

Artigo de Revisão

BACULOVÍRUS: UM VÍRUS VERSÁTIL USADO NO CONTROLE BIOLÓGICO E COMO VETOR DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS APLICADAS NA SAÚDE HUMANA

BACULOVIRUS: A VERSATILE VIRUS USED IN BIOLOGICAL CONTROL AND HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION APPLIED ON HUMAN HEALTH

Gustavo Vieira Dantas¹, Túlio César Ferreira¹

1. Programa de Iniciação Científica do Centro Universitário ICESP, Brasília – DF, Brasil.

RESUMO

Objetivo: revisar a história, morfologia, o ciclo de vida de infecção do baculovírus no inseto hospedeiro e finalmente as aplicações de expressão mediada por baculovírus no controle de pragas e terapia gênica em células de mamíferos. **Fonte de dados:** o desenvolvimento desse trabalho consistiu em uma revisão de literatura. As bases de dados utilizadas foram: SciELO e PubMed, onde foram feitas buscas por artigos e livros referentes ao baculovírus com enfoque na sua morfologia, ciclo de replicação e aplicações biotecnológicas na área de saúde. Adotou-se como critério inicial para seleção a utilização das palavras-chaves “baculovirus”, “baculovirus life cycle”, “gene therapy”, “baculovirus applications” e “aplicações biotecnológicas”. **Resultados:** nas últimas décadas, com o avanço da biologia molecular, os baculovírus evoluíram de um simples vírus de insetos, usados até então apenas no controle biológico de pragas agrícolas, para ferramentas biotecnológicas versáteis, que podem ser usadas para infectar células de insetos e também transduzir células de mamíferos para a expressão de uma grande variedade de proteínas heterólogas. **Conclusão:** o baculovírus surgiu como um novo vetor para a entrega de genes. Além disso, o uso da transferência de genes mediada por baculovírus foi consideravelmente expandida para triagem de medicamentos, exibição de genes eucarióticos, terapia de câncer, engenharia de tecidos, vacinas e outras aplicações.

Palavras-chave: aplicação de baculovírus na biotecnologia; terapia gênica; vetores virais.

ABSTRACT

Objective: to review the history, morphology, life cycle of baculovirus infection in the host insect, and finally as applications of baculovirus-mediated expression in pest control and gene therapy in mammalian cells. **Data source:** the databases used were: SciELO and PubMed, where were searched for articles and books related to baculovirus focusing on its morphology, replication cycle, and biotechnological applications in health subjects. It was adopted as initial criteria for selecting the keywords: “baculovirus”, “baculovirus life cycle”, “gene therapy”, “baculovirus applications” and “biotechnological applications”. **Results:** in recent decades, with the advancement of molecular biology, baculovirus has evolved from a simple insect virus used only in biological control of agricultural pests, to versatile biotechnological tools that can be used to infect insect cells and also transducing mammalian cells for the expression of a wide variety of heterologous proteins. **Conclusion:** therefore, baculovirus has emerged as a new vector for gene delivery. Also, the use of baculovirus-mediated gene transfer has been considerably expanded for drug screening, eukaryotic gene display, cancer therapy, tissue engineering, vaccines, and other applications.

Keywords: baculovirus application in biotechnology; gene therapy; viral vectors.

Contato: Túlio César Ferreira, e-mail: tulio.ferreira@icesp.edu.br

Enviado:	Nov/2019
Revisado:	Mar/2020
Aceito:	Mai/2020

INTRODUÇÃO

A história da descoberta dos baculovírus data a partir do desenvolvimento da indústria da seda que ocorreu há mais de 5000 anos na China antiga. Os baculovírus são agentes infecciosos que estão disseminados em vários organismos dentro das classes dos artrópodes. Embora exista uma grande variedade de alvos do baculovírus, os mais estudados são aqueles que causam doenças em pragas comuns (MARTIGNONI; IWAI, 1986).

Atualmente existem mais de 700 espécies de baculovírus até então isoladas e catalogadas (HERNIOU; JEHLE, 2007). No entanto, somente cerca de 50 espécies tiveram seus genomas sequenciados. A família Baculoviridae atualmente é subdividida com base em evidências filogenéticas e características moleculares em quatro gêneros distintos: Alphabaculovírus, Betabaculovírus, Gammabaculovírus e Deltabaculovírus (JEHLE *et al.*, 2006).

O ciclo de replicação do baculovírus dentro da célula do inseto infectado é bifásico e envolve a formação de dois tipos de virions. Os virions derivados da oclusão (ODVs) são adaptados para terem estabilidade no meio externo ao inseto hospedeiro e os virions que brotam da membrana plasmática (BVs), que não estão ocluídos, são, portanto, responsáveis pela disseminação sistêmica dentro do inseto hospedeiro e consequente morte do inseto (PASSARELLI; GUARINO, 2007).

Os baculovírus apresentam uma grande diversidade de aplicações biotecnológicas de interesse econômico, como, por exemplo, expressão de proteínas heterólogas. No entanto, inicialmente o uso de baculovírus foi considerado como inseticida biológico no controle de pragas. Esses vírus são considerados altamente virulentos, seletivos (infectam somente determinados grupos de artrópodes) e estáveis, e principalmente com baixo impacto ambiental após sua aplicação (MOSCARDI, 2011).

Embora os baculovírus possuam essa versatilidade para inúmeras aplicações, seu uso como bioinseticidas era limitada até recentemente por causa de sua ação lenta de eliminar as pragas e dificuldades técnicas para a produção comercial *in vitro*. Espera-se que duas abordagens para a aplicação mais ampla de baculovírus como biopesticidas sejam implementadas no futuro. Primeiramente, nos países onde o uso de organismos geneticamente modificados é restrito, as melhorias serão principalmente no nível dos diagnósticos, produção *in vitro* e alterações nas formulações de biopesticidas. Na segunda abordagem, a capacidade dos baculovírus matar as pragas pode ser aumentada por modificações genéticas do seu genoma introduzindo nele genes de outros patógenos naturais (SZEWCZYK *et al.*, 2006).

Outra limitação prática no que diz respeito ao uso de baculovírus é que esse vírus possui várias desvantagens como vetores de terapia genética. Uma delas é que o baculovírus induz uma expressão transitória nas células de mamíferos. *In vivo*, a expressão do transgene tipicamente decresce no 7º dia e desaparece 14º dia. A duração da expressão do transgene *in vitro* usando baculovírus é significativamente menor do que a expressão mediada por vetores retrovirais, lentivirais e AAV (AIRENNE *et al.*, 2000; LEHTOLAINEN *et al.*, 2002).

No entanto, a biotecnologia tem avançado muito em todas as áreas de estudo e com diferentes abordagens, e cada vez mais se observa o uso do baculovírus em aplicações além da produção de proteínas em células de insetos. Essas abordagens incluem o desenvolvimento de estratégias para exibição de peptídeos e proteínas heterólogas em

partículas de vírus e a inserção de cassetes de expressão de mamíferos em baculovírus para expressar genes de maneira altamente eficiente em uma grande variedade de células de mamíferos. Os baculovírus também possuem a capacidade de transduzir uma grande variedade de linhagens de células de mamíferos, humanas ou não (HU, 2008), com diferentes propósitos, tais como expressão de genes terapêuticos a serem usados no tratamento de câncer (WANG *et al.*, 2006), lesão por isquemia e reperfusão (IRI) em órgãos transplantados (HITCHMAN *et al.*, 2011), regeneração tecidual (WANG *et al.*, 2005) e como veículo de vacinas (HU, 2008; MADHAN; PRABAKARAN; KWANG, 2010).

Assim, o uso de baculovírus pode ser um método alternativo de fornecer genes terapêuticos a serem utilizados em diversas patologias e principalmente permanecendo confinados aos órgãos-alvos. Como os genes do BV que possuem essas funções nas células de insetos não são expressos, nas células de mamíferos, é pouco provável que a infecção por BV afete as células alvo. Isso é um critério crucial para os protocolos que são empregados nas terapias que envolvem apenas a correção de um defeito genético, e não levar à morte celular das células-alvos (STANBRIDGE; DUSSUPT; MAITLAND, 2003).

METODOLOGIA

O desenvolvimento desse trabalho consistiu em uma revisão de literatura, com busca, em sites científicos como o SciELO e PubMed, por artigos e livros referentes ao baculovírus com enfoque na sua morfologia, ciclo de replicação e aplicações biotecnológicas na área de saúde. A revisão de artigos realizada adotou como critério inicial para seleção a utilização das palavras-chaves em inglês: "baculovirus", "baculovirus life cycle", "gene therapy", "baculovirus applications" e em português "aplicações biotecnológicas". Foram utilizados, na seleção, artigos publicados em línguas inglesa e portuguesa no período compreendido entre 2005 e 2019. Estudos originais não restritos ao intervalo pré-estabelecido de seleção também foram utilizados, em decorrência de seu valor como referência. Foram filtrados 90 artigos científicos e, após uma revisão minuciosa, foram selecionados 86 artigos relevantes para o estudo.

REFERENCIAL TEÓRICO

Um breve histórico e propriedades morfológicas dos Baculovírus

Os baculovírus são agentes infecciosos que estão disseminados em vários tipos de organismos tais como insetos e camarões. Embora exista uma grande variedade de alvos do baculovírus, os mais estudados

são aqueles que causam doenças em pragas comuns como os insetos (MARTIGNONI; IWAI, 1986).

A história da descoberta dos baculovírus data a partir do desenvolvimento da indústria da seda que ocorreu na China antiga, a mais de 5000 anos atrás. Desde então, a cultura do bicho-da-seda se espalhou por toda a Ásia chegando ao Japão por volta de 300 anos dC e à Europa em torno de 550 anos dC. Como em qualquer indústria agrícola, muitos problemas ocasionaram uma variedade de doenças, comprometendo a economia local. Com o surgimento de novas ferramentas de análises, tal como a microscopia de luz, uma característica típica de um dos tipos de doenças foi identificada. Foi observada a presença de corpos de oclusão (OB) que são estruturas altamente refratárias e sintomáticas nos insetos afetados pelo agente infeccioso. Essas estruturas apresentavam-se em forma poliédrica e foi em meados do século XIX que essas constatações levaram à nomenclatura das doenças associadas a essas estruturas, denominadas então como poliedroses (ROHRMANN, 2019).

Embora tenha sido sugerida a presença de partículas infecciosas dentro dos corpos de oclusão (OB), somente no final da década de 1940 a presença de uma partícula completa de um vírus em estrutura de bastonete foi definitivamente demonstrada por meio da microscopia eletrônica (BERGOLD, 1947). Consequentemente, anos mais tarde, duas doenças de poliedrose foram diferenciadas: aquelas em que os corpos de oclusão estavam no citoplasma da célula hospedeira do animal infectado, denominadas poliedroses citoplasmáticas (CPVs) e aquelas em que as estruturas poliédricas se desenvolviam nos núcleos, denominadas poliedroses nucleares (NPVs) (XEROS, 1952).

Os NPVs são descritos como em forma de bastonetes, cujo material genético é o DNA, enquanto os CPVs possuem capsídeos de estrutura icosaedral e foram inseridos na família Reoviridae (gênero *Cypovirus*), na qual estão inseridas partículas virais cujo genoma é constituído de fitas duplas de RNA segmentadas (VAN OERS; VLAK, 2007).

Na década de 1920, foi descrita uma segunda categoria de baculovírus cujas características são dadas pela presença de OBs em forma helicoidal, pequenos e granulares (PAILLOT, 1926), assim denominada vírus da granulose (GV). A morfologia observada nos OBs desses vírus foi um critério crucial para a divisão em dois grandes grupos de vírus: Nucleopoliedrovírus (NPV) e Granulovírus (GV) (Figura 1).

No entanto, com os avanços das técnicas de biologia molecular outros critérios para subdivisão das

diferentes categorias de vírus foram utilizados. A terminologia para esses vírus passou por uma série de nomes, incluindo Borrelinavirus, Bergoldiavirus, Smithiavirus, Moratorvirus e Vagoiavirus até que, no início dos anos 70, a nomenclatura foi alterada e unificada dando origem então à família Baculoviridae (VAGO *et al.*, 1974). Os baculovírus são representados por um grande e diversificado grupo de vírus patogênicos para artrópodes, principalmente insetos das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera. Mais de 700 baculovírus diferentes já foram isolados de invertebrados e relatados na literatura (HERNIOU; JEHL, 2007).

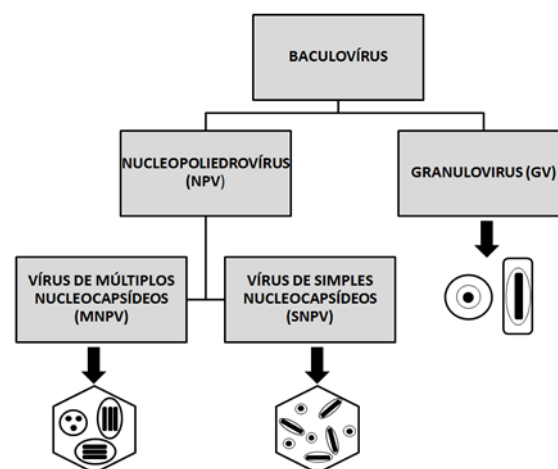


Figura 1. Representação esquemática da classificação dos baculovírus em Nucleopoliedrovírus (NPV) com as subdivisões em Vírus de Múltiplos Nucleocapsídeos (MNPV) e Vírus de Simples Nucleocapsídeos (SNPV) e Granulovírus (GV).

Os múltiplos vírus NPV são incorporados em OBs, que variam em suas dimensões podendo ter tamanhos que vão de 0,15 µm até 15 µm de comprimento, enquanto os grânulos (GV) são menores, aproximadamente 0,3 x 0,5 µm (largura x comprimento), e tipicamente contêm apenas um único vírion, ou raramente dois ou mais virions (HERNIOU *et al.*, 2012). Os nucleocapsídeos do baculovírus possuem um diâmetro que varia entre 30 a 60 nm e comprimento de 250 a 300 nm (Figura 1).

Essas estruturas estão inseridas dentro de um envelope para formar um vírion (partícula viral completa) (HERNIOU *et al.*, 2012). Duas formas distintas de vírions são produzidas durante o processo de infecção: vírus extracelular que brota da membrana plasmática da célula infectada para o meio extracelular, o qual possui estruturas denominadas peplômeros (contendo, por exemplo, a glicoproteína GP64 e a proteína-F), sendo envelopados individualmente (*budded virus-BV* ou *extracellular virus-ECV*); e vírions derivados de OB (ODVs). Ambos possuem genótipos idênticos, no entanto, possuem fenótipos distintos (Figura 2).

Embora os BVs e ODVs possuam o mesmo nucleocapsídeo, eles diferem entre si pela diferente

origem de seus envelopes (MCWILLIAM, 2007). Os envelopes do BV são derivados de membranas plasmáticas modificadas pelo brotamento do nucleocapsídeo, enquanto os envelopes dos ODVs são formados a partir de membranas montadas dentro da região nuclear da célula infectada. Os BVs consistem em apenas um único nucleocapsídeo rodeado por um envelope, enquanto ODVs inseridos dentro dos OBs que possuem nucleocapsídeos únicos (S) ou múltiplos (M) são referidos como NPVs únicos (SNPVs) ou NPVs múltiplos (MNPVs), respectivamente (IKEDA; HAMAJIMA; KOBAYASHI, 2015) (Figura 2).

Os nomes das diferentes espécies de baculovírus são dados adicionando as iniciais dos nomes dos insetos de onde eles foram isolados inicialmente, tais como *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), *Bombyx mori* NPV (BmNPV) e *Anticarsia gemmatilis* MNPV (AgMNPV), os quais foram isolados pela primeira vez a partir da alfafa looper (*A. californica*), bicho-da-seda (*B. mori*) e mariposa-cigana (*L. dispar*), respectivamente (THEILMANN *et al.*, 2005; JEHLE *et al.*, 2006). O mesmo ocorre com os representantes da classe GV, tais como *Agrotis segetum* GV (AgseGV); *Choristoneura occidentalis* GV (ChocGV); *Cryptophlebia leucotreta* GV (CrleGV). No entanto, este método de nomenclatura ocasionalmente cria confusão, pois os baculovírus podem possuir uma grande diversidade de hospedeiros ou ainda quando insetos são permissivos a infecções por múltiplas espécies de baculovírus (JEHLE *et al.* 2006).

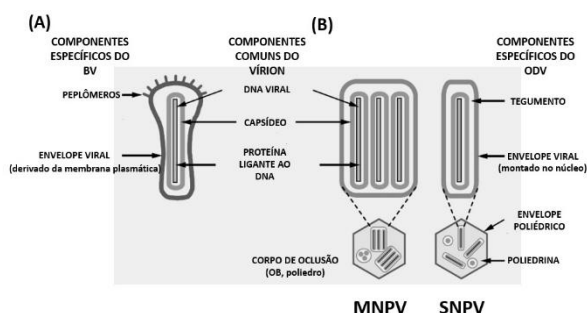


Figura 2. Representação dos dois fenótipos distintos de NPV produzidos durante a infecção de lepidópteros por NPV. (A) Vírus brotado (BV). (B) Vírus Derivado da Oclusão (ODV). BVs e ODVs possuem genótipos idênticos, mas fenótipos diferentes devido a origens distintas do envelope. MNPV, com múltiplos nucleocapsídeos em um envelope; SNPV com um único nucleocapsídeo em um envelope. Adaptado de Ikeda; Hamajima; Kobayashi (2015).

O processo de replicação viral ocorre no núcleo das células infectadas e possuem material genômico na forma de DNA fita dupla e circular, cujo tamanho pode variar entre 80 a 180 Kpb de extensão, codificando entre 100 a 180 proteínas diferentes

(THEILMANN *et al.*, 2005). Cerca de 50 espécies já tiveram seus genomas sequenciados (bases de dados do NCBI). A família Baculoviridae atualmente é subdividida com base em evidências filogenéticas e características moleculares em quatro gêneros distintos: Alphabaculovirus (nucleopoliedrovírus de lepidóptera), Betabaculovirus (granulovírus de lepidópteros), Gammabaculovirus (nucleopoliedrovírus de himenópteros) e Deltabaculovirus (nucleopoliedrovírus de dípteros) (JEHLE *et al.* 2006). Os vírions do gênero Alphabaculovirus são designados como únicos (S) ou múltiplos (M) dependendo do número de nucleocapsídeos por ODV (vírus derivados da oclusão), enquanto os dos gêneros delta e gammabaculovírus normalmente contêm um único nucleocapsídeo por ODV (VOLKMAN; SUMMERS, 1977).

Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação do baculovírus dentro da célula do inseto infectado é caracterizado por ser bifásico e envolve a formação de dois tipos de vírions, os quais são produzidos em fases distintas do ciclo de infecção. Os ODVs são adaptados para terem estabilidade e viabilidade no meio ambiente externo ao inseto hospedeiro e os vírions que brotam da membrana plasmática (BV), que não estão ocluídos e são, portanto, responsáveis pela disseminação sistêmica de célula a célula dentro do inseto. Além disso, o ciclo de replicação do vírus é dividido em três fases consecutivas de acordo com a programação da expressão gênica (imediate-precoce/precoce; tardia e muito tardia) (PASSARELLI; GUARINO, 2007).

O processo de infecção viral pelo baculovírus se inicia quando as larvas de insetos ingerem os corpos de oclusão presentes nas folhas dos vegetais (KEDDIE; APONTE; VOLKMAN, 1989). Os ODVs são embebidos em uma matriz proteica composta principalmente pela proteína polidrina, a qual é expressa na fase muito tardia do ciclo de infecção. Quando os ODVs entram em contato com as condições alcalinas presentes no intestino médio do inseto, o corpo de oclusão se dissolve ocorrendo a liberação dos ODVs, e a matriz proteica de polidrina é, então, degradada por proteinases presentes no intestino do inseto ou por aquelas que estão associadas aos vírions (WANG; GRANADOS, 1997). Em seguida, os ODVs se aderem à microvilosidade da bordadura em escova das células epiteliais colunares do intestino médio do inseto.

Os ODVs possuem um conjunto de proteinases específicas associadas ao envelope, chamadas de fatores de infectividade *per os* (*pif*), que medeiam o ancoramento do vírus aos receptores localizados na superfície da membrana das células epiteliais

(HORTON; BURAND, 1993; KIKHNO *et al.*, 2002). Posteriormente, a entrada do vírus ocorre através da fusão da membrana do envelope viral com as microvilosidades de células epiteliais (via não endocítica), seguida pela liberação dos nucleocapsídeos na região citoplasmática, descapsidação e liberação do DNA viral nu (OHKAWA; VOLKMAN; WELCH, 2010).

Uma vez atingido o núcleo, o processo de transcrição dos genes virais imediato-precoces/precoces inicia-se com auxílio da RNA polimerase da célula hospedeira (até 6 h pós-infecção). Esses genes codificam principalmente para proteínas transativadoras necessárias para uma subsequente expressão de genes virais e também para provocar um distúrbio da atividade normal da célula hospedeira (PASSARELLI; MILLER, 1993).

O processo de transição da fase precoce para a fase tardia da infecção é marcado pelo início da replicação do DNA viral que ocorre dentro de 6h a 18h após a etapa de infecção, juntamente com o início da atividade de uma RNA polimerase codificada pelo vírus (GRULA; BULLER; WEAVER, 1981). Este último processo iniciará com uma cascata ordenada de expressão de genes necessários para a formação de componentes virais na etapa de montagem de novos nucleocapsídeos. Os nucleocapsídeos recém-montados são, então, direcionados do núcleo para a membrana plasmática, onde ocorrerá o brotamento dos virions (BV) (PASSARELLI, 2012).

Os BVs fazem parte da etapa de infecção secundária, portanto, uma vez liberados por brotamento, eles são transportados por toda a hemolinfa para infectar novas células, levando a uma infecção sistêmica. Depois de entrar nas células-alvo, o processo de infecção é semelhante ao que acontece na infecção primária, onde os nucleocapsídeos são direcionados para o núcleo para que ocorra a replicação do DNA e subsequente expressão das proteínas virais. A fase muito tardia da infecção (18h após a infecção) inicia com a expressão de proteínas que constituem a matriz dos ODVs (MONTEIRO *et al.*, 2012).

O final do ciclo de infecção secundário ocorre com a infecção de vários tecidos e lise celular, culminando na morte e liquefação das larvas, e finalmente a disseminação de ODVs para o meio ambiente, onde podem permanecer estáveis e viáveis por vários anos até serem ingeridos por novas larvas (VOLKMAN; SUMMERS, 1977). Portanto, os ODVs embutidos em OBs desempenham um papel na transmissão horizontal viral, que ocorre de insetos para insetos, enquanto os BVs são responsáveis pela transmissão viral de célula a célula dentro da larva do

inseto infectado. Diferente do que acontece com os ODVs, onde a entrada do baculovírus se dá por fusão de membranas, os BVs entram nas células por meio da endocitose (KATOU; IKEDA; KOBAYASHI, 2006; LONG *et al.*, 2006).

Aplicações do Baculovírus

Uso dos baculovírus como inseticidas de lavouras.

Atualmente, os vírus da granulose e os vírus da poliedrose nuclear apresentam diversas aplicações de interesse econômico como modelo de expressão de proteínas heterólogas, mas inicialmente foi considerado para uso como inseticidas biológicos no controle de pragas. Esses vírus são considerados altamente virulentos, seletivos e estáveis, e principalmente com baixo impacto ambiental após sua aplicação, pois são altamente específicos para seus insetos hospedeiros, ou seja, não afetam outros artrópodes, incluindo predadores de pragas e parasitóides, vertebrados, plantas e biosfera (MOSCARDI, 2011).

Existe uma grande rigorosidade em vários países no que diz respeito à regulamentação da fabricação, registro e uso de pesticidas, o que resulta em custos mais altos e escassez dessas ferramentas em alguns casos. Muitas dessas espécies de insetos, que incluem algumas pragas da agricultura, tornaram-se difíceis de serem controladas devido ao desenvolvimento de resistência aos inseticidas químicos. A produção em larga escala e o uso frequente de inseticidas têm causado seu acúmulo nos ecossistemas, resultando em contaminação ambiental e toxicidade para muitas espécies diferentes, incluindo seres humanos. A disseminação da resistência a inseticidas também ameaça a eficácia dos inseticidas atualmente utilizados (FRENCH-CONSTANT, 2013; RANSON *et al.*, 2010; RIVERO *et al.*, 2010). Muitos estudos demonstraram que os baculovírus, tanto GV quanto NPV, são alternativas promissoras e economicamente viáveis para produtos químicos no controle biológico de insetos (WHALON; MOTA-SANCHEZ; HOLLINGWORTH, 2008; STERNBERG; THOMAS, 2018).

O controle biológico pode ser uma prática que tem efeitos duradouros devido à persistência dos patógenos no meio ambiente (FULLER; ELDERD; DWYER, 2012). Os organismos naturais e entomopatógenos utilizados intencionalmente no controle podem se estabelecer na população de pragas e contribuir para a proteção das culturas a longo prazo. Vários patógenos, tais como fungos, nematóides, bactérias e vírus podem ser utilizados para controlar as pragas de uma forma bastante eficiente quando

aplicados de uma forma artificial como inseticidas (SAXENA, 2008; VASANTHARAJ, 2008).

O primeiro relato de uso de um baculovírus no meio ambiente, no controle de pragas, ocorreu na década de 1930 de forma acidental quando um parasitóide foi importado da Europa para os EUA e Canadá para ser utilizado no controle do mosquito da espécie *Diprion hercyniae*. Foi observado que ocorreu uma inibição efetiva do crescimento dessa praga. Neste caso, o baculovírus acidentalmente introduzido foi um NPV específico para esse inseto. Desde então, nenhuma medida de controle foi necessária contra a *Diprion hercyniae* (BIRD; ELGEE, 1957).

Geralmente são utilizadas duas estratégias alternativas de manejo de pragas: a primeira consiste na pulverização das áreas infestadas com formulações concentradas de inseticidas numa tentativa imediata de controlar a praga, ou as áreas são pulverizadas com baixas concentrações de baculovírus, levando à permanência do vírus por várias gerações de insetos (FUXA, 2004).

Embora a prática do uso de baculovírus como inseticida para a proteção de cultivos agrícolas não tenha sido tão extensa quanto se esperava, existem vários relatos de práticas bem sucedidas do uso de diferentes espécies dessa família na América Latina, tais como, *Anticarsia Gemmatalis* MNPV, *Autographa californica* MNPV⁺, *Spodoptera albula* NPV, *Spodoptera sunia* NPV, *Cydia pomonella* GV, entre várias outras (HAASE; SCIOCCO-CAP; ROMANOWSKI, 2015).

Uso dos baculovírus como inseticidas de pragas que ocasionam problemas na saúde humana

Embora na natureza exista uma grande diversidade de lagartas de insetos, a grande maioria delas não representa uma ameaça à saúde humana. No entanto, existem membros de 12 famílias de lepidópteros que podem ocasionar lesões em humanos e que chegam a ser bastante graves (DIAZ, 2005). No Brasil, foi constatado que as larvas da espécie *Lonomia obliqua* (Walker, 1855) (Lepidoptera: Saturniidae) causam vários acidentes (CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007). Esta espécie pode causar a morte de pessoas provocada pela toxina LOPAP (protease ativadora de protrombina de *Lonomia obliqua*), liberada pelas cerdas da lagarta na pele das vítimas no momento que entram em contato, resultando em reações que variam desde irritação local a condições graves de risco de vida, como coagulopatia, insuficiência renal aguda e distúrbios hemorrágicos (GAMBORGI; METCALF; BARROS, 2006).

Devido a um grande índice de acidentes com essa lagarta e uma necessidade de controlar a

população deste inseto, muitas pesquisas foram voltadas para a busca e identificação de vários patógenos e predadores dessa lagarta, incluindo o nematóide *Hexamermis* sp. (MORAES, 2002) e um baculovírus: nucleopoliedrovírus múltiplo de *Lonomia obliqua* (LoobMNPV), que foi isolado de larvas de *L. Obliqua*. Foi observado que as larvas infectadas pelo baculovírus apresentaram todos os sintomas usuais de uma infecção por este vírus, embora não tenham apresentadas as características de liquefação e melanização (WOLFF *et al.*, 2002).

Os Baculovírus também são comumente usados como vetores de expressão de uma grande variedade de proteínas recombinantes. Por meio da engenharia genética da espécie AcNPV, levou à melhoria dos baculovírus já em uso como biopesticidas (SZEWCZYK *et al.*, 2006). Essa modificação promoveu uma redução do tempo necessário para o vírus provocar a morte do inseto hospedeiro. Portanto, a atividade inseticida de baculovírus de tipo selvagem pode ser melhorada através da inserção de genes heterólogos. Muitos trabalhos já foram publicados demonstrando a expressão em baculovírus de genes que codificam toxinas específicas para insetos (por exemplo, toxinas de escorpiões, ácaros, aranhas, anêmonas do mar e *Bacillus thurengiensis*) (LAPIED *et al.*, 2008; INCEOGLU *et al.*, 2006)

Uso de baculovírus em tratamento terapêutico

A terapia gênica é um método que tem como objetivo transferir um material genético para um paciente para tratar uma determinada enfermidade. Embora este conceito tenha sido definido já há muitos anos, a investigação clínica somente se iniciou na década de 1990, quando foi feito um estudo de um distúrbio de imunodeficiência no Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. Desde então, cerca de 2.500 estudos clínicos foram ampliados e abrangendo uma grande variedade de patologias de caráter infeccioso, doenças neurodegenerativas e câncer (ANGUELA; HIGH, 2019).

A terapia gênica visa a expressão de genes transferidos em altos níveis, a longo prazo, e o suficiente para ser considerado terapêutico. O gene transferido geralmente consiste em uma cópia normal de um gene alterado. Outro método da terapia gênica é a supressão da expressão de um gene prejudicial, utilizando métodos de interferência de RNA (RNAi) ou de edição do próprio genoma. Essa última ferramenta para editar o genoma e corrigir o gene alterado é teoricamente possível, no entanto, não existem ensaios clínicos em andamento (KOMOR *et al.*, 2016).

Embora a terapia gênica seja uma opção bastante promissora, existe uma necessidade de

utilizar vetores adequados com baixa ou nenhuma imunogenicidade, que são mais específicos ao tecido e podem ser produzidos de uma forma mais eficiente e relativamente a baixo custo (RITTER; KUPIEC-WEGLINSKI, 2005).

Os baculovírus (BV) são modelos que atendem a todos esses requerimentos, pois, são altamente especializados para células de insetos hospedeiros e apresentam uma baixa imunogenicidade em mamíferos, com ausência de memória imunológica pré-existente após a primeira administração. O BV não possui capacidade de se replicar nas células de mamíferos e, embora alguns genes de BV sejam transcricionalmente ativos, eles são expressos em baixos níveis (HITCHMAN, 2011).

Os baculovírus possuem a capacidade de transduzir uma grande variedade de linhagens de células de mamíferos, humanas ou não (HU, 2008), com diferentes propósitos, tais como expressão de genes terapêuticos a serem usados no tratamento de câncer, como em células malignas de glioma, células PC3 de câncer de próstata (WANG *et al.*, 2006; STANBRIDGE; DUSSUPT; MAITLAND, 2003), na síntese de proteínas protetoras para melhorar os efeitos da lesão por isquemia e reperfusão (IRI) em órgãos sólidos durante procedimentos de transplantes (HITCHMAN *et al.*, 2011), transferência de genes para gânglios da raiz dorsal com intuito de regeneração de células periféricas dos nervos (WANG *et al.*, 2005) e como veículo de vacinas *delivery* (revisado por MADHAN; PRABAKARAN; KWANG, 2010; HU 2008; AOKI *et al.*, 1999).

Assim, a grande questão é se o uso de baculovírus pode ser um método alternativo de fornecer genes terapêuticos a serem utilizados em diversas patologias e principalmente permanecendo confinados aos órgãos-alvos. Os vírus de células de mamíferos, especificamente aqueles utilizados em terapias gênicas, dependem da maquinaria celular da célula hospedeira para completar seu ciclo de vida. Uma consequência é a possibilidade das proteínas virais interagirem com proteínas e material genético das células hospedeiras, frequentemente levando a uma interrupção do ciclo e a viabilidade da célula hospedeira. Como os genes do BV, que possuem essas funções nas células de insetos, não são expressos nas células de mamíferos, é pouco provável que a infecção por BV afete as células alvo. Isso é um critério crucial para os protocolos empregados nas terapias que envolvem a correção de um defeito genético, ao invés de ocasionar a morte celular das células-alvos, como os empregados nas terapias de tratamento de cânceres (STANBRIDGE; DUSSUPT; MAITLAND, 2003).

Tratamento de tumores

Um dos tumores mais comuns em seres humanos é o glioma que tem a tendência a invadir o cérebro de uma forma extremamente agressiva (HOLLAND, 2000). Os gliomas são originários predominantemente dos astrócitos e são classificados de 1 a 4, de acordo com o grau de agressividade. O glioblastoma multiforme (nível 4), representa quase metade de todos os gliomas e é o tipo de tumor cerebral primário mais frequente em adultos e considerado quase incurável. Embora existam cirurgias interventivas (quimio- e radioterapia), os pacientes que possuem esse tipo de tumor geralmente morrem dentro de um período muito curto de tempo. A terapia gênica pode ser uma forma promissora para o tratamento do câncer (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005).

WANG *et al.* (2006) desenvolveram um vetor de baculovírus recombinante que possui a sequência reguladora da transcrição da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Esse procedimento foi feito com o intuito de direcionar a expressão de um gene de toxina da difteria em células de glioma de rato no sentido de minimizar ainda mais os possíveis danos causados nos neurônios, mesmo sendo observado que os baculovírus pareçam ser mais propensos a infectar as células da glia do que os neurônios no cérebro (LI *et al.*, 2004).

Esse baculovírus recombinante melhorou significativamente a transdução nas células de glioma, obtendo até 96% de eficiência em ratos. Quando usado para produzir a cadeia A da toxina da difteria intracelularmente em modelo de xenoinxerto de glioma de rato, o baculovírus foi capaz de suprimir de forma eficiente o desenvolvimento tumoral. Este vetor de baculovírus contorna alguns dos problemas inerentes associados aos vetores virais de mamíferos e fornece uma opção adicional para terapia gênica do câncer (WANG *et al.*, 2006). Estudos usando o baculovírus como vetor de terapia contra o câncer pode ser amplamente explorado para outros tipos de câncer, como, por exemplo, o câncer de próstata.

Assim, o vírus parece ser um veículo adequado para aplicações que requerem expressão gênica a curto prazo. Outras vantagens dos vetores de baculovírus incluem a facilidade de obtenção de um vetor viral recombinante e purificação de grandes quantidades do vírus com altos títulos, processos que poderiam ser extrapolados para níveis farmacêuticos. No entanto, embora se tenha uma boa compreensão de todas essas características atraentes do baculovírus, o uso de terapia gênica com esse vírus ainda está em sua fase inicial, nenhuma aplicação praticamente útil na terapia de câncer ainda foi produzida em humanos (KWANG; ZENG; WANG, 2016).

Regeneração de gânglios nervosos

Já é bem conhecido que os neurônios do gânglio espinhal sofrem degeneração em vários tipos de neuropatias do sistema nervoso periférico, como, por exemplo, após a transecção de um nervo periférico, onde até 40% dos neurônios DRG (gânglios da raiz dorsal) morrem de forma progressiva enquanto os neurônios que permanecem vivos mostram uma grande variedade de alterações patológicas no pericário, desde a cromatólise até a regulação positiva de citocinas, neuropeptídeos e fatores de transcrição (GROVES *et al.*, 2003).

Uma maneira de prevenir esses danos nessas terapias é fazer o uso do fator de crescimento nervoso (NGF), um polipeptídeo neurotrófico (THORNE; FREY, 2001). No entanto, esses fatores polipeptídicos utilizados em terapias são suscetíveis à proteólise e, portanto, neste tipo de terapia seriam necessárias constantes administrações, e a longo prazo. A entrega de genes de interesse terapêutico ao DRG seria outra forma de evitar mais mortes neuronais e degeneração nervosa em neuropatias periféricas (GLORIOSO; MATA; FINK, 2003a). Em estudos anteriores utilizando camundongos, foi observada que a administração intramuscular ou subcutânea de vetores virais levaram à captação dos vírus e entrega desses genes. Em particular, nestes estudos, foram usados os vírus herpes simplex (HSV) e o poliovírus (agente causador da poliomielite), que são captados pelas terminações nervosas e depois transportados através do axoplasma para o corpo celular dos neurônios no DRG (JACKSON; MESSINGER; PALMER, 2003; GLORIOSO; MATA; FINK, 2003b).

WANG *et al.* (2005) analisaram os efeitos por injeção intratecal lombar em ratos de vetores virais tais como adenovírus e baculovírus e observaram que esse método também mostrou-se bastante eficaz de administração para transferência *in vivo* de genes para o DRG. Essa é uma abordagem simples e relativamente não invasiva que pode ser aplicável à entrega repetida de genes no sistema nervoso periférico. Esse método pode estimular o crescimento de nervos que foram lesionados, e também possui um grande potencial para outras aplicações clínicas no sistema nervoso periférico, tais como tratamento de neuropatia diabética, proteção contra a degeneração de neurônios no DRG ocasionados por mutações genéticas e alívio de dores ocasionadas por neuropatias, lesão neural, inflamação ou invasão tumoral. Portanto, esses autores observaram que o baculovírus também poderia migrar por transporte axonal para os corpos celulares neuronais depois de ser internalizado nos terminais nervosos. Essas

descobertas corroboram com a hipótese de que os baculovírus são capazes de infectar neurônios adultos no DRG.

Tratamento contra lesão por isquemia e reperfusão (IRI)

A isquemia caracteriza-se pela falta de suprimento sanguíneo a um órgão, o que resulta em dano ou disfunção dos tecidos pela falta de oxigênio, glicose e outros nutrientes transportados pela corrente sanguínea. Isso faz com que o tecido se torne hipóxico ou, sem nenhum oxigênio situação de anóxia, e pode resultar em acúmulo de resíduos metabólicos. Contudo, a restauração do fluxo sanguíneo após um período de isquemia pode ser ainda mais prejudicial do que a isquemia inicial e é a causa principal da lesão por isquemia e reperfusão (IRI) (DEVARAJAN, 2006). IRI pode reduzir de forma bastante significativa as chances de recuperação em todos os tipos de transplante de órgãos sólidos e é um problema clínico muito comum com incidência crescente e com sérias consequências (DEVARAJAN, 2006).

No entanto, as células possuem um grande número de genes com atividade protetora cuja expressão é aumentada em situações em que a célula é ameaçada por estímulos prejudiciais e as protege inibindo a apoptose e respostas inflamatórias, como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) e genes membros da família de células B2 de linfoma (Bcl2). Por exemplo, a enzima antioxidante SOD degrada os radicais superóxidos que são tóxicos e, portanto, protege as células contra níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (VALDIVIA *et al.*, 2009) e as proteínas bcl-2 que desempenham um papel central no bloqueio da apoptose (LOPEZ-NEBLINA; TOLEDO; TOLEDO-PEREYRA, 2005). O vírus AcMNPV é capaz de transduzir uma grande diversidade de células de mamíferos. Isso sugere que o vírus pode ser útil, também, para a entrega de genes protetores para melhorar os efeitos da IRI em órgãos sólidos durante procedimentos de transplantes (HITCHMAN, 2011).

Uso com vacina

A vacinação é uma maneira eficiente de prevenir a ocorrência de muitas doenças infecciosas em humanos. Em decorrência do avanço na área de doenças infecciosas e do melhoramento e desenvolvimento de vacinas mais eficazes, tornou possível o melhor controle da propagação dessas doenças. No entanto, observa-se um possível perigo iminente de patógenos reemergentes, o que insere um problema sério e ameaça à saúde pública. Entre os tipos de vacinas disponíveis no mercado, as vacinas inativadas são geralmente consideradas mais seguras

e com estabilidade considerável. Devido a sua natureza inativa, essas vacinas são administradas em pessoas com sistema imunológico enfraquecido sem ter uma complicação mais grave decorrente de uma infecção oportunista. No entanto, as respostas imunes induzidas por esse tipo de vacina são principalmente de caráter humoral, sendo necessária imunizações repetidas para otimizar a imunidade à doença alvo (BAXTER, 2007).

Outra estratégia é o uso de vacinas vivas atenuadas, que são mais eficazes na indução da resposta imune. Os principais riscos dessas vacinas são uma possível reversão e recombinação com cepas circulantes de patógenos, como também ocorrer uma incompatibilidade da vacina com indivíduos imunocomprometidos, idosos, doentes crônicos e gestantes (AMANNA; SLIFKA, 2009). As vacinas de subunidades recombinantes, por outro lado, geralmente podem ser usadas independentemente do estado de saúde, mas possuem outras desvantagens, tais como a necessidade do uso de adjuvantes para melhorar a imunogenicidade além da dificuldade de purificação devido à natureza hidrofóbica dos antígenos. Sendo esse último fator o que reduz o custo-benefício da produção da vacina (KUMBHANI *et al.*, 2007).

Os vetores de vacinas virais surgiram da década de 1980 e apresentam um perfil de segurança mais favorável em relação às vacinas derivadas de agentes infecciosos vivos atenuados e também possuem uma melhor capacidade de imunogenicidade em relação às vacinas inativadas. Os vetores de vacinas virais têm a capacidade de apresentar os antígenos desejados em sua conformação nativa, levando a uma resposta imunogênica mais forte com consequente manutenção de níveis mais altos de expressão de genes em comparação com as vacinas de DNA (DRAPER *et al.*, 2008).

Embora os tipos de vacinas mencionados anteriormente apresentem uma série de vantagens, existem algumas considerações para o uso dessas vacinas em humanos tais como, uma imunidade pré-existente do vetor que pode ter um sério impacto na eficácia da vacina e também transgenes com tamanhos muito grandes podem ocasionar uma instabilidade genética comprometendo assim o rendimento. Na tentativa de contornar os problemas de imunidade do vetor preexistente, foram desenvolvidos vetores a partir de vírus recombinantes de origem não humana. Dessa forma, é possível evitar a neutralização do vetor viral por anticorpos preexistentes. Nos últimos anos, tem-se observado um número crescente de estudos do baculovírus como veículo de produção e entrega de vacinas. Esses

estudos apontam que uso de baculovírus aparentam ser bastante promissores (PREMANAND; WEE; PRABAKARAN, 2018).

Dentre os vários baculovírus, o AcMNPV é o mais amplamente estudado. AOKI *et al.* (1999) demonstraram que um baculovírus recombinante que expressa a glicoproteína gB do vírus da pseudo-raiva induz anticorpos contra essa proteína em camundongos. ABE *et al.* (2003) mais tarde, provaram que a imunização de camundongos com um baculovírus que expressa a hemaglutinina (HA) do vírus influenza via administração intranasal provocou respostas imunes inatas e forneceu aos ratos um alto nível de proteção contra um vírus influenza. As respostas imunes mediadas por baculovírus também podem ser desencadeadas pelo antígeno exibido na superfície do envelope viral. Usando a técnicas de exibição de superfície da proteína circunsporozóita de *Plasmodium berghei* (PbCSP), um parasita causador da malária em determinados roedores e uma subsequente imunização dos roedores pelo baculovírus modificado induziram altos níveis de anticorpos e células secretoras de IFN- γ contra a PbCSP e protegeram cerca de 60% dos camundongos (YOSHIDA *et al.*, 2003). Em um trabalho recente desenvolvido por IYORI *et al.* (2017), foi desenvolvido um baculovírus otimizado para a produção de vacina contra esporozóide causador de malária em camundongos também com resultados bastante promissores. Portanto, tem-se verificado um aumento cada vez mais significativo de desenvolvimento de vacinas usando o baculovírus como veículo de expressão de antígenos, o que leva a crer que ele pode ser considerado como uma excelente plataforma de expressão heteróloga direcionadas para vacinação (PREMANAND; WEE; PRABAKARAN, 2018).

Limitações do uso de Baculovírus como sistema de expressão heterólogo

Uma grande limitação do uso de BEVS para expressão heteróloga é que a infecção de células de insetos por baculovírus resulta em morte e lise celular, o que limita a expressão de proteínas baculovirais em uma janela de tempo entre o início da expressão gênica viral tardia e o tempo da morte da célula, o que compromete muito o rendimento da produção de proteínas de interesse biotecnológico (BLISSARD; ROHRMANN, 1990).

Assim, a expressão proteica é tipicamente restrita a três dias após a infecção das células de insetos. Além disso, a via de secreção de proteínas das células dos insetos fica comprometida durante as fases posteriores à infecção com o baculovírus, o que limita o grau de secreção de proteínas recombinantes. O

comprometimento da via secretória é causado, pelo menos até certos níveis, pelo acúmulo de grandes quantidades das enzimas quitinase e catepsina (uma protease) que são codificadas pelo vírus na via secretória (THOMAS *et al.*, 1998). Após a lise, a catepsina viral é liberada no sobrenadante da cultura e pode degradar as proteínas recombinantes após ser ativada pelo tratamento com reagentes caotrópicos como SDS ou pH baixo. Para minimizar os impactos negativos da quitinase e catepsina do baculovírus no rendimento e integridade das proteínas das vias secretoras, alguns vetores de baculovírus sem quitinase e catepsina têm sido desenvolvidos e otimizados nos últimos anos (KABA *et al.*, 2004).

Ultimamente, várias vacinas recombinantes têm sido produzidas no BEVS (ZHANG; MURHAMMER; LINHARDT, 2002), mas esta plataforma não é usada para produzir glicoproteína terapêutica, pois a maioria delas exige complexos padrões de glicosilação típicos de humanos que as linhagens celulares de insetos usadas no BEVS são incapazes de fornecer (STEELE *et al.*, 2017). Outro problema é que alguns sistemas de células de insetos produzem N-glicanos com epítomos imunogênicos. Nos últimos 20 anos, esses problemas foram enfrentados no intuito de obter plataformas de glicoenengenharia capazes de produzir N-glicanos não imunogênicos (GEILER; MABASHI-ASAZUMA; JARVIS, 2015).

Os baculovírus também possuem desvantagens como vetores de terapia genética, já que possui uma expressão transitória nas células de mamíferos. *In vivo*, a expressão do transgene é totalmente nula após 14 dias do início da transfecção. A duração da expressão de transgene *in vitro* usando baculovírus é significativamente menor que a expressão mediada por vetores retrovirais, lentivirais e AAV (AIKENNE *et al.*, 2000; LEHTOLAINEN *et al.*, 2002).

Os vetores baculovirais diferem principalmente dos outros vetores virais no tempo em que os genes transportados podem persistir no núcleo hospedeiro. No caso de vetores retrovirais, lentivirais e adenovirais, o DNA viral pode permanecer no núcleo, tanto de forma integrada como episomal, por um período mais longo. De fato, trabalhos anteriores já demonstraram que o DNA baculoviral persiste nos núcleos das células de mamíferos transduzidas no máximo por 48 h, portanto, sendo considerado um período muito curto para uma expressão otimizada (TJIA *et al.*, 1983).

Outra desvantagem do uso de baculovírus como vetor de terapia genética é a inativação pelo sistema complemento. O contato entre baculovírus e o sistema complemento sérico resulta na rápida inativação de virions em brotamento. Existem várias

modificações necessárias para reduzir o efeito negativo do complemento na transdução mediada por baculovírus. No entanto, o sistema de complemento não é um problema apenas para o baculovírus. É também uma barreira potente à administração *in vivo* de outros sistemas de entrega de genes, como lipossomas, retrovírus murinos e vários complexos de DNA sintético (HU, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de expressão de baculovírus (BV) em células provou ser uma ferramenta extremamente valiosa para produção de proteínas recombinantes. Melhorias contínuas no desenho vetorial e simplificação das técnicas de isolamento de vírus recombinantes, combinada com a relativa facilidade de culturas de pequena e grande escala de células, resultaram em amplo uso desse sistema. Muitos laboratórios estão começando a automatizar a produção de um grande número de vírus e esquemas de produção de proteínas usando métodos avançados de clonagem, manuseio robótico de líquidos e instrumentos de purificação de proteínas.

Embora existam várias limitações e problemas técnicos com o uso dos baculovírus, a biotecnologia tem avançado muito em todas as áreas de estudo e com diferentes abordagens, e cada vez mais se observa o uso do baculovírus em aplicações além da produção de proteínas em células de insetos e larvas. Nessas abordagens incluem o desenvolvimento de estratégias para exibição de peptídeos e proteínas heterólogas na superfície do baculovírus como também a inserção de cassetes de expressão em baculovírus para produção e liberação de diferentes proteínas de uma maneira altamente eficiente em uma grande variedade de células de mamíferos. Essa abordagem relativamente nova oferece várias vantagens, incluindo: a incapacidade do vírus de se replicar nas células de mamíferos; ausência de citotoxicidade, simplicidade técnica e segurança em comparação com vetores virais derivados de células de mamíferos. Embora o uso de baculovírus ainda não tenha atingido o estágio clínico, os ensaios pré-clínicos em animais e *ex vivo* usando células humanas demonstraram a viabilidade considerável da transferência de genes mediada por esses vírus em várias aplicações de terapias gênicas, dentre elas: vacinação, regeneração de tecidos e terapia contra o câncer.

Em conclusão, com as vantagens óbvias dos baculovírus para vários tipos de terapias, têm sido crescentes os esforços integrados para estabelecer métodos e normas de controle de qualidade para produtos derivados desses vírus e a realização da

terapia gênica em clínicas nos próximos anos, sendo então uma expectativa plausível.

REFERÊNCIAS

- Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, Matsuura Y and Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J. Immunol.* 2003; 171:1133-1139.
- Airenne KJ, Hiltunen MO, Turunen MP, Turunen AM, Laitinen OH, Kulo-maa MS and Yla-herdtuala S. Baculovirus-mediated periaxonal gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* 2000; 7:1499-1504.
- Amanna IJ and Slika MK. Wanted, dead or alive: new viral vaccines. *Antiviral Res.* 2009; 84:119-130.
- Angueta XM and High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu. Rev. Med.* 2019; 70:273-88.
- Aoki H, Sakoda Y, Jukuroki K, Takada A, Kida H and Fukushima A. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet Microbiol.* 1999; 68:197-207.
- Baxter D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med (Lond).* 2007; 57:552-556.
- Bergold GH. Die Isolierung des polyeder-virus und die natur der polyeder. *Z Naturforsch.* 1947; 1947:122-143.
- Bird JT and Elgee DE. A virus disease and introduced parasites as factors controlling the European spruce sawfly, *Diprion hercyniae* Htd. in central New Brunswick. *Can. Entomol.* 1957; 89:371-378.
- Blissard GW and Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 1990; 35:127-155.
- Carrijo-Carvalho LC and Chudzinski-Tavassi AM. The venom of the *Lonomia caterpillar*: An overview. *Toxicon.* 2007; 49(6):741-757.
- Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17:1503-1520.
- Diaz JH. The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 72:347-357.
- Dijkman GA and Debruyne FMJ. Epidemiology of prostate cancer. *Eur Urol.* 1996; 30(3):281-295.
- Draper SJ, Moore AC, Goodman AL, et al. Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. *Nat. Med.* 2008; 14:819-821.
- Ffrench-Constant RH. The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics.* 2013; 194(4):807-15.
- Fuller E, Elder BD and Dwyer G. Pathogen persistence in the environment and insect-baculovirus interactions: Disease-Density thresholds, epidemic burnout, and insect outbreaks. *Am. Nat.* 2012; 179:E70-E96.
- Fuxa JR. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2004; 103:27-43.
- Gamborgi GP, Metcalf EB and Barros EJG. Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*. *Toxicon.* 2006; 47:68-74.
- Geisler C, Mabashi-Asazuma H and Jarvis DL. An Overview and History of Glyco-Engineering in Insect Expression Systems. In: Alexandra Castilho (Ed.), *Glyco-Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science Business Media; 2015. 1321:131-152.
- Glorioso JC, Mata M and Fink DJ. Exploiting the neurotherapeutic potential of peptides: targeted delivery using HSV vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2003a; 3:1233-1239.
- Glorioso JC, Mata M and Fink DJ. Gene therapy for chronic pain. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2003b; 5:483-488.
- Groves MJ, Schänzer A, Simpson AJ, An SF, Kuo LT and Scaravilli F. Profile of adult rat sensory neuron loss, apoptosis and replacement after sciatic nerve crush. *J. Neurocytol.* 2003; 32: 113-122.
- Gruel, MA, Buller PL, and Weaver RF. α -Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells. *J. Virol.* 1981; 38(3):916-921.
- Haase S, Sciocco-Cap A and Romanowski V. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. *Viruses.* 2015; 7:2230-2267.
- Herniou EA and Jehle JA. Baculovirus phylogeny and evolution. *Curr. Drug Targets.* 2007; 8:1043-1050.
- Herniou EA, Arif BM, Becnel JJ, Blissard GW, Bonning B, Harrison R et al. Family *Baculoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds). *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* 2012. 163-173. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Hitchman RB, Locanto E, Possee RD and King LA. Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods.* 2011; 55:52-7.
- Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:6242-6244.
- Horton HM and Burand J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 1993; 67:1860-1868.
- Hu YC. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr. Gene Ther.* 2008; 8:54-65.
- Ikeda M, Hamajima R and Kobayashi M. Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. *Entomological Science.* 2015; 18:1-20.
- Inceoglu AB, Kamita SG, Hinton AC, Huang Q, Severson TF, Kang K-d and Hammock BD. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv. Virus Res.* 2006; 68:323-360.
- Iyori M, Yamamoto DS, Sakaguchi M, Mizutani M, Ogata S, Nishiura H, et al. DAF-shielded baculovirus-vectored vaccine enhances protection against malaria sporozoite challenge in mice. *Malar. J.* 2017; 16:390.
- Jackson CA, Messinger J, Palmer MT, Peduzzi JD and Morrow CD. Gene expression in the muscle and central nervous system following intramuscular inoculation of encapsidated or naked poliovirus replicons. *Virology.* 2003; 314: 45-61.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM and Vlak JM. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* 2006; 151:1257-1266.
- Kaba SA, Salcedo AM, Wafu PO, Vlak JM and van Oers MM. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. *J. Virol. Methods.* 2004; 122:113-118.
- Katou Y, Ikeda M and Kobayashi M. Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions. *Virology.* 2006; 347:455-465.
- Keddie BA, Aponte GW and Volkman LE. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science.* 1989; 243:1728-1730.
- Kikhno I, Gutiérrez S, Crozier L, Crozier G and Ferber ML. Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. I. Virol.* 2002; 83:3013-3022.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA and Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016; 533:420-424.
- Kost TA, Condreay JP and Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23:567-575.

42. Kumbhani DJ, Healey NA, Thatte HS, *et al.* Patients with diabetes mellitus undergoing cardiac surgery are at greater risk for developing intraoperative myocardial acidosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2007; 133:1566-1572.
43. Kwang TW, Zeng X and Wang S. Manufacturing of AcMNPV baculovirus vectors to enable gene therapy trials. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development.* 2016; 3:15050.
44. Lapiéd B, Pennetier C, Apaire-Marchais V, Licznar P and Corbel V. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends in Biotechnology.* 2008; 27(4): 190-198.
45. Lehtolainen P, Tyynela K, Kannasto J, Airene KJ and Yla-herttuala S. Baculoviruses exhibit restricted cell type specificity in rat brain: a comparison of baculovirus and adenovirus-mediated intracerebral gene transfer in vivo. *Gene Ther.* 2002; 9:1693-1699.
46. Li Y, Wang X, Guo H and Wang S. Axonal transport of recombinant baculovirus vectors. *Mol. Ther.* 2004; 10:1121-1129.
47. Long G, Pan X, Kormelink R, Vlak JM. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 2006; 80:8830-8833.
48. Lopez-Neblina F, Toledo AH and Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J. Invest. Surg.* 2005; 18, 335-350.
49. Madhan S, Prabakaran M and Kwang J. Baculovirus as Vaccine Vectors. *Curr. Gen. Ther.* 2010. 10: 201-213.
50. Martignoni ME and Iwai PJ. A Catalog of Viral Diseases of Insects, Mites, and Ticks. Portland, Ore, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. General Technical Report PNW; 1986.No.:195.
51. McWilliam A. Environmental Impact of Baculoviruses. FAO. R7299_FTR_anx3. 2007. Available online: http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2003/R7299_FTR_anx3.pdf. Acessado em: 22 de outubro de 2019.
52. Monteiro F, Carinhas N, Carrondo MJT, Bernal V and Alves PM. Toward system420 level understanding of baculovirus-host cell interactions: from molecular fundamental 421 studies to large-scale proteomics approaches. *Front. Microbiol.* 2012; 3:391.
53. Moraes RHP. Identificação dos Inimigos Naturais de *Lononia obliqua* Walker, 1855 (Lepidóptera: Saturniidae) e possíveis fatos determinantes do aumento de sua população [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba:Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ; 2002.
54. Moscardi F, Souza ML, Castro MEB, Moscardi ML and Szewczyk B. Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J, (Eds). *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications* (1st edition). New York: Springer; 2011. p415-445.
55. Ohkawa T, Volkman LE and Welch MD. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J. Cell Biol.* 2010; 190 (2):187-195.
56. Paillot A. Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chenilles de *P. brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasites. *Compt Rend.* 1926; 182:180-182.
57. Passarelli AL and Guarino LA. Baculovirus late and very late gene regulation. *Curr.DrugTargets.* 2007; 8:1103-1115.
58. Passarelli AL and Miller LK. Identification and characterization of lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. *J. Virol.* 1993; 67:3481-3488.
59. Passarelli AL. Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virol.* 2012; 411:383-392.
60. Premanand B, Wee PZ and Prabakaran M. Baculovirus Surface Display of Immunogenic Proteins for Vaccine Development. *Viruses.* 2018;10:298.
61. Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black IV WC. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropJKA.net.* 2010; 1:1-12.
62. Ritter T and Kupiec-Weglinski JW. Gene therapy for the prevention of ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Curr. Gene Ther.* 2005; 5:101-109.
63. Rivero A, Vezilier J, Weill M, Read AF and Gandon S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS pathogens.* 2010; 6(8):e1001000.
64. Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology.* 4th edition. Bethesda (MD). National Center for Biotechnology Information (US). 2019.
65. Saxena H. Microbial Managment of Crop-Pest. *J. Biopestic.* 2008; 1:32-37.
66. Stanbridge LJ, Dussupt V and Maitland NJ. Baculoviruses as vectors for gene therapy against human prostate cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2003; 2:79-91.
67. Steele KH, Stone BJ, Franklin KM, Fath-Goodin A, Zhang X, Jiang H, Webb BA and Geisler C. Improving the Baculovirus Expression Vector System with Vankyrin-enhanced Technology. *Biotechnol. Prog.* 2017; 33:1496-1507.
68. Sternberg ED and Thomas MB. Insights from agriculture for the management of insecticide resistance in disease vectors. *Evol. Appl.* 2018; 11:404-414.
69. Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz I and Lobo de Souza M. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnol. Adv.* 2006; 24:143-160.
70. Theilmann DA, Blissard GW, Bonning B, Jehle JA, O'Reilly DR, Rohrmann GF, Thiem S, and Vlak and JM. *Baculoviridae*. In: Fauquet CX, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA (eds). *Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses.* 8th Report of the International Committee on Viruses. 2005:177-185. Elsevier, Amsterdam.
71. Thomas CJ, Brown HL, Hawes CR, Lee BY, Min M-K, King LA and Possee RD. Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 1998; 72: 10207-10212.
72. Thorne RG and Frey WH II. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 2001; 40:907-946.
73. Tjia ST, zu Altschiltschesche GM. and Doerfler, W. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mam- malian cells. *Virol.* 1983; 125:107-117.
74. Vago C, Aizawa K, Ignoffo C, Martignoni ME, Tarasevitch L and Tinsley TW. Editorial: Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses. *J Invertebr Pathol.* 1974; 23:133-134.
75. Valdivia A, Pérez-Alvarez S, Aroca-Aguila, JD, Ikuta I and Jordán J. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J. Physiol. Biochem.* 2009; 65:195-208.
76. van Oers MM and Vlak JM. Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets.* 2007; 8(10):1051-1068.
77. Vasantharaj DB. Biotechnological approaches in IPM and their impact on environment. *J. Biopestic.* 2008; 1:1-5.
78. Volkman LE and Summers MD. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Comparitive infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. *J Invertebr Pathol.* 1977; 30:102-103.
79. Wang C-Y, Li F, Yang Y, Guo H-Y, Wu C-X and Wang S. Recombinant baculovirus containing the *Diphtheria* toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer Res.* 2006; 66:5798-5806.
80. Wang P and Granados RR .An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:6977-6982.
81. Wang X, Wang C, Zeng J, Xu X, Hwang PYK, Yee W-C, Ng YK and Wang S .Gene Transfer to Dorsal Root Ganglia by Intrathecal Injection: Effects on Regeneration of Peripheral Nerves. *Mol. Ther.* 2005; 12:314-320.

82. Whalon ME, Mota-Sanchez D and Hollingworth RM. Global Pesticide Resistance in Arthropods. CAB International: Wallingford, UK, 2008.
83. Wolff JL, Moraes RHP, Kitajima E, Leal EDS. and Zanotto PMA. Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). J. Invertebr. Pathol. 2002; 79:137-145.
84. Xeros N. Cytoplasmic polyhedral virus diseases. Nature. 1952; 170 (4338):1073.
85. Yoshida S, Kondoh D, Arai E, *et al.* Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. Virol. 3003; 316:161-170.
86. Zhang F, Murhammer DW and Linhardt RJ. Enzyme kinetics and glycan structural characterization of secreted alkaline phosphatase prepared using the baculovirus expression vector system. Appl. Biochem. Biotechnol. 2002; 101:197-210.