y nuevos oligonucleótidos sintetizados a partir de estas secuencias, a obtener la secuencia completa del gen, lo que permitiría clasificar a la APN de *S. frugiperda*.

A título personal, el estudio del efecto de la infección de los baculovirus sobre la expresión de las APN, podría ayudar a dilucidar un efecto característico observado al usar combinación del entomopatógeno más usado a nivel de campo (*Bacillus thuringiensis*) y baculovirus, los cuales normalmente tienen como efecto una disminución en la mortalidad a medida que se aumenta la concentración de los baculovirus en las formulaciones. Sin embargo, este efecto a nivel molecular es aún inexplorado, hasta la realización de este escrito.

Tabla 29.- Oligonucleótidos para realizar qPCR para APN.

Gen	Oligonucleótido Directo/reverso	Amplificación pb	Tm °C	%GC	ΔG hairping Kcal/mol	Tm hairping °C	ΔG homodimero Kcal/mol	ΔG heterodimero Kcal/mol
APN qPCR								
D	GATCGAGTCCAGAACAAATGTG	95 PB	61.2	45.5	-0.18	26.47	-6.79	-5.19
R	TTTCACCGACCTCCAAAGAAT		62	42.9	0.27	20.3	-3.87	

Como resultado de la identificación de los genes y proteínas diferenciales a las 6, 12 y 24 hpi, en las células columnares de *S. frugiperda* infectadas con SfNPV-Ar; fue posible concluir que la infección afectó procesos celulares vitales tanto para el desarrollo celular como procesos necesarios que permitieron la replicación del virus, lo cual ayudó a controlar los procesos de defensa celulares y activar los mecanismos de muerte celular en las etapas tardías de la infección, teniendo como consecuencia el control eficiente del organismo infectado con el baculovirus, corroborando con estas observaciones la hipótesis planteada originalmente. Dichas interacciones fueron registradas en la figura 42, donde se observó a las 6 hpi afectaciones en el estrés oxidativo, plegamiento de proteínas, apagado de rutas apoptóticas, arresto del ciclo celular, el tráfico de lípidos e inicio del rearrreglo del

citoesqueleto. El estrés oxidativo, el apagado de rutas apoptóticas, el arresto del ciclo celular y el rearrreglo del citoesqueleto se mantienen reguladas hasta las 12 hpi, donde también se da una interferencia en la maduración del RNA. Por último, el rearrreglo del citoesqueleto, el arresto del ciclo celular y el incremento del metabolismo fueron apagados a las 24 hpi junto con el procesamiento de nutrientes, mientras que, en ese mismo tiempo, la principal ruta activada fueron rutas apoptóticas, las cuales interesantemente habían sido apagadas entre las 6 y 12 hpi.

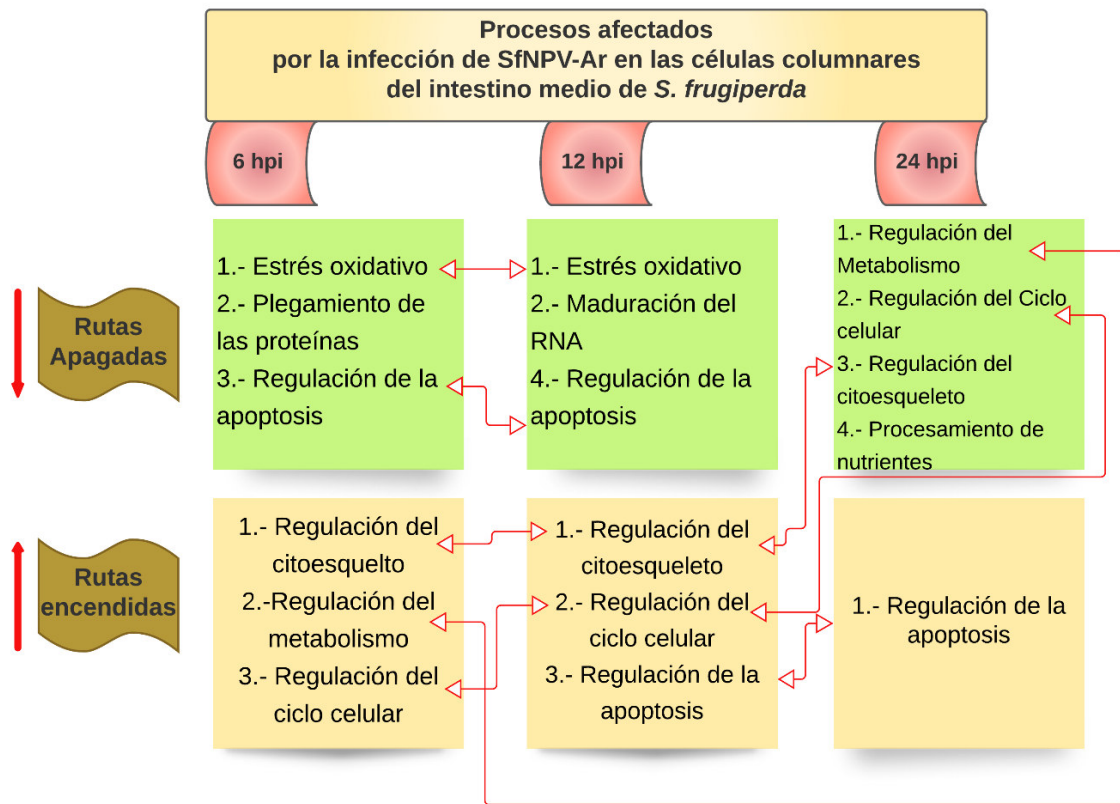


Figura 42.- Diagrama de interacciones de las rutas celulares afectadas por la infección de SfNPV-Ar en las células de *S. frugiperda*.

Conclusiones

Se estableció una colonia de *S. frugiperda* en el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la Universidad de Guanajuato. La cual se usó para determinar a la dosis de 6×10^6 co/larva como la más apta para realizar la infección de larvas de tercer instar de *S. frugiperda*.

Dentro de los genes y proteínas apagadas a través del proceso de infección, se encontraron a las 6 hpi genes relacionados con el estrés oxidativo, el plegamiento de las proteínas y la regulación de la apoptosis; a las 12 hpi se detectaron genes y proteínas relacionados al estrés oxidativo, genes relacionados con modificaciones del cito esqueleto, maduración del RNA; y proteínas relacionadas con la apoptosis. Para las 24 horas se detectaron genes relacionados al metabolismo, el ciclo celular y el citoesqueleto, mientras que las proteínas en este tiempo se relacionaron con la degradación del alimento, mantenimiento del pH básico en el intestino y el citoesqueleto.

Dentro de los genes y proteínas encendidos por la infección, se detectaron a las 6 hpi genes relacionados con el citoesqueleto, el metabolismo y el ciclo celular; a las 12 hpi, se detectó una continuidad en la regulación del citoesqueleto y el arresto del ciclo celular, en este mismo tiempo se detectaron los primeros genes y proteínas relacionados a una activación del proceso apoptótico; finalmente a las 24 hpi se detectaron tanto genes como proteínas relacionados con la apoptosis, siendo estos últimos los principales detectados en este tiempo.

Con los intestinos infectados de larvas de *S. frugiperda* usando métodos transcriptómico y proteómicos, se determinó con bases moleculares los efectos que de la infección del baculovirus SfNPV-Ar sobre las células columnares. Estos efectos fueron:

La activación de un sistema de defensa celular ante la infección basado en el aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno a las 6 hpi, con el apagado del gen Prx-1. Que se vio acompañado de un sistema de defensa ante la producción de especies reactivas de oxígeno con el apagado del gen Pdi. Con lo que

el virus podría modular el efecto antiviral del peróxido y de esta manera poder continuar con la infección.

La modificación de la arquitectura celular influenciada por el virus entre las 6 y 12 horas con la sobre expresión del gen de la subunidad 2 de ARP 2/3 y la proteína de la cadena pesada de la miosina. Este arreglo es vital para una correcta formación de las NC, lo que se da a las 12 h. Las observaciones registradas en el presente indican que desde las 6 horas se da el secuestro de la maquinaria necesaria para modificar el citoesqueleto.

El aumento en la movilización de lípidos en el citosol a las 6 horas con la sobre expresión de los genes FABP y ACBP, con la finalidad de aumentar el metabolismo celular o hacer frente a la oxidación lipídica causada por el acumulamiento de especies reactivas de oxígeno descrita anteriormente.

El arresto del ciclo celular con la sobre expresión del gen ribosomal L11 a las 6 hpi y de la proteína Pin-1 a las 12 hpi. El cual es vital para poder expresar los genes virales, replicar el ADN viral y formación de las nucleocápsides, lo observado en este trabajo sugirió que este fenómeno se activa desde las 6 horas y continua hasta las 12 hpi.

La activación de rutas relacionadas al proceso apoptótico a las 24 h, con la sobre expresión de los genes ribosomales 60s L19 y la fosfoproteína nuclear 32 rica en leucina, quienes pueden desencadenar la muerte celular programada. En este mismo tiempo se detectó un apagado de los genes relacionados con el metabolismo, el arreglo del citoesqueleto y arresto del ciclo celular, que se venían sobre expresando anteriormente.

Durante el desarrollo de la infección por métodos moleculares se detectaron genes y proteínas relacionadas con procesos físicos que corresponden con la infección viral, sorprendentemente a las 24 h, detectamos la sobre expresión de genes pro apoptóticos al igual que el apagado de los genes sobre expresados en las etapas iniciales de la infección; lo que podría sugerir el mecanismo por el cual las células del intestino medio se recuperan de la infección.

Bibliografía

- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W. Z., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., Rout, M. P., & Sali, A. (2007). Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature*, *450*(7170), 683-694. <https://doi.org/10.1038/nature06404>
- Alfonso, V., Maroniche, G. A., Reca, S. R., Lopez, M. G., del Vas, M., & Taboga, O. (2012). AcMNPV Core Gene ac109 Is Required for Budded Virion Transport to the Nucleus and for Occlusion of Viral Progeny. *Plos One*, *7*(9), Article e46146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046146>
- Angelucci, C., Barrett-Wilt, G. A., Hunt, D. F., Akhurst, R. J., East, P. D., Gordon, K. H., & Campbell, P. M. (2008). Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the delta-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*, *38*(7), 685-696. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.03.010>
- Aravind, L. (2000). The BED finger, a novel DNA-binding domain in chromatin-boundary-element-binding proteins and transposases. *Trends Biochem Sci*, *25*(9), 421-423.
- Asser-Kaiser, S., Radtke, P., El-Salamouny, S., Winstanley, D., & Jehle, J. A. (2011). Baculovirus resistance in codling moth (*Cydia pomonella* L.) caused by early block of virus replication. *Virology*, *410*(2), 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.021>
- Au, S., Wu, W., & Pante, N. (2013). Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame. *Viruses-Basel*, *5*(7), 1885-1900. <https://doi.org/10.3390/v5071885>
- Banerjee, D., Bhattacharyya, R., Kaul, D., & Sharma, P. (2011). DIABETES AND TUBERCULOSIS: ANALYSIS OF A PARADOX. *Advances in Clinical Chemistry*, Vol 53, 53, 139-153. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(11\)53006-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(11)53006-9)
- Bao, Y. Y., Lv, Z. Y., Liu, Z. B., Xue, J., Xu, Y. P., & Zhang, C. X. (2010). Comparative analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus responsive genes in fat body and haemocyte of *B. mori* resistant and susceptible strains. *Insect Mol Biol*, *19*(3), 347-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.00993.x>
- Bao, Y. Y., Tang, X. D., Lv, Z. Y., Wang, X. Y., Tian, C. H., Xu, Y. P., & Zhang, C. X. (2009). Gene expression profiling of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals nucleopolyhedrovirus-associated variations in host gene transcript levels. *Genomics*, *94*(2), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.003>
- Bergin, D., Reeves, E. P., Renwick, J., Wientjes, F. B., & Kavanagh, K. (2005). Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infection and Immunity*, *73*(7), 4161-4170. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.4161-4170.2005>
- Bernal, S. J. (2012). Biología, ecología y etiología de parasitoides. . In I. R. J. E. & M. O. P. (Eds.), *Memorias del XXIII Curso Nacional de Control Biológico* (pp. 95-108). Sociedad Mexicana de Control Biológico.

- Bertrand, E., & Fournier, M. (2000-2013). The snoRNPs and Related Machines: Ancient Devices That Mediate Maturation of rRNA and Other RNAs. In *Madame Curie Bioscience Database Landes Bioscience*.
- Beyenbach, K. W., & Wieczorek, H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, 209(4), 577. <https://doi.org/10.1242/jeb.02014>
- Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., & Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene*, 34(12), 1475-1486. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.96>
- Bradford, M. K., Whitworth, K., & Wendland, B. (2015). Pan1 regulates transitions between stages of clathrin-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 26(7), 1371-1385. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1510>
- Braunagel, S. C., Elton, D. M., Ma, H., & Summers, M. D. (1996). Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology*, 217(1), 97-110. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0097>
- Braunagel, S. C., & Summers, M. D. (2007). Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Current Drug Targets*, 8(10), 1084-1095. <https://doi.org/10.2174/138945007782151315>
- Breitenbach, J. E., Shelby, K. S., & Popham, H. J. R. (2011). Baculovirus Induced Transcripts in Hemocytes from the Larvae of *Heliothis virescens*. *Viruses-Basel*, 3(11), 2047-2064. <https://doi.org/10.3390/v3112047>
- Broehan, G., Zimoch, L., Wessels, A., Ertas, B., & Merzendorfer, H. (2007). A chymotrypsin-like serine protease interacts with the chitin synthase from the midgut of the tobacco hornworm. *Journal of Experimental Biology*, 210(20), 3636-3643. <https://doi.org/10.1242/jeb.008334>
- Brosché, M., Gittins, J. R., H., S., & Å., S. (2012). Molecular Marker Analysis. In D. Springer (Ed.), *Gene Expression Under Environmental Stresses* (Jain, S.M.Brar, D.S. Ahloowalia, B.S. ed.).
- Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Licari, P., Mankovich, J., Shi, L. F., Greenberg, A. H., Miller, L. K., & Wong, W. W. (1995). INHIBITION OF ICE FAMILY PROTEASES BY BACULOVIRUS ANTIAPOPTOTIC PROTEIN P35. *Science*, 269(5232), 1885-1888. <https://doi.org/10.1126/science.7569933>
- Byers, R. J., Hoyland, J. A., Dixon, J., & Freemont, A. J. (2000). Subtractive hybridization - genetic takeaways and the search for meaning. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(6), 391-404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00174.x>
- Carlsson, J., Danielsson, T., & Bergman, P. (2017). Two-peaked Increase of Serum Myosin Heavy Chain- α After Ironman Demonstrates Heart Muscle Cell Death. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 49(5), 186-186. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000517344.21991.20>
- CESAVEG. (2010). *Campaña manejo fitosanitario en maíz, manual de plagas y enfermedades en maíz*. Guanajuato, México.: CESAVEG

- CESAVEG. (2013). *Reunion de trabajo nacional para definir estrategias de control de gusano cogollero*.
- Cheley, S., Kosik, K. S., Paskevich, P., Bakalis, S., & Bayley, H. (1992). PHOSPHORYLATED BACULOVIRUS P10 IS A HEAT-STABLE MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN ASSOCIATED WITH PROCESS FORMATION IN SF9 CELLS. *Journal of Cell Science*, *102*, 739-752.
- Chen, L., Hu, X. L., Xiang, X. W., Yu, S. F., Yang, R., & Wu, X. F. (2012). Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus odv-e25 (Ac94) is required for budded virus infectivity and occlusion-derived virus formation. *Archives of Virology*, *157*(4), 617-625. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1211-9>
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C., & Gottlieb, R. A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*, *276*(33), 30724-30728. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103701200>
- Chen, Y. R., Zhong, S. L., Fei, Z. J., Gao, S., Zhang, S. Y., Li, Z. F., Wang, P., & Blissard, G. W. (2014). Transcriptome Responses of the Host Trichoplusia ni to Infection by the Baculovirus Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, *88*(23), 13781-13797. <https://doi.org/10.1128/jvi.02243-14>
- Chen, Y. R., Zhong, S. L., Fei, Z. J., Hashimoto, Y., Xiang, J. Z., Zhang, S. Y., & Blissard, G. W. (2013). The Transcriptome of the Baculovirus Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus in Trichoplusia ni Cells. *Journal of Virology*, *87*(11), 6391-6405. <https://doi.org/10.1128/jvi.00194-13>
- Chimweta, M., Nyakudya, I. W., Jimu, L., & Bray Mashingaidze, A. (2020). Fall armyworm [Spodoptera frugiperda (J.E. Smith)] damage in maize: management options for flood-recession cropping smallholder farmers. *International Journal of Pest Management*, *66*(2), 142-154. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1577514>
- Choi, J., & Guarino, L. A. (1995). THE BACULOVIRUS TRANSACTIVATOR IE1 BINDS TO VIRAL ENHANCER ELEMENTS IN THE ABSENCE OF INSECT-CELL FACTORS. *Journal of Virology*, *69*(7), 4548-4551.
- Choi, J. Y., Roh, J. Y., Wang, Y., Zhen, Z., Tao, X. Y., Lee, J. H., Liu, Q., Kim, J. S., Shin, S. W., & Je, Y. H. (2012). Analysis of Genes Expression of Spodoptera exigua Larvae upon AcMNPV Infection. *Plos One*, *7*(7), Article e42462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042462>
- Clem, R. J. (2005). The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Role of Apoptosis in Infection*, *289*, 113-129.
- Crava, C. M., Bel, Y., Lee, S. F., Manachini, B., Heckel, D. G., & Escriche, B. (2010). Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans Ostrinia nubilalis (Hübner) and Bombyx mori (L.): Sequences, mapping and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(7), 506-515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.04.010>
- Da Silva, I. H. S., Gómez, I., Sánchez, J., Martínez de Castro, D. L., Valicente, F. H., Soberón, M., Polanczyk, R. A., & Bravo, A. (2018). Identification of midgut membrane proteins from different instars of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. *PloS one*, *13*(12), e0207789-e0207789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207789>

- De Vos, K. J., Morotz, G. M., Stoica, R., Tudor, E. L., Lau, K. F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C. E., & Miller, C. C. (2012). VAPB interacts with the mitochondrial protein PTIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum Mol Genet*, *21*(6), 1299-1311. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr559>
- Del Rincon Castro, M. C. (2012). Virus entomopatógenos: agentes de control biológico de plagas. In J. E. Ibarra Rendon & P. Martínez Ortiz (Eds.), *Memorias del XXII curso nacional de control biológico* (pp. 135-144). Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., & Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(12), 6025-6030. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6025>
- Fang, M. G., Nie, Y. C., Harris, S., Erlandson, M. A., & Theilmann, D. A. (2009). Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus Core Gene ac96 Encodes a Per Os Infectivity Factor (pif-4). *Journal of Virology*, *83*(23), 12569-12578. <https://doi.org/10.1128/jvi.01141-09>
- Fang, M. G., Nie, Y. C., Wang, Q., Deng, F., Wang, R. R., Wang, H. Z., Wang, H. L., Vlak, J. M., Chen, X. W., & Hu, Z. H. (2006). Open reading frame 132 of Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus encodes a functional per os infectivity factor (PIF-2). *Journal of General Virology*, *87*, 2563-2569. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81788-0>
- FAOSTAT, F. a. A. O. o. t. U. N. S. D. (2020).
- Farias, P. R. S., Barbosa, J. C., Busoli, A. C., Overal, W. L., Miranda, V. S., & Ribeiro, S. M. (2008). Spatial analysis of the distribution of Spodoptera frugiperda (JE Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) and losses in maize crop productivity using geostatistics. *NEOTROPICAL ENTOMOLOGY*, *37*(3), 321-327.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G. V., & Wilson, J. A. (1997). Analysis of p74, a PDV envelope protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *Journal of General Virology*, *78*, 3091-3100.
- Feher, J. (2017). 3.7 - Muscle Energetics, Fatigue, and Training. In J. Feher (Ed.), *Quantitative Human Physiology (Second Edition)* (pp. 334-348). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00030-6>
- Feltham, R., Khan, N., & Silke, J. (2012). IAPS and ubiquitylation. *Iubmb Life*, *64*(5), 411-418. <https://doi.org/10.1002/iub.565>
- Fernandes, D. C., Manoel, A. H. O., Wosniak, J., & Laurindo, F. R. (2009). Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: Effects of nitrosothiol exposure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *484*(2), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.022>
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, I., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., & Ghezzi, P. (2003). Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics*, *3*(7), 1154-1161. <https://doi.org/10.1002/pmhc.200300436>
- Gallegos, M. G., Cepeda, S. M., & Olayo, P. R. P. (2003). *Entomopatógenos*. Trillas.

- Gill, S., Cowles, E., & Pietrantonio, P. (1992). THE MODE OF ACTION OF BACILLUS-THURINGIENSIS ENDOTOXINS. *ANNUAL REVIEW OF ENTOMOLOGY*, 37, 615-636.
- Jimona, M., Kaverina, I., Resch, G. P., Vignal, E., & Burgstaller, G. (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*, 14(6), 2482-2491. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0743>
- Goley, E. D., Ohkawa, T., Mancuso, J., Woodruff, J. B., D'Alessio, J. A., Cande, W. Z., Volkman, L. E., & Welch, M. D. (2006). Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, 314(5798), 464-467. <https://doi.org/10.1126/science.1133348>
- Gottlieb, R. A., Giesing, H. A., Zhu, J. Y., Engler, R. L., & Babior, B. M. (1995). Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H(+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), 5965-5968. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5965>
- Gross, C. H., Russell, R. L. Q., & Rohrmann, G. F. (1994). ORGYIA-PSEUDOTSUGATA BACULOVIRUS P10 AND POLYHEDRON ENVELOPE PROTEIN GENES - ANALYSIS OF THEIR RELATIVE EXPRESSION LEVELS AND ROLE IN POLYHEDRON STRUCTURE. *Journal of General Virology*, 75, 1115-1123. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-1115>
- Gross, C. H., & Shuman, S. (1998). RNA 5'-triphosphatase, nucleoside triphosphatase, and guanylyltransferase activities of baculovirus LEF-4 protein. *Journal of Virology*, 72(12), 10020-10028.
- Gruha, M. A., Buller, P. L., & Weaver, R. F. (1981). ALPHA-AMANITIN-RESISTANT VIRAL-RNA SYNTHESIS IN NUCLEI ISOLATED FROM NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS-INFECTED HELIOTHIS-ZEA LARVAE AND SPODOPTERA-FRUGIPERDA CELLS. *Journal of Virology*, 38(3), 916-921.
- Guarino, L. A., Gonzalez, M. A., & Summers, M. D. (1986). COMPLETE SEQUENCE AND ENHANCER FUNCTION OF THE HOMOLOGOUS DNA REGIONS OF AUTOGRAPHA-CALIFORNICA NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS. *Journal of Virology*, 60(1), 224-229.
- Guarino, L. A., & Summers, M. D. (1986). INTERSPERSED HOMOLOGOUS DNA OF AUTOGRAPHA-CALIFORNICA NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS ENHANCES DELAYED-EARLY GENE-EXPRESSION. *Journal of Virology*, 60(1), 215-223.
- Gutierrez, S., Kikhno, I., & Ferber, M. L. (2004). Transcription and promoter analysis of pif, an essential but low-expressed baculovirus gene. *Journal of General Virology*, 85, 331-341. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19623-0>
- Hang, X., Dong, W., & Guarino, L. A. (1995). THE LEF-3 GENE OF AUTOGRAPHA-CALIFORNICA NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS ENCODES A SINGLE-STRANDED-DNA BINDING-PROTEIN [Note]. *Journal of Virology*, 69(6), 3924-3928.
- Hashimoto, Y., Corsaro, B. G., & Granados, R. R. (1991). LOCATION AND NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF THE GENE ENCODING THE VIRAL ENHANCING FACTOR OF THE TRICHOPLUSIA-NI GRANULOSIS-VIRUS.

- Journal of General Virology*, 72, 2645-2651. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-11-2645>
- Herniou, E. A., Luque, T., Chen, X., Vlak, J. M., Winstanley, D., Cory, J. S., & O'Reilly, D. (2001). Use of whole genome sequence data to infer Baculovirus phylogeny. *Journal of Virology*, 75(17), 8117-8126. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8117-8126.2001>
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., O'Reilly, D. R., & Cory, J. S. (2004). Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*, 78(7), 3244-3251. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3244-3251.2004>
- Hong, M., Kim, H., & Kim, I. (2014). Ribosomal protein L19 overexpression activates the unfolded protein response and sensitizes MCF7 breast cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 450(1), 673-678. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.036>
- Horton, H. M., & Burand, J. P. (1993). SATURABLE ATTACHMENT SITES FOR POLYHEDRON-DERIVED BACULOVIRUS ON INSECT CELLS AND EVIDENCE FOR ENTRY VIA DIRECT MEMBRANE-FUSION. *Journal of Virology*, 67(4), 1860-1868.
- Huang, H.-J., Zhang, T.-Q., Li, Q., Zhang, C.-X., & Zhang, B.-Q. (2018). Transcriptional analysis of *Pieris rapae* in response to *P. rapae* granulovirus. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 513-518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.02.001>
- Hubank, M., & Schatz, D. G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 22(25), 5640-5648.
- Huff, J., & Haseman, J. (1991). EXPOSURE TO CERTAIN PESTICIDES MAY POSE REAL CARCINOGENIC RISK. *CHEMICAL & ENGINEERING NEWS*, 69(1), 33-36.
- Hughes, A. L. (2014). Evolutionary diversification of aminopeptidase N in Lepidoptera by conserved clade-specific amino acid residues. *Mol Phylogenet Evol*, 76, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.014>
- Ibarra R., J. E. (2012). Las bacterias como agentes de control biológico. In J. E. Ibarra R. & P. Martínez Ortiz (Eds.), *XXIII curso nacional de control biológico* (pp. 122-134). Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Ikeda, M., & Kobayashi, M. (1999). Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 258(1), 176-188. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9706>
- Ikeda, M., Yamada, H., Hamajima, R., & Kobayashi, M. (2013). Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology*, 435(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.016>
- Ikeda, M., Yanagimoto, K., & Kobayashi, M. (2004). Identification and functional analysis of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus iap genes. *Virology*, 321(2), 359-371. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.01.002>
- Irvine, A. G., Wallis, A. K., Sanghera, N., Rowe, M. L., Ruddock, L. W., Howard, M. J., Williamson, R. A., Blindauer, C. A., & Freedman, R. B. (2014). Protein disulfide-isomerase interacts with a substrate protein at all stages along its folding pathway. *PLoS One*, 9(1), e82511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082511>

- Ishikawa, H., Ikeda, M., Alves, C. A. F., Thiem, S. M., & Kobayashi, M. (2004). Host range factor 1 from *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (NPV) is an essential viral factor required for productive infection of NPVs in IPLB-Ld652Y cells derived from *L-dispar*. *Journal of Virology*, 78(22), 12703-12708. <https://doi.org/10.1128/iai.78.22.12703-12708.2004>
- Ishikawa, H., Ikeda, M., Yanagimoto, K., Alves, C. A. F., Katou, Y., Lavina-Caoili, B. A., & Kobayashi, M. (2003). Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology*, 84, 705-714. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18815-0>
- Ito, E., Sahri, D., Knippers, R., & Carstens, E. B. (2004). Baculovirus proteins IE-1, LEF-3, and P143 interact with DNA in vivo: a formaldehyde cross-linking study. *Virology*, 329(2), 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.035>
- Jabbour, A. M., Ekert, P. G., Coulson, E. J., Knight, M. J., Ashley, D. M., & Hawkins, C. J. (2002). The p35 relative, p49, inhibits mammalian and *Drosophila* caspases including DRONC and protects against apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 9(12), 1311-1320. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401135>
- Javed, M. A., Biswas, S., Willis, L. G., Harris, S., Pritchard, C., van Oers, M. M., Donly, B. C., Erlandson, M. A., Hegedus, D. D., & Theilmann, D. A. (2017). *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus AC83 is a Per Os Infectivity Factor (PIF) Protein Required for Occlusion-Derived Virus (ODV) and Budded Virus Nucleocapsid Assembly as well as Assembly of the PIF Complex in ODV Envelopes. *Journal of Virology*, 91(5), Article UNSP e02115. <https://doi.org/10.1128/jvi.02115-16>
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J., & Forgac, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(1), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.025>
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257-1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Jiantao, L., Zhu, L., Zhang, S., Deng, Z., Huang, Z., Yuan, M., Wu, W., & Yang, K. (2016). The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac110 gene encodes a new per os infectivity factor. *Virus Res*, 221, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.017>
- Jones, D. H., Martin, H., Madrazo, J., Robinson, K. A., Nielsen, P., Roseboom, P. H., Patel, Y., Howell, S. A., & Aitken, A. (1995). Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins. *J Mol Biol*, 245(4), 375-384. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0031>
- Kaksonen, M., Toret, C. P., & Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, 123(2), 305-320. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.024>
- Katsuma, S., Koyano, Y., Kang, W., Kokusho, R., Kamita, S. G., & Shimada, T. (2012). The Baculovirus Uses a Captured Host Phosphatase to Induce Enhanced Locomotory Activity in Host Caterpillars. *Plos Pathogens*, 8(4), Article e1002644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002644>

- Keddie, B. A., Aponte, G. W. & Volkman, L. E. 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science*, 243, 1728-30.
- Kelly, B. J., King, L. A., & Possee, R. D. (2016). Introduction to Baculovirus Molecular Biology. *Methods Mol Biol*, 1350, 25-50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3043-2_2
- Kim, S. Y., Kim, T. J., & Lee, K. Y. (2008). A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway. *Febs Letters*, 582(13), 1913-1918. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.015>
- Klotz, I. M., Langerman, N. R., & Darnall, D. W. (1970). Quaternary structure of proteins. *Annu Rev Biochem*, 39, 25-62. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.39.070170.000325>
- Knebe-Morsdorf, D., Quadt, T., Li, Y., Montier, L., & Guarino, L. A. (2006). Expression of baculovirus late and very late genes depends on LEF-4, a component of the viral RNA polymerase whose guanyltransferase function is essential. *Journal of Virology*, 80(8), 4168-4173. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.8.4168-4173.2006>
- Koczka, K., Peters, P., Ernst, W., Himmelbauer, H., Nika, L., & Grabherr, R. (2018). Comparative transcriptome analysis of a *Trichoplusia ni* cell line reveals distinct host responses to intracellular and secreted protein products expressed by recombinant baculoviruses. *Journal of Biotechnology*, 270, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.001>
- Kool, M., Voncken, J. W., Vanlier, F. L. J., Tramper, J., & Vlak, J. M. (1991). DETECTION AND ANALYSIS OF AUTOGRAPHA-CALIFORNICA NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS MUTANTS WITH DEFECTIVE INTERFERING PROPERTIES. *Virology*, 183(2), 739-746. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)91003-y](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)91003-y)
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, 21(3), 230-248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>
- Lagunes-Tejeda, A., & Villanueva-Jimenez, J. A. (1994). Toxicología y manejo de insecticidas. In *35° aniversario del Colegio de Posgraduados* (Primera ed., pp. 264). Colegio de Posgraduados.
- Laity, J. H., Lee, B. M., & Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 11(1), 39-46.
- Landais, I., Vincent, R., Bouton, M., Devauchelle, G., Duonor-Cerutti, M., & Ogliastro, M. (2006). Functional analysis of evolutionary conserved clustering of bZIP binding sites in the baculovirus homologous regions (hrs) suggests a cooperativity between host and viral transcription factors. *Virology*, 344(2), 421-431. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.036>
- Langou, K., Moumen, A., Pellegrino, C., Aebischer, J., Medina, I., Aebischer, P., & Raoul, C. (2010). AAV-mediated expression of wild-type and ALS-linked mutant VAPB selectively triggers death of motoneurons through a Ca²⁺-dependent ER-associated pathway. *J Neurochem*, 114(3), 795-809. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06806.x>
- Lapointe, R., Popham, H. J., Straschil, U., Goulding, D., O'Reilly, D. R., & Olszewski, J. A. (2004). Characterization of two *Autographa californica*

- nucleopolyhedrovirus proteins, Ac145 and Ac150, which affect oral infectivity in a host-dependent manner. *J Virol*, 78(12), 6439-6448. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6439-6448.2004>
- Laufs, S., Lu, A., Arrell, L. K., & Carstens, E. B. (1997). Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p143 gene product is a DNA-binding protein. *Virology*, 228(1), 98-106. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8361>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- León-García, I., Rodríguez-Leyva, E., Ortega-Arenas, L. D., & Solís-Aguilar, J. F. (2012). Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) a insecticidas asociada a Césped en Quintana Roo, México. In (Vol. 46(3), pp. 279-287): *Agrociencia*.
- Li, G., Wang, J., Deng, R., & Wang, X. (2008). Characterization of AcMNPV with a deletion of ac68 gene. *Virus Genes*, 37(1), 119-127. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0238-9>
- Li, X., Song, J., Jiang, T., Liang, C., & Chen, X. (2007). The N-terminal hydrophobic sequence of Autographa californica nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. *Archives of Virology*, 152(10), 1851-1858. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1012-3>
- Li, Z., Karakousis, G., Chiu, S. K., Reddy, G., & Radding, C. M. (1998). The beta protein of phage lambda promotes strand exchange [Article]. *Journal of Molecular Biology*, 276(4), 733-744. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1572>
- Liou, J.-Y., Ghelani, D., Yeh, S., & Wu, K. K. (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3 ϵ . *Cancer research*, 67(7), 3185-3191.
- Liu, X. Y., Yao, Q., Wang, Y., & Chen, K. P. (2010). Proteomic analysis of nucleopolyhedrovirus infection resistance in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.007>
- Liu, T., Wang, J., Hu, X., & Feng, J. (2020). Land-use change drives present and future distributions of Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Science of The Total Environment*, 706, 135872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135872>
- Lu, A., & Carstens, E. B. (1991). NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF A GENE ESSENTIAL FOR VIRAL-DNA REPLICATION IN THE BACULOVIRUS AUTOGRAPHA-CALIFORNICA NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS. *Virology*, 181(1), 336-347. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90500-b](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90500-b)
- Lu, A., & Miller, L. K. (1995). Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *J Virol*, 69(10), 6265-6272.
- Lu, A., & Miller, L. K. (1996). Species-specific effects of the hcf-1 gene on baculovirus virulence. *Journal of Virology*, 70(8), 5123-5130.
- Lu, K. P., Hanes, S. D., & Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*, 380(6574), 544-547. <https://doi.org/10.1038/380544a0>
- López Arroyo, J. I., Cortez Mondaca, E., Ramírez Delgado, M., Marín Jarrillo, A., Reyes Rosas, M., A., & Loera Gallardo, J. (2012). Importancia de los insectos

- depredadores para el control biológico de plagas en México. In Ibarra Rendon J. I. & P. Martinez Ortiz (Eds.), *XXII curso nacional de control biológico* (pp. 55-69). Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Mace, P. D., Shirley, S., & Day, C. L. (2010). Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death and Differentiation*, 17(1), 46-53. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.45>
- Makkonen, K. E., Airene, K., & Yla-Herttulala, S. (2015). Baculovirus-mediated Gene Delivery and RNAi Applications. *Viruses-Basel*, 7(4), 2099-2125. <https://doi.org/10.3390/v7042099>
- Marek, M., Romier, C., Galibert, L., Merten, O. W., & van Oers, M. M. (2013). Baculovirus VP1054 is an acquired cellular PURalpha, a nucleic acid-binding protein specific for GGN repeats. *J Virol*, 87(15), 8465-8480. <https://doi.org/10.1128/jvi.00068-13>
- Martínez, A. M., Simón, O., Williams, T., & Caballero, P. (2003). Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 109(2), 139-146.
- Marshansky, V., & Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 415-426. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.015>
- Matilla, A., & Radrizzani, M. (2005). The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum*, 4(1), 7-18. <https://doi.org/10.1080/14734220410019020>
- McCarthy, C. B., & Theilmann, D. A. (2008). AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology*, 375(1), 277-291. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.039>
- Mikhailov, V. S., Okano, K., & Rohrmann, G. F. (2006). Structural and functional analysis of the baculovirus single-stranded DNA-binding protein LEF-3. *Virology*, 346(2), 469-478. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.027>
- Mikhailov, V. S., & Rohrmann, G. F. (2002). Baculovirus replication factor LEF-1 is a DNA primase. *Journal of Virology*, 76(5), 2287-2297. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.5.2287-2297.2002>
- Mireles Martínez, M. (2006). *Análisis genético de cepas nativas de Bacillus thuringiensis Aislados de zonas aguacateras y su evaluación tóxica contra Argyro taenia sp.* Instituto Politécnico Nacional.]. México.
- Monteiro, F., Carinhas, N., Carrondo, M. J. T., Bernal, V., & Alves, P. M. (2012). Toward system-level understanding of baculovirus host cell interactions: from molecular fundamental studies to large-scale proteomics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 3, Article 391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00391>
- Morotz, G. M., De Vos, K. J., Vagnoni, A., Ackerley, S., Shaw, C. E., & Miller, C. C. (2012). Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56S perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria. *Hum Mol Genet*, 21(9), 1979-1988. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds011>
- Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44, 257-289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257>

- Mu, J., Zhang, Y., Hu, Y., Hu, X., Zhou, Y., Zhao, H., Pei, R., Wu, C., Chen, J., Yang, K., Oers, M. M., Chen, X., & Wang, Y. (2016). Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus Ac34 Protein Retains Cellular Actin-Related Protein 2/3 Complex in the Nucleus by Subversion of CRM1-Dependent Nuclear Export. *PLoS Pathog*, 12(11), e1005994. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005994>
- Murua, G., Molina-Ochoa, J., & Coviella, C. (2006). Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) and its parasitoids in northwestern Argentina. *FLORIDA ENTOMOLOGIST*, 89(2), 175-182.
- Nagamine, T., Kawasaki, Y., & Matsumoto, S. (2006). Induction of a subnuclear structure by the simultaneous expression of baculovirus proteins, IE1, LEF3, and P143 in the presence of hr. *Virology*, 352(2), 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.04.034>
- Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N., & Sato, R. (2002). Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* – their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Letters*, 519(1), 215-220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02708-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02708-4)
- Nayyar, N., Kaur, I., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2017). Quantitative proteomics of Sf21 cells during Baculovirus infection reveals progressive host proteome changes and its regulation by viral miRNA. *Scientific Reports*, 7, Article 10902. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10787-z>
- Nguyen, Q., Chan, L. C. L., Nielsen, L. K., & Reid, S. (2013). Genome scale analysis of differential mRNA expression of *Helicoverpa zea* insect cells infected with a *H. armigera* baculovirus. *Virology*, 444(1-2), 158-170. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.004>
- Ningshen, T. J., Aparoy, P., Ventaku, V. R., & Dutta-Gupta, A. (2013). Functional Interpretation of a Non-Gut Hemocoelic Tissue Aminopeptidase N (APN) in a Lepidopteran Insect Pest *Achaea janata*. *PLOS ONE*, 8(11), e79468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079468>
- Olson, V. A., Wetter, J. A., & Friesen, P. D. (2003). The highly conserved basic domain I of baculovirus IE1 is required for hr enhancer DNA binding and hr-dependent transactivation. *Journal of Virology*, 77(10), 5668-5677. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.10.5668-5677.2003>
- Pacheco-Covarrubias, J. J. (1993). Monitoring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* populations from the Yaqui Valley, Son., Mexico. In (pp. 3-4): Pest Manage. Newsletter 5.
- Paliwal, R. L. (2001). *Introducción al maíz y su importancia, el maíz en los trópicos*. FAO, Plant Production and Protection Series. FAO. X7650. ID 60342.
- Park, J. O., Chang, K. H., Lee, H. H., & Chung, I. S. (1999). Biochemical analysis of *Hyphantria cunea* NPV attachment to *Spodoptera frugiperda* 21 cells. *Cytotechnology*, 31(1-2), 157-161.
- Pearson, M. N., Bjornson, R. M., Ahrens, C., & Rohrmann, G. F. (1993). IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE ORIGIN OF DNA-REPLICATION IN THE GENOME OF A BACULOVIRUS PATHOGENIC

- FOR ORGYIA-PSEUDOTSUGATA. *Virology*, 197(2), 715-725. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1647>
- Peng, K., van Lent, J. W. M., Boeren, S., Fang, M. G., Theilmann, D. A., Erlandson, M. A., Vlak, J. M., & van Oers, M. M. (2012). Characterization of Novel Components of the Baculovirus Per Os Infectivity Factor Complex. *Journal of Virology*, 86(9), 4981-4988. <https://doi.org/10.1128/jvi.06801-11>
- Peng, K., van Oers, M. M., Hu, Z. H., van Lent, J. W. M., & Vlak, J. M. (2010). Baculovirus Per Os Infectivity Factors Form a Complex on the Surface of Occlusion-Derived Virus. *Journal of Virology*, 84(18), 9497-9504. <https://doi.org/10.1128/jvi.00812-10>
- Peng, K., Wu, M., Deng, F., Song, J., Dong, C., Wang, H., & Hu, Z. (2010). Identification of protein-protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 91, 659-670. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017103-0>
- Pennington, K. L., Chan, T. Y., Torres, M. P., & Andersen, J. L. (2018). The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene*, 37(42), 5587-5604. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0348-3>
- Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995). PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS - METHODS FOR DETECTION AND ANALYSIS. *Microbiological Reviews*, 59(1), 94-123.
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(2), 255-281. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>
- Popham, H. J. R., Shelby, K. S., Brandt, S. L., & Coudron, T. A. (2004). Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 85, 2255-2261. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79965-0>
- Qualmann, B., Kessels, M. M., & Kelly, R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, 150(5), F111-116. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.f111>
- Rangel Núñez, J. C., Vázquez Ramírez, M. F., & Del Rincón Castro, M. C. (2014). Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de BACULOVIRUS SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Interciencia*, 320-326.
- Rapp, J. C., Wilson, J. A., & Miller, L. K. (1998). Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *Journal of Virology*, 72(12), 10197-10206.
- Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Del Rincón-Castro, M. C., Cerna-Chávez, E., Sánchez-Peña, S. R., & Siller, M. C. (2011). Insecticidal activity of native isolates of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in Mexico. *The Florida Entomologist*, 94(3), 716-718.
- Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., Gallegos-Morales, G., & Del Rincon-Castro, M. C. (2012). Characterization of baculovirus isolates obtained from soil by restriction fragment patterns [Article]. *African Journal of Microbiology Research*, 6(21), 4546-4549. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.161>

- Rizzo, H. F., & La Rossa, F. R. (1992). Aspectos morfológicos y biológicos de la oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*)(J. E. Smith). In (pp. 193-199). Buenos Aires, Argentina: Rev. Facultad de Agronomía.
- Rodems, S. M., & Friesen, P. D. (1995). TRANSCRIPTIONAL ENHANCER ACTIVITY OF HR5 REQUIRES DUAL-PALINDROME HALF SITES THAT MEDIATE BINDING OF A DIMERIC FORM OF THE BACULOVIRUS TRANSREGULATOR IE1. *Journal of Virology*, *69*(9), 5368-5375.
- Rodems, S. M., Pullen, S. S., & Friesen, P. D. (1997). DNA-dependent transregulation by IE1 of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: IE1 domains required for transactivation and DNA binding. *Journal of Virology*, *71*(12), 9270-9277.
- Rodríguez del Bosque, L. A. (2012). Bases ecológicas del control biológico. In J. I. Ibarra Rendon & P. Martinez Ortiz (Eds.), *XXII Curso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Rodríguez, M., R., & De León, C. (2008). El Cultivo del Maíz. In *El cultivo del maíz, temas selectos* (Primera edición ed., pp. 29-45). Mundi Presna, Colegio de posgraduados.
- Rohrmann, G. F. (2013a). Baculovirus infection: the cell cycle and apoptosis. In *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann.
- Rohrmann, G. F. (2013b). Baculovirus late transcription. In *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann.
- Rohrmann, G. F. (2013c). Early events in infection: Virus transcription. In *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann.
- Rohrmann, G. F. (2013d). Introduction to the baculoviruses, their taxonomy and evolution. In *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann.
- Rohrmann, G. F. (2013e). Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. In *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann.
- Rohrmann, G. F. (2013f). The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. In *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US) George Rohrmann.
- Rosinski, M., Reid, S., & Nielsen, L. K. (2002). Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, *77*(4), 476-480. <https://doi.org/10.1002/bit.10126>
- Rozenblum, G. T., & Gimona, M. (2008). Calponins: Adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(10), 1990-1995. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.010>
- Saito, T., Dojima, T., Toriyama, M., & Park, E. Y. (2002). The effect of cell cycle on GFPuv gene expression in the baculovirus expression system. *Journal of*

- Biotechnology*, 93(2), 121-129. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00398-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00398-4)
- Salem, T. Z., Zhang, F. R., Xie, Y., & Thiem, S. M. (2011). Comprehensive analysis of host gene expression in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology*, 412(1), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.006>
- Samanta, S. K., Lee, J., Hahm, E. R., & Singh, S. V. (2018). Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 regulates withaferin A-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Mol Carcinog*, 57(7), 936-946. <https://doi.org/10.1002/mc.22814>
- Santos, C. X., Stolf, B. S., Takemoto, P. V., Amanso, A. M., Lopes, L. R., Souza, E. B., Goto, H., & Laurindo, F. R. (2009). Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J Leukoc Biol*, 86(4), 989-998. <https://doi.org/10.1189/jlb.0608354>
- Shevelev, I. V., & Hubscher, U. (2002). The 3'-5' exonucleases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), 364-375. <https://doi.org/10.1038/nrm804>
- Shirata, N., Ikeda, M., & Kobayashi, M. (2010). Identification of a *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (NPV) gene that is involved in global protein synthesis shutdown and restricted *Bombyx mori* NPV multiplication in a *B. mori* cell line. *Virology*, 398(2), 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.049>
- Simon, O., Palma, L., Williams, T., Lopez-Ferber, M., & Caballero, P. (2012). Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus reveals sf58 as a new per os infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.10.010>
- Singh, J., Singh, C. P., Bhavani, A., & Nagaraju, J. (2010). Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology*, 407(1), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.033>
- Slack, J. M., Kuzio, J., & Faulkner, P. (1995). CHARACTERIZATION OF V-CATH, A CATHEPSIN L-LIKE PROTEINASE EXPRESSED BY THE BACULOVIRUS AUTOGRAPHA-CALIFORNICA MULTIPLE NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS. *Journal of General Virology*, 76, 1091-1098. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-5-1091>
- Song, J. J., Wang, R. R., Deng, F., Wang, H. L., & Hu, Z. H. (2008). Functional studies of per os infectivity factors of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 89, 2331-2338. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/002352-0>
- Sparks, A. N. (1979). A review of the biology of the fall armyworm. In (pp. 82-87.): Fla. Entomol.
- Sparks, W. O., Harrison, R. L., & Bonning, B. C. (2011). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virology*, 409(1), 69-76. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.09.027>
- Sugiura, N., Setoyama, Y., Chiba, M., Kimata, K., & Watanabe, H. (2011). Baculovirus Envelope Protein ODV-E66 Is a Novel Chondroitinase with

- Distinct Substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 29026-29034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251157>
- Sun, B., Fang, Y. T., Li, Z. Y., Chen, Z. Y., & Xiang, J. B. (2015). Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomedical Reports*, 3(5), 603-610. <https://doi.org/10.3892/br.2015.494>
- Szewczyk, B., Lobo de Souza, M., Batista de Castro, M. E., Moscardi, M. L., & Moscardi, F. (2011). Baculovirus biopesticides. In M. Stoytcheva & J. Trdine (Eds.), *Pesticides – Formulations, effects, fate*. (pp. 25 – 36). InTech. <https://doi.org/10.5772/13219>
- Theilmann, D. A., & Stewart, S. (1991). IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE IE-1 GENE OF ORGYIA-PSEUDOTSUGATA MULTICAPSID NUCLEAR POLYHEDROSIS-VIRUS. *Virology*, 180(2), 492-508. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90063-h](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90063-h)
- Theze, J., Bezier, A., Periquet, G., Drezen, J.-M., & Herniou, E. A. (2011). Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 15931-15935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105580108>
- Thiem, S. M. (2009). Baculovirus Genes Affecting Host Function. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 45(3/4), 111-126.
- Tomalski, M. D., Eldridge, R., & Miller, L. K. (1991). A BACULOVIRUS HOMOLOG OF A CU/ZN SUPEROXIDE-DISMUTASE GENE. *Virology*, 184(1), 149-161. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90831-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90831-u)
- van Loo, N. D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F., & Scholte, B. J. (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: Mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of Virology*, 75(2), 961-970. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.2.961-970.2001>
- Vanarsdall, A. L., Okano, K., & Rohrmann, G. F. (2006). Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. *Journal of Virology*, 80(4), 1724-1733. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.4.1724-1733.2006>
- Vergara, O., Pitre, H., & Parvin, D. (2001). Economic evaluation of lepidopterous pests in intercropped sorghum and maize in southern Honduras. *TROPICAL AGRICULTURE*, 78(3), 190-199.
- Vigdorovich, V., Miller, A. D., & Strong, R. K. (2007). Ability of Hyaluronidase 2 To Degrade Extracellular Hyaluronan Is Not Required for Its Function as a Receptor for Jaagsiekte Sheep Retrovirus. In *J Virol* (Vol. 81, pp. 3124-3129). <https://doi.org/10.1128/jvi.02177-06>
- Volkman, L. E. (1988). Autographa californica MNPV nucleocapsid assembly: inhibition by cytochalasin D. *Virology*, 163(2), 547-553.
- Wieczorek, D., Delauriere, L. & Schagat, T. 2012. Methods of RNA Quality Assessment. In: Corporation., P. (ed.)
- Wang, P., & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6977-6982. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6977>

- Wang, P., Hammer, D. A., & Granados, R. R. (1997). Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells. *Journal of General Virology*, 78, 3081-3089.
- Wang, X., Liu, X. P., Makallawa, G. A., Li, J., Wang, H. L., Hu, Z. H., & Wang, M. L. (2017). Per os infectivity factors: a complicated and evolutionarily conserved entry machinery of baculovirus. *Science China-Life Sciences*, 60(8), 806-815. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9127-1>
- Wang, X. Y., Yu, H. Z., Geng, L., Xu, J. P., Yu, D., Zhang, S. Z., Ma, Y., & Fei, D. Q. (2016). Comparative Transcriptome Analysis of *Bombyx mori* (Lepidoptera) Larval Midgut Response to BmNPV in Susceptible and Near-Isogenic Resistant Strains. *Plos One*, 11(5), Article e0155341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155341>
- Wang, Y., Wang, Q., Liang, C. Y., Song, J. H., Li, N., Shi, H., & Chen, X. W. (2008). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid protein BV/ODV-C42 mediates the nuclear entry of P78/83. *Journal of Virology*, 82(9), 4554-4561. <https://doi.org/10.1128/jvi.02510-07>
- Warner, J. R., & McIntosh, K. B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell*, 34(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.006>
- Westenberg, M., Uijtdewilligen, P., & Vlak, J. M. (2007). Baculovirus envelope fusion proteins F and GP64 exploit distinct receptors to gain entry into cultured insect cells. *J Gen Virol*, 88(Pt 12), 3302-3306. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83240-0>
- Wieczorek, D., Delauriere, L., & Schagat, T. (2012). Methods of RNA Quality Assessment. In P. Corporation. (Ed.).
- Williams, T., Goulson, D., Caballero, P., Cisneros, J., Martinez, A., Chapman, J., Roman, D., & Cave, R. (1999). Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. *BIOLOGICAL CONTROL*, 14(2), 67-75.
- Xiao, C. X., Yang, X. N., Huang, Q. W., Zhang, Y. Q., Lin, B. Y., Liu, J. J., Liu, Y. P., Jazag, A., Guleng, B., & Ren, J. L. (2013). ECHS1 acts as a novel HBsAg-binding protein enhancing apoptosis through the mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Cancer Lett*, 330(1), 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.030>
- Xing, K., Deng, R. Q., Wang, J. W., Feng, J. H., Huang, M. S., & Wang, X. Z. (2005). Analysis and prediction of baculovirus promoter sequences. *Virus Research*, 113(1), 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.016>
- Xu, H. J., Yang, Z. N., Zhao, J. F., Tian, C. H., Ge, J. Q., Tang, X. D., Bao, Y. Y., & Zhang, C. X. (2008). *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production. *J Gen Virol*, 89(Pt 5), 1212-1219. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83633-0>
- Xue, J., Qiao, N., Zhang, W., Cheng, R. L., Zhang, X. Q., Bao, Y. Y., Xu, Y. P., Gu, L. Z., Han, J. D., & Zhang, C. X. (2012a). Dynamic interactions between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis. *J Virol*, 86(13), 7345-7359. <https://doi.org/10.1128/jvi.07217-12>

- Xue, J., Qiao, N., Zhang, W., Cheng, R. L., Zhang, X. Q., Bao, Y. Y., Xu, Y. P., Gu, L. Z., Han, J. D. J., & Zhang, C. X. (2012b). Dynamic Interactions between *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus and Its Host Cells Revealed by Transcriptome Analysis. *Journal of Virology*, 86(13), 7345-7359. <https://doi.org/10.1128/jvi.07217-12>
- Yang, S., & Miller, L. K. (1999). Activation of Baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *Journal of Virology*, 73(4), 3404-3409.
- Yu, Q., Xiong, Y., Liu, J., Wen, D., Wu, X., & Yin, H. (2016). Transcriptome Analysis of the SL221 Cells at the Early Stage during *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus Infection. *PLOS ONE*, 11(2), e0147873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147873>
- Yu, S. (1992). Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). *JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY*, 85(3), 675-682.
- Zambon, R. A., Nandakumar, M., Vakharia, V. N., & Wu, L. P. (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(20), 7257-7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409181102>
- Zhang, J. H., Ohkawa, T., Washburn, J. O., & Volkman, L. E. (2005). Effects of Ac150 on virulence and pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in noctuid hosts. *Journal of General Virology*, 86, 1619-1627. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80930-0>
- Zhu, S. M., Wang, W., Wang, Y., Yuan, M. J., & Yang, K. (2013). The Baculovirus Core Gene ac83 Is Required for Nucleocapsid Assembly and Per Os Infectivity of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 87(19), 10573-10586. <https://doi.org/10.1128/jvi.01207-13>
- Zimoch, L., Hogenkamp, D. G., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., & Merzendorfer, H. (2005). Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 515-527. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.008>
- Zoog, S. J., Schiller, J. J., Wetter, J. A., Chejanovsky, N., & Friesen, P. D. (2002). Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 in vivo. *Embo Journal*, 21(19), 5130-5140.