

Desarrollo de una plataforma biotecnológica sobre el baculovirus autóctono AgMNPV

Resumen

Los baculovirus son patógenos que infectan insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera en su estado larval. Se caracterizan por contener genomas grandes de cccdsDNA (80-180 kpb), y por ser muy utilizados en el control biológico de plagas agrícolas. Por otro lado, el baculovirus AcMNPV ha sido modificado genéticamente para explotarlo en otras aplicaciones, tales como la producción de proteínas recombinantes y la vehiculización de genes terapéuticos en mamíferos, gracias a convertir su genoma en un vector de clonado molecular. En tanto, el virus sudamericano AgMNPV, que infecta a la plaga *Anticarsia gemmatalis*, sólo se lo emplea en formulaciones bioplaguicidas. En vistas de las diversas y exitosas aplicaciones biotecnológicas logradas sobre AcMNPV, en este trabajo se pretende evaluar si usos equivalentes podrían ser obtenidos mediante la intervención genómica de AgMNPV. En particular, se generará un replicón para *Escherichia coli* basado en el genoma de AgMNPV (bácmido), y a partir del mismo, se producirán viriones recombinantes como pruebas de concepto para tecnologías de biocontrol de plagas, para la expresión de proteínas recombinantes, y para la transferencia de genes terapéuticos en células de mamífero y otros animales no susceptibles.

Palabras clave: Baculovirus, AgMNPV, Bácmido, BEV, BacMam

Estado del arte

Los baculovirus constituyen una familia de patógenos virales que infectan insectos de los órdenes Lepidoptera, Hymenoptera y Diptera. Junto a *Asfaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Polydnaviridae*, *Mimivirus*, *Phycodnaviridae*, *Nimaviridae*, *Adenoviridae* y *Poxviridae*, la familia *Baculoviridae* formaría parte del grupo de los virus con grandes genomas de DNA doble cadena (dsDNA), los cuales podrían tener un origen ancestral común (Gao y Qui, 2007). Estas entidades poseen moléculas genómicas de dsDNA circular grandes contenidas en una vaina o cápside cilíndrica polar de naturaleza proteica y forma baciliforme, rodeada por una bicapa lipídica con presencia de proteínas transmembrana, y presentan dos fenotipos a lo largo de un ciclo de multiplicación: los viriones brotados o *Budded Viruses* -BV-; y los viriones derivados de los cuerpos de oclusión, u *Occlusion Derived Viruses* -ODV-, presentes dentro de los cuerpos de oclusión, u OB -*Occlusion Body*-. Las diferencias principales están centradas en la composición de la membrana y de las proteínas que allí se anclan, además de existir una matriz proteica sólo presente en el segundo (Braunagel *et al*, 2003; Wang *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011; Hou *et al*, 2013). La misma es conocida como poliedro o gránulo dependiendo del género, y otorga una gran estabilidad ambiental al virión. En cuanto a la función, los ODVs son especialistas (infectan por vía oral células del intestino medio de la larva), mientras que los BVs son generalistas (responsables de la infección sistémica dentro del insecto y en general en muchas especies, poliorganotrópicos). Actualmente se conoce la secuencia de más de 250 genomas baculovirales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y se los clasifica en 4 géneros: *Alphabaculovirus*

(nucleopoliedrovirus –NPV- que infectan lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovirus –GV- que infectan lepidópteros), *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovirus –NPV- que infectan himenópteros), *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovirus –NPV- que infectan dípteros) (Herniou *et al.*, 2004; Jhele *et al.*, 2006; Herniou *et al.*, 2007; Miele *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2018). Respecto de la carga génica poseen entre 100 y 200 genes codificantes de proteínas, sumando más de 800 al considerar a toda la Familia, existiendo un subconjunto de 38 conocidos como *core genes* o genes esenciales, los cuales están presentes en todas las especies (Miele *et al.*, 2011; Garavaglia *et al.*, 2012; Wenmann *et al.*, 2018).

Gracias al establecimiento de numerosas líneas celulares derivadas de insectos, es posible multiplicar y producir lotes de estos patógenos en cultivos *in vitro* (Mengual *et al.*, 2010). Además, el genoma viral es infeccioso *per se* y ha podido ser modificado en algunas especies para replicar como megaplásmido (bácmido) en *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Estas propiedades han facilitado los estudios básicos y aplicados. Así, se han concretado tecnologías relevantes, algunas ya como productos comerciales y otras en desarrollo, asociadas a la expresión de proteínas en contextos eucariotas (BEVs, por *Baculovirus Expression Vectors*) y a otras aplicaciones en mamíferos (tecnologías BacMam, por *Baculoviruses applied on Mammals*) (Rodríguez *et al.*, 2011; Hsin-Yu *et al.*, 2012; Rajesh Kumar *et al.*, 2013; Swift *et al.*, 2013; Haase *et al.*, 2015; Felberbaum, 2015). En particular, el virus AcMNPV (nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*) es el baculovirus modelo, ampliamente explotado en la producción de proteínas recombinantes mediante, por ejemplo, el sistema *Bac-to-Bac* (Luckow *et al.*, 1993; Ciccarone *et al.*, 1997), que incluyen la producción de fármacos y vacunas (van Oers *et al.*, 2015), y en diversas tecnologías BacMam por su gran capacidad de incorporar DNAs heterólogos, baja citotoxicidad e incapacidad de replicación en mamíferos (Airenne *et al.*, 2013; Arghia *et al.*, 2014; Makkonen *et al.*, 2015; Mansouri y Berger, 2018). En tanto, baculovirus como AgMNPV (nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*), CpGV (granulovirus de *Cydia pomonella*), y SfMNPV (nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*), entre otros, son especialmente empleados para el control biológico de plagas (Haase *et al.*, 2015; Hatting *et al.*, 2018). AgMNPV infecta larvas de *Anticarsia gemmatalis*, una plaga sudamericana de cultivos de soja que causa serios impactos económicos, por lo que ha sido exitosamente empleado para su control (Oliveira *et al.*, 2006; Moscardi *et al.*, 2011; Haase *et al.*, 2015). De hecho, es considerada la especie baculoviral más extensivamente empleada como bioplaguicida.

El sistema *Bac-to-Bac* (comercializado por Invitrogen) se basa en la generación de bácmidos recombinantes en *E. coli*, mediante la transposición sitio específica *in vivo* (dentro de la cepa DH10B) de una secuencia que se comporta como un transposón de DNA no autónomo, contenida en un vector plasmídico denominado *Donor* (pFastBac según su nombre comercial), hacia un vector baculoviral (bácmido: genoma de AcMNPV conteniendo en el *locus poliedrina* a un ORI mini-F, kanamicina^R, y un segmento que codifica para el péptido LacZ- α que incluye el sitio de inserción para el transposón bacteriano Tn7 -mini-attTn7-), por la acción de una transposasa expresada a partir de un plásmido colaborador (pHelper). Los bácmidos recombinantes luego son recuperados de *E. coli*, y transfectados en células de insecto susceptibles, para así generar lotes virales de BVs destinados a cumplir las aplicaciones biotecnológicas de interés.

Hipótesis

El genoma del baculovirus AgMNPV puede replicar y sostenerse en *Escherichia coli* si se le introducen secuencias de un replicón procariota, y puede soportar la introducción de nuevas secuencias convirtiéndose en un vector de clonado molecular. Además, dado que su genoma es infeccioso *per se*, se podrán generar viriones recombinantes en células de insecto susceptibles, los cuales podrán asistir en aplicaciones de control biológico de plagas, en la expresión de proteínas (sistemas BEV), y en la vehiculización de genes terapéuticos en mamíferos (tecnologías BacMam).

Objetivo general

Desarrollo y evaluación de una nueva plataforma biotecnológica baculoviral que asista en la expresión de proteínas en contextos eucariotas, en la vehiculización de genes terapéuticos en animales, y en la formulación de biocontroladores de plagas agrícolas locales.

Objetivos específicos

- Modificar el genoma del baculovirus AgMNPV introduciéndole funciones de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido-Ag).
- Evaluar la generación de AgMNPV recombinantes derivados del Bácmido-Ag, útiles para la expresión de proteínas en entornos eucariotas.
- Evaluar la generación de AgMNPV recombinantes derivados del Bácmido-Ag, útiles para generar bioplaguicidas.
- Evaluar la generación de AgMNPV recombinantes derivados del Bácmido-Ag, útiles para transducir mamíferos y otros animales no susceptibles.

Materiales y Métodos

Mantenimiento de células y virus

Células UFL-Ag-286 (Sieburth *et al*, 1988 a y b) serán cultivadas en monocapas sobre soportes plásticos de diferente superficie, en estufa a 27°C (estufa MIR 5531, SANYO) y en medio GRACE's (Invitrogen) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% v/v y antibióticos y antimicóticos. La calidad de las líneas se certificará periódicamente mediante observaciones microscópicas y medidas de cinética de crecimiento. En tanto, lotes de virus AgMNPV (NC_008520.1), serán multiplicados mediante procedimientos estándar en monocapas de las mismas células, utilizándose para tal fin las multiplicidades de infección (*mdí*) que requieran los ensayos. Las estimaciones del título de BVs se realizarán mediante dilución terminal y plaqueo (O'Reilly, 1992). La calidad y estabilidad de los lotes virales se establecerán a través de las caracterizaciones que se realicen del genotipo y fenotipo de las progenies generadas, mediante ensayos de RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) genómicos, observaciones microscópicas, y ensayos de infección en cultivos *in vitro*. Cuando sea necesario, el genoma viral se

obtendrá mediante metodologías tradicionales que incluyen el tratamiento con Proteinasa K, la extracción con solventes orgánicos y la concentración mediante precipitación alcohólica (O'Reilly, 1992). Las líneas celulares de mamíferos también se mantendrán en monocapa, pero empleando medio DMEM o RPMI (Invitrogen), suplementado con SFB al 10% v/v e incubadas en estufa a 37°C con atmósfera húmeda y gaseada con CO₂.

Cepas bacterianas, plásmidos y otros ácidos nucleicos

Para el trabajo con DNAs plasmídicos se utilizarán estrategias tradicionales (Green y Sambrook, 2012). Así, los plásmidos que se empleen serán aislados a partir de cultivos bacterianos (cepas de *Escherichia coli* DH5 α , Top 10, DH10Bac; medio *Luria Bertani* suplementado con antibióticos) mediante minipreparaciones por lisis alcalina. En tanto, la generación del fragmento conteniendo el replicón procariota del báculo de AcMNPV bMON14272 (Luckow *et al*, 1993) será llevado a cabo mediante PCR, utilizando *primers* diseñados *ad hoc* y DNA polimerasas termoestables en condiciones de reacción adecuadas. Por otro lado, las transformaciones bacterianas se realizarán mediante *shock* térmico o electroporación según se considere necesario, en lotes de cepas de *E. coli* preparados según procedimientos tradicionales (Green y Sambrook, 2012). Posteriormente, la selección de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se realizará en medio Luria-Bertani sólido (agar-agar 1,5% p/v) suplementado con los antibióticos correspondientes según el plásmido utilizado. Las estimaciones de concentración de ácidos nucleicos se llevarán a cabo mediante la detección de sus propiedades espectroscópicas (NanoDrop 1000, Thermo Fisher), y mediante real time PCR (qPCR) empleando química SyBrGreen y el equipo StepOne (Thermo Fisher). En tanto, las electroforesis de ácidos nucleicos se realizarán en geles de agarosa y en condiciones tradicionales de corrida y tinción (Green y Sambrook, 2012) y, las imágenes se digitalizarán mediante el programa *Kodak Digital Images* (Kodak).

Mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Se utilizarán nematodos de la cepa N2 (*wild type*) adquiridos del *Caenorhabditis Genetics Center* (Universidad de Minnesota, <https://cgc.umn.edu/>). Los nematodos serán cultivados en placas de Petri de 15 mm de diámetro con medio NGM (*Nematode Growth Medium*; NaCl 0,3% p/v, Peptona 0,25% p/v, Colesterol 5 μ g/mL, CaCl₂ 1 mmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L, Agar 1,7% p/v en *buffer* fosfato de potasio 25 mmol/L a pH 6,0) y un césped de *E. coli* cepa HB101. Los nematodos se mantendrán siempre bajo condiciones de oscuridad y temperatura constante de 20°C. Para obtener poblaciones sincronizadas en el estadio larval L1, se utilizará el método de cloro (Lewis y Fleming 1995). Posteriormente, los embriones se resuspenderán en 3,5 mL de *buffer* M9 (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO₄ 1 mM), suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10 μ g/mL de tobramicina (Tobrabiocin, Denver Farma) y se dejarán en agitación durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab). Al día siguiente las larvas L1 se transferirán a nuevas placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101 y se dejarán crecer hasta el estadio L4. Las larvas L4 serán utilizadas para el experimento de transducción con viriones recombinantes de baculovirus. En el caso que sea necesario, se utilizará 5-fluorodeoxyuridina (FUDR) 40 μ M (Sigma) para inhibir la autoreproducción.

Generación de bÁcrido-Ag

DNA aislado de BVs de AgMNPV se cotransformará por electroporación junto al casete de DNA conteniendo el replicón de bMON14272 en bacterias DH10B suplementadas con el plÁsmido pKD46-RecA (Nature Technology), que aportará el fenotipo recombinogénico Lambda-Red (Ellis *et al.*, 2001). Luego de incubar a 37°C sin presiones de selección, se sembrarán placas de LB sólido suplementadas con kanamicina, IPTG y X-gal. El bÁcrido de AgMNPV se verificará mediante su aislamiento y posterior caracterización por RFLP y/o ensayos de PCR con *primers* específicos diseñados *ad hoc*.

Generación de bÁcridos-Ag recombinantes

Lotes de bacterias DH10B serán cotransformadas con el bÁcrido de AgMNPV (BÁcrido-Ag) y el plÁsmido *pHelper* del sistema *Bac to Bac* (Invitrogen). De alguna de las colonias resultantes (resistentes a kanamicina y tetraciclina) se generarán lotes de bacterias competentes para *shock* térmico (Green y Sambrook, 2012), que luego serán transformadas con alguna de las construcciones donoras (pFastBac) a ser ensayadas (pFastBac-Prom_{polh}/gfp/SV40pA; pFastBac-Prom_{polh}/polh/SV40pA-Prom_{p10}/gfp/HSVtkpA; pFastBac-Prom_{HSP70}/gfp/SV40pA, pFastBac-Prom_{CMV}/gfp/SV40pA)¹ previamente realizadas en el LIGBCM (*Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular* de la UNQ). Los bÁcridos recombinantes serán seleccionados por el fenotipo que producen en bacterias (colonias resistentes a kanamicina, gentamicina y sin capacidad de metabolizar el X-gal en presencia de IPTG). Luego de su aislamiento mediante *miniprep* por lisis alcalina, serán transfectados en células UFL-Ag-286 utilizando sistemas comerciales de transfección (Cellfectin, Genjuice) según las recomendaciones de los fabricantes y las optimizaciones que se hayan practicado. Los medios condicionados serán recuperados, y se realizarán multiplicaciones de BVs en nuevos cultivos celulares por ensayos de infección controlados. Los lotes virales serán almacenados a 4°C y protegidos de la luz.

Ensayos de expresión proteica

Lotes de BVs que porten de genoma al BÁcrido-Ag-Prom_{polh}/gfp/SV40pA (BV-GFP) se usarán para infectar células UFL-Ag-286 creciendo en monocapa. A las 72 hs se harán observaciones al microscopio de fluorescencia (Cytation 3, BioTek Instruments), y se cosecharán las células para evaluar su proteoma total mediante ensayos de SDS-PAGE con el sistema tris-glicina, y posteriores tinciones con Coomassie Brilliant Blue (Green y Sambrook, 2012). Las imágenes se digitalizarán mediante el programa *Kodak Digital Images* (Kodak).

Transducción de células y *C. elegans*

Lotes de BVs que porten de genoma al BÁcrido-Ag-Prom_{CMV}/gfp/SV40pA (BV-CMV/GFP) se usarán para realizar ensayos de transducción sobre células humanas HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) a diferentes *mdi*. Los resultados se analizarán en el microscopio de fluorescencia (Cytation 3, BioTek Instruments) a las 24 y 48 hs. En tanto, larvas L4 de *C. elegans* serán incubadas en *buffer* M9 [conteniendo lotes de BVs que portan de genoma al BÁcrido-Ag-Prom_{HSP70}/gfp/SV40pA (BV-Rec-Hsp/GFP) -o controles- + FUJDR

¹ Prom: promotor; polh: poliedrina; gfp: *green fluorescence protein*; pA: señal de polyA; SV40: simian vacuolating virus 40; HSVtk: timidina quinasa de herpes virus; CMV: citomegalovirus.

40 μ M] durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab). Al día siguiente los nematodos se transferirán a nuevas placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101, por un lado, y a placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101 suplementadas con FUDR 40 μ M, por otro, que se incubarán a 20°C. Al cabo de diferentes tiempos (por ejemplo, 24 y 48 hs) se evaluarán en lupa de epifluorescencia (Nikon).

Bioensayos sobre larvas susceptibles

Lotes de BVs que porten de genoma al Bámido-Ag-Prom_{polh}/polh/SV40pA-Promp10/gfp/HSVtkpA se usarán para generar lotes de OBs en células UFL-Ag-286. A los 5 dpi, se cosecharán las células para a partir de ellas obtener suspensiones de OBs según procedimientos tradicionales (Mengual *et al*, 2010), los cuales serán cuantificados mediante recuento directo utilizando microscopio óptico (Nikon) y cámara de Neubauer. Larvas de tercer estadio de *Anticarsia gemmatilis* serán tratadas con estos lotes de virus empleando el procedimiento de la gota (Hughes *et al*, 1986). Se registrarán los decesos, que se certificarán por observación en lupa de epifluorescencia (Nikon).

Cronograma

Actividades	Cuatrimestre						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Aislamiento de DNA viral y plasmídico	X						
Cuantificación de DNA viral por espectrofotometría, PCR <i>end point</i> y qPCR. Generación del casete de recombinación.		X					
Generación del bámido en <i>Escherichia coli</i>			X				
Generación de bácmidos recombinantes.				X			
Aislamiento de bácmidos recombinantes y transfección en células de insectos.					X		
Generación de lotes virales recombinantes por infección.						X	
Evaluaciones funcionales de baculovirus recombinantes (SDS-PAGE/Transducción de células humanas/Transducción de <i>C. elegans</i> /Bioensayos).							X

Factibilidad

Todo el equipamiento necesario para realizar este trabajo se encuentra disponible en las instalaciones de la UNQ. No se requieren autorizaciones especiales, ya que no se trabajará con organismos silvestres, animales vertebrados de laboratorio ni seres humanos. Los invertebrados serán obtenidos de laboratorios de cría de la UNQ, y los cultivos celulares serán manipulados en cabinas de flujo laminar. Ninguna de las cepas bacterianas, células eucariotas y virus a ser utilizados confieren un riesgo para el ambiente o para los seres

humanos. La línea celular UFL-Ag-286 y el baculovirus AgMNPV han sido gentilmente suministrados por el Dr. Bergmann Morais-Riveiro, de la Universidad de Brasilia. Las células HEK-293 han sido adquiridas en ATCC. Los residuos derivados de este trabajo serán dispensados según las normas vigentes en la UNQ.

Resultados esperados

Mediante la ejecución de este trabajo se espera lograr un nuevo sistema baculoviral, similar al de AcMNPV, pero en este caso basado en AgMNPV, para que actúe como plataforma para brindar diferentes servicios biotecnológicos. En particular, se demostrará con la proteína verde fluorescente (GFP) expresada bajo diferentes promotores la capacidad del baculovirus AgMNPV para expresar proteínas recombinantes en sus propias células y en otras, que incluyen a los mamíferos. Si los resultados fueran exitosos, se podrá sustituir GFP por el ORF de la proteína de interés, y aplicar el sistema como BEV, BacMam, o para la generación de mejores bioplaguicidas. A futuro, se espera poder compararlo con la plataforma basada en AcMNPV para determinar sus performances diferenciales. Se identifica como potencial obstáculo de este trabajo la disponibilidad de larvas de *Anticarsia gemmatalis* para realizar los bioensayos, dado que la plaga puede no estar presente en campo para establecer un pie de cría.

Este plan será uno de los trabajos prácticos de *Ingeniería Genética II* de la *Licenciatura en Biotecnología de UNQ*.

Bibliografía

- Airene KJ, Hu YC, Kost TA, Smith RH, Kotin RM, Ono C, Matsuura Y, Wang S, Ylä-Herttuala S. *Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications*. Mol Ther. 2013. 21(4), 739-49.
- Arghia P, Hasan A, Rodes L, Sangaralingam M, Prakash S. *Bioengineered baculoviruses as new class of therapeutics using micro and nanotechnologies: Principles, prospects and challenges*. Adv Drug Deliv Rev. 2014. 71C:115-130.
- Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD. *Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of Autographa californica nucleopolyhedrovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100(17):9797-802.
- Ciccarone, VC, Polayes D, Luckow VA. *Generation of Recombinant Baculovirus DNA in E. coli Using Baculovirus Shuttle Vector*. Methods in Molecular Medicine (Reischt, U., Ed.), 13, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1997.
- Ellis HM, Yu D, DiTizio T, Court DL. *High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001. 98(12):6742-6.
- Felberbaum RS. *The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors*. Biotechnol J. 2015. 10(5):702-14.
- Ferrelli ML, Berretta M, Belaich MN, Ghiringhelli PD, Sciocco-Cap A. & Romanowski V. *The Viral Genome; Chapter: Baculoviruses: The baculoviral genome*. InTech - Open Access Publisher. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. (2012) (30 páginas).
- Gao L, Qi J. *Whole genome molecular phylogeny of large dsDNA viruses using composition vector method*. BMC Evol Biol. 2007. 7:41.
- Garavaglia MJ, Miele SA, Iserle JA, Belaich MN, Ghiringhelli PD. *The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae*. J Virol. 2012. 86(22):12069-79.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. *Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives*. Viruses. 2015. 30;7(5):2230-67.
- Harrison RL, Herniou EA, Jehle JA, Theilmann DA, Burand JP, Becnel JJ, Krell PJ, van Oers MM, Mowery JD, Bauchan GR, Ictv Report Consortium. *ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae*. J Gen Virol. 2018. 99(9):1185-1186.
- Hatting JL, Moore SD, Malan AP. *Microbial control of phytophagous invertebrate pests in South Africa: Current status and future prospects*. J Invertebr Pathol. 2018. pii: S0022-2011(17)30367-1.
- Herniou EA, Jehle JA. *Baculovirus phylogeny and evolution*. Curr Drug Targets. 2007. 8(10):1043-50.
- Herniou EA, Olszewski JA, O'Reilly DR, Cory JS. *Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts*. J Virol. 2004. 78(7):3244-51.
- Hou D, Zhang L, Deng F, Fang W, Wang R, Liu X, Guo L, Rayner S, Chen X, Wang H, Hu Z. *J Virol. Comparative proteomics reveal fundamental structural and functional differences between the two progeny phenotypes of a baculovirus*. 2013. 87(2):829-39.

- Hsin-Yu Lu, Yi-Hsuan Chen, Hung J. Liu. *Baculovirus as a vaccine vector*. Landes Bioscience. **2012**. 1;3(5).
- Hughes PR, van Beek NAM, Wood HA. *A modified droplet feeding method for rapid assay of Bacillus thuringiensis and baculoviruses in noctuid larvae*. Journal of Invertebrate Pathology. **1986**. 48(2):187-192.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. *On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision*. Arch Virol. **2006** Jul;151(7):1257-66.
- Lewis, J. A. y J. T. Fleming. *Basic culture methods*. **1995**. Methods Cell Biol 48:3-29.
- Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. *Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by sitespecific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli*. J. Virol. **1993**. 67:4566-4579.
- Makkonen KE, Airenne K, Ylä-Herttulala S. *Baculovirus-mediated gene delivery and RNAi applications*. Viruses. **2015** 22;7(4):2099-125
- Mansouri M, Berger P. *Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future*. Plasmid. **2018**. 26;98:1-7.
- Mengual Gomez DL; Belaich MN; Rodriguez VA & Ghiringhelli PD. *Effects of Fetal Bovine Serum deprivation in cell cultures on the production of Anticarsia gemmatalis Multinucleopolyhedrovirus*. BMC Biotechnology, **2010**. 10:68.
- Miele SAB, Belaich MN, Garavaglia MJ & Ghiringhelli PD. *Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation*. **2011** Int J Evol Biol. 2011; 2011:379424.
- Moscardi F, Souza ML, Castro MEB, Moscardi M, Szewczyk B. *Baculovirus pesticides: present state and future perspectives*. En: Ahmad I., Ahmad F. and J. Pichtel (eds) Microbes and Microbial Technology. Springer. New York, USA, **2011**. 415-445.
- Oliveira JV, Wolff JL, Garcia-Maruniak A, Ribeiro BM, de Castro ME, de Souza ML, Moscardi F, Maruniak JE, Zanotto PM. *Genome of the most widely used viral biopesticide: Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*. J Gen Virol. **2006**. 87(Pt 11):3233-50.
- Rajesh Kumar S, Syed Khader SM, Kiener TK, Szyporta M, Kwang J. *Intranasal Immunization of Baculovirus Displayed Hemagglutinin Confers Complete Protection against Mouse Adapted Highly Pathogenic H7N7 Reassortant Influenza Virus*. PLoS One. **2013**. 7;8(6):e63856.
- Rodriguez VA, Belaich MN, & Ghiringhelli PD. *Integrated Pest Management and Pest Control; Chapter: Baculoviruses: members of Integrated Pest Management strategies*. InTech - Open Access Publisher. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. **2012**. (18 páginas).
- Sieburth PJ, Maruniak JE (a). *Growth characterist of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)*. In vitro Cell Dev Biol. **1988**. (24), 195-198.
- Sieburth PJ, Maruniak JE (b). *Suceptibility of a stablished cell line of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses*. J Invertebr Pathol. **1988**. (52), 453-458.
- Swift SL, Rivera GC, Dussupt V, Leadley RM, Hudson LC, Ma de Ridder C, Kraaij R, Burns JE, Maitland NJ, Georgopoulos LJ. *Evaluating baculovirus as a vector for human prostate cancer gene therapy*. PLoS One. **2013**. 6;8(6):e65557.
- van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. *Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology*. J Gen Virol. **2015**. 96(Pt 1):6-23.
- Wang H, Deng F, Pijlman GP, Chen X, Sun X, Vlak JM, Hu Z. *Cloning of biologically active genomes from a Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome*. Virus Res. **2003**. 97(2):57-63.
- Wang R, Deng F, Hou D, Zhao Y, Guo L, Wang H, Hu Z. *Proteomics of the Autographa californica nucleopolyhedrovirus budded virions*. J Virol. **2010**. 84(14):7233-42.
- Wang XF, Zhang BQ, Xu HJ, Cui YJ, Xu YP, Zhang MJ, Han YS, Lee YS, Bao YY, Zhang CX. *ODV-associated proteins of the Pieris rapae granulovirus*. J Proteome Res. **2011**. 3;10(6):2817-27.
- Wennmann JT, Keilwagen J, Jehle JA. *Baculovirus Kimura two-parameter species demarcation criterion is confirmed by the distances of 38 core gene nucleotide sequences*. J Gen Virol. **2018**. 99(9):1307-1320.
- Wu W, Wang J, Deng R, Wang X, He X, Long Q. *An efficient method for precise gene substitution in the AcMNPV genome by homologous recombination in E. coli*. J Virol Methods. **2003**. 113(2):95-101.