



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Simonin, Jorge Alejandro

Optimización de tecnologías BacMam para aplicaciones en biología celular y terapia génica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Simonin, J. A. (2023). *Optimización de tecnologías BacMam para aplicaciones en biología celular y terapia génica. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4058>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Optimización de tecnologías BacMam para aplicaciones en biología celular y terapia génica

TESIS DOCTORAL

Jorge Alejandro Simonin

alejandro.simonin@gmail.com

Resumen

Desde los comienzos de la humanidad, ésta ha utilizado a las distintas entidades biológicas de su entorno como materia prima para el desarrollo de herramientas diversas que le permitieran subsistir y mejorar su calidad de vida, con más o menos conocimiento del funcionamiento de dichos organismos y de sus productos derivados. En 1796 el médico británico Edward Jenner desarrolló la primera vacuna contra una enfermedad de origen viral: la viruela. Sin embargo, para ese entonces el pequeño tamaño de los virus les impedía a los científicos y científicas dilucidar cuáles eran los patógenos causantes de ciertas enfermedades como la viruela. Se tardaría un siglo más, con el invento del microscopio electrónico, en descubrir y comenzar a describir a las entidades que denominamos virus.

Desde esos tiempos y, en particular, con el nacimiento de la ingeniería genética en la década de 1970, las tecnologías en las ciencias de la vida han crecido de manera exponencial. La posibilidad de intervenir clonando y modificando el material genético de organismos y sus movilomas asociados ha hecho posible una expansión del conocimiento general sobre la materia viva pero, además, también ha facilitado la aparición de numerosos bienes y servicios que han mejorado la calidad de vida humana.

En este contexto el viroma del planeta es un espacio sumamente importante, cuya abundancia y variedad han mostrado (y siguen haciéndolo) ser una fuente inagotable para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. La producción de proteínas recombinantes, la generación de vectores virales adaptados para la entrega de secuencias específicas a células y tejidos diana, o el desarrollo de vacunas, entre otras posibles aplicaciones, son claros ejemplos de esos alcances. En este sentido, los baculovirus se destacan como un grupo prominente de entidades virales con un papel importante en la biotecnología.

La capacidad de los baculovirus de transducir (no infectar) células de mamíferos con un alto grado de bioseguridad permite su utilización como vectores empleados en terapias génicas, cuyas prestaciones deben ser ampliadas y mejoradas. En este trabajo, se explora el uso de

un baculovirus de *Autographa californica* (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* o AcMNPV) para vehiculizar genes terapéuticos en mamíferos en distintos modelos de enfermedad, y sus posibles mejoras a partir de la pseudotipificación con la glicoproteína del Virus de la Estomatitis Vesicular, para así aumentar su capacidad de traducción de células de mamífero. También se aborda la posibilidad de incorporar un circuito de liberación de minicírculos mediante el uso de la tecnología Cre/LoxP, y de liberación de ministrings mediante el uso de la tecnología TelRL/iTelomerasa, ambos conteniendo un origen de replicación del virus de Epstein-Barr, para así aumentar su tiempo de permanencia y de expresión de genes de interés dentro de la célula blanco.



Universidad Nacional de Quilmes

Julio 2023

TESIS DE DOCTORADO

Optimización de tecnologías BacMam para aplicaciones en biología celular y terapia génica

Autor: Jorge Alejandro Simonin

Director: Dr Mariano Nicolás Belaich

Co-Directores: Dr. Pablo Daniel Ghiringhelli/ Dra.
Carolina Cerrudo

Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular Área Virosis de Insectos LIGBCM-AVI, Dpto. de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes

Abreviaturas

AAV = *Adeno Asociated Virus*

ANMAT = Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

AdV = *Adeno Virus*

BacMam = *Baculovirus gene transfer into Mammalian cells*

BFP = *Blue Fluorescence Proteins*

BV = *Budded Virus*

CAR = Gen codificante para el receptor Coxsackie-adenovirus

CMV = Cito Megalo Virus

DOX = Doxiciclina

DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol

EAP = Enfermedad Arterial Periférica

EMA = *European MedicineAgency*

FDA = *Food and Drug Administration*

GFP = Green Fluorescence Proteins

GOI = *Gen of interest*

GV = Granulo Virus

HSPC = Células Hematopoyéticas Madre y Progenitora

IA = Ingredientes Activos

IAM = Infarto Agudo de Miocardio

IPTG = Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ITR = Secuencias terminales invertidas y repetidas

LB = *Luria-Bertani*

LTR = Regiones terminales repetidas

kpb = Kilo pares de bases

MCS = Sitio de clonado múltiple

MOI = Multiplicidad de Infección

MNPV = Virus de la poliedrosis nuclear múltiple

nm = Nano metros

NPV = Núcleo Poliedro Virus

NK = *Natural killers*

OB = Occlusion Bodies

ODV = Occlusion-derived virus

ORF = *Open reading frame*

pb = Pares de bases

PEG = Polietilenglicol

PEI = Polyethylenimine

PVDF = Membrana de Fluoruro de Polivinilideno

PCR = *Polimerase Chain Reaction*

PBS = *Phosphate Saline Buffer*

PIF = *Per os Infectivity Factors*

qPCR = *Real Time Polimerase Chain Reaction*

SFB = Suero Fetal Bovino

SNPV = Virus de la poliedrosis nuclear Simple

UFP = Unidades formadoras de placa

UV = *Ultraviolet Light*

VEF = *Virus Enhancing Factors*

VLP = *Virus Like Particle*

VSV-G = Glicoproteína del Virus de la Estomatitis Vesicular

VSV = Virus de la Estomatitis Vesicular

mL = Mili Litros

μL = Micro Litros

μm = Micro metros

dsDNA = DNA doble cadena

cccdsDNA = DNA doble cadena circular covalentemente cerrado

lccdsDNA = DNA doble cadena lineal covalentemente cerrados

Índice

Introducción	2
Baculovirus	2
Características generales	2
Clasificación.....	5
Ciclo viral	8
Aplicaciones tecnológicas de los baculovirus	11
Terapia génica	14
Definiciones y tipos	14
Vehículos utilizados para la formulación de IA (ingredientes activos) en enfoques in vivo	18
Vectores virales en Terapia génica.....	19
Terapias génicas en el mercado farmacológico	23
Tecnologías BacMam	26
Baculovirus y terapia génica	27
Baculovirus y la glicoproteína de VSV	32
Baculovirus y la duración de la expresión génica en mamíferos:	33
Hipótesis de trabajo	35
Objetivo General	35
Objetivos Específicos	35
Materiales y Métodos	36
Metodologías generales	36
Electroforesis de ácidos nucleicos	36
Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa	36
Precipitación de ácidos nucleicos	36
Transformación de DNA en bacterias	37
Reacciones de secuenciación de DNA.....	37
Digestiones y ligaciones enzimáticas de DNA.....	37
Síntesis y amplificación de DNA mediante PCR	37

Mantenimiento de líneas celulares de insecto	38
Generación de virus recombinantes	38
Multiplicación de stocks de viriones brotantes	38
Concentración de virus brotantes por centrifugación a alta velocidad	38
Titulación de stocks virales	38
Mantenimiento de líneas celulares de mamífero	39
Transducción de líneas celulares de mamíferos con BVs	39
Materiales	39
Cepas bacterianas y líneas celulares	39
Plásmidos y virus recombinantes	40
Primers utilizados en las reacciones de PCR y secuenciación	44
Antibióticos e inductores	44
Metodologías específicas	45
Inmunodetección de VSV-G (Western Blot)	45
Cinética de generación de virus brotantes pseudotipados	45
Cinética temporalidad de los promotores ie-1, gp64 y p10	45
Ensayo de fusogénesis en células Sf9 infectadas con virus pseudotipados	45
Ensayo de progresión del diámetro de focos virales	46
Transducción de células HEK293T con el virus Ac-iCre-Inducible	46
qPCR de BV de AcMNPV	46
Ensayos <i>in vivo</i>	47
Resultados A: Herramientas útiles	49
BacMam con genes reporteros	49
Determinación de títulos virales por qPCR	50
Transducción de células de mamíferos <i>In vitro</i>	53
Resultados B: BacMam con genes terapéuticos	56
Generación de virus recombinantes portadores de genes terapéuticos	56
Terapia génica para regeneración cardíaca en modelo ovino	59
Terapia génica para enfermedad arterial periférica en conejos	60
Resultados C: BacMam con mayor poder de transducción	63
Generación de baculovirus recombinantes	63
Cinética de expresión de los promotores baculovirales	67

Determinación de la incorporación de la proteína VSV-G en los BVs pseudotipados	69
Ensayo de fusogénesis de células infectadas con BVs pseudotipados con VSV-G.....	71
Ensayo de capacidad de transducción de los BVs pseudotipados con VSV-G	73
Resultados D: BacMam con efecto terapéutico más duradero	76
Diseño de secuencias y clonados moleculares.....	76
Circuito regulador de la inducción génica	77
Circuito generador de minicírculo/ministring	79
Discusión.....	81
Resultados A - Herramientas útiles	81
Resultados B - BacMam con genes terapéuticos	82
Resultados C - BacMam con mayor poder de transducción	83
Resultados D - BacMam con efecto terapéutico más duradero	85
ANEXO I: Clonados Moleculares	86
Resultados A: Herramientas útiles	86
Plásmido pFastBac-CMV-GFP	86
Plásmido pFastBac-CMV-BFP	87
Plásmido pFastBac-CMV-mCherry	91
Plásmido pGMT-IE1 p/qPCR.....	93
Resultados B: BacMam con genes terapéuticos	95
Secuencia diseñada para pFastBac-Tbx20	97
Secuencia diseñada para pFastBac-mHif1-alpha	98
Secuencia diseñada para pFastBac-Meis	99
Secuencia diseñada para pFastBac-shRNA-A y pFastBac-shRNA-B.....	100
Resultados C: BacMam con mayor poder de transducción	101
Obtención de promotores de ie1 y gp64, y del ORF del gen vsv-g	101
Clonado de GFP bajo los promotores de ie1 y gp64 en pFastBac-Dual	102
Clonado del gen vsv-g bajo los promotores p10, ie1 y gp64	105
Resultados D: BacMam con efecto terapéutico más duradero	107
Diseño de secuencias necesarias a sintetizar	107
Clonado de p-iCre-Inducible.....	110
Clonado de pFastBac-CMV-iCre y FastBac-CMV-iTelomerasa	113
Clonado de pFastBac conteniendo el minicírculo/ministring (MCMS)	115

ANEXO II: Generación de b́acmidos mediante el sistema BAC-TO-BAC(Thermo Fisher Scientific)	121
ANEXO III: Citometría de flujo	123
Resultados A: Transducción de células de mamíferos <i>In vitro</i>	123
Resultados C: Ensayo de capacidad de transducción de los BV pseudotipados con VSV-G	127
Agradecimientos	128
Bibliografía.....	129

Durante el tiempo de producción de esta tesis doctoral y con las herramientas y virus recombinantes generados en ella se publicaron los siguientes trabajos:

- Protein-gene orthology in Baculoviridae; an exhaustive analysis to redefine the ancestrally common coding sequences (**Cerrudo et al., 2023**)

En colaboración con Cintia Parsza y Diego Mengual Gómez de la Universidad Nacional de Quilmes

- Evaluation of the nucleopolyhedrovirus of Anticarsium gemmatilis as a new vector for gene therapy in mammals (**Parsza et al., 2021**)

En colaboración con Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMETTYB), Universidad Favaloro-CONICET.

- Novel insights into cardiac regeneration based on differential fetal and adult ovine heart transcriptomic analysis (**Locatelli et al., 2020**)
- Effect of intramuscular baculovirus encoding mutant hypoxia-inducible factor 1-alpha on neovascularization and ischemic muscle protection in rabbits with peripheral arterial disease (**Gimenez et al., 2020**)

En colaboración con el Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, CONICET

- Solutions against emerging infectious and noninfectious human diseases through the application of baculovirus technologies (**Targovnik et al., 2021**)

Introducción

Baculovirus

Características generales:

Los baculovirus representan una familia de patógenos virales, mayoritariamente infectivos en insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Diptera*. Sus efectos devastadores en los organismos infectados los ha vuelto un objeto de estudio sumamente importante para el diseño de agentes biológicos controladores de plagas en la industria agrícola, principalmente debido a su acotado rango de hospedador y a su gran perfil de bioseguridad (Rohrmann, 2019).

Los virus integrantes de esta familia presentan genomas de gran tamaño (entre 80 y 180 kb, aproximadamente), de DNA doble cadena circular covalentemente cerrado, conteniendo desde 90 a 180 genes codificantes de proteínas, de los cuales se estima que al menos 38 de ellos resultan ortólogos, y de carácter esencial para el ciclo viral. La existencia de genes adicionales presentes en algunos especímenes y no en otros, aportando probablemente ventajas adaptativas o factores de virulencia, denota la existencia de eventos de transferencia horizontal determinando inserciones y deleciones en los genomas involucrados. En diversos ensayos fue posible evidenciar la recuperación de numerosos genotipos provenientes de un mismo organismo infectado, a causa de las altas tasas de recombinación de estos virus, cercana al 50% en genotipos relacionados, mutaciones puntuales espontáneas, o propias del sistema replicativo. El material genético se encuentra condensado y empaquetado dentro de una cápside proteica baciliforme, de aproximadamente 230 a 385 nm de longitud, y 40 a 60 nm de diámetro (Rohrmann, 2019; Gómez Valderrama & Villamizar, 2013).

A lo largo del ciclo viral, los baculovirus presentan dos fenotipos característicos, genéticamente idénticos, que varían tanto en su momento de ocurrencia durante la infección, como en su morfología y composición. Los viriones brotantes o brotados (*Budded Virus*; BV), responsables de la propagación dentro de las células del organismo infectado, se presentan en los estadios más tempranos de la infección, mientras que el fenotipo mayoritario en los estadios tardíos es denominado cuerpo de oclusión (*Occlusion Body*, OB), que contiene a los *Occlusion Derived Virus* (ODV), responsables de la transmisión del virus de un organismo a otro (Figura 1).

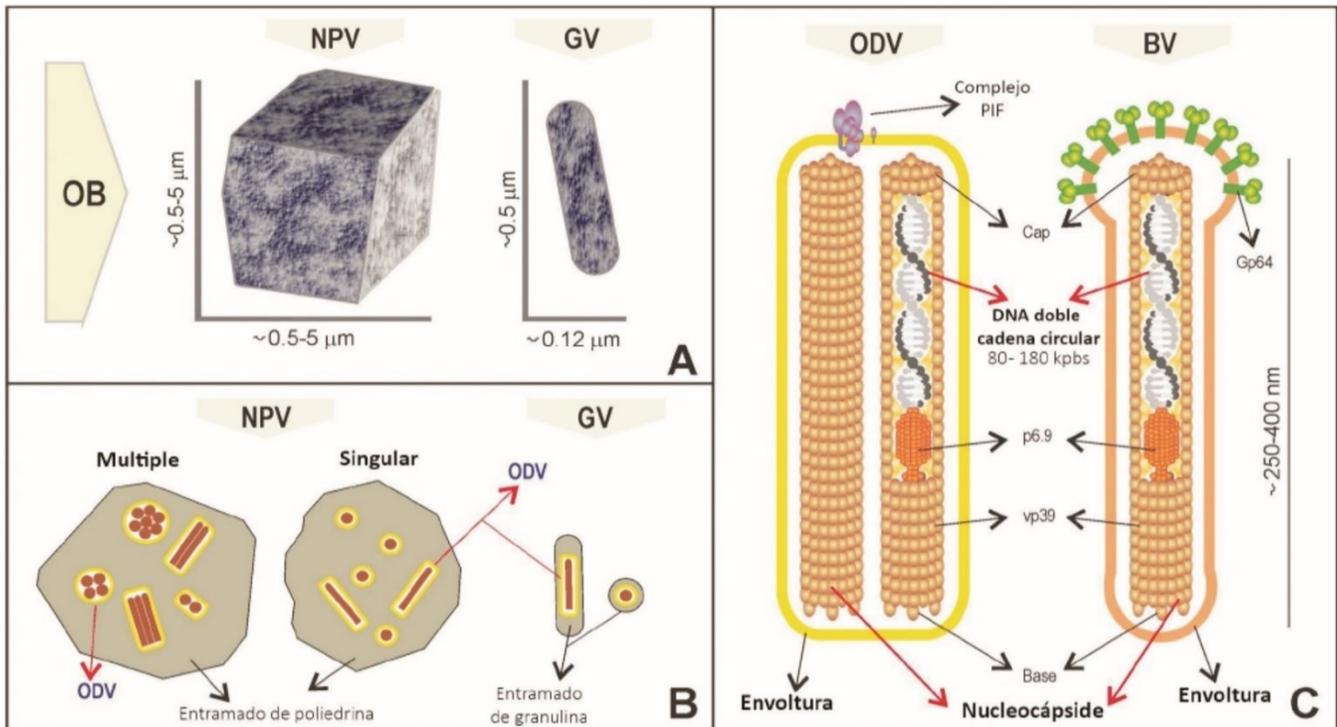


Figura 1. Fenotipos de los baculovirus. La ilustración describe las características principales de los fenotipos baculovirales. Se ofrece una representación de las formas y dimensiones típicas de los cuerpos de oclusión (OB) de nucleopoliedrovirus y granulovirus (A), así como un corte transversal de éstos (B), exponiendo la multiplicidad o singularidad de viriones por OB. Además, se ofrece una comparación entre los fenotipos de los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) y virión brotante (BV). (C) Las nucleocápsides, en este caso, son las mismas, a diferencia de las envolturas, que poseen orígenes diferentes (la envoltura del ODV proviene de la membrana nuclear, mientras que la del BV proviene de la membrana plasmática). Estas estructuras presentan polaridad, que radica no solo en morfología, sino también en composición proteica. El DNA (doble cadena y circular, covalentemente cerrado) se encuentra asociado a una proteína básica denominada p6.9. El complejo de infección, mejor conocido como *per os infectivity complex* (PIF), se encuentra presente solo en el ODV. Por otro lado, la proteína fusogénica GP64 resulta única para los BV pertenecientes al género *Alphabaculovirus*, mientras que, en el resto de las entidades de esta familia, este rol lo toma la proteína F. Adaptado de **Targovnik et al., 2021**.

Las poblaciones de insectos son altamente dependientes de la temperatura y la humedad del ecosistema, por lo que existen estaciones que concuerdan con un aumento drástico de individuos, y otras asociadas a su colapso, ya sea por la pérdida de alimento, a que resulten eliminados por predadores, o a que las condiciones ambientales se vuelvan inhóspitas. De esta forma, las entidades virales han desarrollado y adquirido diversos mecanismos que les permiten perdurar en el ambiente en períodos de ausencia de hospedadores compatibles, y los baculovirus no son una excepción. Los OB permiten conservar la viabilidad del virus, portando una protección de larga duración contra las altas temperaturas, la radiación UV, los agentes químicos, la humedad extrema o, incluso, la deshidratación, hasta ingresar a un individuo susceptible y proceder con el ciclo viral. Este fenotipo es el causante de la infección primaria, y a pesar de tener una estructura rígida y sumamente resistente, resulta soluble en condiciones de pH básico, como las dadas en el lumen intestinal de los insectos. Esto permite la liberación de los ODV y, así, iniciar la infección de las células del epitelio. Dependiendo del género viral, los OB pueden presentar una morfología similar a un poliedro irregular, o de gránulo, en función del polipéptido mayoritario que conforma

tal estructura, pudiendo ser poliedrina o granulina, respectivamente. En la **Figura 2**, se disponen micrografías electrónicas que denotan estas diferencias morfológicas. Los ODV se encuentran comprendidos dentro de cápsides proteicas localizadas en el interior de estas estructuras pseudo cristalinas, envueltas por un recubrimiento de naturaleza lipoproteica proveniente de la membrana interna de la célula hospedadora, e integran alrededor de 13 proteínas de membrana, siendo algunas de ellas cruciales para el desarrollo de la infección primaria por vía oral (**Rohrmann, 2019**).

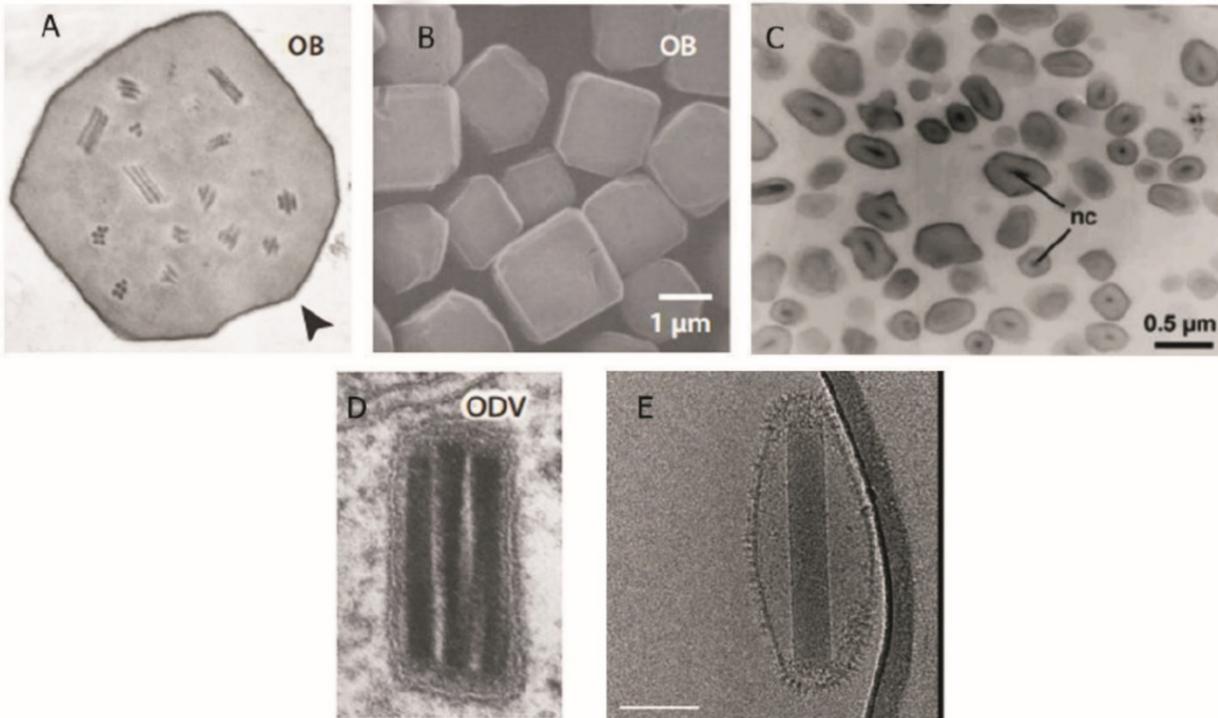


Figura 2. Fenotipos baculovirales. (A-B) Micrografía electrónica de transmisión de un OB maduro proveniente del baculovirus AcMNPV (**Blissard & Theilmann, 2018**). (C) Micrografía electrónica de transmisión de un OB maduro proveniente del baculovirus ErelGV (**Ardisson-Araújo et al., 2014**). (D) Micrografía electrónica de transmisión de un ODV proveniente del baculovirus AcMNPV (**Blissard & Theilmann, 2018**). (E) Crio microscopía electrónica de un BV proveniente del baculovirus AcMNPV (**Wang et al., 2015**).

Una vez iniciada la replicación del genoma viral comienza la síntesis de las proteínas de la nucleocápside, al igual que su ensamblaje en el estroma virogénico y, posteriormente, su transporte a la zona del anillo localizada en la periferia del núcleo. Las nucleocápsides, durante el proceso de ensamble, pueden ser derivadas a la formación de OB o BV, aunque los mecanismos biológicos detrás de la selección de estas no se encuentran completamente dilucidados (**Blissard & Theilmann, 2018**). Los BV son producidos y liberados aproximadamente a las 12 horas de comenzada la infección, conteniendo una única nucleocápside en su interior, y una envoltura lipídica proveniente de la membrana plasmática de la célula infectada. La proteína mayoritaria en estas estructuras varía dependiendo el grupo al cual el baculovirus corresponde, pudiendo ser la glicoproteína GP64, o la proteína F, homólogos funcionales requeridos para el mecanismo de fusión de membranas y, por lo tanto, para el ingreso del material genético viral a la célula y el desarrollo de la infección secundaria. No obstante, existen diferencias entre ambas proteínas no solo a nivel aminoacídico, sino también bioquímico y estructural. Estas proteínas, concentradas generalmente en uno de los extremos del

virión, se asocian para dar lugar a la formación de trímeros, disponiendo sus ectodominios de forma perpendicular a la membrana viral (Yu et al., 2020; Wang et al., 2015). La producción y liberación de OB, por otro lado, ocurre luego de las 24 horas de comenzada la infección debido a la expresión de genes virales tardíos, incluidos aquellos codificantes para la poliedrina o granulina, dependiendo de la entidad particular, y la acción de proteínas líticas que permiten el egreso hacia el espacio extracelular (Rohrmann, 2019; Benz, 1986).

Clasificación:

Los baculovirus reciben su nombre a partir de la morfología característica de sus cápsides, presentando una forma semejante a un bastón (del latín baculum). Inicialmente, la principal clasificación taxonómica en esta familia viral se basaba tanto en la morfología de los OB correspondientes a la entidad, como en su localización en el interior celular, dando origen a dos géneros particulares: los virus de la poliedrosis nuclear (NPV), con una forma compatible a la de un poliedro irregular compuesto principalmente por poliedrina, y localizados en el núcleo celular; y los virus de la granulosis (GV), a partir de su forma granular, compuestos por granulina, y localizados en el espacio citoplasmático de las células infectadas.

En base al conocimiento sobre sus rangos de hospedador, se estableció erróneamente la limitación de estos virus a una única especie hospedadora, por lo que cada entidad ha sido nombrada a partir del individuo del cual fue aislada como, por ejemplo, el caso del baculovirus AcMNPV, recuperado de *Autographa californica*. De esta forma, las primeras dos letras hacían referencia al insecto hospedador, y las siguientes, al género viral, siendo en este caso un virus que se manifiesta como una poliedrosis nuclear múltiple (varios ODV por OB). Este evento conlleva a la existencia de múltiples identidades para genotipos virales idénticos o, al menos, con una alta identidad de secuencia, lo cual fue comprobado a partir de estudios ulteriores que arrojaron la información biológica y genómica requerida (Van Oers & Vlak, 2007). Actualmente, existe una clasificación mucho más compleja, derivada de evidencia filogenética y características biológicas y morfológicas, que permiten la derivación de estas entidades en cuatro géneros característicos, bajo el nombre de *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* o *Deltabaculovirus* (Nagamine, 2021; Jehle, 2006).

Los alfabaculovirus integran a todos aquellos virus de la poliedrosis nuclear específicos del orden *Lepidoptera*, independientemente del contenido de nucleocápsides en su interior, pudiendo ser múltiple (MNPV), o única (SNPV). En el transcurso de una infección, son capaces de producir tanto BV, como ODV. Los OB presentan un tamaño comprendido entre los 0,4 y 3 μm y, por lo general, la extensión del genoma viral se encuentra entre los 100 y 180 kpb. Existe una diferenciación adicional dentro de este género en dos grupos, dependiendo, entre otros factores, de la proteína mayoritaria presente en los viriones brotantes. De esta forma, de ser la proteína mayoritaria GP64 se trata del Grupo 1, y de serlo la proteína F, del Grupo 2.

Los betabaculovirus integran a los virus de la granulosis específicos del orden *Lepidoptera*. Son, de igual forma que el primer grupo, capaces de producir BV y ODV, y sus OB disponen de un tamaño promedio de 300-500 x 130-250 nm. La extensión del genoma viral es equivalente a la de los alfabaculovirus. Los gamabaculovirus, en tanto, integran aquellos virus de la poliedrosis nuclear

específicos del orden *Hymenoptera*. No producen BV, ni presentan los genes vinculados a las proteínas F y GP64. Sus genomas presentan una extensión inferior a la registrada en baculovirus infectivos del orden *Lepidoptera*, rondando los 82 y 82 kb. Los OB generados durante el ciclo viral tienen una morfología poliédrica de aproximadamente 0,4 a 1,1 μm , y contienen una única nucleocápside. Por último, los deltabaculovirus engloban a los virus de la poliedrosis nuclear específicos del orden *Diptera*. Producen tanto BV, como OB, aunque estos presentan una forma globular, de aproximadamente 400 nm de diámetro, constituida mayoritariamente por una proteína no homóloga (o con homología remota) a la poliedrina o granulina de los géneros anteriores.

En la **Figura 3** se ofrece un árbol filogenético resultante del análisis concatenado de 38 secuencias aminoacídicas correspondientes a *core genes*, es decir, genes conservados en todos los miembros de la familia viral, codificando funciones básicas estructurales, o asociadas a la replicación. De esta forma, se ofrece una clasificación taxonómica adicional, dividiendo a las entidades en 4 clados distintivos, bajo el nombre de NPV específicos del género *Lepidóptera*, GVs específicos del género *Lepidóptera*, NPVs específicos del género *Hymenoptera* y NPVs específicos del género *Diptera* (Targovnik et al., 2021).

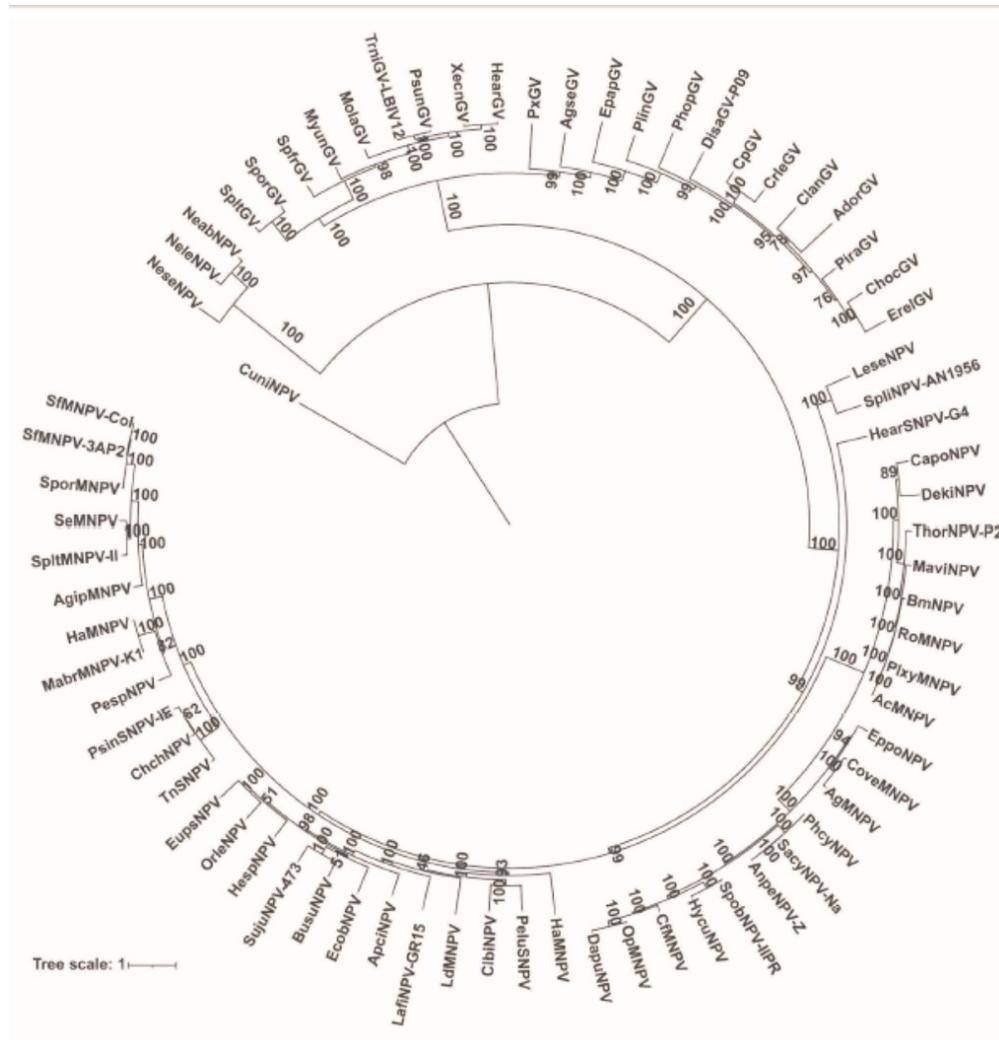


Figura 3. Árbol filogenético baculoviral. El presente árbol fue producido *ad hoc*, y para ello se realizó un análisis de filogenia mediante el método de Maximum Likelihood con las 38 *core proteins* concatenadas, utilizando el IQ-TREE 2.1.2 (Minh et al., 2020) y el análisis “ModelFinder + tree reconstruction + ultrafast Bootstrap (1000 replicates)”. La confiabilidad de los nodos fue calculada mediante bootstrapping generando 1000 réplicas. Para este análisis se utilizaron 72 secuencias con 23693 *amino-acid sites*, y el mejor modelo seleccionado fue rtREV+F+R10.

Ciclo viral:

Al igual que el resto de las entidades virales, los baculovirus enfrentan una incapacidad para producir y almacenar energía por sí mismos. Por ello, recurren a la infección de células hospedadoras, disponiendo de la maquinaria celular y reorganizando la expresión génica para asegurar el progreso del ciclo y, por lo tanto, su multiplicación. Particularmente, la infección mediada por baculovirus puede dividirse en tres etapas principales, siendo estas: la “infección primaria”, originada a partir de los OB, que liberan los ODV que infectan las células del epitelio intestinal; la “infección secundaria”, caracterizada por la infección de células en otras localizaciones del insecto, a causa de los BV; y la muerte, permitiendo así la liberación de los OB producidos a partir de la infección secundaria. En la **Figura 4**, se expone una representación del ciclo viral enunciado.

Los OB producidos y liberados en los estadios finales de la infección, presentan una gran resistencia a eventos abrasivos que podrían comprometer al virión, permitiendo así su persistencia en el ecosistema el tiempo suficiente para que logre su ingreso en un organismo hospedador de la entidad viral. La infección primaria ocurre a partir de la ingesta de este fenotipo, permitiendo su ingreso al lumen intestinal del organismo. El ambiente alcalino del intestino (pH 10-11) permite la disolución del OB y, por lo tanto, la liberación de los ODV, siendo estos determinantes del comienzo de la infección luego de atravesar la barrera peritrófica. Esta puede definirse como una red o capa de quitinas y proteína, producida alrededor del intestino, dispuesta como una superficie protectora que impide el contacto directo del epitelio con los componentes que ingresan por la cavidad oral. Esta barrera se presenta como una defensa inmunológica similar a la mucosa intestinal, conteniendo cavidades de 21 a 36 nm que permiten el transporte de enzimas digestivas, pero no de patógenos tales como bacterias, hongos o virus. El ODV puede asegurar su ingreso a través de lesiones producidas en la membrana peritrófica, ya sea por daños ajenos a la entidad viral particular, o propios de ella (**Cheng & Lynn, 2009**). En el segundo caso, unas proteínas de tipo *metaloproteasas*, conocidas como *virus enhancing factors* (VEF) interfieren con la integridad de la membrana peritrófica, digiriendo gran parte de ella (**Roelvink et al., 1995; Wang & Granados, 1997; Wang et al., 1997**). Durante el proceso de ecdisis, coincidente con la renovación del exoesqueleto y la membrana peritrófica del insecto, esta estructura es en gran parte degradada por quitinasas y acetilglucosamidases, permitiendo el contacto directo de los ODV con el epitelio subyacente y, por lo tanto, constituyendo otra alternativa posible de infección (**Liu et al., 2019**).

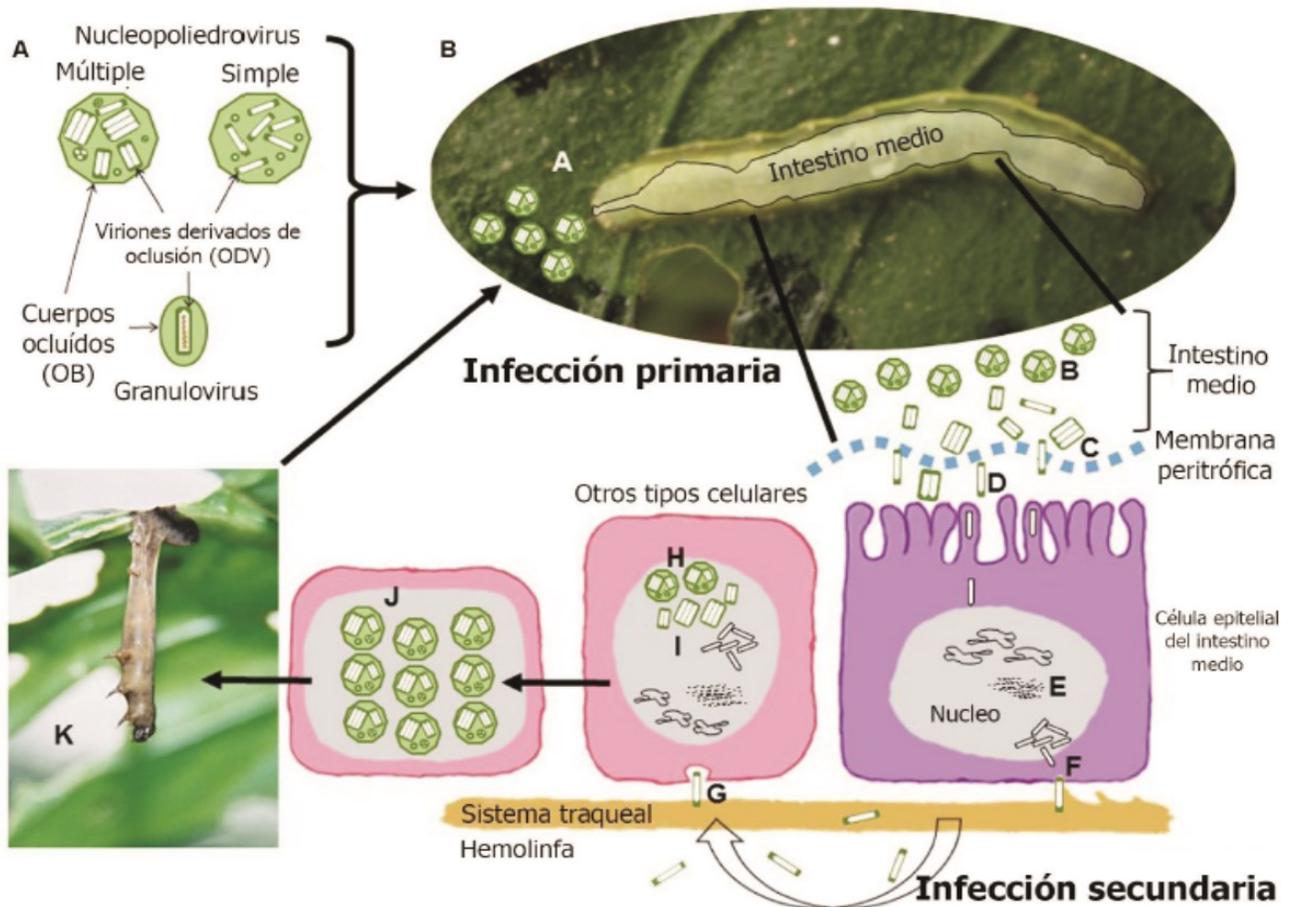


Figura 4. Representación esquemática del ciclo viral de los baculovirus. Los cuerpos ocluidos (A) son inicialmente consumidos por la larva. Al llegar al intestino medio (B), se da la liberación de los cuerpos derivados de oclusión (ODV) a raíz del alto pH y ciertas actividades enzimáticas (C), lo que permite la posterior fusión de estas entidades con las microvellosidades de las células epiteliales del tejido (D). Las nucleocápsides arriban al núcleo, donde se libera el material genético, para así dar comienzo a la replicación (E). Una vez ensambladas las nuevas nucleocápsides, estas adquieren una envoltura lipídica proveniente de la membrana basal, rica en las proteínas GP64 o F, dependiendo de la entidad (F), conformando los viriones brotantes (BV). Este fenotipo se propaga luego a través de la hemolinfa o el sistema traqueal, dando origen a la infección secundaria, caracterizada por la dispersión de la enfermedad a las células de otros tejidos (G), que comienza por un proceso de endocitosis, seguido de la replicación del genoma viral. En esta etapa, las nucleocápsides son contenidas en envolturas formando nuevamente viriones derivados de oclusión (H) que, eventualmente, constituirán los cuerpos de oclusión (I). Este último fenotipo se acumula en el núcleo (J), liberándose a partir de la ruptura del tegumento de la larva, posterior a su muerte (K). Adaptado de **Williams et al, 2017**.

Los BV generados en la infección primaria presentan una envoltura lipídica proveniente de la membrana plasmática de las células infectadas. Para propagar la infección, deben atravesar un segundo obstáculo físico, la lámina basal, una matriz extracelular dispuesta por aquellas células del epitelio que las separa de otros tipos celulares cercanos (**Blissard & Theilmann, 2018; Yurchenco & O'Rear, 1994**). La infección de células traqueolares presentes en la matriz permite surcar esta barrera, y así diseminar la infección hacia el hemocele, el cual brinda el transporte requerido para dispersar los viriones hacia otros tejidos, tales como el músculo, el sistema nervioso, y el cuerpo graso (**Blissard & Theilmann, 2018**). Los hemocitos juegan un rol crucial en el sistema inmunológico

del insecto, por lo que al resultar comprometido, permite la infección de las células de los órganos internos del organismo al diezmar sus defensas. El ingreso al espacio intracelular por parte del fenotipo BV se da a partir de endocitosis, mediada por las proteínas mayoritarias de esta estructura, pudiendo ser GP64 o la proteína F dependiendo de la entidad viral (**Thiem, 2009**). El cuerpo graso resulta el blanco principal para los baculovirus infectivos en insectos del orden *Lepidoptera*. Esta estructura actúa como el tejido adiposo e hígado del insecto, localizado a lo largo de todo el animal y especializado en el almacenamiento de nutrientes, metabolismo energético, mecanismos inmunológicos y detoxificación (**Li et al., 2019**). El alto contenido energético resulta óptimo para asegurar la replicación viral, permitiendo así la generación de una gran progenie, tanto del fenotipo BV en el estadio temprano, como el OB en el tardío.

A lo largo de la infección secundaria, y conforme la temporalidad de la infección se acerca a los estadios tardíos, comienza la expresión de los genes implicados en esta etapa, como los asociados a la producción de poliedrina o granulina, requeridos para la formación de OB. Este fenotipo es liberado conforme ocurre la lisis celular, y se da la ruptura de las membranas celulares. Los baculovirus pueden, además, comprometer el tejido epidérmico, permitiendo así su liberación al exterior del organismo. El exoesqueleto del insecto representa una barrera para ello, por lo que algunas entidades virales poseen genes codificantes de enzimas degradativas para este, como quitinasas y catepsinas, permitiendo la licuefacción tisular y la ruptura de la cutícula (**Wang et al., 2019a; Blissard, 1996**). Eventualmente, la enfermedad determina la muerte del insecto, y así la liberación de cuerpos de oclusión asegura la contaminación de superficies, pudiendo estas ser fuentes de alimento, que posteriormente podrían determinar la infección de otro organismo.

Dependiendo del trayecto evolutivo de la entidad viral, su relación con el hospedador, y el conjunto de genes dispuestos en su genoma, variarán los tejidos afectados en cada infección. Algunos gammabaculovirus desencadenan únicamente la infección primaria, afectando exclusivamente las células del epitelio intestinal, sin observar signos de diseminación en otros tejidos, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las infecciones por parte de alfabaculovirus o betabaculovirus. Estos se caracterizan por diseminar la infección, comenzando con el hemocele y luego dirigiéndose a diversos tejidos que, dependerán de la entidad viral y el hospedador particular. Los deltabaculovirus se asemejan a lo acontecido en las infecciones por parte de gammabaculovirus, enfocando su tropismo a células epiteliales del intestino y la zona gástrica (**Grzywacs, 2017**).

Manejo de baculovirus en laboratorio:

Cada entidad viral presenta un rango de hospedador característico y un tropismo particular, que determina los organismos vulnerables a su infección y los tipos celulares afectados por ella. De esta forma, resulta esencial la recopilación de evidencia empírica para determinar los protocolos y métodos más eficientes para la producción de baculovirus. El crecimiento de cualquier organismo de forma controlada en el laboratorio se centra en proveer un ambiente compatible con el correspondiente en su entorno biológico. Por esto, los modelos empleados para la replicación del virus deberán ser coherentes con su rango de hospedador y tropismo, al igual que las condiciones fisicoquímicas y nutricionales tendrán que corresponderse con las imperativas en el sistema original,

para asegurar la viabilidad de la célula, y el correcto desarrollo del ciclo viral, tales como temperatura, pH, entre otras variables.

Los baculovirus pueden ser producidos empleando tanto larvas como líneas celulares de insectos. Para la producción en larvas, se requiere de una dieta capaz de suplir las necesidades nutricionales de las mismas, al igual que una temperatura comprendida entre los 28 y 29°C, y un porcentaje de humedad cercano al 60%. Se debe tener en cuenta la cantidad de larvas cultivadas en conjunto, ya que algunas especies presentan tendencias caníbales que podrían comprometer al sistema y, por lo tanto, a la eficiencia de la producción (**Van Beek & Davis, 2016**). Por otro lado, la producción en líneas celulares de insectos puede ser abordada por dos metodologías distintas, ya sea empleando un cultivo en suspensión, o en monocapa. La gran mayoría de las líneas celulares se encuentran confinadas a un solo tipo de cultivo, aunque las provenientes de células de insecto son parte de la excepción, pudiendo crecer tanto en monocapa como en suspensión (**Tavira Montalván et al., 2009**). Para su cultivo, se requiere mantener una temperatura constante de aproximadamente 28°C y, generalmente, el uso de *buffers* suplementados con suero bovino, a fin de favorecer el crecimiento y el mantenimiento de las células en cuestión.

El prototipo empleado en este trabajo es el baculovirus AcMNPV (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*), una de las entidades más estudiadas de esta familia por su capacidad de funcionar como plaguicida, vector de expresión de proteínas heterólogas, y vehículo de transporte viral en mamíferos, incluidos los humanos. La larva del insecto *Autographa californica* es un blanco característico de la entidad viral, por lo que puede emplearse para su cultivo, respetando las condiciones mencionadas anteriormente. Las líneas celulares más utilizadas para la producción de esta entidad han sido *Sf9*, un subclon de la línea *IPLB-SF-21* aislada de tejido ovárico pupal del insecto *Spodoptera frugiperda*, y *High Five_{TM}*, aislada de tejido ovárico adulto del insecto *Trichoplusia ni*, capaces de crecer tanto en suspensión como en monocapa, aunque existe evidencia que permite concluir que el segundo método resulta en una mayor producción. Para su cultivo, también es requerida una temperatura cercana a 28°C, y no requiere de utilización de un incubador de CO₂, debido a que los *buffers* posibles a emplear en el cultivo presentan fosfato, y no carbonato. Su crecimiento puede darse tanto en ausencia de suplementos séricos como en presencia, y existe una vasta cantidad de medios dispuestos para su compra en el mercado. Actualmente, diversas modificaciones han sido realizadas sobre las líneas mencionadas para mejorar algunos aspectos particulares, asociados principalmente al metabolismo celular, tales como la adición de genes codificantes para proteínas procesadoras de N-glicanos. De esta forma, se observa un progreso en la producción de glicoproteínas, permitiendo modificaciones coherentes con las células humanas. Un ejemplo de estas sería la línea *MIMIC_{TM}*, derivada de *Sf9* (**Kioukia et al., 1995; Schmid, 1996; Jarvis, 2009**).

Aplicaciones tecnológicas de los baculovirus:

Los baculovirus recopilan una serie de características que los vuelven sumamente interesantes para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas diversas. Al resultar infectivos en insectos de múltiples géneros, pero no en mamíferos, se destaca su alto potencial en la industria agrícola como agente de control biológico de plagas, permitiendo diezmar la población de determinado organismo sin comprometer la seguridad de la producción en lo que respecta a su consumo y manipulación por humanos u otros animales. El avance en ingeniería genética y la facilidad que representa la edición del genoma de estas entidades ha permitido emplearlos también

como vectores de expresión, ya sea para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto, como para el diseño de terapias génicas en mamíferos, valiéndose del fenómeno de transducción. Se destaca a su vez, su participación en el diseño de vacunas, particularmente en aquellas basadas en *viral like particles* (VLP) (Vega, 2016).

Para la agricultura moderna, el control de plagas resulta un foco principal, ya que su presencia es capaz de comprometer hasta un 30% del rendimiento en poco menos de la totalidad de los cultivos. Gran parte de los productos dispuestos para afrontar esta problemática resultan tóxicos no solo para los organismos problema, sino también para sus predadores, impidiendo la supresión natural de la especie plaga por sus propios enemigos naturales, sin mencionar el impacto ambiental asociado a la utilización de compuestos contaminantes. Alternativas a los plaguicidas sintéticos integran a los bioplaguicidas y a los plaguicidas botánicos, derivados de animales, plantas, microorganismos y/o minerales capaces de actuar de forma casi específica sobre los organismos deseados, con un riesgo mínimo para el ecosistema y para el consumo humano (Liu et al., 2019; Nava-Perez et al., 2012). Se ve destacada además la posibilidad de emplear manipulaciones en el ambiente para favorecer la llegada de organismos beneficiosos o, incluso, redirigir a la plaga a otro recurso, mediante la utilización de estímulos particulares (Paredes et al., 2012).

El primer evento de incorporación de un baculovirus tuvo lugar en 1930, al ser dispuesto accidentalmente en conjunto con un parásito con el objetivo de controlar una población del insecto *Diprion hercyniae*. Este baculovirus resultó ser un NPV específico del insecto, dando evidencia de su potencial como biopesticida. Actualmente, en América Latina, existen varios programas de control mediados por baculovirus, y si bien algunos de ellos han resultado sumamente exitosos, se destaca la dependencia de la técnica de variables vinculadas al compromiso de los gobiernos, las agencias encargadas, los grupos de investigación, el personal en contacto directo con los cultivos, y la información pública disponible. En Argentina, el baculovirus *Cydia pomonella* GV ha sido empleado para el control de *Cydia pomonella* y *Grapholita molesta*, plagas características de los cultivos de manzana, pera, durazno y nuez (Haase et al., 2015). La especificidad de estas entidades, al igual que la facilidad asociada a su producción industrial, las vuelven candidatas sumamente prometedoras para su uso como pesticidas biológicos, aunque se destaca la inconveniencia en su tiempo de acción, lo que las hace poco competentes contra pesticidas de naturaleza sintética. Por ello, la manipulación genética de sus genomas ha sido una alternativa abordada, con el objetivo de acelerar la muerte del organismo y aumentar su eficiencia mediante la incorporación de genes de toxinas, tales como la proteína bacteriana Cry (De Lima et al., 2007; Inceoglu et al., 2006; Jinn et al., 2006).

Antes de la década de 1970, la recuperación y purificación de proteínas era abordada únicamente desde sus fuentes naturales, encontrando como principal limitante a la producción propia de los organismos empleados. El avance referido a técnicas de expresión heteróloga en modelos de producción ha sido un hito biotecnológico, permitiendo suplir la demanda y dar comienzo a la era de producción de proteínas recombinantes, modificadas genéticamente a fin de suprimir, mejorar o incluso adicionar propiedades en función de un objetivo particular. Diversos modelos bacterianos, tales como *Escherichia coli*, continúan siendo ejemplares para esta aplicación, permitiendo alcanzar niveles de producción de escala industrial, aunque no representan la única posibilidad (Gonzalez & Fillat, 2018; Graselli, 2015). Los baculovirus, a raíz de una serie de mejoras tecnológicas vinculadas a eliminar pasos tediosos asociados a la identificación y aislamiento de estas entidades, los métodos de cuantificación, vectores de transferencia más diversos, y el aumento en el conocimiento del cultivo celular y la comercialización de los reactivos pertinentes, han cobrado gran protagonismo en el área de producción heteróloga de proteínas. Las larvas de insectos o líneas

celulares son empleadas para ello, albergando al virus y permitiendo la realización de su ciclo viral y, por lo tanto, la expresión de aquellos genes adicionados mediante ingeniería genética. Generalmente, los genes dispuestos para su expresión han sido clonados bajo el control de los promotores génicos que producen las proteínas poliedrina y/o p10, con una alta tasa de expresión durante el desarrollo del ciclo viral, y de carácter no esencial para la realización de este. Al trabajar con células eucariotas, se permite obtener proteínas mucho más cercanas a las producidas en humanos que al emplear modelos bacterianos, en función de aquellas modificaciones post-transcripcionales aportadas por la maquinaria propia de los insectos empleados. La modificación genética de las líneas celulares ha permitido la expresión de genes particulares para aumentar la humanización de las proteínas producidas, por ejemplo, mediante la adición de proteínas con actividad glicosilasa, obteniéndose patrones de glicosilación mucho más semejantes a las observadas en proteínas humanas (**Kost, 2005; Vega, 2016**). Las proteínas producidas, tanto recombinantes como naturales, han sido empleadas en diversas áreas, incluyendo investigación, diagnóstico, terapia, e incluso vacunas (**Rychlowska et al., 2011; Cox, 2012; Lu et al., 2012**).

Las terapias génicas comprenden un conjunto de tratamientos terapéuticos que emplean secuencias nucleotídicas como principio activo, que al ingresar a las células blanco, serán expresadas para dar lugar a la producción de proteínas o RNA particulares, dispuestas estratégicamente para aliviar sintomatologías relacionadas con determinadas patologías o, incluso, para curar definitivamente al organismo afectado, ya sea por la reversión del fenotipo o la muerte de aquellas células comprometidas (**FDA, 2008**). Las secuencias nucleotídicas deben disponerse de tal forma que su ingreso a la célula sea posible, por lo que el desarrollo de vehículos de transporte de diferente naturaleza bioquímica tiene una gran importancia para el campo terapéutico. Si bien es posible la inoculación del material genético desnudo, también han sido utilizados nanopartículas de naturaleza lipídica y vectores virales, incluyendo a los baculovirus (**Dalal et al., 2018**). Los baculovirus aportan no solo una envoltura protectora y un modelo de producción, sino también una serie de proteínas y factores que median el ingreso del material genético al núcleo celular, permitiendo así la expresión de genes dispuestos en el genoma, pero no su replicación, por lo que se trata de transducción y no de una infección viral (**Felberbaum, 2015**). En este caso, los genes adicionales se encuentran bajo el control de promotores correspondientes a genes de mamíferos, permitiendo así su expresión y regulación en las células tratadas, existiendo un gran número de vectores actualmente aprobados para su comercialización (**Coligan et al., 2001**). Se destaca la capacidad del baculovirus AcMNPV de ingresar a varios tipos celulares, particularmente, a endosomas de alto pH, mediante endocitosis de los viriones (**Hu et al., 2019**). Las manipulaciones genéticas adosadas a estos vectores han permitido no solo adicionar genes para su expresión heteróloga, sino además afectar la especificidad de la transducción, limitándose a tipos celulares particulares y determinando así su seguridad y potencial terapéutico, obteniéndose grandes resultados en experimentos *in vitro*, particularmente, en células hepáticas. Esto es logrado a partir de la modificación de las proteínas de la envoltura, afectando directamente al tropismo de la entidad, habiéndose obtenido resultados exitosos en la incorporación de la glicoproteína transmembrana del virus de la estomatitis vesicular G (VSV-G), y otros compuestos como biotina y avidina (**Tani et al., 2003**). Particularmente, la barrera principal en sistemas *in vivo* se corresponde con el sistema del complemento, mecanismo inmunológico dispuesto por la inmunidad innata para el reconocimiento de microorganismos adventicios o derivados de estos, su opsonización, eliminación, y expansión del estado antiinflamatorio (**Ghosh, 2002**). Los receptores de tipo Toll, además, contribuyen en gran parte al reconocimiento del baculovirus, disponiendo mecanismos inmunológicos adicionales (**Ono et al., 2018**).

La eficiencia de transducción puede ser modificada de acuerdo a las modificaciones realizadas sobre el vector viral, aunque existe evidencia que indicaría que los medios de cultivo empleados para su producción también influirían en ella (**Mähönen et al., 2007; Lesch et al., 2008; Hsu et al., 2004**). Varios elementos de regulación, tanto transcripcional como post-transcripcional, han sido empleados para la obtención de fenotipos super transductores, compatibles con una alta eficiencia de expresión (**Takata et al., 2011**).

Las mismas cualidades que vuelven al baculovirus un vehículo útil para el diseño de terapias génicas en mamíferos son las que determinan su potencial para el diseño de vacunas. Mediante la expresión de genes heterólogos derivados de agentes adventicios particulares, es posible inducir una buena respuesta inmunológica, tanto celular como humoral. Además, la propia inoculación del baculovirus presenta actividad adyuvante, estimulando la secreción de citoquinas inflamatorias e interferones que contribuyen a la propagación del estado antiviral, requerido para la activación de las células de la inmunidad innata y, por lo tanto, para la generación de una memoria inmunológica dispuesta por la inmunidad adaptativa (**Premanand et al., 2018; Madhan et al., 2010**).

Terapia génica

Definiciones y tipos:

La terapia génica se presenta como una de las contribuciones más revolucionarias provistas por la biotecnología moderna. La *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) la describe como aquella que pretende modificar o manipular la expresión genética, con la intención de alterar funciones biológicas de células vivas, ya sea mediante el reemplazo alélico, la inactivación, o el agregado de genes (**FDA, 2008**). Paralelamente, de acuerdo a la *European Medicine Agency* (EMA), esta puede ser empleada tanto con una finalidad terapéutica, como profiláctica o diagnóstica, aunque usualmente es destinada al tratamiento de enfermedades, incluyendo desórdenes genéticos, cáncer, y enfermedades a largo plazo (**EMA, 2007**). Organismos nacionales como la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) reconocen de igual forma el carácter emergente de esta propuesta terapéutica, y concluye una definición propia de todo medicamento de terapia génica, comprendiendo que: “el principio activo contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, administrado con la finalidad de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica; su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia” (**ANMAT, 2019**). Se observa que, a modo de consenso, se define a la terapia génica como la transferencia horizontal de secuencias nucleotídicas recombinantes, empleando transportes de naturaleza diversa, con la finalidad de interferir en la expresión génica de las células afectadas por motivos terapéuticos, profilácticos, o de diagnóstico.

La manipulación genética ejercida sobre las células tratadas puede diferir en diversas cuestiones, describiendo una serie de variantes posibles para la terapia génica. De forma general, esta puede ser abordada de forma *in vivo* o *ex vivo*, ser de carácter transitorio o estable, y darse sobre células somáticas o germinales. En sus inicios, esta clase de terapias fue principalmente considerada para el abordaje de enfermedades monogénicas o multigénicas, aunque a la brevedad,

fue reconocido su potencial en el tratamiento de múltiples grupos de enfermedades, de origen infeccioso, metabólico, cardiovascular, e inclusive para el cáncer (**Blomberg & Smith, 2003**)

La metodología *ex vivo* implica la extracción de las células del paciente, su transformación, y luego su reingreso, por lo que requiere de la secuencia nucleotídica correspondiente al tratamiento, vehículos de transporte dispuestos para su *delivery*, conocidos como vectores, y las facilidades respectivas para el procesamiento y mantenimiento celular. Al contrario, la metodología *in vivo* resulta similar a tratamientos farmacéuticos típicos, resultando afectadas células específicas ya dispuestas dentro del propio individuo, y requiere tanto de la secuencia nucleotídica empleada como principio activo, como del vehículo de transporte. Dependiendo de la estrategia y el transporte utilizado, es posible identificar una serie de riesgos teóricos tales como el montaje de respuestas inmunológicas dirigidas a los vectores utilizados o, incluso, de mutagénesis insercional por parte de vectores integrativos en el propio genoma celular (**High & Roncarolo, 2019; Hu & Yu-Chen, 2006**). En la **Figura 5 y 6** se disponen esquemas correspondientes a ambos abordajes para enfermedades particulares, siendo un tratamiento para la β -talasemia en el caso de la terapia *ex vivo*, y otro para la pérdida de visión asociada a variantes defectuosas del gen *rpe65*, basado en terapia *in vivo*.

El efecto dado a partir de la terapia empleada puede persistir en el tiempo, teniendo carácter permanente o transitorio. De esta forma, en el primer caso, la modificación genética queda asentada en las células transformadas. Como fue mencionado anteriormente, esta puede darse sobre células germinales o somáticas, de acuerdo con la finalidad pautada del tratamiento. La terapia génica somática es empleada para la modificación de células de este tipo, con el objetivo de mejorar la salud de los individuos afectados, mientras que la germinal sólo ha sido llevada a cabo en animales no humanos, utilizando el cigoto o el embrión para evitar el desarrollo de enfermedades. Cada una de las variables, dependiendo de su naturaleza, presenta asociadas una serie de consideraciones éticas y legales, mayoritariamente asignadas a la posibilidad de producir daños irreversibles, tanto sobre células somáticas como germinales. La variante germinal resulta aún más controversial, debido a que las modificaciones efectuadas perdurarán en la descendencia, resultando además imposible el acceso al consentimiento informado por parte del individuo (**Rehmann-Sutter, 2018; Yunta, 2003**).

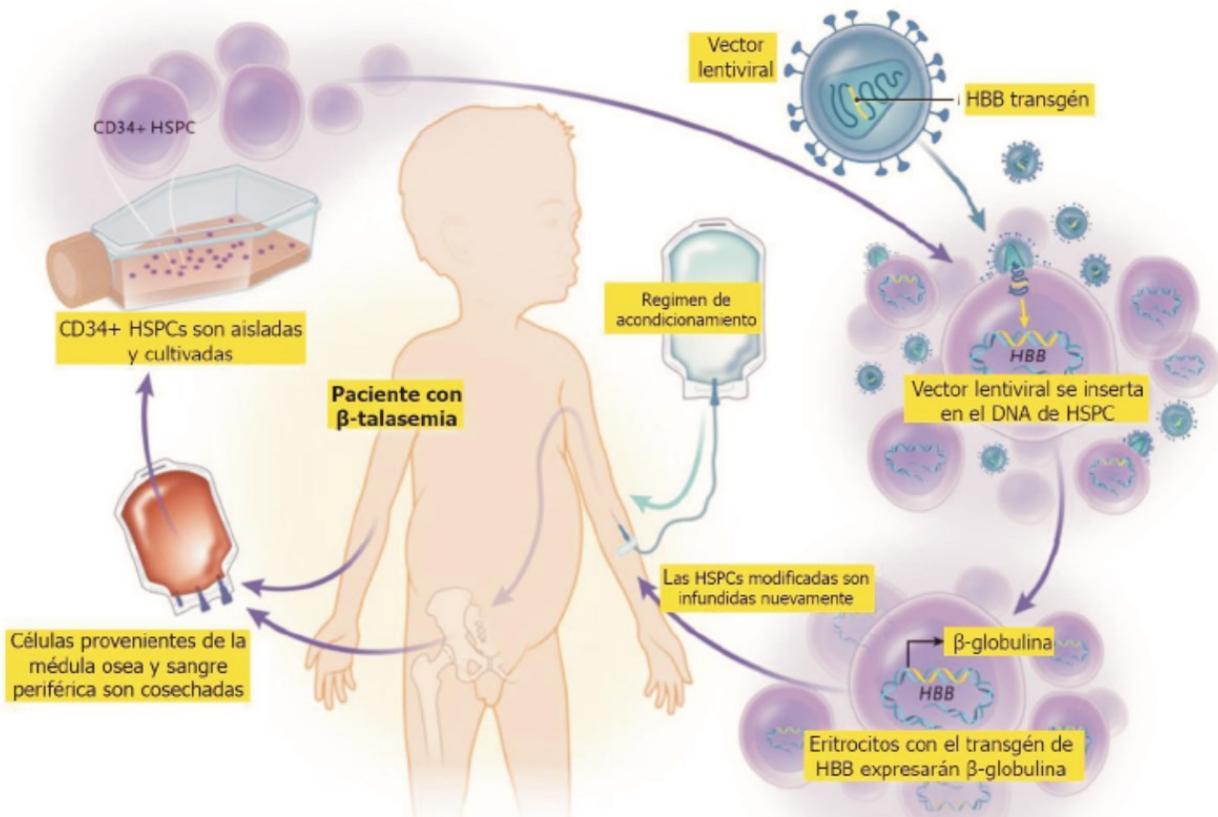


Figura 5. Terapia génica del tipo *ex vivo* como tratamiento para la β -talasemia. Partiendo de una extracción de sangre periférica y médula ósea, se efectúa la selección de células hematopoyéticas madre y progenitoras (HSPC), las cuales serán afrontadas al vector lentiviral integrativo que porta el gen de la Hemoglobina Subunidad Beta (HBB). A su vez, el paciente recibe un régimen de acondicionamiento para depletar las HSPC endógenas. Posteriormente, las células modificadas *ex vivo* son reinsertadas al paciente por vía intravenosa que, eventualmente, se diferenciarán en los linajes hematopoyéticos, aunque la expresión de β -globulina solo estará restringida al linaje de eritrocitos. **Recuperado de High & Roncarolo, 2019.**

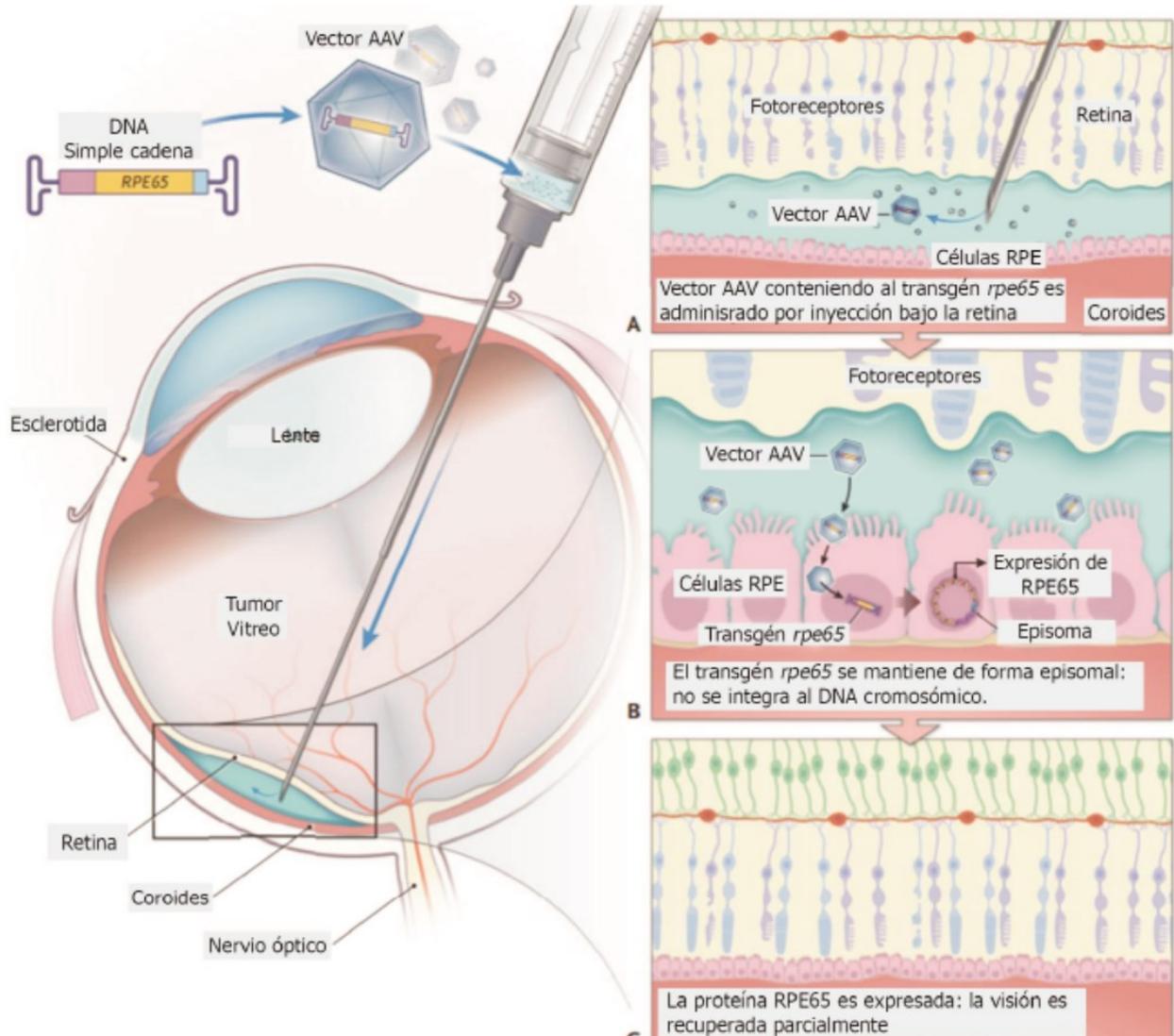


Figura 6. Terapia génica del tipo *in vivo* para el tratamiento de tumores vítreos. Tratamiento empleado para la pérdida de visión causada por variantes de la proteína RPE65 con función defectuosa. El transgén *rpe65*, contenido en un vector viral adeno-asociado (AAV), es administrado por inyección debajo de la retina neural (A). El ácido nucleico se mantiene de forma episomal (B), y la expresión de una variante funcional de la proteína RPE65 en células epiteliales del pigmento retinal (RPE) permite una recuperación parcial de la vista (C). Traducido de **High & Roncarolo, 2019**.

Vehículos utilizados para la formulación de IA (ingredientes activos) en enfoques *in vivo*:

La acción terapéutica característica de cada terapia génica depende directamente de la secuencia nucleotídica empleada, por lo que se define al DNA como al principio activo de la técnica. El éxito del tratamiento recaerá en gran medida en el correcto ingreso del material genético a las células, por lo que resulta ineludible el estudio de diversos vehículos de transporte que aseguren la movilización del principio activo, su protección, y llegada al interior celular.

En la actualidad, existen diferentes tecnologías vinculadas al transporte de secuencias nucleotídicas, variando tanto en su formulación y producción, como en diversos aspectos adicionales, que determinan ventajas y desventajas para cada una de ellas. De las alternativas posibles, pueden mencionarse: utilización del DNA desnudo, es decir, únicamente el plásmido o DNA que contiene la secuencia nucleotídica; vectores virales; y estructuras nanoparticuladas (**Figura 7**).



Figura 7. Alternativas posibles como metodologías de transporte de secuencias. Se describen las distintas metodologías de *delivery* de DNA desnudo, vectores virales, y estructuras nanoparticuladas.

Los ácidos nucleicos presentan una muy baja inmunogenicidad, por lo que la probabilidad de que el sistema inmune de los individuos expuestos monte una respuesta inmunológica frente a ellos, es mínima. A raíz de este hecho, la utilización de DNA desnudo resulta conveniente, debido a su seguridad, y a la baja citotoxicidad del principio activo. Adicionalmente, la producción de plásmidos es sumamente sencilla, pudiendo llevarse a cabo mediante bioprocesos simples, empleando modelos procariontas, con bajos costos asociados, y la capacidad de portar información

genética en ellos es muy alta, por lo que es posible realizar un *delivery* de múltiples genes, diseñando terapias más complejas. Como desventaja, este tipo de vectores presenta una baja eficiencia de transfección y penetración al interior celular, por lo que se requiere de un trabajo exhaustivo de manipulación genética para poder obtener resultados comparables a los registrados al utilizar vehículos virales (Dalal et al., 2018). En ocasiones, se emplean mecanismos físicos como la electroporación o el *shotgun* génico para asegurar el ingreso del ácido nucleico terapéutico al tejido diana. Cabe señalar que los plásmidos obtenidos de bacterias son capaces de estimular respuestas debido al reconocimiento de sitios CpG no metilados, lo que ha llevado al desarrollo de variantes del tipo “CpG free”.

Respecto a los vectores virales, se destaca la existencia de una gran diversidad. Mediante técnicas de ingeniería genética ha sido posible la modificación de estos vehículos, con la finalidad de mejorar su seguridad y eficiencia, permitiendo la permanencia de ciertas actividades que resultan útiles para el transporte, codificadas en el genoma viral, y la supresión de otras que determinen efectos nocivos para el paciente tratado. Cada tipo particular presenta una serie de ventajas y desventajas asociadas, en función de su potencial integrativo, permanencia en el individuo, facilidad de producción, eficiencia de transducción, células blanco, cantidad de información posible de portar, entre otras. Los vectores basados en bacteriófagos, y otros virus no infectivos en mamíferos, también se encuentran dentro de esta categoría (Dalal et al., 2018).

Por otro lado, las estructuras nanoparticuladas han sido empleadas para el *delivery* de drogas de diversa naturaleza química, incluyendo ácidos nucleicos para el diseño de terapias génicas. Actualmente, ya existen productos clínicos aprobados basados en estos transportes, particularmente para RNA, como es el caso de las vacunas contra el SARS-CoV-2 propuestas por Pfizer y Moderna (Pilkington et al., 2021). Esta tecnología resulta sumamente prometedora, debido a su posibilidad de direccionamiento y eficiencia. El agregado de ligandos particulares en las superficies de estas estructuras permite dirigir su acción a células específicas, manipulando su tropismo, mientras que su composición bioquímica asegura la protección del principio activo, y su ingreso al interior celular. La tendencia de estas estructuras a formar agregados resulta un inconveniente, al igual que su rápida dilución, luego de ser administradas. Asegurar la interacción específica entre ligando y receptor resulta de suma importancia, al igual que reducir aquellas interacciones inespecíficas que comprometería otros tipos celulares, y reducirían la eficiencia del tratamiento. La complejidad en la preparación de estos vehículos se hace evidente incluso en el fenómeno de transfección, ya que se requiere de un balance particular de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas para efectuar la transferencia, además de que pueden darse ciertos problemas de toxicidad vinculados a la naturaleza bioquímica de estas estructuras (Zylberberg et al., 2017)

Vectores virales en Terapia génica:

Un virus es una entidad biológica submicroscópica, comprendida por una estructura proteica o lipoproteica que encapsula su material genético, pudiendo ser DNA o RNA, simple o doble cadena, y circular o lineal. Debido a su incapacidad de generar y almacenar energía por su cuenta, los virus recurren a la infección de células blanco, pudiendo de esta forma reorganizar la expresión

génica de estas, y asegurar su replicación, empleando la maquinaria disponible en el contexto intracelular (**National Human Genome Research Institute, 2021**). A lo largo del tiempo, estas entidades han adquirido particularidades específicas, codificadas en su genoma, que determinan los mecanismos de virulencia dispuestos en cada infección, y su rango de hospedador, indicando este último la especie vulnerable al virus, y el o los tipos celulares afectados. La diversidad de estas entidades se estima hasta 10 veces superior a la de las bacterias, por lo que es natural contar con una gran variedad de vectores virales modificados genéticamente para el transporte de material genético en tratamientos de terapia génica. Gran parte de los vectores empleados hoy en día provienen de virus infectivos en humanos u otros mamíferos, como es el caso de los adenovirus (AdV), adeno-asociados (AAV), lentivirus y retrovirus, aunque también se cuenta con otros basados en virus no infectivos en los organismos mencionados, como los bacteriófagos, y los baculovirus. En la **Figura 8**, se presentan representaciones esquemáticas de cada una de las variantes mencionadas, haciendo énfasis en su morfología y naturaleza nucleotídica.

Los vectores virales AAV son parvovirus no patogénicos, compuestos por DNA simple cadena de aproximadamente 4,7 kb, encapsulado en una estructura proteica icosaédrica. Para llevar a cabo su ciclo de replicación en la naturaleza, requieren de la presencia de un virus *helper*, como podría ser un adenovirus, o un herpes simple. Su genoma viral posee tres genes principales, siendo estos *Rep*, *Cap* y *AAP*, y secuencias terminales invertidas y repetidas (ITR), que marcan el origen de replicación y la señal de empaquetamiento. Los genes *Rep* codifican para proteínas no estructurales, requeridas para la replicación, la regulación transcripcional y el empaque, mientras que los genes *Cap*, codifican para tres proteínas estructurales. Los genes *AAP* codifican para proteínas que facilitan la importación de las proteínas de la cápside al núcleo celular, promoviendo además la maduración, y el ensamble de la cápside. Estos vectores son capaces de infectar tanto células que no han entrado en ciclo celular, como aquellas que ya lo han hecho, aunque al no ser integrativos, se pierden fácilmente en el segundo caso. Al no ser patogénicos o citotóxicos, y en virtud de que resultan menos inmunogénicos que otros vehículos virales, resultan una alternativa muy segura, perdurando por años en células quiescentes, y con bajo riesgo de mutagénesis insercional debido a su baja probabilidad de integrarse en el genoma celular. En tanto, su baja capacidad de carga, permitiendo incorporar secuencias nucleotídicas de hasta 5 kb, representa una limitante significativa, aunque este obstáculo puede ser abordado mediante la utilización de vectores adicionales, fragmentando la secuencia en dos o más partes, que luego podrían ser reconstituidas a partir de eventos de *trans-splicing* en el núcleo celular (**Chen, 2018**). De todos modos, algunas variantes silvestres de estos vectores son capaces de integrarse en sitios precisos del genoma humano, presentando altas frecuencias de recombinación, causando deleciones, como ha sido observado tanto *in vivo* como *ex vivo* en células hepáticas (**Dalwadi et al., 2021**).

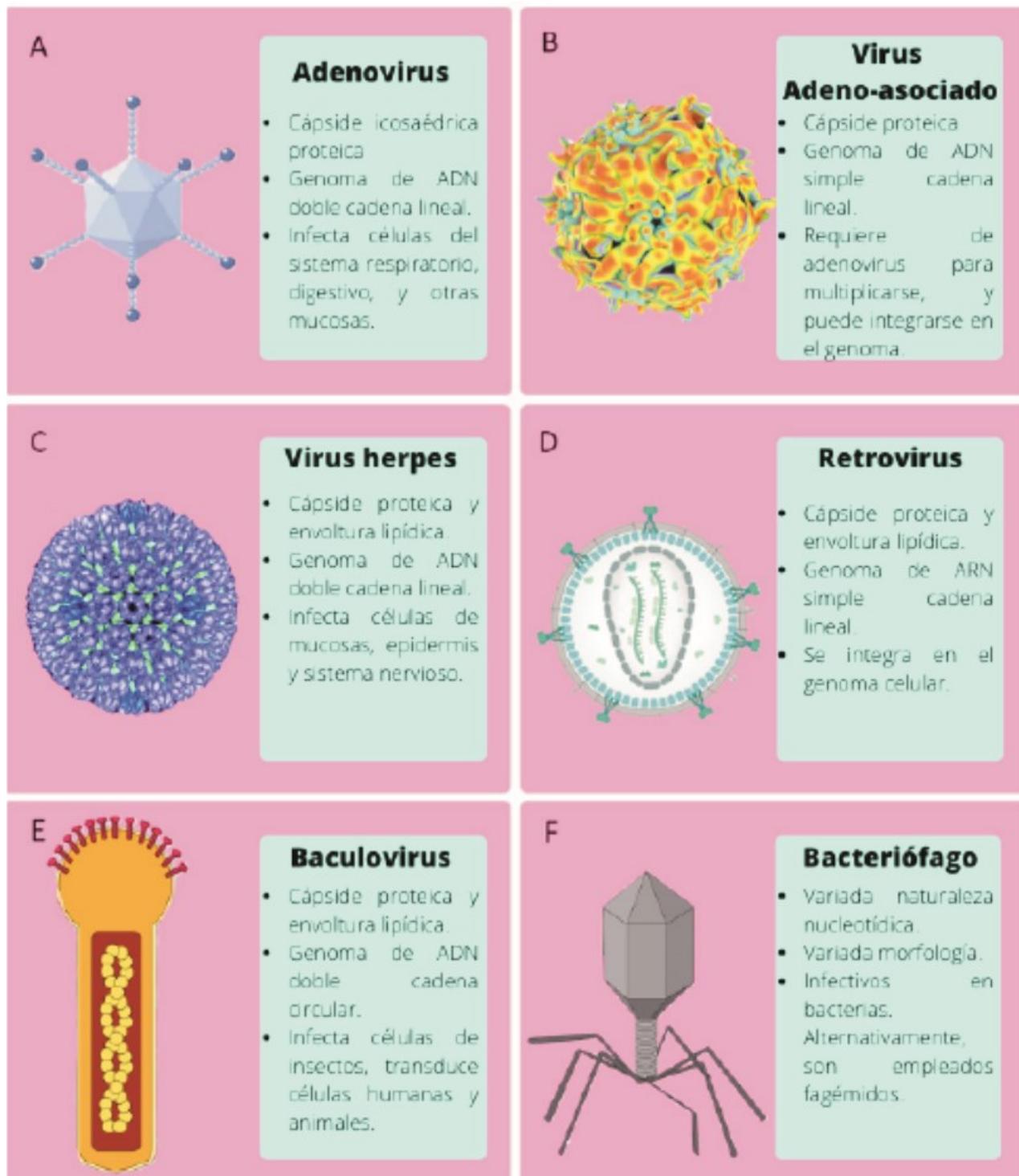


Figura 8. Representaciones esquemáticas de vectores virales empleados en terapia génica. Se muestra información sobre su naturaleza nucleotídica y morfológica, así como de su rango de infección y posibilidad de integración

Los vectores basados en retrovirus cuentan con dos moléculas de RNA simple cadena positivas, encapsuladas en una cápside cubierta por una envoltura. El genoma de este grupo viral presenta los genes *gag*, *pol*, y *env*, que se flanquean por regiones terminales repetidas (LTR), que funcionan como *enhancers* y promotores. Los genes *gag* codifican para proteínas estructurales, los *pol* para la retrotranscriptasa necesaria para su replicación, y una integrasa, requerida para su inserción en el genoma celular, mientras que los *env* originan proteínas correspondientes a la envoltura de la partícula viral. Los lentivirus representan una subcategoría dentro de este grupo conteniendo genes adicionales, codificantes para una serie de proteínas accesorias requeridas para la infección, replicación, y liberación de viriones. Estas entidades presentan una mayor capacidad de carga respecto de los AAV (hasta alrededor de 9 kb), lo que los vuelve una propuesta ventajosa. Generalmente, presentan tropismos amplios, pudiendo infectar varios tipos celulares y perdurar en el tiempo, logrando una expresión estable a partir de su integración en el genoma. Sin embargo, esta característica resulta en una problemática considerable, debido al riesgo de mutagénesis insercional inherente del proceso que puedan dar como resultado alteraciones en la expresión génica indeseadas a partir de la disrupción o activación de genes del hospedador (**Chen, 2018**). Por otra parte, los retrovirus, resultan poco inmunogénicos, por lo que el riesgo de que el individuo monte una respuesta inmune frente al vehículo es relativamente bajo. La eficiencia de estos vectores recae en el título de virus empleado en la terapia, pudiéndose conseguir valores mucho más altos para el caso de los lentivirus que de los retrovirus. La utilización de lentivirus solo puede ser empleada para el tratamiento de células quiescentes, mientras que los retrovirus se emplean para células con un ciclo celular activo (**Dalal et al., 2018**).

Los adenovirus presentan una cápside icosaédrica proteica, conteniendo en su interior al genoma viral, siendo este una molécula de DNA doble cadena de entre 26 y 45 kpb, según la entidad, flanqueado por secuencias ITR. Estos virus pueden ser producidos de forma de obtener altos valores de títulos, y presentan una alta eficiencia de transferencia, tanto para células quiescentes como en división celular, siempre que cuenten con receptores *target* específicos. Los vectores derivados de AV son altamente inmunogénicos, y presentan una expresión génica a corto plazo a causa de la respuesta inflamatoria puesta en marcha en el organismo (**Dalal et al., 2018**). Se destaca la síntesis de vacunas que hacen uso de estos vectores virales como plataforma de transporte, particularmente, de genes emparentados con microorganismos adventicios, como es el caso de la proteína Spike portada por el virus SARS-Cov-2, y responsable del reconocimiento del receptor ACE2 (**Zhao et al., 2020; Zhu et al., 2020; Barry, 2019**).

Por otra parte, los vectores basados en bacteriófagos consisten esencialmente del genoma completo del bacteriófago en cuestión, pudiendo ser tanto DNA como RNA, en el cual luego es insertada la secuencia nucleotídica que se desea transportar. El genoma restante permanece intacto, debido a que es requerido para la eficiencia de la etapa de producción, portando los genes necesarios para la infección y replicación en las bacterias blanco de cada entidad. Una alternativa resulta en la producción de fagémidos, plásmidos convencionales que cuentan con el origen de replicación típico del bacteriófago en cuestión, más los genes de empaquetamiento (**Lam & Steinmetz, 2018; Lowman, 2013**). Debido a que no resultan infecciosos en células eucariotas, estos vectores resultan una alternativa segura, debido a su baja probabilidad de inducir efectos adversos en las células tratadas. Además, presentan una alta estabilidad frente a una variedad de condiciones indeseadas, una alta capacidad de carga, y un bajo costo asociado a su producción y purificación en

cultivos bacterianos. Actualmente, a pesar de sus ventajas, son considerados vectores poco eficientes para la transferencia de genes, particularmente debido a su falta de capacidad transductora, comprometiendo el ingreso del material genético en las células blanco animales (**Dalal et al., 2018**).

Finalmente, los baculovirus, como antes se describió, representan una gran familia de virus con genomas de DNA circulares, doble cadena, naturalmente infectivos en insectos. Presentan rangos de hospedador estrechos, por lo que cada entidad generalmente es infectiva en una única especie. Un vector basado en estas entidades es, esencialmente, un baculovirus recombinante que contiene en su genoma la secuencia nucleotídica deseada para su transporte, bajo el control de un promotor de mamífero. El promotor empleado depende del contexto biológico en el que se expresará, por lo que no pueden emplearse los promotores virales ya dispuestos en el baculovirus para esta aplicación. Si se desea emplear a estas entidades para la producción de proteínas recombinantes en larvas o líneas celulares de insecto, el ORF (*Open reading frame*) suele disponerse bajo el control del promotor viral del gen de la poliedrina, siendo esta última una proteína no esencial expresada en grandes cantidades (**Chambers et al., 2018; Jarvis, 2009**). Si bien no tienen un impacto citotóxico en las células a las que transducen, los baculovirus son capaces de estimular respuestas antivirales, probablemente debido al reconocimiento de sitios CpG no metilados (**Ang et al., 2016**). La respuesta inmune desarrollada frente al vehículo representa una problemática considerable, ya que contribuye a la eliminación del principio activo y, por lo tanto, compromete significativamente la duración temporal del tratamiento (**Tsai et al, 2020**).

Terapias génicas en el mercado farmacológico:

El diseño de terapias génicas se presenta como una alternativa altamente eficiente para el tratamiento de múltiples enfermedades, de diversa etiología. Naturalmente, hasta el año 2017, más de 2600 ensayos clínicos fueron realizados alrededor del mundo con relación a terapias génicas destinadas al tratamiento de enfermedades de origen tumoral y monogénicas, entre otras, como puede observarse en la **Figura 9**, en la cual se describe la relación porcentual de terapias orientadas al tratamiento de varias enfermedades, o grupos de ellas. De esta forma, existe una gran demanda que requiere el desarrollo de nuevos tratamientos destinados al abordaje de los tipos de patologías mencionadas, que impulsa la apertura de líneas de investigación y desarrollo orientadas a este objetivo particular.

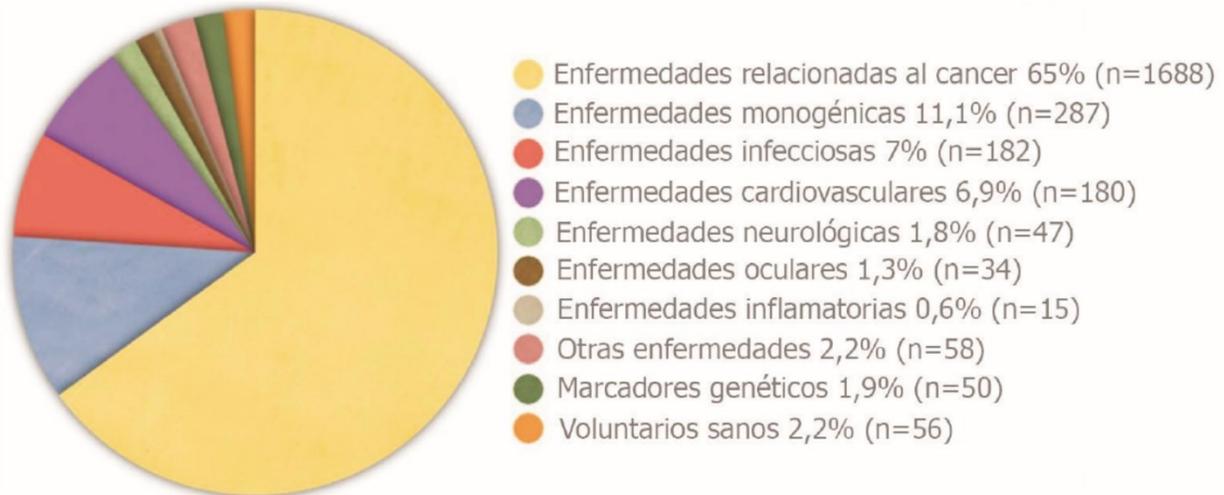


Figura 9: Principales enfermedades y utilidades abordadas en tratamientos experimentales de terapia génica.
Traducido de **Ginn et al, 2018**

Actualmente, se destaca el desarrollo de principios activos orientados a la tecnología de células CAR T, siendo estas linfocitos T provenientes del paciente modificados mediante terapia génica *ex vivo* para la incorporación de un receptor CAR (*Chimeric Antigen Receptor*), capaz de mediar un reconocimiento específico que da lugar a la activación de la célula y, por lo tanto, de sus mecanismos efectores. Se destaca su utilización en el tratamiento de enfermedades tumorales, empleando como *targets* marcadores característicos de las células que hayan adquirido dicho fenotipo. Por otro lado, es notorio el aumento de ensayos clínicos asociados a tratamientos dirigidos a enfermedades monogénicas, probablemente debido al aumento del marco teórico involucrado en estas patologías, la naturaleza de estas técnicas, y el desarrollo y mejora de vehículos de transporte. Para ello, son evaluadas una serie de alternativas, como la edición genética mediante recombinación dirigida, la síntesis de oligonucleótidos capaces de inducir la omisión de exones, y técnicas de RNAi (**Ginn et al, 2018**).

Aproximadamente, un tercio de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha se encuentran en fase clínica 1, 2 o en una combinada resultante de estas, teniendo como foco de estudio la seguridad de la terapia y su eficiencia. El número de terapias en fase 3, si bien representa tan solo el 5%, se encuentra en un constante aumento, siendo prueba fehaciente del potencial práctico portado en este tipo de metodologías terapéuticas, al obtenerse resultados prometedores en las fases anteriores (**Ginn et al, 2018**). En la **Tabla 1** se enlistan una serie de medicamentos de terapia génica aprobados para su comercialización, ya sea a nivel internacional, o nacional, dependiendo de la regulación de los organismos de la salud pertinentes de cada país.

Producto	Empresa	Enfermedad	Secuencia IA	Vector	Enfoque (In vivo o ex vivo)	Efecto (transitorio o estable)
Gendicine	Shenzhen SiBiono GeneTech	Carcinoma de cuello y cabeza, cáncer de hígado	Gen <i>p53</i>	Adenovirus	<i>In vivo</i>	Estable
Rexin-G	Epeius Biotechnologies	Sarcoma de tejido suave, osteosarcoma, y cáncer de hígado	Gen codificante para Ciclina G1	Retrovirus	<i>In vivo</i>	Transitorio
Neovasculgen	Human Stem Cells Institute	Enfermedad arterial periférica, isquemia de extremidades	Gen codificante para <i>VEGF</i>	Plásmido	<i>In vivo</i>	Transitorio
Glybera	UniQure	Deficiencia de lipoproteína lipasa (DLPL)	Gen Lipoproteína lipasa	Adeno asociado	<i>In vivo</i>	Transitorio
Imlygic	Amgen Inc	Melanoma	Gen codificante para GM-CSF	Herpes virus	<i>In vivo</i>	Transitorio
Zalmoxis	MolMed S.p.A	Trasplante de células madre hematopoyéticas (Cáncer asociado a la sangre)	Genes Δ LNGFR y HSV-TK Mut2	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>	Estable
Strimvelis	Orchard Therapeutics	Deficiencia de adenosina desaminasa	Gen codificante para Adenosina desaminasa humana	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>	Estable
Kymriah	Novartis Pharmaceuticals	Leucemia Linfoblástica aguda	Receptor CAR T anti CD19	Lentivirus	<i>Ex vivo</i>	Estable
Yescarta	Kite Pharma, Incorporated	Linfoma de células B	Receptor CAR T anti CD19	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>	Estable
Luxturna	Spark Therapeutics	Distrofia retiniana hereditaria	Gen <i>RPE65</i>	Adeno asociado	<i>In vivo</i>	Estable
Invossa	Kolon TissueGene	Osteoartritis	Gen codificante para TGF-B1	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>	Transitorio
Collategene	Anges Inc.	Isquemia de extremidades	Gen codificante para HGF	Plásmido desnudo	<i>In vivo</i>	Transitorio
Zolgensma	Novartis Pharmaceuticals	Atrofia muscular espinal	Gen <i>SMN1</i>	Adeno asociado	<i>In vivo</i>	Estable
Zynteglo	BlueBird Bio	Beta Talasemia	Gen codificante para β A-T87Q-globina	Lentivirus	<i>Ex vivo</i>	Estable

Tabla 1. Productos terapéuticos basados en terapia génica. Se mencionan una serie de medicamentos de terapia génica aprobados por diversos organismos reguladores, en conjunto con las secuencias nucleotídicas correspondientes y enfermedades a tratar, el tipo de vector y terapia, y la temporalidad de su efecto

Tecnologías BacMam

Al descubrirse la capacidad de los BV de baculovirus de transducir células de mamíferos, sin que estos fueran capaces de replicarse e iniciar un ciclo viral, se abrió inmediatamente la puerta a la generación de tecnologías BacMam (*Baculovirus gene transfer into Mammalian cells*). Estos vectores presentan un casete donde quedará dispuesto el gen a expresar en las células blanco bajo promotores funcionales en células de mamífero. La aplicación BacMam se destaca por la sencillez del procedimiento de clonado molecular para generar variantes recombinantes, gracias a la conversión del genoma viral en un vector bácmidico (ácido nucleico baculoviral transformado en un mega plásmido capaz de replicar en bacterias), a su posibilidad de producción en escala de los viriones a costos aceptables, al rango de tipos celulares susceptibles en mamíferos, a la baja o nula citotoxicidad en mamíferos, y a su perfil de bioseguridad bajo, entre otras ventajas (**Chambers et al., 2018; Vega, 2016**). En la **Figura 10** se esquematiza el proceso de generación de baculovirus recombinantes conteniendo secuencias de DNA heterólogo. Adicionalmente, en el **Anexo II** se describe y se esquematiza el sistema Bac to Bac (**Thermo Fisher**) utilizado en este trabajo.

Además, diversas modificaciones adicionales al genoma baculoviral pueden resultar en mejoras para la producción de los BV. Por ejemplo, la remoción de los genes codificantes para la quitinasa y la catepsina (ambos responsables de la licuefacción del insecto y la degradación del exoesqueleto en los estadios más tardíos de la infección), o la de otros genes innecesarios para la generación del BV (como el gen de la poliedrina) pueden mejorar los sistemas productivos (**Kost & Kemp, 2016**).

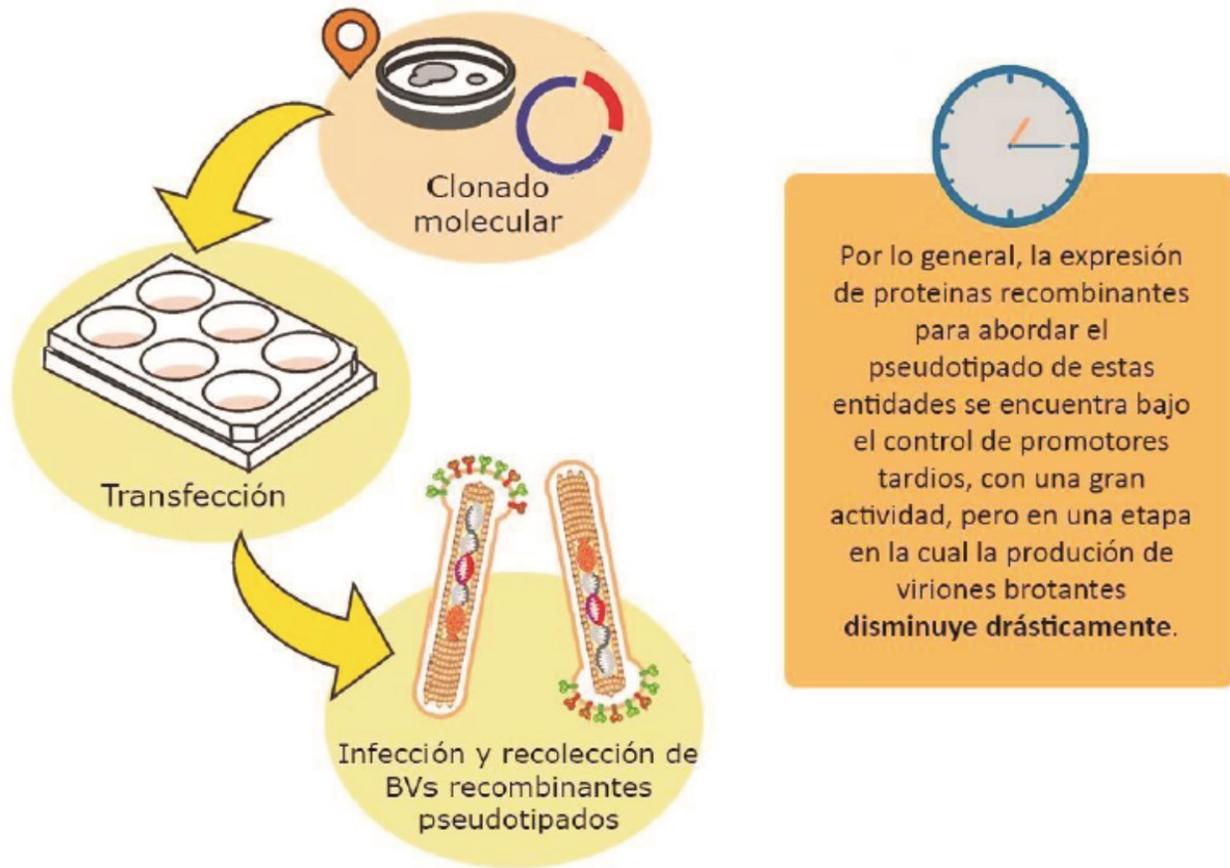


Figura 10. Producción de baculovirus recombinantes. El procedimiento consta de una etapa de clonado molecular, disponiendo de un amplio abanico de metodologías, hasta obtener los genomas baculovirales recombinantes, los cuales serán empleados para transfectar células de insecto. Finalmente, se recuperará el sobrenadante que contiene a los viriones brotantes (dado que el DNA baculoviral es infeccioso *per se*), los cuales serán empleados para posteriores rondas de infección (para incrementar el título de viriones). La ilustración muestra que los BV recombinantes portan genes codificantes de factores útiles en mamíferos, además de la posibilidad de portar proteínas de envoltura diferentes a GP64 (proteína fusogénica del BV) para favorecer la transducción o tropismo en el tejido diana de la terapia. Adaptado de Targovnik et al., 2021.

Baculovirus y terapia génica:

Los baculovirus, actualmente, presentan un papel protagónico en el diseño y evaluación conceptual de terapias génicas para mamíferos, incluidos los humanos. Aun habiéndose reconocido su potencial para esta aplicación, múltiples líneas de investigación continúan abordando los límites que presentan estas entidades biológicas para esta tarea, alterando su tropismo, su eficiencia de transducción, el límite de información genética adicional capaz de portar, el tiempo de expresión del gen terapéutico, entre otras variables que, en definitiva, dispondrán los límites para el propio diseño de las terapias mencionadas.

Como antes se mencionó, y como también puede ocurrir con los plásmidos bacterianos, la cantidad de motivos CpG no metilados en el DNA baculoviral vuelve al baculovirus en una partícula

inmunogénica, pudiendo activar células de la inmunidad innata tales como dendríticas y *Natural killers* (NK), por lo que se destaca su potencial como adyuvante, ya sea cuando el propio baculovirus porta el gen terapéutico, como cuando no (Ang et al., 2016). El reconocimiento es mediado a partir de múltiples receptores, como aquellos de tipo *Toll pathways* (Abe et al., 2005; Boulaire et al., 2009), RIG-1 (Balasundaram et al., 2017), otros asociados al reconocimiento de citoquinas (Shin et al., 2020), vinculadas al estado antiviral, y a la ruta de síntesis y reconocimiento de ácidos nucleicos cGAS, por medio de la proteína STING (Amalfi et al., 2020).

Si bien el efecto de terapias génicas *in vivo* utilizando estos vectores es de baja temporalidad por lo antes expuesto (7 a 14 días), han sido observados buenos resultados al implantar células transducidas de forma *ex vivo*, aunque múltiples estudios se disponen para la optimización de estos vehículos en ambos enfoques (Chuang et al, 2009). Algunos de los avances realizados hasta el momento, incluyen: la pseudotipificación de baculovirus, capaces de expresar la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (Barsoum et al, 1997; Kolangath et al, 2014), u otros factores de virulencia asociados a patógenos infectivos en eucariotas (Tamura et al, 2016; Hu et al, 2019), con la finalidad de aumentar la eficiencia de transducción en células de mamífero; el empleo de un vehículo adicional no viral, como podría ser una nanopartícula o un polímero de quitosano, pudiendo determinar este el tropismo celular y el mecanismo de ingreso del baculovirus, mientras que este último dispondrá las actividades biológicas requeridas para la transferencia génica y, por lo tanto, la transducción de la secuencia nucleotídica dispuesta como principio activo (Paul et al., 2011; You-Kyoung et al., 2009); la inclusión de secuencias terminales repetidas e invertidas y genes Rep pertenecientes a AAV (Wang, 2008), o las mismas secuencias, acompañadas del gen de la transposasa correspondiente al transposon *Sleeping Beauty* (Turunen et al, 2014); y algunas modificaciones genómicas para afectar alguna de las variables asociadas al procedimiento, determinando el rendimiento de la transferencia (Graves et al, 2018), entre otras optimizaciones.

Al momento, ninguna terapia basada en baculovirus como vector ha alcanzado el estadio de pruebas clínicas en seres humanos, aunque existe un gran número de estudios que han ofrecido evidencia contundente sobre la eficiencia de su empleo, utilizando modelos animales y variantes recombinantes del prototipo AcMNPV realizados en los últimos 10 años, expuestos en la **Tabla 2**. En su mayoría, los diseños terapéuticos evaluados se encuentran dispuestos al tratamiento de enfermedades de carácter oncológico, cardiovascular, e ingeniería de tejidos, tanto empleando un enfoque *in vivo* como *ex vivo* en diversos modelos animales, y empleando algunas variantes asociadas al vehículo de transporte de la secuencia nucleotídica.

Enfermedad	Secuencia AI	Tipo de vector	Modelo animal	<i>In vivo/ex vivo</i>	Referencia
Cáncer					
Hepatoma	Gen codificante para Apoptina, proveniente del virus de la anemia de gallina	Bac to Bac (Thermo Fisher) Pseudotipado con VSV-G	Ratón	<i>In vivo</i> (intra-tumor)	Pan et al., 2010
Glioblastoma	Gen codificante para timidina quinasa, proveniente del virus herpes simple	Bac to Bac (Thermo Fisher)	Ratón	<i>Ex vivo</i> (Células humanas de tipo MSC trasducidas)	Bak et al., 2011
Tumor de próstata u ovario	Gen codificante para una proteína de fusión antiangiogénica	Bac to Bac (Thermo Fisher) Sistema híbrido con trasposón Sleeping Beauty	Ratón	<i>In vivo</i> (intra-tumor)	Luo et al., 2012
Carcinoma hepatocelular	Gen codificante para lncRNA PTENP1	Sistema híbrido con trasposón Sleeping Beauty (Dos BV, expresando uno la transposasa para SB, y otro secuencias de inserción y la secuencia AI)	Ratón	<i>In vivo</i> (intra-tumor)	Chen et al., 2015
Tumor de vejiga	Gen codificante para el ligando CD40 e IL-15	BacPAK (Clontech)	Ratón	<i>In vivo</i> (intra-tumor)	Ang et al., 2016
Tumor pituitario	Gen codificante para shRNA	BacPAK (Clontech)	Ratón	<i>In vivo</i> (intra-tumor)	Gottardo et al., 2018
Carcinoma hipofaríngeo	Gen codificante para simportador de yoduro de sodio (NIS)	Bac to Bac (Thermo Fisher) Sistema híbrido con AAV	Ratón	<i>Ex vivo</i> (células madre mesenquimatosas de la médula ósea humana transducidas con BMSC) combinadas con terapia con 131 I	Wang et al., 2019 Wang et al., 2020
Enfermedades cardiovasculares					
Infarto del miocardio	Gen codificante para angiopoyetina-1	BaculoGold (BD Biosciences) y nanopartículas de Tat/DNA	Rata	<i>In vivo</i> (regiones periféricas al infarto)	Paul et al., 2011
Aterosclerosis relacionada a enfermedades cardiovasculares	Gen codificante para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Bac to Bac (Thermo Fisher) Evaluación de variantes pseudotipadas con VSV-G	Conejo	<i>In vivo</i> (músculo esquelético)	Heikura et al., 2012

Infarto del miocardio	Gen codificante para angiopoyetina-1	BaculoGold (BD Biosciences) y nanopartículas de Tat/DNA	Rata	<i>Ex vivo</i> (tejido adiposo humano modificado, derivado de células madre - hASCs transducidas)	Paul et al., 2012
Reestenosis intra-stent	Gen codificante para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	BaculoGold (BD Biosciences) con partículas sintéticas de dendrímeros catiónicos de poliamidoamina (PANAM)	Perro	<i>In vivo</i> (Stent liberador de genes basado en baculovirus)	Paul et al., 2013
Infarto del miocardio	Gen codificante para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Bac to Bac (Thermo Fisher). Uso de Bac- GOI/ORI P (EBV) + Bac- recombinase (FLP)	Conejo	<i>Ex vivo</i> (células madre derivadas de tejido adiposo de conejo ASCs transducidas)	Sung et al., 2014
Enfermedad isquémica de las extremidades	Gen codificante para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Bac to Bac (Thermo Fisher). Uso de Bac- GOI/ORI P (EBV) + Bac- recombinase (FLP)	Ratón	<i>Ex vivo</i> (células estromales derivadas de tejido adiposo de ratón - ADSCs transducidas)	Makarevich et al., 2015
Lesión por isquemia-reperfusión (I / R) asociada con el trasplante de riñón	Gen codificante para dismutasa superoxidasa de manganeso (SOD-2)	flashBAC ULTRA™ DNA (Oxford Expression Technologies Ltd)	Riñón porcino	<i>Ex vivo</i> (Células de riñón humano 2 -HK-2- transducidas)	Hitchman et al., 2017
Enfermedad arterial periférica	Gen codificante para un factor 1-alfa mutante oxígeno resistente e hipoxia inducible	Bac to Bac (Thermo Fisher).	Conejo	<i>In vivo</i> (músculo esquelético)	Giménez et al., 2020
Medicina de regeneración/ingeniería de tejidos					
Defectos óseos segmentarios masivos seguidos de trauma o resección de tumor	Gen codificante para la proteína-2 morfogenética ósea (BMP2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Bac to Bac (Thermo Fisher). Uso de Bac- GOI/ORI P (EBV) + Bac- recombinase (FLP)	Conejo	<i>Ex vivo</i> (células madre derivadas de tejido adiposo de conejo - ASCs transducidas)	Lin et al., 2011 Lin et al., 2014
Defectos óseos segmentarios masivos seguidos de trauma o	Gen codificante para la proteína-2 morfogenética ósea (BMP2) y el factor de	Bac to Bac (Thermo Fisher). Uso de Bac- GOI/ORI P (EBV) + Bac-	Minicerdo	<i>Ex vivo</i> (células madre derivadas de tejido adiposo de conejo - ASCs transducidas)	Lin et al., 2015

resección de tumor	crecimiento endotelial vascular (VEGF)	recombinase (FLP optimized)			
Osteoporosis	Gen codificante para una esponja de miR-214	Bac to Bac (Thermo Fisher). Uso de Bac-GOI/ORI P (EBV) + Bac-recombinase (Cre)	Rata	<i>Ex vivo</i> (células madre derivadas de tejido adiposo de conejo - ASCtransducidas)	Li et al., 2016 Li et al., 2017
Enfermedad degenerativa del disco	Gen codificante para la proteína-7 morfogenética ósea (BMP-7)	Bac to Bac (Thermo Fisher).	Rata	<i>Ex vivo</i> (células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de rata - BMDMSCtransducidas)	Liao, 2016
Columna vertebral inestable	Gen codificante para la proteína-7 morfogenética ósea (BMP-7)	Bac to Bac (Thermo Fisher).	Conejo	<i>Ex vivo</i> (células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de rata - BMDMSCtransducidas)	Liao, 2016
Artritis reumatoide	Gen codificante para el receptor Cocksackie-adenovirus (CAR) en BV + adenovirus humano de tipo 5 (HAdV5)-PUMA (p53 modulador regulado de la apoptosis)	Bac-N-Blue (Thermo Fisher).	Rata	<i>In vivo</i> (intra-articular)	Hon et al., 2017
Lesiones de nervios periféricos	Gen codificante para CRISPRa, sistema de activación múltiple del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de línea celular de células gliales (GDNF) y genes de crecimiento de nervios (NGF)	Bac to Bac (Thermo Fisher). Uso de Bac-GOI/ORI P (EBV) + Bac-recombinase (Cre)	Rata	<i>Ex vivo</i> (células madre derivadas de tejido adiposo de ratón - ASCtransducidas)	Hsu et al., 2019
Otras enfermedades					
Encefalopatía hepática	Gen codificante para la glutamina sintetasa	Bac to Bac (Thermo Fisher).	Rata	<i>In vivo</i> (intramuscular)	Torres-Vega et al., 2015

					Espíritu-Ramírez et al., 2018
--	--	--	--	--	-------------------------------

Tabla 2. Desarrollos en terapia génica empleando baculovirus. Se enuncia, en cada caso, el vector utilizado, la enfermedad tratada, el enfoque de la terapia, el modelo animal utilizado, y la secuencia terapéutica estudiada (Secuencia AI).

Baculovirus y la glicoproteína de VSV:

Si bien el uso de entidades virales como vehículos de transporte de secuencias nucleotídicas ha mostrado resultados sumamente prometedores para el diseño de vacunas, procedimientos terapéuticos, y metodologías de diagnóstico y prevención, existen alternativas para optimizar o alterar algunas de sus características biológicas, dependiendo del objetivo de la práctica. Una posibilidad recae en la pseudotipificación, implicando ésta la modificación genética del virus con la finalidad de permitir que exprese de forma heteróloga una proteína de superficie derivada de otra entidad (**Joglekar & Sandoval, 2017; Bentley et al., 2015**). Una pseudotipificación recurrente es aquella que emplea a la glicoproteína VSV-G, del virus de la estomatitis vesicular. De esta forma, el virus modificado expresaría en su envoltura a la proteína VSV-G.

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) presenta un genoma lineal simple cadena, no segmentado, basado en RNA de sentido negativo de aproximadamente 11 kb, comúnmente transmitido por diversos artrópodos a un gran rango de especies animales. Se encuentra asignado al orden *Mononegavirales*, y particularmente, a la familia *Rhabdoviridae* (**Whelan, 2008; Banerjee et al., 1977**). Las infecciones dadas en mamíferos superiores como bovinos, equinos y suinos pueden determinar el desarrollo de la patología, presentando una sintomatología que incluye lesiones vesiculares en la boca, patas y ubres del animal, además de fiebre, siendo el diagnóstico temprano la clave para la sobrevida (**Whelan 2008; Mason, 1978**). El genoma de VSV codifica 5 proteínas esenciales, siendo estas la proteína de la nucleocápside (N), una fosfoproteína (P), una proteína de matriz (M), una glicoproteína (G), y RdRp (L), todas empacadas en el virión, sugiriendo su rol vital en el ensamblado de la partícula. Esta entidad viral tiene el potencial de infectar un gran rango de tipos celulares, por lo que se propone que el receptor requerido para la infección es común entre ellas, o que el virus VSV es capaz de mediar reconocimientos con diferentes moléculas dispuestas en su envoltura. El reconocimiento permite la endocitosis de la partícula por parte de la célula contactada, y la acidificación de la misma produce un cambio conformacional drástico en la proteína VSV-G, induciendo la fusión de la membrana viral con la membrana celular de la vesícula. Esto determina la liberación de la nucleocápside, dando comienzo a la transcripción de los genes virales (**Luo, 2012; Coil & Miller, 2004**).

Los vectores virales correspondientes a los tipos adenovirus, retrovirus, lentivirus, o incluso baculovirus, presentan la desventaja de encontrarse limitados por el reconocimiento específico dado entre receptores y moléculas de superficie del virión. Al recurrir a la pseudotipificación con VSV-G, la eficiencia del ingreso suele aumentar drásticamente, debido a su interacción con componentes de membrana típicos en un amplio grupo de tipos celulares. De esta forma, no solo aumenta la eficiencia del ingreso, sino también la amplitud del tropismo del vector (**Joglekar & Sandoval, 2017; Cronin et al., 2005; Burns et al., 1993**).

El baculovirus AcMNPV ha sido pseudotipado con VSV-G, demostrándose un aumento en la eficiencia de transferencia de genes en una gran variedad de líneas celulares. Resultados similares

han sido notificados al sobre expresar la proteína Gp64, localizada en la superficie del virión baculoviral, y requerida para la propagación del virus en la infección secundaria. Ha sido demostrada, incluso, la infectividad del virión pseudotipado con VSV-G al eliminar la proteína Gp64, indicando su alto potencial como recurso, aunque esta resulta menor que la del fenotipo original (Kitawaga et al., 2005; Tani et al., 2003; Mangor et al., 2001; Tani et al., 2001; Barsoum et al., 1997). A su vez, fue evaluada la posibilidad de incorporar una versión truncada de la glicoproteína, conteniendo el dominio GED, obteniéndose una menor eficiencia respecto de la proteína completa, probablemente debido a la ausencia del dominio de fusión. Por otro lado, al trabajar con una multiplicidad de infección alta, ambas versiones muestran resultados equivalentes (Kolangath et al., 2014). Una explicación adicional que podría justificar el aumento de transducción en el caso de baculovirus pseudotipados con esta glicoproteína recae en el escape de las vesículas destinadas para su degradación, ya que por medio de su acidificación, permiten la inducción de la fusión de membranas y, por lo tanto, el ingreso al interior celular.

Baculovirus y la duración de la expresión génica en mamíferos:

Entre las desventajas del uso de los baculovirus como vehículos de terapia génica se ha visto que la expresión de genes terapéuticos contenidos en genomas baculovirales dentro de células de mamífero se prolonga hasta 8-35 días (Pan et al., 2013; Yeh et al., 2014) pudiendo ser esto escaso para determinadas patologías que requerirían de una mayor temporalidad en la expresión del gen terapéutico, requiriendo así de nuevas dosis del vector viral, lo que podría conllevar varios problemas. En este sentido, la estrategia de generar minicírculos de dsDNA (cccdsDNA; fragmentos pequeños de DNA doble cadena circular covalentemente cerrado sólo conteniendo los genes terapéuticos) ha resultado en mayores niveles de sobrevivencia y funcionalidad (Gaspar et al., 2015), ya que su pequeño tamaño les proporciona mayor estabilidad en comparación con el genoma viral, el cual además contiene secuencias que son reconocidas como exógenas por parte de la célula transducida. Para esto, la tecnología más utilizada ha sido la de Cre/LoxP (Vítor et al., 2014). Por otra parte, en los últimos años se ha visto que los *ministrings* (moléculas de DNA doble cadena lineal covalentemente cerrados, lccdsDNA) también poseen una gran estabilidad y podrían ser usados para aumentar la duración de la expresión génica. Así, la tecnología más utilizada es la de protelomerasa/telRL, aunque las *ministrings* siempre han sido producidas *in vivo* en bacterias o *in vitro*, y posteriormente transfectadas en las células de mamífero (Schakowski et al., 2007; Nafissi et al., 2014; Wong et al., 2016) (Figura 11).

A su vez, se ha reportado que la introducción de un replicón basado en el OriP y el gen *ebna-1* del virus Epstein Barr (Ren et al., 2006) aumenta todavía más la temporalidad de la permanencia del virus/minicírculo dentro de la célula y, por tanto, su temporalidad de expresión de un gen terapéutico, ya que convierten a los minicírculos en vectores episomales de mamíferos (Suzuki et al., 2009).

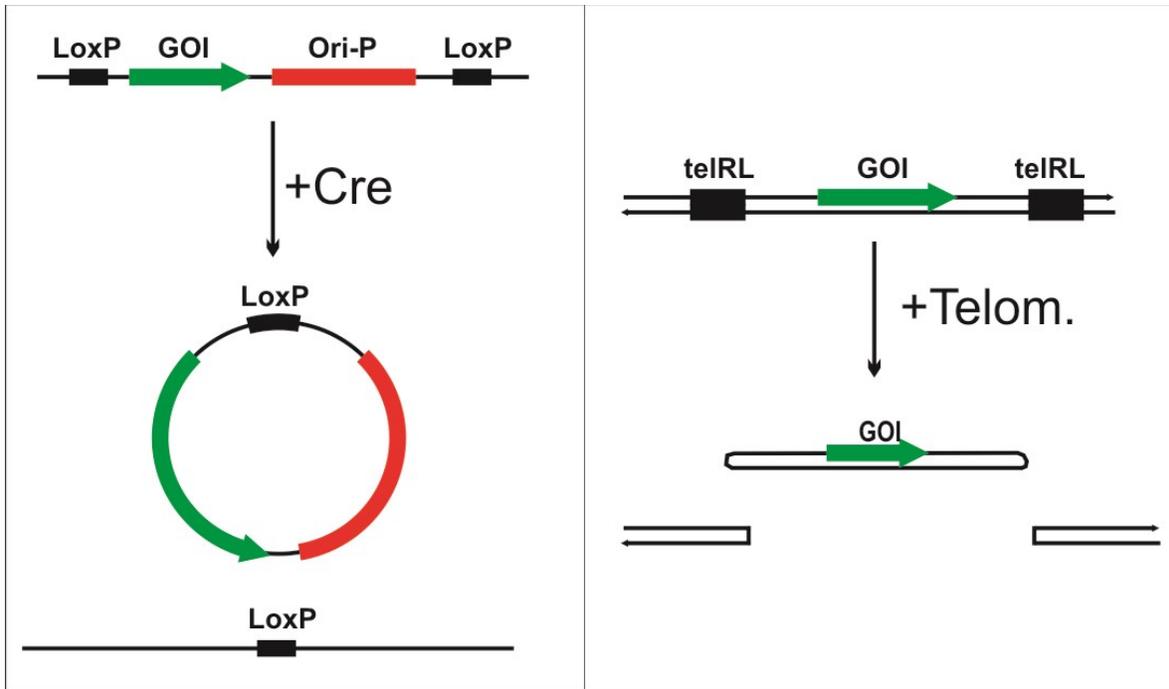


Figura 11. Mecanismos de generación de minicírculos/*ministrings*. (Panel Izquierdo) Se esquematiza el funcionamiento del sistema Cre/LoxP para la generación de minicírculos. (Panel Derecho) se esquematiza el funcionamiento del sistema Telomerasa/telIRL para la generación de *ministrings*. GOI (*Gene of interest*).

Hipótesis de trabajo

Viriones Brotados (BV) derivados del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) recombinantes, portadores de genes funcionales en células de mamífero, producidos en cultivos *in vitro* de células Sf9 y ultraconcentrados, transducen eficientemente de manera transitoria células de mamíferos creciendo en condiciones *in vitro* (líneas celulares y cultivos primarios), y transducen eficientemente tejidos de animales *in vivo*, en modo comparable a otros vectores virales usados para tales propósitos. Modificaciones en las proteínas de membrana de los BV, como la incorporación de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), incrementan la capacidad de transducción del vector baculoviral sin afectar su producción en células de insecto. También, modificaciones en el DNA funcional en mamíferos presente en los baculovirus recombinantes, las cuales sean responsables de la liberación de minicírculos replicativos (cccdsDNA) o moléculas lineales (lccdsDNA), incrementan la duración de la expresión génica cuando transducen células de mamífero.

Objetivo General

Disponer de vectores baculovirales optimizados en su capacidad de transducir y expresar factores de interés en células de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo*, útiles para propósitos de terapia génica en seres humanos.

Objetivos Específicos

- a) Generar y evaluar viriones brotados recombinantes derivados de AcMNPV, los cuales porten genes reporteros que sean funcionales en cultivos celulares y tejidos de mamíferos.
- b) Generar y evaluar viriones brotados recombinantes derivados de AcMNPV, los cuales porten genes terapéuticos que sean funcionales en cultivos celulares y tejidos de mamíferos, y que sean útiles para la resolución de problemáticas de salud vinculadas con enfermedades cardiovasculares.
- c) Generar y evaluar viriones brotados recombinantes derivados de AcMNPV, los cuales se encuentren pseudotipados con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G).
- d) Generar y evaluar viriones brotados recombinantes derivados de AcMNPV, los cuales porten secuencias que posibiliten liberar moléculas de dsDNA circular pequeño con capacidad replicativa (cccdsDNA; minicírculos), o moléculas de dsDNA lineal con extremos cerrados (lccdsDNA; miniStrings) conteniendo a los genes de interés.

Materiales y Métodos

Metodologías generales

Electroforesis de ácidos nucleicos:

Las visualizaciones de tamaño, cantidad y calidad de ácidos nucleicos se realizaron mediante electroforesis en geles de agarosa en *buffer* TAE 1x (Tris base 0,04 M, Ácido acético glacial 1,14 mL/L, EDTA pH 8 1mM), tinción con Bromuro de etidio (**Sigma**, *stock* 20.000 X, 10 mg/mL) y revelado por exposición a luz UV. Teniendo en cuenta los tamaños de los fragmentos de DNA a separar, se seleccionó el porcentaje de agarosa deseado de los geles (0,6 – 1,5 % p/v) y los patrones de tamaño y masa molecular (**Productos Bio-lógicos**) más adecuados para cada situación.

Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa:

En los casos de recuperación de fragmentos de DNA, provenientes de digestiones enzimáticas o productos de PCR a partir de geles de agarosa, se utilizaron *Kits* comerciales (**Productos Bio-lógicos**) basados en el método de adsorción a matriz de sílica.

Extracciones plasmídicas y de DNA viral:

Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron por el método de mini preparación por lisis alcalina (**Green y Sambrook, 2012**). En el caso de las extracciones del báculo de AcMNPV (bMON14272) se utilizó el método adaptado en el manual *Bac-To-Bac® Baculovirus expression system* (**Thermo Fisher Scientific**). Para la extracción de DNA viral a partir de los BV del báculo AcMNPV recombinante, 1,5 mL de sobrenadante de cultivo celular infectado y clarificado se centrifugó a 16.000g a 4°C durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 µL de *buffer* de lisis (Tris 10mM, EDTA 10 mM, SDS 0,25% p/v, Proteínasa K 500 µg/mL) y se incubó 15 minutos a 55°C. Luego, se le agregaron 400 µL de cloroformo y se centrifugó 5 minutos a 16.000g a 4°C. La fase acuosa se transvasó a otro tubo y se realizó una precipitación de ácidos nucleicos con etanol en presencia de sales.

Precipitación de ácidos nucleicos:

Para la precipitación de ácidos nucleicos se utilizó el protocolo de precipitación con etanol en presencia de sales (**Green y Sambrook, 2012**). A partir de un volumen determinado de ácidos nucleicos, se agregaron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,3 y 2,5 volúmenes de etanol 96% v/v. Se incubó a -20°C durante 20 minutos y se centrifugó a 4°C a 16.000g durante 20 minutos. Luego se realizó un lavado con etanol 70 % v/v y se disolvió el *pellet* en el volumen de agua estéril deseado.

Transformación de DNA en bacterias:

Se utilizó el equipo Gene Pulser II (**BioRad**) para la electroporación de células de *Escherichia coli* electrocompetentes. Luego de ser transformadas, las bacterias fueron incubadas a 37°C, 220 rpm durante 40 min en medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido (extracto de levadura 0,5 % p/v, peptona de carne 1 % p/v, NaCl 1 % p/v) sin antibiótico. Posteriormente, se sembraron en placas de Petri con LB sólido (+ 1.5% p/v agar bacteriológico) conteniendo el antibiótico correspondiente e incubadas *Over Nigth* (ON) a 37°C.

La transformación de bacterias DH10Bac con los plásmidos derivados del vector pFastBac-dual se realizó por el método de *shock* térmico. Para esto, la mezcla de DNA plasmídico y bacterias químicamente competentes se incubó en hielo durante 30 minutos, tras los cuales se sumergió en agua a 42°C durante 90 segundos, para volver a incubarlas 2 minutos en hielo. Luego de ser transformadas, las bacterias fueron incubadas a 37°C, 220 rpm durante 4 horas en medio de cultivo LB líquido sin antibiótico para dar tiempo a que suceda la reacción de transposición. Posteriormente, se sembraron en placas de Petri con LB sólido conteniendo los antibióticos kanamicina y gentamicina y los reactivos isopropil- β -Dtiogalactopiranósido (IPTG) y X-gal e incubadas ON a 37°C.

Reacciones de secuenciación de DNA:

Todas las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el método automático de Sanger (**Macrogen, Korea**) a partir de mini preparaciones precipitadas con polietilenglicol (PEG) 8000 (**Green y Sambrook, 2012**) utilizando distintos *primers* universales proporcionados por la empresa según correspondiera.

Digestiones y ligaciones enzimáticas de DNA:

Todas las digestiones se realizaron con enzimas de restricción (**Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Productos Bio-lógicos, New England Biolabs**) en un volumen final de 10 a 20 μ L, e incubadas a 37 °C ON en las condiciones óptimas especificadas por los fabricantes e inactivadas térmicamente.

Las ligaciones de los diferentes fragmentos de DNA realizadas en los distintos clonados moleculares fueron realizadas utilizando 2 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (**Fermentas y Productos Bio-Lógicos**) en un volumen final de 20 μ L, e incubando ON a 21 °C. Todas las construcciones genéticas utilizadas y generadas en este trabajo se mencionan en la **Tabla 4**.

Síntesis y amplificación de DNA mediante PCR:

Todas las amplificaciones de DNA se realizaron en un volumen de 10 μ L, utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM de cada uno; 1 μ M de cada *primer* (**Tabla 5**) y 1 U de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (DNA Taq polimerasa, **Productos Bio-Lógicos**). En los distintos casos se modificaron las temperaturas y los tiempos de los pasos del ciclado según las características de los *primers*, el DNA molde y del producto deseado.

Mantenimiento de líneas celulares de insecto:

Se utilizó la línea celular de insecto *Sf9* (Tabla 3) para la generación y multiplicación de virus recombinantes de AcMNPV derivados del sistema *Bac-to-Bac*® *Baculovirus Expression System* (Invitogen). En todos los casos, las células se mantuvieron a 25°C (estufa MIR 5531, SANYO) en monocapa, en frascos de poliestireno de 25, 75 y 175 cm², utilizando medio GRACE's (Thermo Fisher Scientific), 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) más antibióticos y antimicóticos (Thermo Fisher Scientific).

Generación de virus recombinantes:

Los genomas baculovirales recombinantes obtenidos a partir de bacterias DH10Bac transpuestas, fueron transfectados en monocapas de células *Sf9* creciendo en medio GRACE's (Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino al 10 % v/v (Natocor), haciendo uso del reactivo PEI (polietilenimina) y procedimientos reportados (Longo et al., 2013). La progenie viral obtenida fue recuperada de los medios condicionados a los 7 días, y empleada como inóculo para propagar los viriones brotados mediante ensayos de infección a bajas multiplicidades de infección para evitar generación de viriones defectivos (O'Reilly et al, 1992). Los lotes virales así protegidos fueron correctamente identificados y almacenados a 4°C, con protección a la luz. En el Anexo II se describe y se esquematiza el sistema *Bac to Bac* (Thermo Fisher) utilizado en este trabajo.

Multiplicación de stocks de viriones brotantes:

La multiplicación de BV de AcMNPV derivados del sistema *Bac-to-Bac* se realizó mediante infecciones de cultivos de células *Sf9* crecidas en monocapa en frascos de 175 cm² a una confluencia del 70%, utilizándose multiplicidades de infección (MOI) menores a 1. Para ello, células en monocapa, lavadas previamente con *buffer* salino de fosfato (PBS), se incubaron durante 1 hora a 25°C con una película de BV en medio GRACE's sin SFB, con períodos cortos de agitación suave cada 20 minutos, luego de los cuales se les agregó medio GRACE's completo (con SFB 10% v/v) y se las incubó durante 4 días a 25°C.

Concentración de virus brotantes por centrifugación a alta velocidad:

Los sobrenadantes clarificados de células *Sf9* infectadas se centrifugaron en colchón de sacarosa 30% p/v a 22000 rpm durante 2 horas y 30 minutos a 4°C (ultracentrifuga Beckman XL-70, rotor SW28) y se resuspendieron en *buffer* PBS pH 7.4. Los virus concentrados se utilizaron para los ensayos de transducción *in vitro* e *in vivo*, así como también para la realización de los *Western Blot*.

Titulación de stocks virales

Los *stocks* virales fueron titulados en términos de su capacidad de formación de focos infectivos (ufp/mL). Para lo primero, diluciones seriadas de cada lote fueron empleadas para infectar monocapas de células *Sf9* creciendo en medio completo sobre placas de 6 o 12 *wells* (BIOFIL), las cuales fueron incubadas durante 4 días a 25°C (un una capa de agarosa *low melting temperature* 1.5 p/v y así evitar la diseminación del virus en la placa), para luego contar de forma visual mediante

microscopía de fluorescencia (**Cytation 5, Biotek**) la cantidad de focos infectivos expresando GFP. Luego, la cantidad de focos contados se multiplicó por el factor de dilución correspondiente para calcular la concentración de partículas virales infectivas finales por mL de *stock*.

Mantenimiento de líneas celulares de mamífero

En cuanto a los ensayos de transducción de células de mamíferos con virus recombinantes, se utilizaron las líneas enumeradas en la **Tabla 3**. En todos los casos, las células se mantuvieron a 37°C en monocapa en frascos de poliestireno de 25 y 75 cm², utilizando medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)*, 10 % v/v SFB inactivado más antibióticos y antimicóticos (**Invitrogen**) en atmósfera húmeda 5% v/v CO₂

Transducción de líneas celulares de mamíferos con BVs:

Las células fueron sembradas en placas *multi well* mantenidas a 37°C utilizando medio DMEM 10 % v/v SFB inactivado más antibióticos y antimicóticos en atmósfera húmeda 5% v/v CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Para realizar la transducción con los virus recombinantes las células se lavaron con PBS 2 veces y se les agregó una mezcla de virus concentrado/PBS según la MOI (multiplicidad de infección) a utilizar, de manera que las células quedaran cubiertas con el mínimo volumen de líquido posible. Luego, las células con el virus fueron incubadas a 37°C durante 1 hora, tiempo tras el cual se retiró el PBS con el virus para agregarle medio DMEM completo. Las eficiencias de transducción se analizaron por microscopía de fluorescencia (**Cytation 5, Biotek**) y citometría de flujo (**BD FACSCalibur, Biosciences**) a las 24 post-transducción.

Todos los antibióticos e inductores utilizados se indican en la **Tabla 6**.

Materiales

Cepas bacterianas y líneas celulares:

Nombre	Características
<i>Escherichia coli</i>	
Top 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-(Invitrogen)
DH10Bac	DH10B [F- endA1 deoR+ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) StrR λ-] (Invitrogen) conteniendo el báculo de AcMNPV.
Stbl3	F- glnV44 recA13 mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 leu mtl-1 (Invitrogen)

Células de insecto y mamífero	
Sf9	ATCC® CRL-1711™, línea celular derivada de ovarios de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i>
HEK 293T	Línea celular derivada de tejido embrionario de riñón humano
CMFR:	Cardiomiositos de rata neonatal
H9C2	Mioblastos de rata
MUSE Conejo	<i>Multi-lineage differentiating stress enduring cell</i> de conejo
MUSE Humano	<i>Multi-lineage differentiating stress enduring cell</i> de Humano
AC16	Cardiomiocitos ventriculares humanos
SkM	<i>Skeletal muscle cells</i> de conejo
Vero	<i>línea epitelial de riñón de mono</i>
MIA PaCa-2	<i>línea celular de cáncer de páncreas humano</i>
BHK21	<i>línea de células de riñón de hámster bebé</i>

Tabla 3. Cepas bacterianas y líneas celulares utilizadas y sus características generales

Plásmidos y virus recombinantes:

Nombre	Características	Origen
Plásmidos		
pFastBac-Dual	Plásmido utilizado para generar b́acmidos recombinantes mediante el sistema <i>Bac to Bac</i> .	Invitrogen
pFastBac-CMV-GFP	Expresa el gen gfp en células de insecto bajo el promotor de poliedrina, y en células de mamífero bajo el promotor de CMV. Precursor del virus AcCMV-GFP	Este trabajo
pFastBac-CMV-BFP	Expresa el gen bfp en células de insecto bajo el promotor de poliedrina, y en células de mamífero bajo el promotor de CMV. Precursor del virus AcCMV-BFP	Este trabajo
pFastBac-CMV-mCherry	Expresa el gen mCherry en células de insecto bajo el promotor de poliedrina, y en células de mamífero bajo el promotor de CMV. Precursor del virus AcCMV-mCherry	Este trabajo
pGMT-IE1 p/qPCR	Contiene clonado el gen de ie-1 de AcMNPV. Plásmido calibrador para qPCR	Este trabajo

pFastBacProm.Ie1/GFP	Expresa el gen <i>gfp</i> en células de insecto bajo el promotor <i>ie-1</i> . Precursor del virus AcProm.Ie-1/GFP	Este trabajo
pFastBacProm.Gp64/GFP	Expresa el gen <i>gfp</i> en células de insecto bajo el promotor <i>gp64</i> . Precursor del virus AcProm.Gp64/GFP	Este trabajo
pFastBacProm.Ie1/VSVG	Expresa el gen <i>vsv-g</i> en células de insecto bajo el promotor <i>ie1</i> y <i>gfp</i> en células de mamífero bajo el promotor CMV. Precursor del virus AcProm.Ie-1/VSVG	Este trabajo
pFastBacProm.Gp64/VSVG	Expresa el gen <i>vsv-g</i> en células de insecto bajo el promotor <i>gp64</i> y <i>gfp</i> en células de mamífero bajo el promotor CMV. Precursor del virus AcProm.gp64/VSVG	Este trabajo
pFastBacP10/VSVG	Expresa el gen <i>vsv-g</i> en células de insecto bajo el promotor <i>p10</i> y <i>gfp</i> en células de mamífero bajo el promotor de poliedrina. Precursor del virus AcProm.p10/VSVG	Este trabajo
pFastBac-Tbx20	Expresa el gen <i>Tbx20</i> en células de mamífero bajo el promotor de CMV. Precursor del virus Precursor del virus BV.Tbx20	GenUniversal
pFastBac-mHif1-alpha	Expresa el gen <i>mHif1-a</i> en células de mamífero bajo el promotor de CMV. Precursor del virus BV.mHif1-a	GenUniversal
pFastBac-Meis	Expresa el gen <i>meis1</i> en células de mamífero bajo el promotor de CMV. Precursor del virus BV.Meis	GenUniversal
pFastBac-shRNA-A	Expresa un shRNA anti <i>meis1</i> en células de mamífero bajo el promotor de <i>pu6</i> . Precursor del virus BV.shRNA-A	GenUniversal
pFastBac-shRNA-B	Expresa un shRNA anti <i>meis1</i> en células de mamífero bajo el promotor de <i>pu6</i> . Precursor del virus BV.shRNA-B	GenUniversal
pUC57-1A	Contiene un sitio <i>telRL</i> junto a un sitio <i>LoxP66</i>	GenUniversal
pUC57-1B	Contiene un sitio <i>telRL</i> junto a un sitio <i>LoxP71</i> Y el ORF de <i>iTelomerasa</i>	GenUniversal

pUC57-2	Contiene el gen de BFP y de iCre bajo un promotor dual de CMV regulado por la secuencia Tet(O)	GenUniversal
pUC57-3	Contiene el ORF del represor tet (TetR) unido a una secuencia IRES	GenUniversal
pCRISPER-S12	Contiene el origen de replicación del virus Epstein-barr (Ebna1 +OriP)	Addgene
pFastBac-iCre-Inducible	Expresa Cre y BFP en células de mamífero bajo el promotor de CMV de manera inducible por deoxiciclina. Precursor del virus	Este trabajo
pUC57-MCMS	Contiene un MCS flanqueado por las regiones telRL generadoras de ministrings y por las regiones LoxP66/loxP71 generadoras de minicírculo	Este trabajo
pFastBac-MCMS-GFP	Contiene el gen de gfp bajo el promotor de CMV flanqueado por las regiones telRL generadoras de ministrings y por las regiones LoxP66/loxP71 generadoras de minicírculo	Este trabajo
pFastBac-MCMS-GFP-ORI	Contiene el gen de gfp bajo el promotor de CMV y el origen de replicación del virus Epstein-barr flanqueado por las regiones telRL generadoras de ministrings y por las regiones LoxP66/loxP71 generadoras de minicírculo	Este trabajo
pFastBac-CMV-iCre	Contiene el gen de iCre bajo el promotor de CMV	Este trabajo
pFastBac-CMV-iTelomerasa	Contiene el gen de iTelomerasa bajo el promotor de CMV	Este trabajo
Virus recombinantes		
AcNull	Virus derivado del báculo AcMNPV	Pre-existente
AcCMV-GFP	Expresa el gen gfp en células de insecto bajo el promotor de poliedrina, y en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo
AcCMV-BFP	Expresa el gen bfp en células de insecto bajo el promotor de poliedrina, y en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo
AcCMV-mCherry	Expresa el gen mCherry en células de insecto bajo el	Este trabajo

	promotor de poliedrina, y en células de mamífero bajo el promotor de CMV	
AcProm.Ie1/GFP	Expresa el gen gfp en células de insecto bajo el promotor ie-1	Pre-existente
AcProm.Gp64/GFP	Expresa el gen gfp en células de insecto bajo el promotor gp64	Este trabajo
AcProm.P10/GFP	Expresa el gen gfp en células de insecto bajo el promotor p10	Este trabajo
AcProm.Ie1/VSVG	Expresa el gen vsv-g en células de insecto bajo el promotor ie1 y gfp en células de mamífero bajo el promotor CMV	Este trabajo
AcProm.Gp64/VSVG	Expresa el gen vsv-g en células de insecto bajo el promotor gp64 y gfp en células de mamífero bajo el promotor CMV	Este trabajo
AcProm.P10/VSVG	Expresa el gen vsv-g en células de insecto bajo el promotor p10 y gfp en células de mamífero bajo el promotor de poliedrina	Este trabajo
BV.Tbx20	Expresa el gen Tbx20 en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo
BV.mHif1-a	Expresa el gen mHif1-a en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo
BV.Meis	Expresa el gen meis1 en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo
BV.shRNA-A	Expresa un shRNA anti meis1 en células de mamífero bajo el promotor de pu6	Este trabajo
BV.shRNA-B	Expresa un shRNA anti meis1 en células de mamífero bajo el promotor de pu6	Este trabajo
BV.iCre-Inducible	Expresa Cre y BFP en células de mamífero bajo el promotor de CMV de manera inducible por doxiciclina	Este trabajo
AcMCMS-GFP	Contiene el gen de gfp bajo el promotor de CMV flanqueado por las regiones telRL generadoras de ministrings y por las regiones LoxP66/loxP71 generadoras de minicírculo	Este trabajo
AcMCMS-GFP-ORI	Contiene el gen de gfp bajo el promotor de CMV y el origen de replicación del virus Epstein-barr flanqueado por las	Este trabajo

	regiones telRL generadoras de ministrings y por las regiones LoxP66/loxP71 generadoras de minicírculo	
AcCMV-iCre	Expresa el gen iCre en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo
AcCMV-iTelomerasa	Expresa el gen iTelomerasa en células de mamífero bajo el promotor de CMV	Este trabajo

Tabla 4. Plásmidos y virus recombinantes generados y sus características generales

Primers utilizados en las reacciones de PCR y secuenciación:

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Sitio de restricción
FwAcMNPV.IE1	CAACCAAGTGACTATGACGC	-
RvAcMNPV.IE1	CAACGTCGCCAACTCCCATTG	-
Fw.qPCR-IE1	ACCATCGCCCAGTTCTGCTTATC	-
Rv.qPCR-IE1	GCTTCCGTTTAGTTCCAGTTGCC	-
RvVSVG	GATATC -TGATTTGAGTTACTTTCC	EcoRV
FwVSVG	GGATCC -GACACTATGAAGTGCC	BamHI
Fw.pIE1	CTCGAG -TTGCACAACACTATTAT	XhoI
Rv.pIE1	GGATCC -AGTCACTTGTTGTTTCC	BamHI
Fw.pGP64	GGATCC -CTTGCTTGTGTGTTCCCTTATTG	BamHI
Rv. pGP64	CTCGAG -GATGACCACCTCCAG	XhoI
FwCMV	CCTATTGGCGTTACTATGGG	-
FwBSTXI-mCHERRY	CCACAA -CCATGGTGAGCAAGGG	BstXI
RvSpeI-mCHERRY	ACTAGT -CTACTTGTACAGCTCG	SpeI
FwCMV-XhoI	CTCGAG -CCTAGTTATTAATAGTAATC	XhoI
RvCMV-BamHI	GGATCC -GATCTGACGGTTCAC	BamHI
Rv.Ebna1-BamHI	GGATCC -CTGTCTGACAGCGACC	BamHI
Fw.ORI Epst-Bar-BamHI	GGATCC -TCAAGAGGGCATTAGC	BamHI
RvHSV.PolyA	TCCTCCGTGTTTCAGTTAGC	-
FwPU6	GAGGGCCTATTTCCCATGATTC	-
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	MacroGen
M13F-pUC	GTTTTCCAGTCACGAC	MacroGen

Tabla 5. *Primers* utilizados y sus secuencias.

Antibióticos e inductores:

Nombre	[Uso]
Ampicilina	100 μ g/mL
Kanamicina	50 μ g/mL
Gentamicina	50 μ g/mL

Deoxiciclina	100 μ g/mL
X-gal	20 μ g/mL
IPTG	1 mM

Tabla 6. Reactivos generales de microbiología utilizados y sus concentraciones

Metodologías específicas

Inmunodetección de VSV-G (Western Blot):

Para la realización de *Western blots* las muestras a analizar se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, **GE Healthcare**) utilizando el equipo *Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell* (**BioRad**). Luego de transferidas, las membranas fueron bloqueadas por incubación ON a 4°C en *buffer* PBS con 5% p/v de leche descremada en polvo. Para la incubación de los anticuerpos primarios (Mouse anti-VSV-G *Antibody* y Mouse anti-GP39 *Antibody*, **Santa Cruz Biotechnology**) se utilizaron diluciones entre 1/500 y 1/1.000 en *buffer* PBS, 1% p/v leche descremada, 0,1 % v/v Tween-20 a 37°C durante 1 hora. Luego, para la incubación del anticuerpo secundario (*Goat anti-mouse* IgG-HRP, **Santa Cruz Biotechnology**) se utilizaron diluciones 1/10.000 en *buffer* PBS 0,1 % Tween-20 a 37°C durante 1 hora. Después de cada incubación con anticuerpo, la membrana fue lavada tres veces con *buffer* PBS 0,1 % Tween durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). El revelado de las placas se realizó en cuarto oscuro utilizando placas radiográficas y el reactivo Bio Lumina (**BioRad**).

Cinética de generación de virus brotantes pseudotipados:

Células Sf9 crecidas en placas de 6 *multi wells* a una confluencia del 70% se infectaron a MOI 5 con los virus AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG, AcProm.P10/VSVG y el virus AcCMV-GFP como control negativo (por triplicado), realizando 4 lavados con 1 mL de PBS luego de terminado el proceso de infección, previo al agregado del medio GRACE's completo (1 mL). Post infección se tomó el sobrenadante de las células cada 6 horas, durante 48 horas. Cada vez que se tomó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con PBS para retirar los virus que pudieran haber quedado, y se les agregó 1 mL de medio GRACE's completo. Los sobrenadantes recuperados se titularon por el método tradicional midiendo su capacidad de formación de focos infectivos ufp/mL.

Cinética temporalidad de los promotores *ie-1*, *gp64* y *p10*:

Células Sf9 crecidas en placas de 6 *multi wells* a una confluencia del 70% se infectaron a MOI 5 con los virus AcProm.Ie1/GFP, AcProm.Gp64/GFP, AcProm.P10/GFP y el virus AcCMV-GFP como control negativo. Post infección las células infectadas se analizaron por microscopia de fluorescencia cada 3 horas, durante 48 horas.

Ensayo de fusogénesis en células Sf9 infectadas con virus pseudotipados:

Células Sf9 crecidas en placas de 6 *multi wells* a una confluencia del 100% se infectaron a MOI 5 con los virus AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG, AcProm.P10/VSVG y el virus AcCMV-GFP como control negativo (por triplicado). A las 72hs post infección, las células se fijaron con formaldehído 4% v/v en PBS y se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La formación de sincicios se analizó por microscopía de fluorescencia (**Cytation 5, Biotek**).

Ensayo de progresión del diámetro de focos virales:

Células Sf9 crecidas en placas de 24 *multi wells* a una confluencia del 70% se infectaron con diluciones de los *stocks* virales de manera que quedara cerca de 1 foco de infección por *well*. Luego de esto, se retiró todo el medio y se agregó 500 μ L de Agarosa *low melting* 3 % p/v líquida mezclada al 50 % con medio GRACE's completo. Una vez gelificada la agarosa, se agregó medio de cultivo completo y se incubaron las células a 25°C. La progresión del tamaño de los focos de infección se siguió por microscopía de fluorescencia cada 24 horas gracias a la expresión de GFP, midiéndose a cada foco de infección el diámetro horizontal y vertical.

Transducción de células de mamífero HEK293T con el virus BV.iCre-Inducible:

Las células fueron sembradas en placas *multi well* mantenidas a 37°C utilizando medio DMEM 10 % v/v SFB inactivado sin antibióticos y antimicóticos en atmósfera húmeda 5% v/v CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Para realizar la transducción con el virus recombinante, las células se lavaron 2 veces con PBS y se les agregó una mezcla de virus concentrado/PBS a una MOI de 100, de manera que quedaran cubiertas con el mínimo volumen de líquido posible. Luego, las células con el virus fueron incubadas a 37°C durante 1 hora, tiempo tras el cual se retiró el PBS con el virus y se les agregó medio DMEM completo con el agregado de doxiciplina 200 ng/mL (concentración final) al grupo de *wells* donde se deseaba inducir la expresión de BFP e iCre. La eficiencia de la transducción y de la inducción se analizó por microscopía de fluorescencia (**Cytation 5, Biotek**) a las 24 post-transducción utilizando los filtros Texas Red (Expresión de mCherry) y DAPI (Expresión de BFP).

qPCR de BV de AcMNPV:

La cuantificación de moléculas de DNA viral se determinó a partir de alícuotas de 5 μ L de los lotes concentrados de virus que se utilizaron para la extracción de DNA, descrito previamente. A partir del DNA, los virus fueron titulados mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos para la secuencia constitutiva del gen *Ie-1*. Para la titulación, se elaboró una curva estándar de 7 puntos (dilución 1/10) con un plásmido conteniendo la secuencia *Ie-1*, siendo su punto máximo de concentración 10⁹ copias. Los *primers* utilizados fueron: **Fw.qPCR-Ie1 y Rv.qPCR-Ie1 (Tabla 5)**. La amplificación de DNA se realizó utilizando el siguiente ciclo térmico: 95 °C durante 30 segundos para un ciclo inicial de desnaturalización, seguido de un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, 5 segundos de *annealing* de *primers* a 63 °C y 10 segundos de extensión a 72 °C; la señal de fluorescencia se monitoreó durante 45 ciclos. Se utilizó el *Kit* master Mix para qPCR (Sybr/ROX) (**Productos Bio-Lógicos**) basado en la detección de fluorescencia emitida por SYBR Green I.

Ensayos *in vivo*:

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía para Cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Publicación No. 85 23, revisado en 1996, <https://doi.org/10.17226/5140>) y aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Favaloro (aprobación #DCT0216-18).

➤ **En conejos**

Conejos *new zeland* de cualquier sexo con un peso aproximado de 4 kg se anestesiaron y se operaron para ser usados como modelo de enfermedad arterial periférica (PAD) (Olea et al., 2009). Brevemente, se realizó una incisión longitudinal en la extremidad trasera izquierda, la arteria femoral profunda fue ligada, y la arteria femoral superficial fue extirpada del origen hasta la bifurcación safeno-poplítea. Finalmente, la herida quirúrgica fue reparada y se administró una sola dosis profiláctica de cefalexina 50 mg/kg por vía intravenosa. Los conejos fueron devueltos al bioterio bajo tratamiento analgésico. Dichos conejos se emplearon en los dos protocolos descrito a continuación:

Después de 7 días, 6 conejos fueron inyectados en sus extremidades isquémicas con 1×10^9 copias totales de AcCMV-GFP distribuidas en 10 inyecciones de 100 μ L o Solución salina con PBS (1 mL total). Los conejos luego fueron sacrificados a los 3 (n = 2), 7 (n = 2) y 15 (n = 2) días. Dos animales adicionales fueron inyectados con PBS y sacrificados a los 3 y 14 días. Muestras de la zona inyectada, retina, cerebro, gónadas y pulmones se recolectaron y congelaron para estudios histológicos y análisis de expresión génica.

Siete días después de la cirugía, 12 animales con PAD fueron separados aleatoriamente en dos grupos: un grupo control y otro tratado. El grupo control (n = 6) recibió 1 mL de PBS que contenía 1×10^9 copias del vector baculoviral desprovisto de gen terapéutico, mientras que el grupo tratado (n = 6) recibió 1 mL de PBS que contenía 1×10^9 copias del vector de baculovirus con el gen terapéutico (mHIF-1a) siguiendo el procedimiento de inyección descrito anteriormente. A los 14 días después del tratamiento, los conejos se sometieron a una angiografía arterial ilíaca interna bajo anestesia general, y se contaron los vasos colaterales por cm^2 . Finalmente, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de propofol, y las muestras del músculo inyectado fueron recolectadas y congeladas para análisis histológicos y de expresión génica.

➤ **En ovejas**

Se utilizaron ovejas macho raza corriedale, de 33 ± 3 kg y de 24 a 36 meses de vida. Los animales ingresaron al Bioterio de la Universidad Favaloro y fueron puestos en cuarentena durante 7 días para su observación clínica y adaptación, desparasitadas con ivermectina y vacunadas contra clostridiosis por el equipo de veterinarios de la institución

Para la preparación quirúrgica y generación del infarto agudo de miocardio (IAM) los animales fueron previamente medicados con maleato de acepromacina intramuscular (0,3 mg/kg). La anestesia fue inducida con propofol intravenoso 3mg/kg, y el mantenimiento con isoflurano al

2% en oxígeno con ventilación mecánica. Se practicó asépticamente una toracotomía izquierda en el 5^{to} espacio intercostal bajo monitoreo electrocardiográfico y oximétrico (**515 A Pulse Oximeter, Novamatrix Medical Systems**). Una vez expuesto el corazón, se inspeccionó visualmente la anatomía coronaria, y se ligaron ramas diagonales de la arteria descendente anterior para producir un infarto anterolateral de aproximadamente el 10-15% de la masa ventricular izquierda. Para reducir la incidencia de arritmias ventriculares, se administró lidocaína (tres inyecciones en bolo de 2 mg cada una y una infusión de 2 mg/Kg/h) y amiodarona (infusión de 150 mg en 2 hs).

Treinta minutos después de la ligadura, las ovejas se aleatorizaron para recibir 10 inyecciones intramiocárdicas de 0,2 mL utilizando una aguja de 25 G en la zona del borde del infarto. La dosis total fue de 1×10^{10} copias del vector baculoviral conteniendo el gen terapéutico Tbx20 (grupo Tbx20, n=12) o el virus control sin gen terapéutico (grupo Null, n=12). Después de cada inyección, se efectuó una compresión local suave para asegurar la hemostasia del sitio de punción. Después del tratamiento, se cerró la toracotomía por planos y se retiró el tubo endotraqueal. Se administró cefalotina 1 g por vía intravenosa y las ovejas volvieron al bioterio bajo tratamiento analgésico (0,3 mg/kg de nalbufina, por vía subcutánea). Es importante destacar que, en cada procedimiento, los/as investigadores/as involucrados/as estuvieron cegados en cuanto a la pertenencia de grupo experimental de cada animal hasta el final del análisis de datos. Estos animales fueron analizados siguiendo dos protocolos distintos: un protocolo de efecto a 7 días del tratamiento (n=12) para detección del transgén, evaluación de la expresión génica y de la densidad microvascular; y un protocolo de efectos a 30 días (n=12), donde además de los estudios anteriores, se evaluó el tamaño de infarto y la función ventricular.

A siete (n=6 por grupo) o treinta (n=6 por grupo) días después del IAM, las ovejas se sacrificaron mediante inyección intravenosa de sobredosis de propofol seguida de cloruro de potasio para detener el corazón en diástole. Se extrajo el corazón, se removieron las aurículas y la pared libre del ventrículo derecho y se abrió el ventrículo izquierdo (VI) a lo largo del surco septal posterior. Se fotografió el aspecto endocárdico y se cuantificó el tamaño del infarto por morfometría, y se expresó como porcentaje respecto al área total del VI (**Image-Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, EE.UU.**). Además, se extrajeron muestras de tejido de la zona peri infarto inyectada, de la zona distal al infarto, y también muestras de órganos remotos (pulmón, retina, hígado, bazo, riñón y gónadas) para poder realizar el correspondiente estudio de bioseguridad. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina (para estudios histológicos por inmunohistoquímica) y otras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C (para estudios de biología molecular).

En los animales del protocolo de seguimiento de 30 días, se realizaron ecocardiografías (**Sonos 5500, Hewlett-Packard, EE.UU.**) para evaluar la función ventricular, antes de la cirugía y a los 3, 15 y 30 días posteriores al tratamiento. Los estudios se realizaron bajo una ligera sedación (diazepam 10 mg vía intravenosa) con el animal acostado en decúbito lateral derecho.

Resultados A: Herramientas útiles

Con el fin de comenzar a evaluar el uso de BV del baculovirus AcMNPV en aplicaciones de terapia génica, se generaron una serie de viriones recombinantes con genes reporteros y pruebas conceptuales para demostrar su capacidad de vehiculizar genes al núcleo de células de mamíferos, para iniciar allí la expresión de los factores de interés. En esta primera instancia, era necesario contar con procedimientos de producción y concentración de viriones recombinantes, como así también de metodologías para la titulación viral, la transducción de células de mamíferos y para la confirmación de las tasas de éxito.

BacMam con genes reporteros

Como primera manipulación, se generaron tres lotes de baculovirus recombinantes diferentes conteniendo cada uno de ellos un gen reportero distinto (para permitir la expresión de las proteínas fluorescentes GFP, BFP, mCherry). En todos los casos, los ORF de estos factores indicadores se los dispuso bajo un doble sistema de promotores: el promotor viral temprano CMV (funcional de manera constitutiva en células de mamífero); y el promotor baculoviral del gen de la poliedrina, para permitir la expresión en el sistema productivo (células Sf9). Para cumplir este objetivo, se utilizó el sistema comercial *Bac to Bac* (**Thermo Fisher**). En el **Anexo I** se describe el proceso de clonado molecular para la generación de los plásmidos derivados de pFastBac-Dual (pFastBac-CMV-GFP, pFastBac-CMV-BFP, pFastBac-CMV-mCherry), a partir de los cuales se generaron los bácmidos recombinantes y, posteriormente, los baculovirus recombinantes (AcCMV-GFP, AcCMV-BFP, AcCMV-mCherry). En la **Figura 11** se muestran células de insecto Sf9 infectadas con dichos virus y células de mamífero HEK293T transducidas con tales lotes virales, previamente concentrados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa, a una MOI (multiplicidades de infección) de 100

Los análisis mediante microscopia de fluorescencia permitieron observar la capacidad de los BV recombinantes generados en expresar correctamente cada gen reportero en las células de insecto (lo cual asistió en el seguimiento de los procesos productivos y en la determinación del título viral), así como en la capacidad de transducir células humanas y expresar allí los genes conceptuales elegidos. Con estos lotes, se realizaron las optimizaciones de los procesos de transducción.

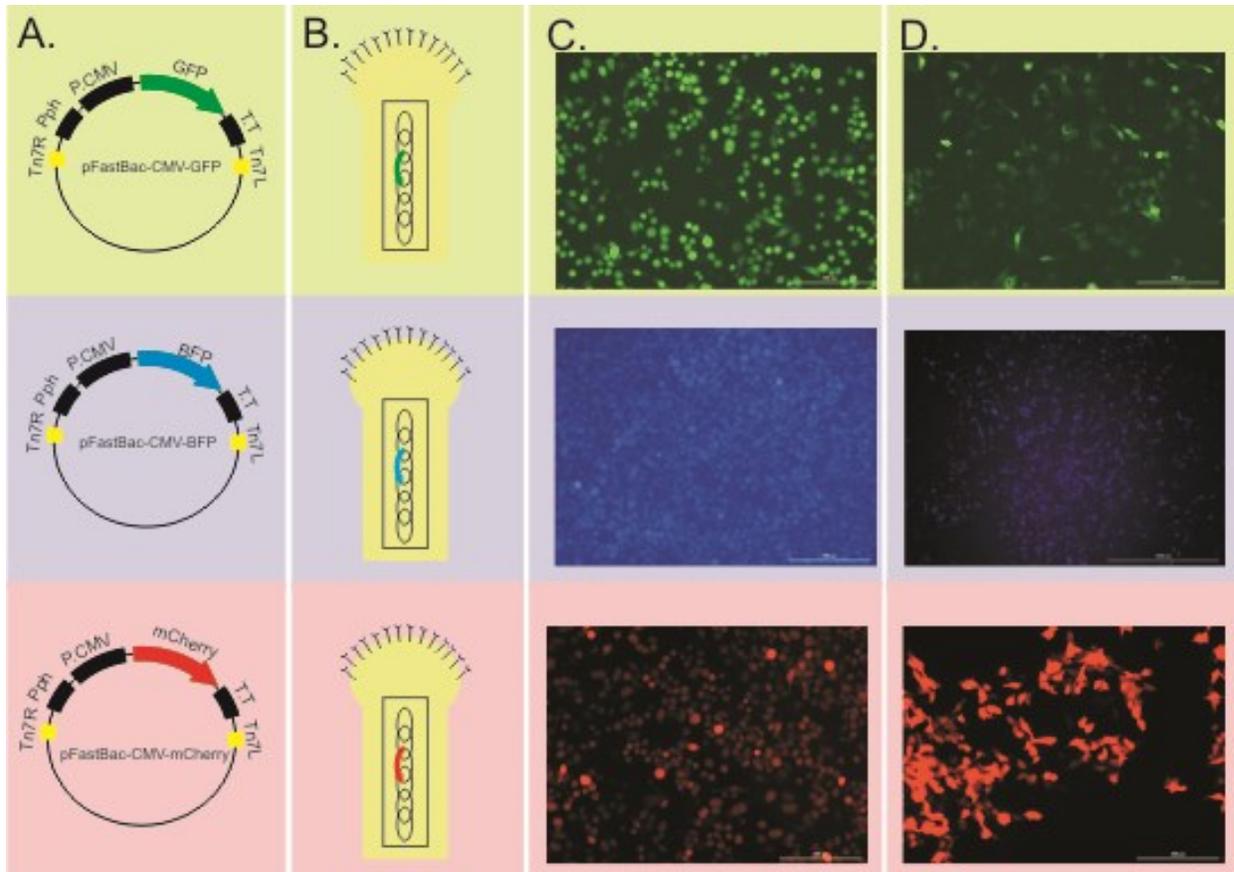


Figura 11. Baculovirus reporteros para análisis conceptuales. (A) Se muestra un esquema general de las tres construcciones genéticas utilizadas para generar los baculovirus recombinantes AcCMV-GFP, AcCMV-BFP, AcCMV-mCherry esquematizados en (B). (C) Se muestran microscopías de fluorescencia de células de insecto Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes. (D) Se muestran microscopías de fluorescencia de células de mamífero HEK 293T transducidas (MOI 100) con los baculovirus recombinantes previamente concentrados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa. Todas las micrografías fueron tomadas con el Cytation 5 (Microscopio de fluorescencia) a 100X.

Determinación de títulos virales por qPCR

Con el objetivo de facilitar la titulación de baculovirus que no portan genes reporteros, como aquellos destinados a la evaluación terapéutica de condiciones patológicas en modelos animales, se adquirieron *primers* para qPCR según Hwei-Ru Lo & Yu-Chan Chao, 2004 (Fw.qPCR-IE1 y Rv.qPCR-IE1; **Tabla 5**). Cabe señalar que estos oligonucleótidos hibridan sobre el gen *ie1* del virus AcMNPV, el cual se encuentra tanto en las variantes silvestres como en las recombinantes. Además, para construir un DNA calibrador, el gen *ie1* (anidando el fragmento que sería amplificado por el par de *primers* para la qPCR) se amplificó mediante PCR *end point* utilizando los *primers* FwAcMNPV.IE1 y RvAcMNPV.IE1 (**Tabla 5**) y se clonó en un vector comercial, generándose la construcción pGMT-IE1 p/qPCR (**Tabla 4; Anexo I**). En la **Figura 12** se muestra una reacción de PCR *end point* utilizando los *primers* para qPCR sobre una curva de calibración empleando concentraciones diferenciales del

plásmido pGMT-IE1 p/qPCR como molde. En tanto, en la **Figura 13** se observa la curva de calibración en función del ciclo umbral (Ct) realizada con el mismo plásmido, pero por qPCR.

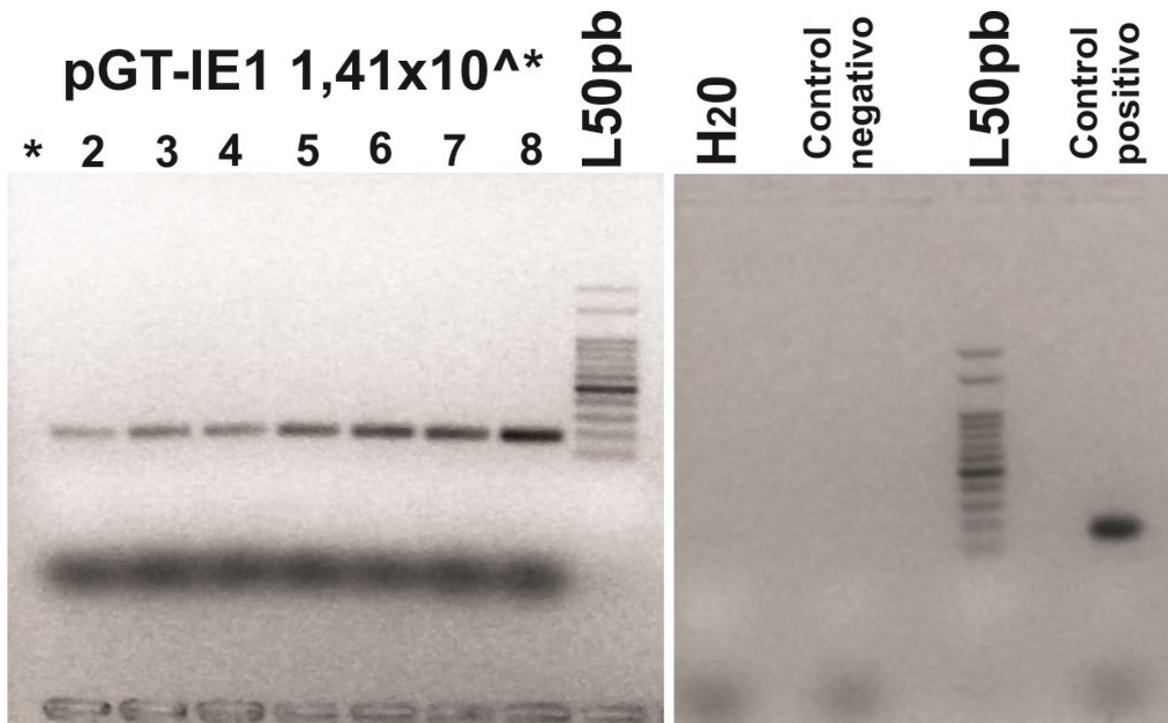


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 2% p/v de una reacción de PCR *end point* realizada con los primers Fw.qPCR-IE1 y Rv.qPCR-IE1. (Izquierda) Se muestra una curva de calibración generada a partir de diluciones seriadas del plásmido pGMT-IE1 p/qPCR; se observa una banda de amplificación de unos 89 pb acorde al fragmento esperado. **(Derecha)** Se muestran los controles de dicha reacción, habiéndose utilizado como molde negativo un plásmido control carente de la secuencia blanco, y como control positivo, genoma del bácmido de AcCMV-GFP.

La PCR *end point* arrojó resultados adecuados en un rango de concentraciones de molde amplio, sin mostrar oligómeros de primers ni productos inespecíficos, ambas condiciones importantes para ensayos de qPCR basados en SybrGreen.

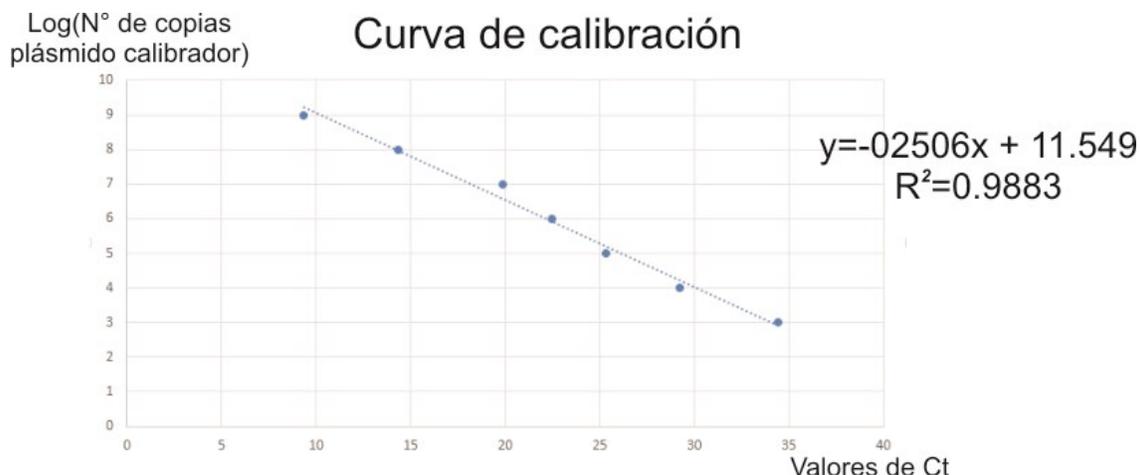


Figura 13. Curva de calibración para qPCR realizada con el plásmido pGMT-IE1 p/qPCR. Se muestran los valores de Ct obtenidos en función de la concentración del plásmido calibrador empleado como molde de reacción en una PCR en tiempo real con SyBrGreen. Además, se muestra la ecuación de la recta obtenida.

Considerando lo anterior, lotes del virus AcCMV-GFP (concentrados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa) fueron titulados tanto por el método tradicional de conteo de focos virales en placa de cultivo celular (ufp, por unidades formadoras de placa), como por el método de qPCR antes descrito, y se compararon los resultados obtenidos. Luego, se calculó una relación entre ambos [$R = \text{Título qPCR} / \text{Título placa (ufp)}$] dado que los procedimientos empleados miden partículas bajo conceptos diferentes (**Tabla 7**). Dicho factor R se utilizó para la transformación (de moléculas de DNA/mL a ufp/mL) de los títulos de aquellos virus utilizados en ensayos de transducción *in vitro* e *in vivo* con variantes recombinantes que no expresan genes reporteros.

Stock Viral	Título placa (ufp/mL)	Título qPCR (moléculas/mL)	Título qPCR/Título placa (moléculas DNA/ufp)
1	$2,4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{11}$	50,00
2	$2,4 \times 10^8$	$6,0 \times 10^9$	25,00
3	$2,4 \times 10^7$	$7,7 \times 10^8$	32,00
4	$2,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	7,90
5	$2,4 \times 10^8$	$4,1 \times 10^9$	17,00
6	$1,5 \times 10^9$	$3,9 \times 10^{10}$	26,00
7	$3,4 \times 10^9$	$4,4 \times 10^{10}$	13,00
8	$1,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$	36,00
9	$1,0 \times 10^8$	$5,4 \times 10^9$	54,00
10	$5,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	41,07
11	$5,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^7$	64,29
12	$5,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^6$	50,00
13	$5,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	19,64
14	$7,0 \times 10^7$	$3,3 \times 10^9$	47,14
15	$6,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^9$	40,94
16	$3,6 \times 10^7$	$8,6 \times 10^8$	24,00

		R Promedio	34,25
		Desviación estándar	16,28

Tabla 7. Titulación de lotes virales por qPCR y titulación en placa. Se muestran los valores de titulación de lotes virales obtenidos por el método tradicional de conteo de focos en placa vs los obtenidos por qPCR sobre el gen baculoviral *ie-1*. Se muestra el cálculo del valor de R para cada *stock* viral el promedio de los R obtenidos y la desviación estándar del R promedio.

Gracias a disponer del método de cuantificación de BV por qPCR, se puso a punto un procedimiento de producción de lotes baculovirales en monocapas de células Sf9, para estandarizar la adquisición de los IA que se emplearan en pruebas *in vitro* e *in vivo*. Así, se optimizó un proceso de producción basado en la infección de células Sf9 en *flasks* de cultivo de 175 cm² a MOI 0,1 a una densidad celular del 80-90 %. Recolectándose los sobrenadantes del cultivo a los 4 días post infección y clarificándolos por centrifugación a 500g durante 10 min. 150 mL de sobrenadante clarificado se concentró por ultracentrifugación en colchón de sacarosa y el *pellet* obtenido conteniendo los BV se resuspendió en 1 mL de PBS pH 7,4, obteniéndose de esta manera títulos de entre 1x10⁹-1x10¹⁰ pfu/ml.

Transducción de células de mamíferos In vitro

Una vez ajustados los procedimientos productivos y de cuantificación de los baculovirus, se transdujeron distintas líneas celulares de mamíferos y cultivos primarios utilizando distintas MOI de lotes de BV recombinantes que expresan genes reporteros (trabajos realizados en colaboración con el *Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería -IMETTYB-*, Universidad Favaloro-CONICET).

En las **Figuras 14 y 15** se resumen los resultados obtenidos por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo, para su interpretación cualitativa y cuantitativa. En el **Anexo III** se muestran los datos de citometría de flujo con las imágenes de microscopia de fluorescencia correspondiente a las células transducidas en cada medición. Estos ensayos mostraron que a partir de una MOI de 200 ya no se podían observar mejoras significativas en la población de células transducidas y, sin importar la estirpe celular ensayada (incluyendo a los cultivos primarios considerados), se lograron exitosamente fracciones celulares positivas para el transgén de entre un 50% y un 80% de la población total de células impactadas.

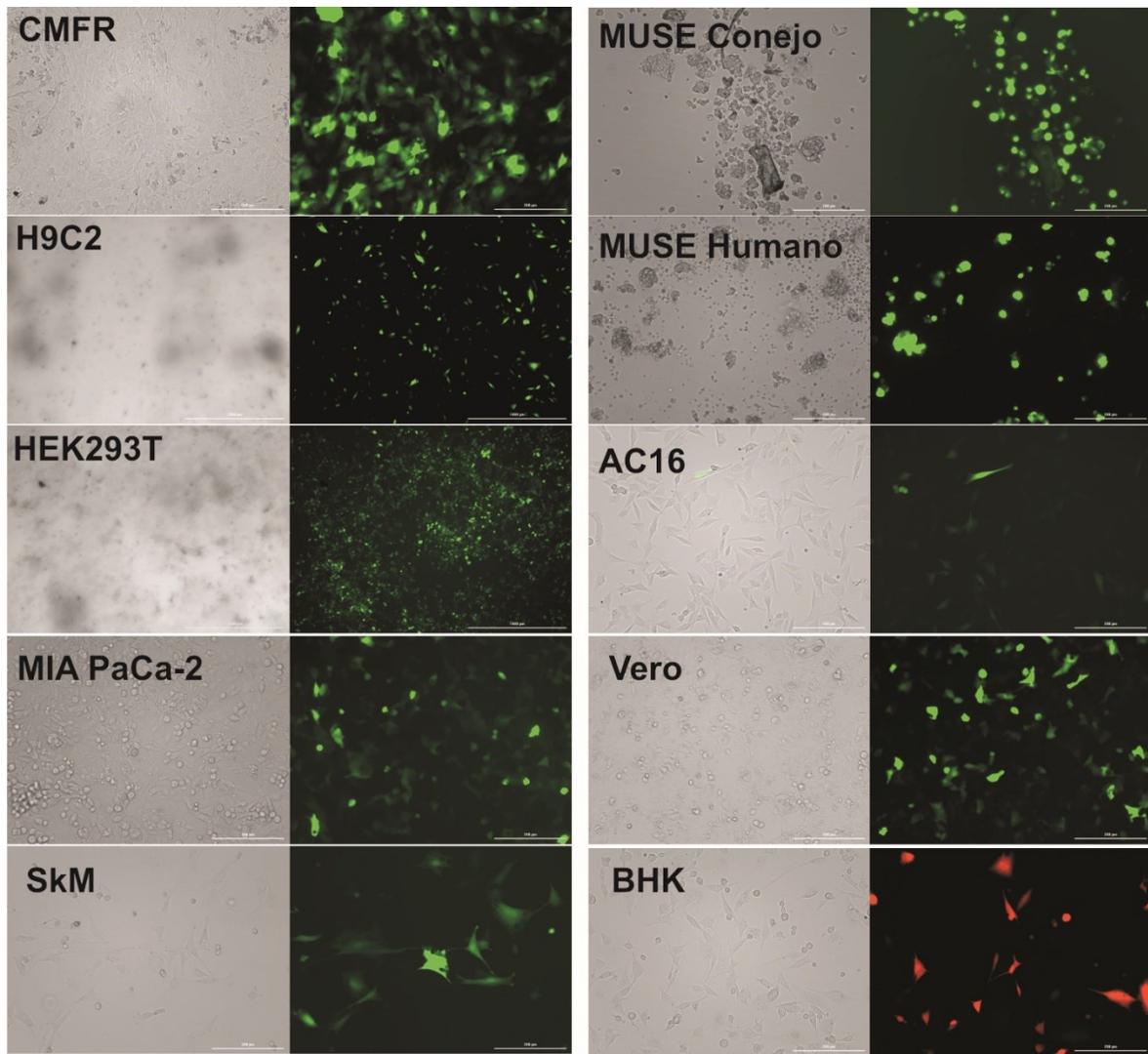


Figura 14. Transducción de distintas células con baculovirus reporteros. Diferentes líneas celulares y cultivos primarios de mamíferos fueron expuestas con baculovirus recombinantes que expresan GFP o mCherry. CMFR: Cardiomiocitos de rata neonatal; H9C2: Mioblastos de rata; HEK293T: Línea celular de riñón humano; MUSE Conejo (cultivo primario): Multi-lineage differentiating stress enduring cell; MUSE Humano (cultivo primario): Multi-lineage differentiating stress enduring cell; AC16: Cardiomiocitos ventriculares humanos; MIA PaCa-2: línea celular de cáncer de páncreas humano; Vero: línea epitelial de riñón de mono; SkM: *Skeletal muscle cells* de conejo; BHK21 (Transducidas con AcCMV-mCherry): línea de células de riñón de hámster bebé. Las fotografías fueron tomadas con Cytation 5 a 100X (HEK293T y H9C2, 25X). Todas las transducciones fueron realizadas a MOI 100.

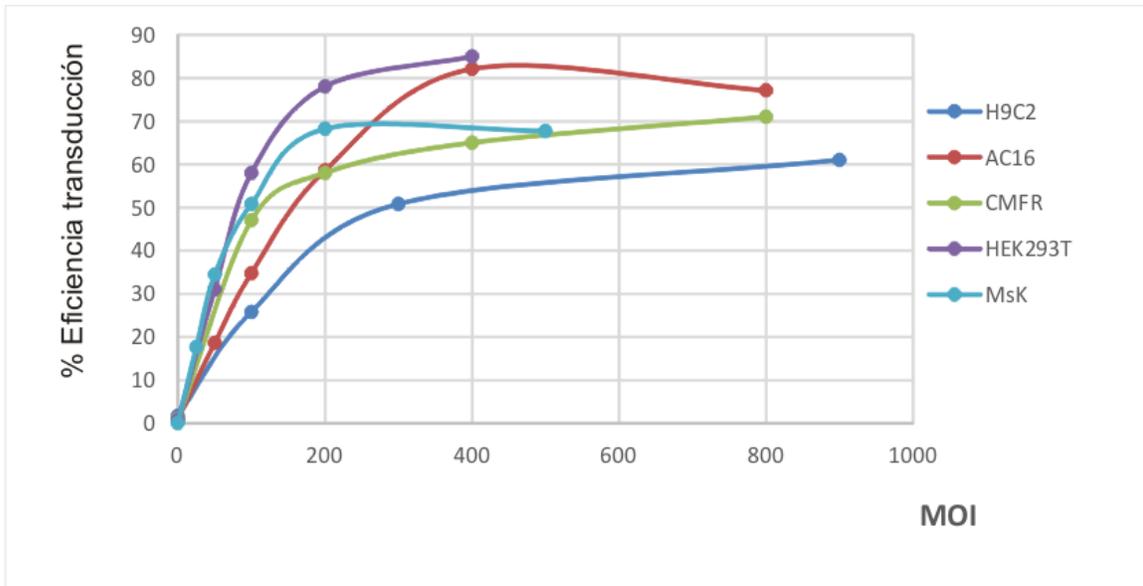


Figura 15. Eficiencias de transducción en función de la MOI. Diferentes líneas celulares y cultivos primarios de mamíferos fueron expuestas con baculovirus recombinantes que expresan GFP (AcCMV-GFP) a diferentes MOI (multiplicidades de infección) y analizadas luego mediante citometría de flujo. CMFR: Cardiomiocitos de rata neonatal; H9C2: Mioblastos de rata; HEK293T: Línea celular de riñón humano; MUSE Conejo (cultivo primario): *Multi-lineage differentiating stress enduring cell*; MUSE Humano (cultivo primario): *Multi-lineage differentiating stress enduring cell*; AC16: Cardiomiocitos ventriculares humanos; MsK (cultivo primario): *Skeletal muscle cells* de conejo.

Estos resultados fueron considerados exitosos y compatibles con los reportes bibliográficos previos, permitiendo sentar las bases para la producción y evaluación de IA específicos para diferentes condiciones patológicas empleando modelos animales.

Resultados B (BacMam con genes terapéuticos)

Una vez que se lograron optimizar procedimientos *in house* para la generación, producción, titulación y evaluación *in vitro* de lotes de BV baculovirales recombinantes, se procedió a ensayar diferentes IA en modelos animales vertebrados. En particular, se avanzó con enfermedades cardiovasculares (enfermedad arterial periférica e infarto agudo de miocardio) en modelos de ovejas y conejos dada nuestra colaboración con el IMETTYB.

Generación de virus recombinantes portadores de genes terapéuticos

Los cardiomiocitos adultos suelen estar en un estado de quiescencia, por lo que cualquier daño isquémico puede derivar en muerte celular y, en consecuencia, en una cicatrización que compromete la función cardíaca posterior. El control del ciclo celular de los cardiomiocitos puede constituirse entonces en una clave para un posible tratamiento, por ejemplo, de infartos agudos de miocardio (IAM). En tal sentido, la inhibición de factores que bloquean el ciclo celular, o la sobre expresión de factores prometóticos podrían colaborar en la regeneración del tejido cardíaco. Bajo tales conceptos, nuestro grupo de investigación y el IMETTYB detectaron genes candidatos como blancos terapéuticos para el desarrollo de terapias génicas para el IAM, a través de un análisis de transcriptómica diferencial por RNAseq en corazones ovinos de diferentes niveles de desarrollo fetal y adultos (**Locatelli et al, 2020**). Este estudio, más una exhaustiva revisión bibliográfica (**Locatelli et al, 2019**), posibilitaron seleccionar blancos para abordarlos con viriones recombinantes portadores de genes terapéuticos adecuados.

Así, se diseñaron una serie de vectores conteniendo distintos genes terapéuticos bajo el promotor CMV (ya evaluado exitosamente con las proteínas reporteras GFP, BFP y mCherry), y otros conteniendo *sets* de expresión de shRNA (*Short hairpin* RNA) bajo promotores de RNA polimerasa III, para hacer silenciamiento génico (**Tabla 8**). Dichas secuencias fueron sintetizadas y clonadas en el plásmido pFastBac-Dual por la empresa Gene Universal (China), dando lugar a los plásmidos pFastBac-TbX20, pFastBac-mHif1-a, pFastBac-Meis, pFastBac-shRNA-A, pFastBac-shRNA-B. A partir de estas construcciones se generaron virus recombinantes mediante el sistema *Bac to Bac* (**Thermo Fisher**). En el **Anexo I** se adjuntan las secuencias diseñadas y el proceso de generación de los virus recombinantes.

Virus	Gen terapéutico	Acción del gen terapéutico
BV.Tbx20	Tbx20 (T-Box 20 Transcription Factor) bajo promotor CMV	interactúa con Nkx2.5 y Gata4, así como con genes reguladores positivos del ciclo celular y, a su vez, reprime los inhibidores del ciclo celular, lo que lleva a la proliferación y diferenciación celular
BV.mHif1-a	mHif1-Alpha (Variante mutante de la subunidad alpha del factor inducible por hipoxia 1 resistente a oxígeno) bajo promotor CMV	Factor de transcripción capaz de inducir la expresión de más de 60 genes implicados en la angiogénesis y arteriogénesis
BV.Meis	Gen humano Meis1 bajo promotor CMV	MEIS1 es un factor de transcripción que juega un papel importante en el desarrollo de varios órganos, incluidos los sistemas nerviosos central y periférico.
BV.shRNA-A	shRNA anti Meis1	Silenciamiento de Meis1
BV.shRNA-B	shRNA anti Meis1	Silenciamiento de Meis1
BV.Null	--	Control negativo para ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>

Tabla 8. Resumen de los baculovirus recombinantes generados para ser usados en ensayos de terapia génica para el tratamiento del infarto agudo de miocardio.

Los virus mencionados se genotipificaron mediante PCR (**Figura 16**), y se produjeron en las cantidades necesarias siguiendo los procedimientos optimizados con los baculovirus reporteros antes generados, para realizar ensayos *in vitro* e *in vivo*, los cuales continúan en la actualidad. Cada lote viral se concentró por ultracentrifugación en colchón de sacarosa y se tituló mediante la qPCR que detecta el gen *ie-1*.

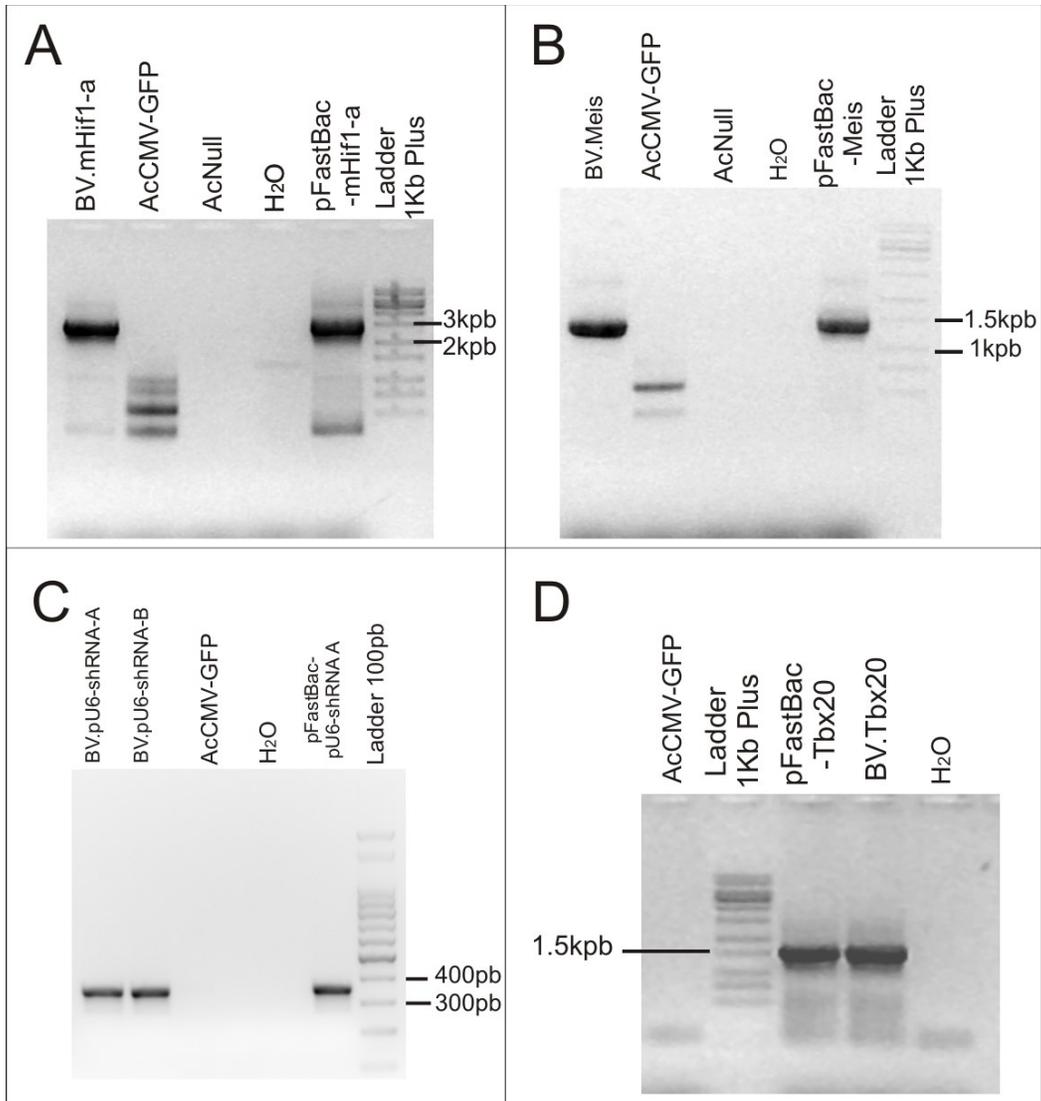


Figura 16. Genotipificación de los virus recombinantes portadores de genes terapéuticos. (A) PCR sobre el virus BV.mHif1-a con los *primers* **FwCMV** y **RvHSV.PolyA**. Amplificación esperada: 2620 pb. **(B)** PCR sobre el virus BV.Meis con los *primers* **FwCMV** y **RvHSV.PolyA**. Amplificación esperada: 1312 pb. **(C)** PCR sobre los virus BV.pU6-shRNA-A y BV.pU6-shRNA-B con los *primers* **FwPU6** y **RvHSV.PolyA**. Amplificación esperada: 345 pb. **(D)** PCR sobre el virus BV.Tbx20 con los *primers* **FwCMV** y **RvHSV.PolyA**. Amplificación esperada: 1506 pb. En todos los casos, se muestran electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñidas con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV.

Terapia génica para regeneración cardíaca en modelo ovino

Se realizaron ensayos *in vitro* en cardiomiocitos de rata neonatal e *in vivo* en un modelo de IAM en ovejas, utilizando el virus AcCMV-GFP y el virus BV.Tbx20 (un IA de los antes generados). Los resultados se encuentran en proceso de publicación: "Effect of intramyocardial administration of baculovirus encoding the transcription factor Tbx20 in sheep with experimental acute myocardial infarction", **Bauza et al 2023 (En revisión)**, y algunos de ellos se resumen en la **Figura 17**.

En particular, se midió la proliferación celular y la angiogénesis *in vitro* en cardiomiocitos transducidos con BV.Tbx20 o BV.Null a los 2 y 5 días pos-tratamiento. Posteriormente, en ovejas con IAM, se inyectaron 10^{10} copias de BV.Tbx20 o BV.Null por vía intramiocárdica en el borde del infarto. Se midieron la proliferación celular, la angioarteriogénesis, la función del ventrículo izquierdo y el tamaño del infarto a los 7 y 30 días después del tratamiento. Estos ensayos mostraron que BV.Tbx20 aumentó la proliferación celular, la expresión de genes angiogénicos y reguladores del ciclo celular y la tubulogénesis en comparación con BvNull. A los 7 días posteriores al tratamiento, las ovejas tratadas con BV.Tbx20 mostraron: a) un aumento en la expresión del transgén Tbx20, genes promitóticos y angiogénicos; b) una disminución en los niveles de P21 (inhibidor de ciclo celular); c) un aumento en Ki67 y fosfo-histona H3 (PHH3)/mm² (biomarcadores de células mitóticas); d) un aumento de la densidad capilar y arteriolar.

A los 30 días posteriores al tratamiento, el grupo con BV.Tbx20 disminuyó el tamaño del infarto y mejoró la función del ventrículo izquierdo. Además, no se observaron secuelas ni respuestas inmunes evidentes del tratamiento con los BV recombinantes en las ovejas. Por otra parte, no se detectó DNA baculoviral en los tejidos no intervenidos de los animales que participaron del ensayo. Cabe señalar que actualmente se están llevando a cabo procedimientos similares a los empleados con el IA BV.Tbx20, pero con los IA BV.Meis, BV.shRNA-A y BV.shRNA-B.

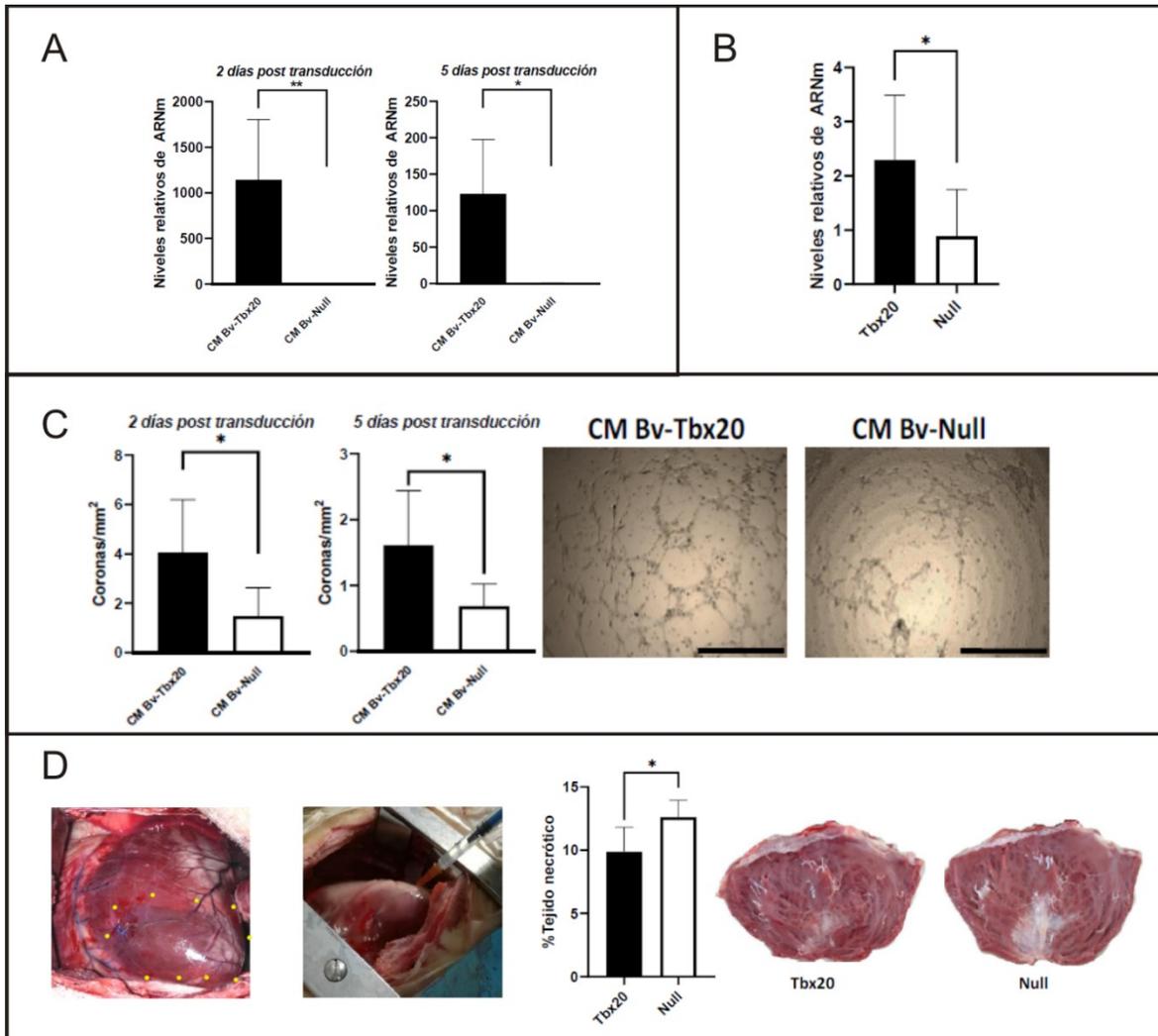


Figura 17. Ovejas con IAM tratadas con terapia génica baculoviral. (A) Expresión relativa del transgén Tbx20 en cardiomiocitos transducidos con BV.Tbx20 y BV.Null a 2 y 5 días post transducción. **(B)** Detección del transgén Tbx20 humano en tejido ovino inyectado a los 7 días post tratamiento. **(C)** Ensayo de inducción de angiogénesis *in vitro*. **(D)** Izquierda: fotografías representativas de la inducción del infarto agudo de miocardio experimental, donde los puntos de color amarillo representan los lugares de inyección del vector baculoviral, y procedimiento de la inyección intramiocárdica en las zonas peri-IAM. Derecha: porcentaje de tejido necrótico a 30 días post-IAM; imágenes representativas de ventrículos izquierdos infartados desde la cara endocárdica de cada grupo. Los * representan diferencias significativas. **Imágenes tomadas de Bauza et al, 2023.**

Terapia génica para enfermedad arterial periférica en conejos

Por otra parte, se analizó otra terapia génica con vector baculoviral basada en el BV. mHif1-a. Esta vez, se eligió la enfermedad arterial periférica y a los conejos como modelo animal. Esta patología es una afección circulatoria prevalente en los seres humanos, en la que el estrechamiento o bloqueo de los vasos sanguíneos reduce la irrigación sanguínea en los miembros, pudiendo derivar en amputaciones. Su desarrollo suele ser a causa de la acumulación de depósitos de grasa y calcio en las paredes de las arterias (aterosclerosis), y los factores de riesgo son la edad, la diabetes y el tabaquismo. Las intervenciones terapéuticas buscan, por ejemplo, revascularizar el miembro afectado para corregir los problemas de irrigación deficiente. Por ello, la proteína Hif1-Alpha (subunidad alfa del factor inducible por hipoxia) es una candidata adecuada para procedimientos experimentales de terapia génica, debido a que es un factor de transcripción capaz de inducir la expresión de más de 60 genes implicados en la angiogénesis y arteriogénesis ante un proceso isquémico. En particular, el IMETTYB en colaboración con la Universidad de Stanford (EE. UU.) han desarrollado una variante mutante (mHif1-Alpha), la cual es resistente al oxígeno y, por ende, posee una vida media superior a la *wild type* (Hnatiuk et al, 2016).

En base a lo anterior, se realizaron ensayos *in vitro* en cultivos primarios de células de mioblastos esqueléticos (SkM) de conejo, e *in vivo* en un modelo de enfermedad arterial periférica (EAP) en conejos, utilizando el virus AcCMV-GFP y el virus BV.mHif1-a como IA de una terapia génica. Los resultados han dando lugar a una publicación (*Effect of intramuscular baculovirus encoding mutant hypoxia-inducible factor 1-alpha on neovasculogenesis and ischemic muscle protection in rabbits with peripheral arterial disease*, Gimenez et al, 2020) donde se mostró que la aplicación del virus BV.mHIF-1a indujo neovascularización y daño isquémico reducido en conejos con EAP, como se resume en la **Figura 18**.

Además, utilizando el virus AcCMV-GFP se realizó un perfil de bioseguridad en los conejos a los 14 días posteriores al tratamiento (**Figura 18**). Estos estudios permitieron mostrar que la duración de la expresión de los genes transducidos decae a los 14 días post-inyección, y que el vector viral en los órganos periféricos no es detectable.

En síntesis, los procedimientos de terapia génica con vector baculoviral que han sido ensayados en modelos animales con enfermedades cardiovasculares (ovejas con IAM y conejos con EAP), nos han permitido verificar que los BV de AcMNPV (producidos y formulados en acuerdo con los procedimientos optimizados por este trabajo de tesis), demostraron ser vehículos seguros y eficaces para los fines deseados. Como desventaja observada, la cual está en acuerdo con la bibliografía, se determinó que la ventana temporal de expresión de los transgenes no supera las dos semanas luego de la inoculación. Esto podría ser un limitante y, por ende, es interesante diseñar alternativas que permitan extender la duración del tratamiento sin la necesidad de una redosificación. En tanto, mejorar la capacidad de transducción de los BV en células de mamífero mediante estrategias de pseudotipificación, podría derivar en el uso de cantidades menores de viriones a ser administrados, aliviando en consecuencia cuestiones productivas y potenciales aspectos inmunológicos en el organismo destino.

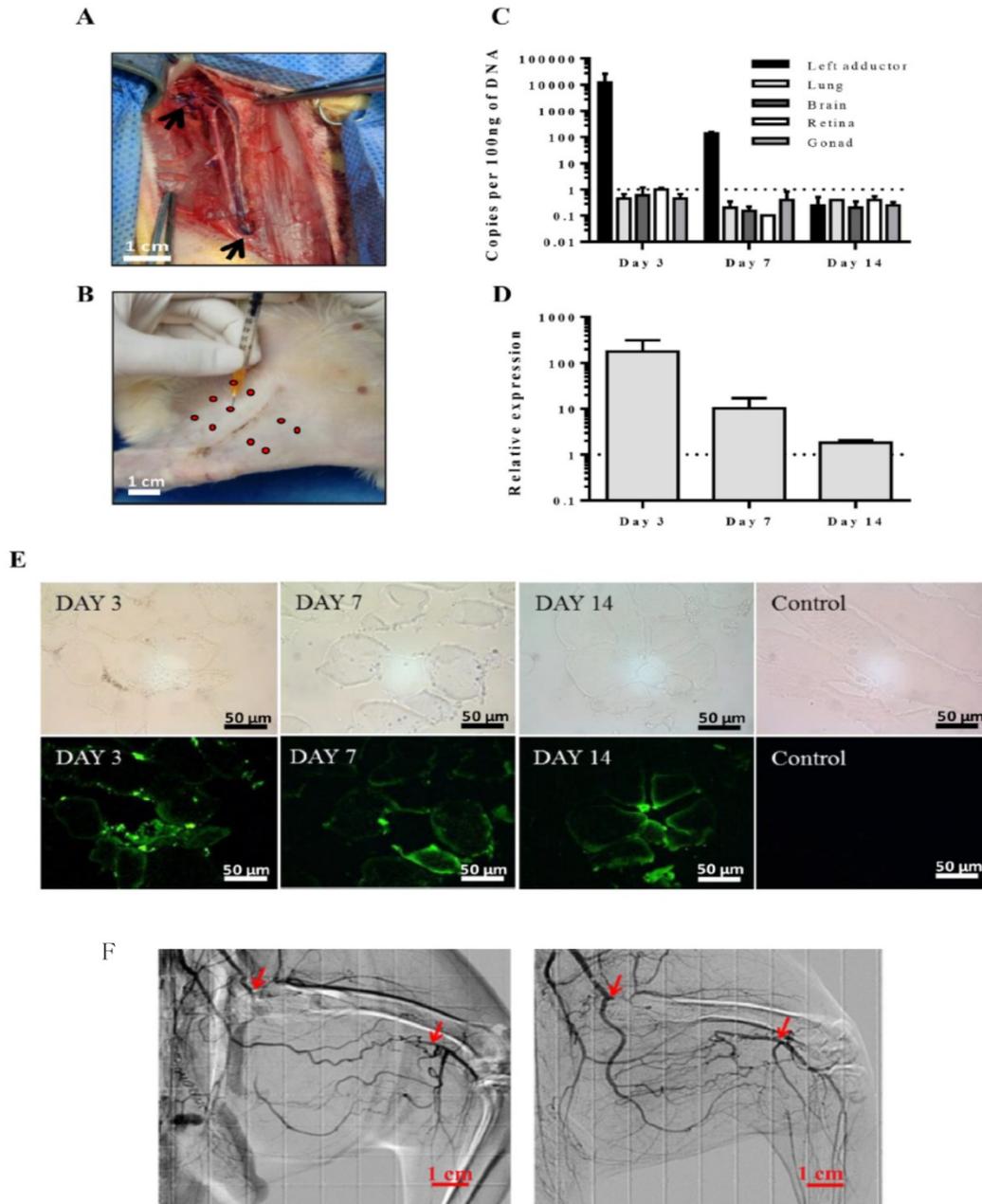


Figura 18. Detección y expresión de baculovirus en conejos modelo para enfermedad arterial periférica. (A) Disección de la arteria femoral. La flecha negra superior indica el origen de la arteria femoral superficial. La flecha negra inferior indica la arteria femoral inmediatamente proximal a su bifurcación en las arterias safena y poplítea. **(B)** Sitios de inyección. **(C)** Gen viral ie-1 y detección por qPCR en aductor izquierdo (inyectado) y tejidos remotos (pulmón, cerebro, retina y gónadas) a los 3, 7 y 14 días post-inyección. La línea punteada indica el límite inferior del rango de detección del equipo utilizado. **(D)** Niveles relativos de mRNA de GFP con respecto a animales inyectados con PBS (línea de puntos). **(E)** Imágenes representativas del aductor isquémico en Microscopía óptica (fila superior) y de fluorescencia (fila inferior). Se observó fluorescencia verde de la proteína GFP en las fibras musculares. **(F)** Imágenes angiográficas representativas de arteriolas y capilares de los grupos control (BV.Null, Izquierda) y tratados (BV.mHif-1a, Derecha). Las flechas rojas en los angiogramas indican los sitios proximal y distal de la arteria femoral extirpada quirúrgicamente. Imágenes tomadas de Giménez et al., 2020.

Resultados C (BacMam con mayor poder de transducción)

En las secciones previas se describieron los resultados vinculados con las optimizaciones llevadas a cabo para la generación, producción en células de insecto, y validación conceptual de baculovirus recombinantes (formulaciones ultraconcentradas de BV que expresan proteínas reporteras), así como el desarrollo y pruebas de eficacia preclínicas en modelo animal (ovejas y conejos) de dos IA de terapia génica para las patologías IAM (gen que expresa Tbx20 humano) y EAP (gen que expresa una versión mutada de HIF-1alpha humano) basadas en tecnología BacMam.

Dado que el número de vectores virales a ser administrados en un paciente puede implicar riesgo inmunológico, las mejoras en el poder de transducción de viriones ingenierizados es un objetivo de mejora perseguido. En tal sentido, en este apartado se detallan los ensayos y resultados destinados a la pseudotipificación de las partículas BV con VSV-G, dado que si ya lograron ser eficaces en su versión silvestre (empleando la proteína baculoviral GP64 para el ingreso en las células de mamíferos), podrían superar su performance con la nueva proteína fusogénica en evaluación.

Generación de baculovirus recombinantes

La generación de viriones de baculovirus con una proteína estructural heteróloga requiere de su expresión en el contexto de una infección en células susceptibles de insectos. En el caso particular de los baculovirus, los cuales poseen dos morfotipos de virión (BV y ODV; estos últimos dentro de OB), resulta clave evaluar en qué momento de la cascada regulatoria viral resulta conveniente la producción de la proteína en cuestión. Como se introdujo oportunamente, existen genes baculovirales inmediatamente tempranos, tardíos, y muy tardíos, cuya expresión está asociada a la producción de cada morfotipo viral, siendo primero producidos los BV, y luego los OB. En consecuencia, la elección del promotor viral que dirija la generación de una nueva proteína estructural de membrana (en este caso, la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, o VSV-G) resulta en un desafío clave para favorecer que la mayoría del lote de viriones producido exponga el pseudotipo deseado.

Bajo el marco anterior, y con el fin de conocer en primer término la temporalidad de expresión diferencial de tres promotores del baculovirus AcMNPV, se produjeron lotes de BV recombinantes que expresan GFP bajo los promotores de los genes virales *ie-1* (inmediatamente temprano), *gp64* (temprano/tardío) y *p10* (muy tardío), activos en células de insecto en condiciones de infección con baculovirus, confrontándose también la expresión diferencial con la producción de BV. Bajo estas secuencias, por otra parte, se produjeron luego BV recombinantes que expresan a VSV-G (versión completa) bajo los tres promotores en evaluación, además de la proteína GFP bajo

el promotor viral temprano de Citomegalovirus, o pCMV, para su evaluación conceptual en células de mamífero (**Figura 19**). En el **Anexo I** se describen todos los clonados moleculares realizados para generar dichas construcciones y virus.

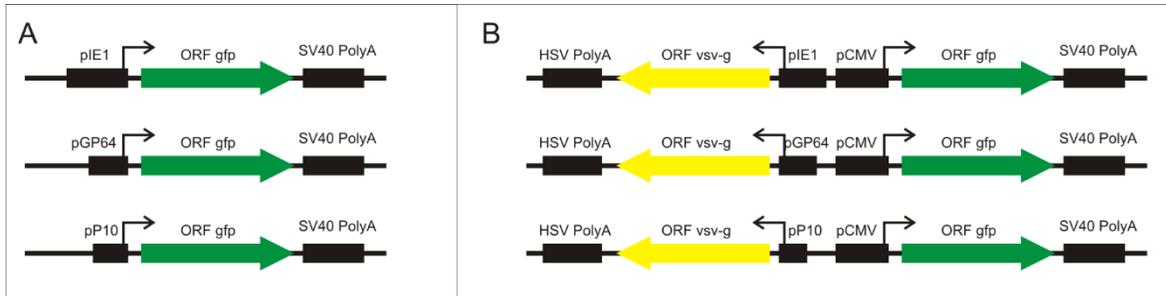


Figura 19. Esquemas de las secuencias genéticas presentes en los virus pseudotipados. (A) Corresponde a los virus que expresan la proteína GFP bajo los promotores virales *ie1* (inmediatamente temprano), *gp64* (temprano/tardío) y *p10* (muy tardío). **(B)** Corresponde a los virus que expresan la proteína VSV-G bajo los promotores virales *ie1*, *gp64* y *p10* y a la proteína GFP bajo el promotor CMV.

Los baculovirus AcMNPV recombinantes que expresan GFP bajo el control de los promotores virales de *ie1* y *gp64* fueron construidos en este trabajo, mientras que el correspondiente al promotor *p10* había sido elaborado previamente en el laboratorio. Las construcciones “donoras” utilizadas para generar estos virus recombinantes se denominaron pFastBac-Prom.*ie1*/GFP, pFastBac-Prom.*Gp64*/GFP (**Tabla 4**), mientras que los virus resultantes se nombraron AcProm.*ie1*/GFP, AcProm.*Gp64*/GFP y AcProm.*P10*/GFP (**Tabla 4**), en función del promotor correspondiente. En la **Figura 20**, se muestran microscopías de fluorescencia correspondientes a la línea celular Sf9, a las 24 horas de ser infectadas con los BV recombinantes. El tiempo elegido, coincidente con momentos muy tardíos de un ciclo infectivo, posibilita la acumulación de proteínas heterólogas (en este caso, GFP) sin importar su temporalidad de expresión. Esto permitió evidenciar la integridad y funcionamiento de los promotores virales seleccionados.

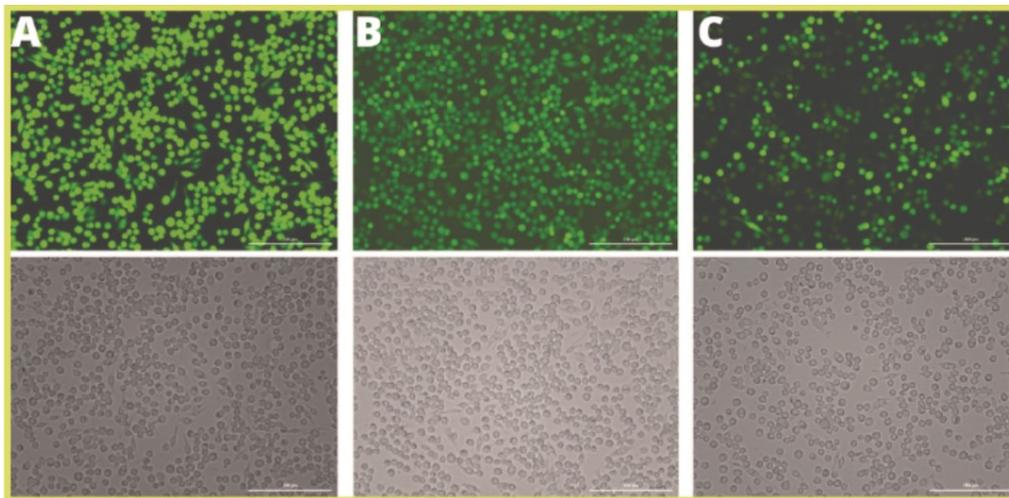


Figura 20. Células Sf9 infectadas con BV recombinantes productores de GFP con temporalidad diferencial. Monocapas de células Sf9 fueron infectadas a MOI 5 con los BV recombinantes. Las imágenes superiores exponen la emisión de fluorescencia verde a las 24 hs, correspondiente a la proteína reportera GFP, expresada por los promotores baculovirales en estudio. Todas las micrografías fueron tomadas con el Cytation 5 (10X): **(A)** corresponde al virus AcProm.ie1/GFP; **(B)** corresponde al virus AcProm.GP64/GFP; **(C)** corresponde al virus AcProm.P10/GFP.

Confirmado entonces que los promotores baculovirales elegidos fueron funcionales durante un ciclo de infección en células de insecto (quedando pendiente su evaluación temporal, lo que es descrito más adelante en esta misma sección), se construyeron los BV recombinantes que expresan la proteína VSV-G bajo el control de los promotores virales de *ie1*, *gp64* y *p10*, además de portar un gen reportero para células de mamíferos (expresión de GFP dirigida por el promotor CMV) según lo descrito en **Anexo I**. Las construcciones “donoras” que posteriormente dieron origen a los bácmidos se denominaron pFastBac-Prom.ie1/VSVG, pFastBac-Prom.Gp64/VSVG y pFastBac-P10/VSVG (**Tabla 4**), mientras que los virus resultantes se nombraron como AcProm.ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG (**Tabla 4**), en función del promotor correspondiente.

En la **Figura 21**, se muestran las microscopías de fluorescencia correspondientes a la línea celular Sf9, a las 48 horas de ser infectadas con los BV recombinantes potencialmente pseudotipados. Como puede observarse, las células infectadas presentaron fluorescencia verde, lo que no era esperado ya que el promotor CMV es muy poco funcional en células Sf9, con picos posibles de expresión en tiempos muy tardíos de infección, cercanos a las 72 horas (**Li et al., 2014**). Sin embargo, al contener las células muchas copias del gen debido a la MOI empleada y a la generación de nuevos genomas virales dentro de ella por los eventos de replicación, es factible suponer que los niveles de expresión de GFP serían suficientes para ser observados bajo el microscopio de fluorescencia. En tal sentido, estos ensayos permitieron confirmar la funcionalidad del gen reportero para su evaluación posterior en mamíferos, quedando aún pendiente ensayar la correcta expresión de VSV-G.

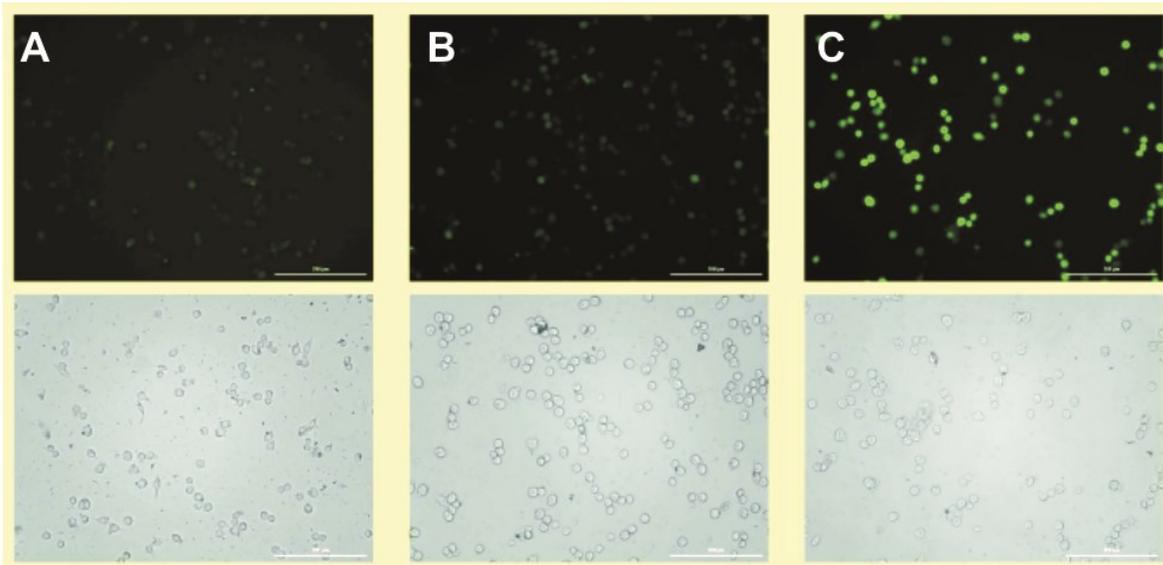


Figura 21. Células Sf9 infectadas con BV recombinantes productores de VSV-G con temporalidad diferencial. Monocapas de células Sf9 fueron infectadas a MOI 5 con los BV recombinantes. Las imágenes superiores exponen la emisión de fluorescencia verde a las 48 hs, correspondiente a la proteína reportera GFP, expresada bajo el promotor temprano de CMV. Todas las micrografías fueron tomadas con el Cytation 5 (10X): **(A)** corresponde al virus AcProm.Ie1/VSVG; **(B)** corresponde al virus AcProm.Gp64/VSVG; **(C)** corresponde al virus AcProm.P10/VSVG.

En la **Figura 22** se muestra la genotipificación mediante PCR de los virus generados con VSV-G, utilizando para ello los *primers* **Fw.pIE1**, **Fw.pGP6**, y **RvVSVG** y **FwVSVG** (**Tabla 5**). En todos los casos, se confirmó que los BV recombinantes contienen el transgén de *vsv-g*, sin existir contaminación cruzada entre los distintos lotes virales. Estas pruebas se realizaron con BV ultraconcentrados y listos para su posterior evaluación funcional.

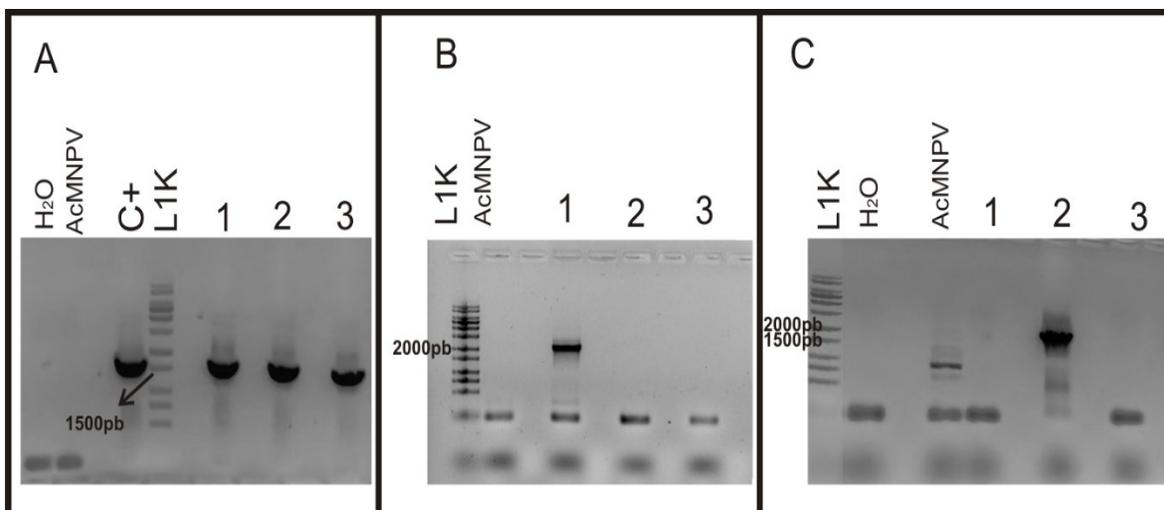


Figura 22. Genotipificación de los virus AcProm.le1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcPromP10/VSVG. (A) PCR para amplificar el ORF del gen de vsv-g utilizando los *primers* RvVSVG y FwVSVG observándose que todos los virus recombinantes amplificaron el fragmento esperado de 1587pb. **(B)** PCR para amplificar el promotor de *ie1* + el ORF vsv-g utilizando los *primers* Fw.pIE1 y RvVSVG, observándose que solo el virus 1 (AcProm.le1/VSVG) amplificó el fragmento esperado de 2223pb. **(C)** PCR para amplificar el promotor gp64 + el ORF vsv-g utilizando los *primers* Fw.pGP64 y RvVSVG, observándose que solo el virus 2 (AcProm.Gp64/VSVG) amplificó el fragmento esperado de 1883pb. En todos los casos, se muestran electroforesis en geles de agarosa 0,8% p/v. L1K: Ladder 1kpb plus (Anexo I); C+: plásmido pFactBac-P10/VSVG; 1: virus AcProm.le1/VSVG; 2: Virus AcProm.Gp64/VSVG, 3: Virus AcPromP10/VSVG.

Cinética de expresión de los promotores baculovirales

Los baculovirus que portaban al ORF de GFP bajo el control de los promotores baculovirales en estudio (*ie-1*, *gp64* y *p10*), denominados AcProm.le1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG (**Tabla 4**), fueron propagados en monocapas de células Sf9, titulados los lotes producidos, y evaluados en la temporalidad de la expresión de la proteína fluorescente verde en células Sf9 a distintos tiempos (3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas) para cubrir un ciclo baculoviral completo. Esta información resultaba relevante para cotejar en qué momento las células de insecto infectadas comenzarían a expresar la proteína VSV-G, y cómo esto podría afectar la producción de BV y su potencial pseudotipificación. En la **Figura 22**, se exponen microscopías de fluorescencia derivadas del ensayo mencionado.

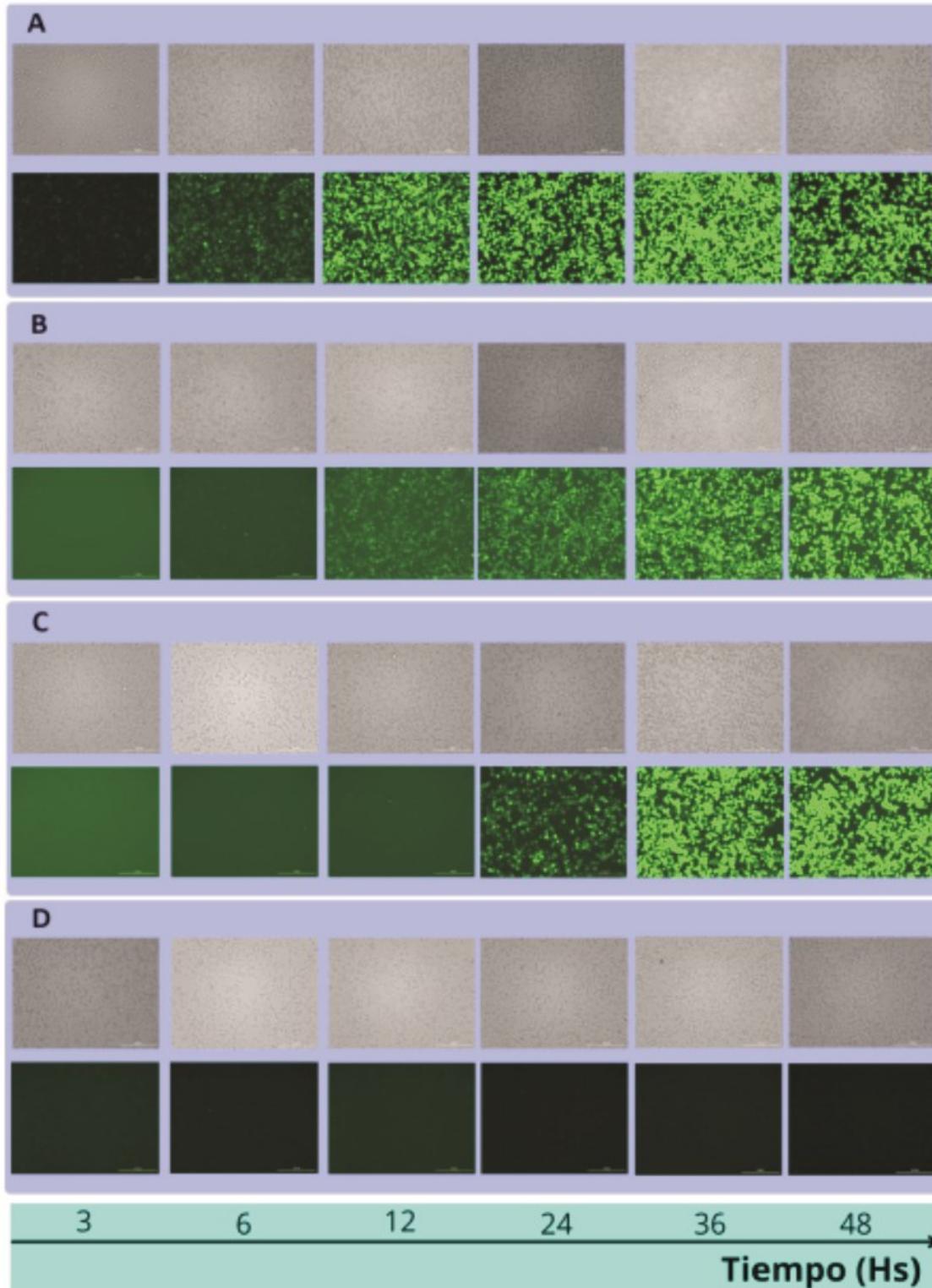


Figura 22. Temporalidad en la expresión de GFP bajo promotores diferenciales en células de insecto. Microscopías de fluorescencia (25X) de células Sf9 a las 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas post-infección. Se emplearon los baculovirus AcProm.Ie1/GFP (A), Ac.Prom.Gp64/GFP (B) y Ac.Prom.P10/GFP (C). A modo de control, se utilizaron células sometidas al protocolo de infección pero, en vez de ser enfrentadas a virus, fueron incubadas en medio GRACE's.

Para el caso del virus AcProm.Ie1/GFP, ya resulta posible observar la aparición de focos de fluorescencia a las 6 horas de infección. La intensidad, así como la cantidad de ésta, aumenta sostenidamente hasta las 36 horas, y decrece hacia las 48 horas. Si bien, como se mencionó anteriormente, el promotor de *ie1* es de temporalidad inmediatamente temprana, la longevidad del transcripto es mucho menor que la de GFP (dado que está sometido a otros controles regulatorios), lo que explicaría la alta intensidad de focos en un estadio tardío de infección. Por otro lado, en lo que respecta al virus AcProm.Gp64/GFP, la aparición de focos se observa a las 12 horas, lo que indicaría una expresión más tardía que la de *ie1*, y más temprana que la de *p10*. La intensidad de la fluorescencia de los focos resultantes de este lote, en comparación con los del AcProm.Ie1/GFP, resulta menor, lo que también permite el análisis cualitativo de la actividad de cada promotor. Por ello, podría inferirse que el promotor de *ie1* presenta una mayor actividad respecto del de *gp64*. Por último, en lo que refiere al virus AcProm.P10/GFP, los focos de fluorescencia comienzan a aparecer recién a las 24 horas, lo cual coincide con la temporalidad del promotor en cuestión, cuya actividad está vinculada principalmente con la infección secundaria, entre las 19 y las 48 horas *post* exposición. El número de focos aumenta hacia las 36 y 48 horas, al igual que la intensidad, y también es posible observar que esta última, en particular, es mayor a la observada para los casos de los otros dos virus. La actividad de los promotores, así como su temporalidad, coinciden con lo evidenciado en experiencias previas, como lo expuesto en **Chen et al., 2014**.

A la par de los ensayos anteriores, se midió en los medios condicionados la producción de BV. Estos análisis arrojaron que a partir de las 12 horas comienzan a emerger las partículas virales de nueva generación al medio de cultivo. En tal sentido, cualquiera de los tres promotores elegidos para dirigir la expresión de VSV-G deberían ser adecuados para pseudotipar a los BV, pero su acumulación diferencial en las membranas celulares podría no ser similar, lo que podría impactar en la capacidad de transducción de estos viriones en células de mamíferos. También, la presencia de VSV-G podría comprometer la disposición de GP64 (proteína fusogénica baculoviral) y, en consecuencia, afectar la producción de viriones pseudotipados. Por ello, se prosiguió con ensayos específicos sobre los lotes virales de AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG (**Tabla 4**).

Determinación de la incorporación de la proteína VSV-G en los BVs pseudotipados

Con el objetivo de determinar si los BV recombinantes AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG contenían la proteína VSV-G, se realizaron ensayos de *western blot* con anticuerpos anti VSV-G (58kDa) y anti VP39 (39KDa) (proteína mayoritaria de la cápside viral) sobre extractos proteicos derivados de los virus previamente purificados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa (**Figura 23**).

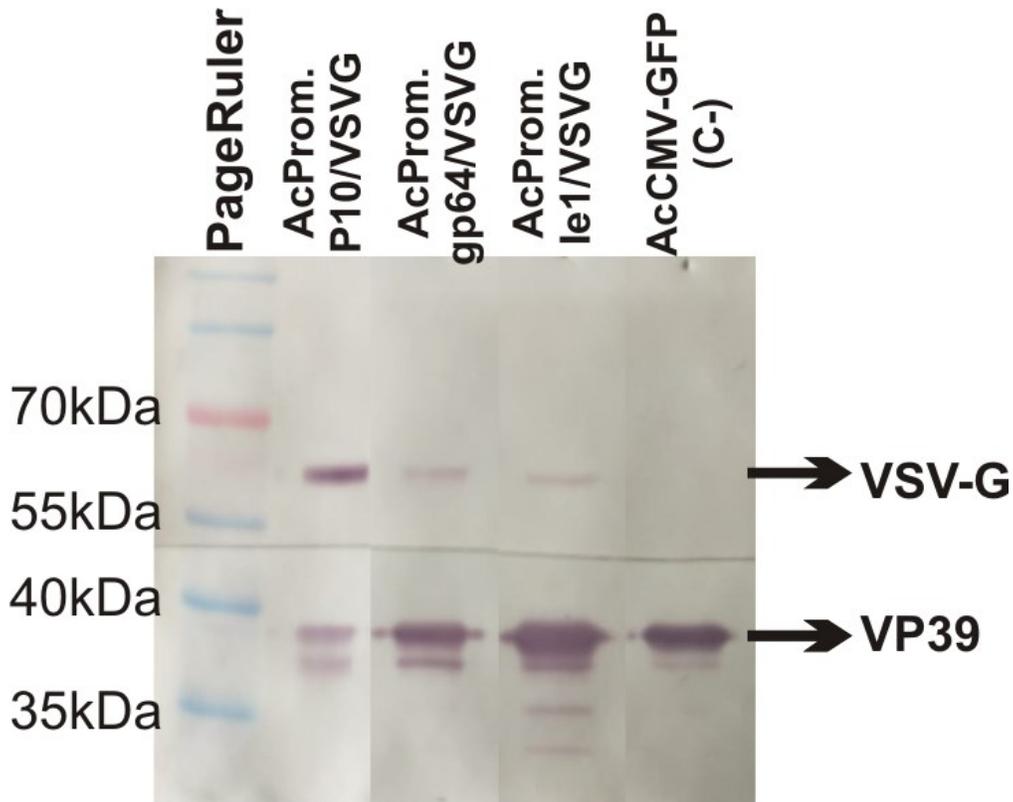


Figura 23. Western Blot con anticuerpos anti VSV-G y anti VP39 de baculovirus recombinantes. Se emplearon los BV AcPromP10/VSVG (calle 2), Ac.Prom.Gp64/VSVG (calle 3) y AcProm.Ie-1/VSVG (calle 4). A modo de control negativo, se utilizó el virus recombinante AcCMV-GFP (calle 5).

Se observa que todos los BV en estudio expresan VSV-G y, como dato más importante, la portan en la estructura del virión, a pesar de haberse empleado la variante silvestre sin modificación alguna. En particular, AcProm.P10/VSVG resultó ser la variante con la mayor cantidad de la proteína en cuestión, seguido por AcProm.gp64/VSVG y, luego, por AcProm.Ie1-1/VSVG. Estos últimos parecen contener a VSV-G en cantidades similares, pero considerablemente menores al resultado de AcProm.P10/VSVG. En consonancia con los estudios realizados con los virus AcProm.Ie1/GFP, AcProm.Gp64/GFP y AcProm.P10/GFP, es posible pensar que la potencia del promotor *p10*, a pesar de comenzar a funcionar en momentos posteriores al inicio de la brotación de viriones, permite producir lotes de BV con mayor carga de pseudotipo que cuando se emplearon los promotores *ie-1* y *gp64*, cuyo comienzo funcional ocurre antes de la liberación de viriones. Sin embargo, resta saber si la presencia de VSV-G compromete la infectividad de los BV en células de insecto, lo cual podría limitar la posible mejora tecnológica en la transducción.

Ensayo de fusogénesis de células infectadas con BVs pseudotipados con VSV-G

Durante el proceso de generación y producción de BV pseudotipados con VSV-G se visualizó la fusión de las células Sf9 infectadas con dichos virus, por lo que se realizó un ensayo para corroborar la formación de sincicios. En la **figura 24** se muestran microscopías de fluorescencia de las células a las 72 horas post infección.

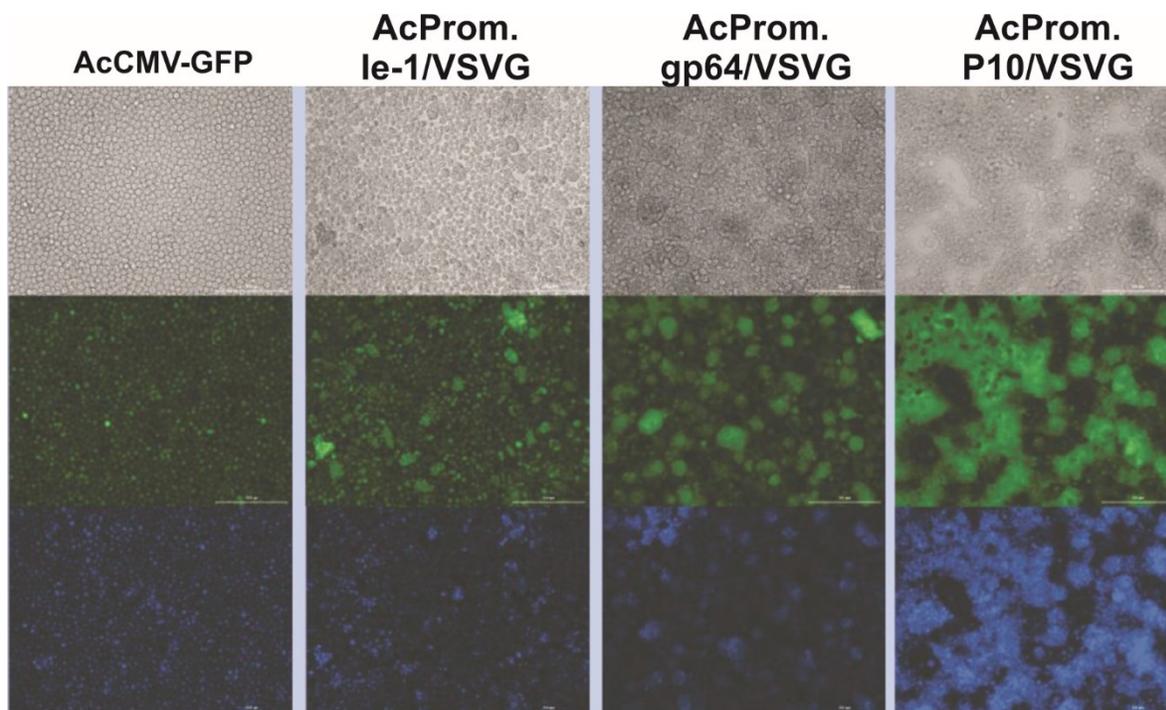


Figura 24. Formación de sincicios en células Sf9 infectadas con BV portadores de VSV-G. Se muestran microscopías de fluorescencia (100X) de células Sf9 a las 72 horas post-infección con los virus recombinantes que expresan la proteína VSV-G. Se emplearon los BV AcPromP10/VSVG, Ac.Prom.Gp64/VSVG y AcProm.Ie1/VSVG. A modo de control negativo, se utilizó el virus recombinante AcCMV-GFP. (**Arriba**) Imagen campo claro; (**Medio**) Imagen con el filtro para GFP; (**Abajo**) Imagen con el filtro DAPI.

Este estudio permitió confirmar que las células infectadas con los virus que expresan la proteína VSV-G tienden a fusionarse entre sí formando sincicios, siendo las células infectadas con AcProm.P10/VSVG las que presentaron mayor formación de estas estructuras, seguidas por las expuestas a AcProm.gp64/VSVG y, en tercer lugar, las infectadas con AcProm.Ie1/VSVG. En tanto, las células infectadas con un virus control (AcCMV-GFP) no generaron fusiones celulares. Este ensayo mostró que la presencia de VSV-G en las membranas (que luego formarán parte de las envolturas de los BV) se encuentra activa en su rol fusogénico, al evidenciarse la formación de células multinucleadas. Por otra parte, este estudio correlacionó con el *western blot*, mostrando que AcProm.P10/VSVG es la variante que expresa en mayor medida a VSV-G.

Ensayo de producción de BV de los virus pseudotipados con VSV-G

Con el objetivo de determinar si la capacidad de producir BV se veía afectada por la expresión de VSV-G durante el ciclo infeccioso en AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG (antes corroborada por *western blot* y presencia de sincicios), se realizaron ensayos para estudiar la cinética de generación de viriones en función del tiempo, comparándolo con AcCMV-GFP, un baculovirus que sólo expresa GP64. En la **Figura 25** se grafican los resultados obtenidos durante las primeras 48 horas post-infección.

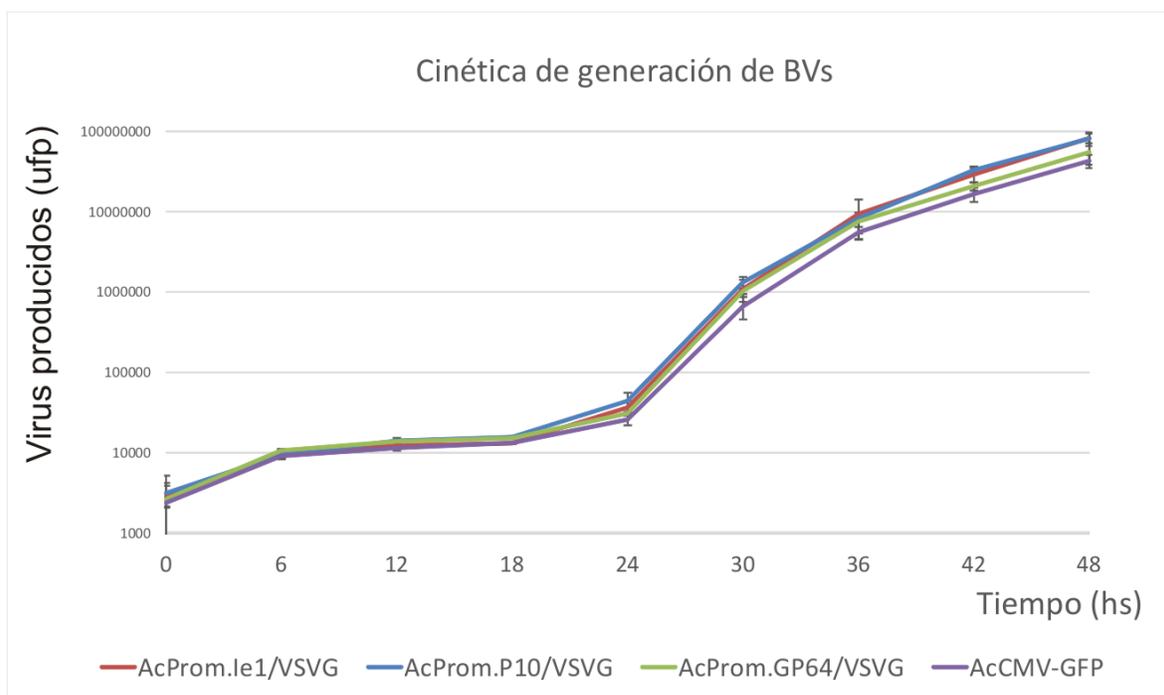


Figura 25. Producción de BV en función del tiempo en baculovirus pseudotipados con VSV-G. El gráfico de líneas muestra la producción acumulada de BV a cada tiempo ensayado (promedio de tres réplicas y desvío estándar). No se observan diferencias significativas. UFP = unidades formadoras de placas totales.

De este modo, pudo observarse que la expresión de la proteína VSV-G no compromete la producción de BV, sin importar el momento del ciclo dónde ésta se expresa y la formación de los sincicios. Por otra parte, este estudio reveló que la mayor productividad de BV ocurre luego de las 24 horas de iniciada la infección, lo cual ayuda a explicar por qué AcProm.P10/VSVG es la variante que porta mayor cantidad de VSV-G en sus viriones producidos, dado que el promotor *p10* es el que presenta mayor actividad en esa parte del ciclo infeccioso.

También, a modo de sumar más evidencias sobre el impacto de la presencia de VSV-G en la productividad de BV, se realizaron ensayos de medición del crecimiento de focos de infección en monocapas de células Sf9 infectadas (**Figura 26**).

Esta nueva evidencia reveló que la infectividad y capacidad de producción de BV no se ve alterada a pesar de estar presente el pseudotipo de VSV-G. En tal sentido, esta ingeniería del vector baculoviral no afecta los procesos productivos y, si logra una mejora en la capacidad de transducción, resultará entonces en una incorporación deseada dentro de las tecnologías BacMam.

Ensayo de capacidad de transducción de los BVs pseudotipados con VSV-G

Finalmente, para determinar si los BV pseudotipados con VSV-G (AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG) poseían una capacidad diferencial de transducir células de mamíferos en comparación con los BV que sólo portan GP64 (que fueron los utilizados en los ensayos preclínicos en modelos animales para IAM y PAD y, que en este caso, se representan con AcCMV-GFP), se realizaron estudios en células HEK 293T, Vero y Mia PaCa-2, los cuales se analizaron por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (**Figura 27**).

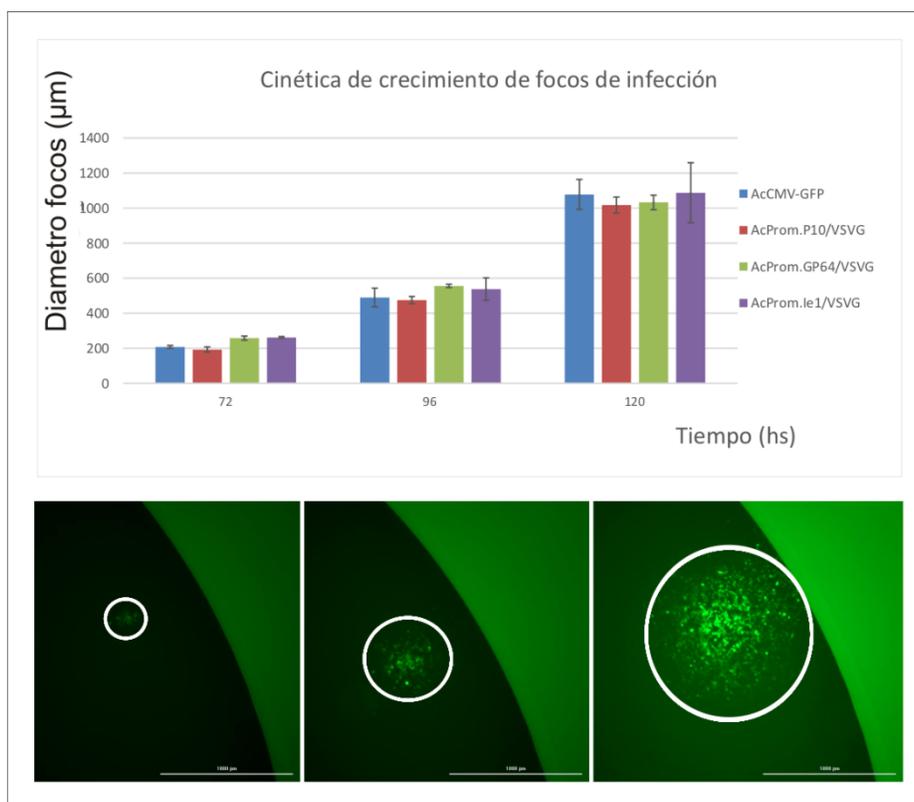


Figura 26. Evolución de focos de infección de BV pseudotipados con VSV-G en monocapa de células. Gráfico de barras mostrando la progresión del aumento en el diámetro de los focos de infección a lo largo del tiempo. Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran la progresión de uno de los focos medidos a manera de ejemplo (Tiempos 72, 96 y 120 horas). Las mediciones (promedios de 5 focos y desvíos estándar) se realizaron considerando el diámetro vertical y el diámetro horizontal de los focos.

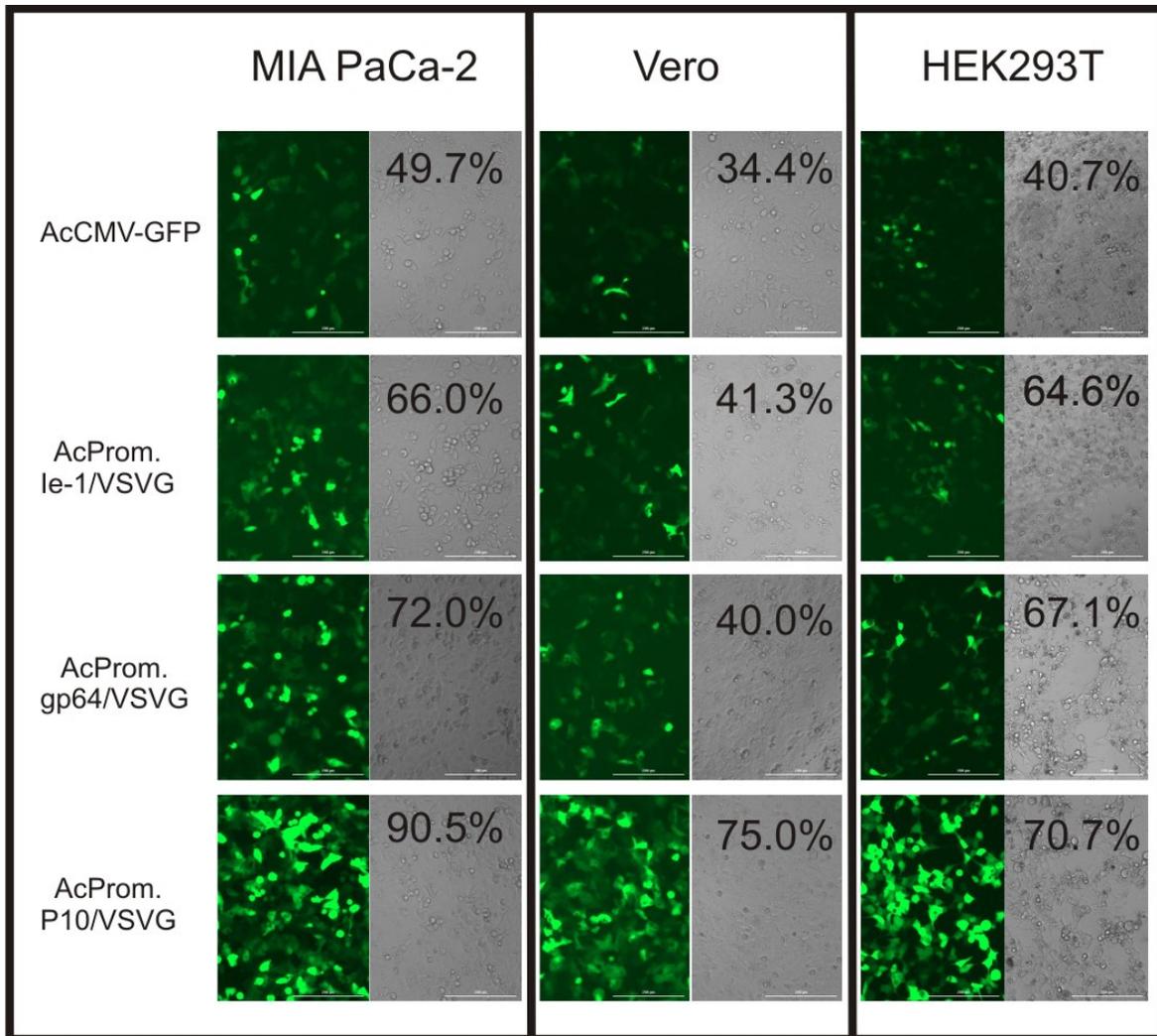


Figura 27. Ensayos de transducción con BV pseudotipados con VSV-G. Microscopías de fluorescencia (100X) de células MIA PaCa-2, Vero y HEK293T a las 24hs post-transducción (MOI 100) con los virus recombinantes pseudotipados con VSV-G (AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG) vs BV silvestre (AcCMV-GFP). En la esquina superior derecha de cada foto se detallan los porcentajes de células que expresan GFP determinado por citometría de flujo.

Los resultados evidenciaron que los virus pseudotipados con VSV-G fueron todos más eficaces en ingresar a las células de mamífero ensayadas que la variante que sólo portaba GP64. En particular, el virus AcProm.P10/VSVG resultó el más exitoso, seguido por las variantes AcProm.gp64/VSVG y AcProm.Ie1/VSVG. Esto podría estar mostrando un aumento en la cantidad de virus que ingresan por célula, como también una posible mejora en la llegada del virus transducido al núcleo celular por una mejor liberación del endosoma. En el **Anexo III** se muestran los resultados de las citometrías de flujo.

En síntesis, la totalidad de los estudios descritos en esta sección demostraron que es posible pseudotipar a los viriones brotados de AcMNPV con VSV-G, sin comprometer su infectividad

en células de insecto (dato clave para no afectar los bioprocesos productivos), y mejorando a su vez el poder transductor en células de mamífero. De manera clara, los viriones que expresan VSV-G en momentos muy tardíos del ciclo baculoviral resultaron ser los más apropiados, por lo que en una futura ingeniería definitiva del vector BacMam debería emplearse esta opción, la cual aproximadamente duplica la eficacia respecto a la versión silvestre. Esto permitirá reducir el número de viriones administrados en el paciente con una consecuente mejora en el perfil inmunológico.

Resultados D (BacMam con efecto terapéutico más duradero)

En acuerdo con los resultados vertidos en este trabajo de tesis, los BV de AcMNPV resultaron exitosos como vectores de terapias génicas en mamíferos, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, mostrando una alta capacidad de transducción de un amplio espectro de tipos de células y una producción sencilla y fácilmente escalable. Por otra parte, se pudo demostrar que los viriones pueden ser pseudotipados con la proteína VSV-G para incrementar su aptitud en el *delivery* de genes de interés. Sin embargo, aún queda la necesidad de buscar estrategias para lograr un incremento en la temporalidad de expresión de los genes vehiculizados, para así lograr un mayor efecto terapéutico para ciertas condiciones patológicas.

En esta sección, se muestran alternativas conducentes a mejorar la duración de la expresión en mamíferos de las secuencias vehiculizadas, con el propósito de ampliar las opciones del uso de las tecnologías BacMam a un mayor porfolio de enfermedades humanas, en las cuales una expresión transitoria de tan corta duración resulta insuficiente para la generación de una mejora sustancial en el paciente.

Diseño de secuencias y clonados moleculares

Se diseñaron varias construcciones genéticas con el objetivo de generar un circuito génico inducible capaz de liberar un minicírculo (cccDNA) o un *ministring* (ccclDNA) dentro de las células de mamífero. Estas moléculas de dsDNA serían más pequeñas que el esqueleto baculoviral íntegro, y podrían contar incluso con secuencias que ayuden a su replicación. De este modo, una vez en el núcleo de las células de mamíferos, podrían estabilizarse en un plazo de tiempo mayor, para así soportar una expresión génica potencialmente más duradera que ayude con la acción terapéutica deseada.

Para la generación del minicírculo se decidió utilizar la tecnología Cre/LoxP, utilizando para ello las variantes LoxP66 y LoxP71, las cuales contienen una mutación que torna al proceso de liberación en irreversible (Zhang & Lutz, 2002). En tanto, para la producción de *ministring* se decidió utilizar la tecnología protelomerasa/telRL (Deneke et al., 2000; Heinrich et al., 2002; Schakowski et al., 2007). Por otra parte, se decidió agregar al minicírculo el origen de replicación del virus Epstein-Barr (gen *ebna1* + OriP) (Suzuki et al., 2009), para que tenga la capacidad de permanecer como un episoma en la célula intervenida. En tanto, como regulador de la inducción génica para la liberación de estas moléculas de dsDNA se decidió utilizar la tecnología TetON/TetOFF, la cual se basa en el uso de tetraciclina/doxiciclina (Tet-On® 3G Inducible Expression Systems User Manual, Clontech® Laboratories Inc., USA).

Dichas secuencias se diseñaron *in silico* y se sintetizaron por la empresa **GeneUniversal** la cual las clonó en el vector plasmídico pUC57, dando lugar a los plásmidos pUC57-1A, pUC57-1B, pUC57-2, pUC57-3 (**Tabla 4**). Por otra parte, el origen de replicación de Epstein-Barr se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pCRISPER-S12, el cual fue adquirido en **Addgene (Anexo I)**. Para las evaluaciones iniciales, se emplearon genes reporteros.

Circuito regulador de la inducción génica

A partir del plásmido pFB-iCre-inducible (**Tabla 4 y Anexo I**) se generó un virus recombinante denominado BV.iCre-inducible con la capacidad de expresar la proteína improved-Cre (iCre) de manera inducible en células de mamífero. Dicho circuito expresa la proteína transactivadora TetON 3G y mCherry en una misma unidad transcripcional de manera constitutiva bajo el promotor de CMV. También, expresa las proteínas BFP e iCre de manera inducible, ambas bajo un mismo promotor de CMV bidireccional conteniendo la secuencia operadora Otet3X. En ausencia de tetraciclina (o su derivado doxiciclina) la proteína TetON 3G no se une a la secuencia operadora Otet3X; mientras que en la presencia del compuesto, Tet-ON 3G se une al operador induciendo el proceso de transcripción del promotor regulado (**Figura 28**)

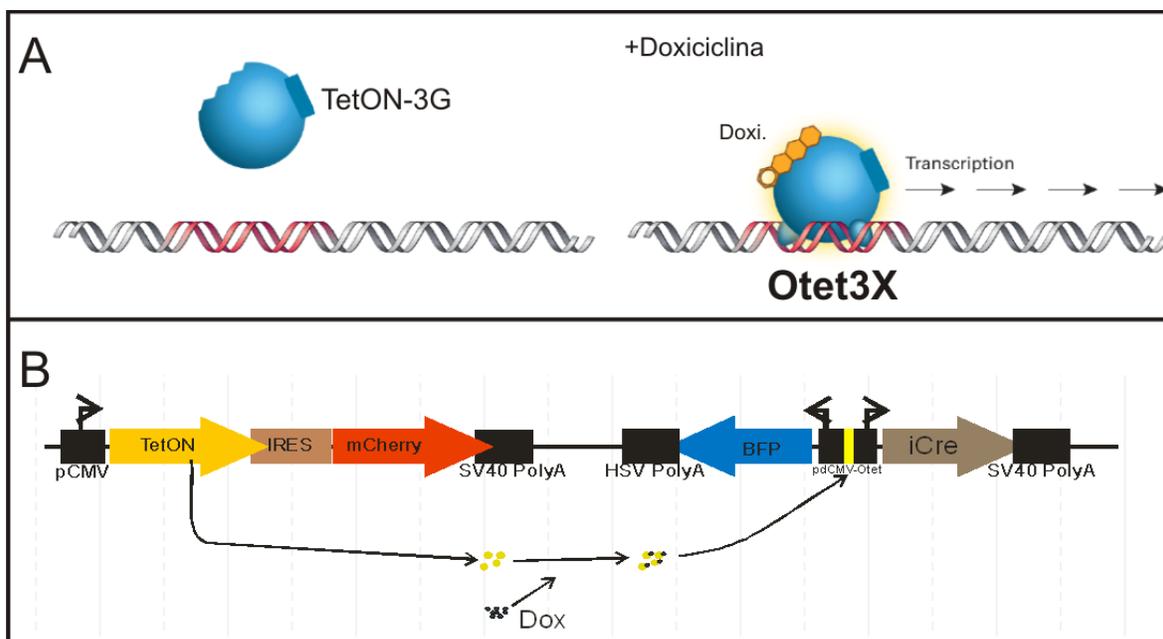


Figura 28. Funcionamiento del virus BV.iCre-inducible. (A) Sistema TetOn 3G. Las células diana en donde se expresa la proteína transactivadora Tet-On 3G contienen un gen de interés (GOI) bajo el control de un promotor con la región operadora Otet3X. Así, expresarán altos niveles del GOI, pero solo cuando se cultivan en presencia de doxiciclina. **(B)** Esquema de la secuencia exógena llevada por el virus BV.iCre-inducible capaz de inducir la expresión de BFP e iCRE en presencia de doxiciclina. pCMVbi = promotor bidireccional de Citomegalovirus; IRES = *internal ribosome entry site* del *encephalomyocarditis virus*; BFP = Blue Fluorescence Protein; iCre = Codon-improved Cre recombinase; Otet3X = Secuencia operadora reguladora de la transcripción, TetON = Proteína quimérica transactivadora TetON-3G, mCherry = Proteína fluorescente roja derivada de dsRED.

El funcionamiento de dicho sistema se evaluó mediante la transducción de células HEK293T a MOI 100 y su inducción con doxiciclina (200 ng/mL) según lo expuesto en la sección de materiales y métodos (**Figura 29**).

Siguiendo tales procedimientos, se observó por microscopia de fluorescencia que las células transducidas (pero no inducidas con doxiciclina) expresan la proteína mCherry, evidenciando un correcto funcionamiento de la secuencia IRES (*Internal ribosome entry site*) del *encephalomyocarditis virus* (EMCV) y, como dato más importante, que se estaría produciendo la proteína TetON-3G. Al faltar la inducción con doxiciclina, la proteína TetON no se une a las secuencias reguladora Otet3X del promotor bidireccional CMVbi, manteniendo en consecuencia reprimida la expresión de iCre y de BFP. En tanto, las células transducidas e incubadas con doxiciclina expresaron tanto la proteína mCherry como la proteína BFP, evidenciando un correcto funcionamiento del sistema TetON/TetOF.

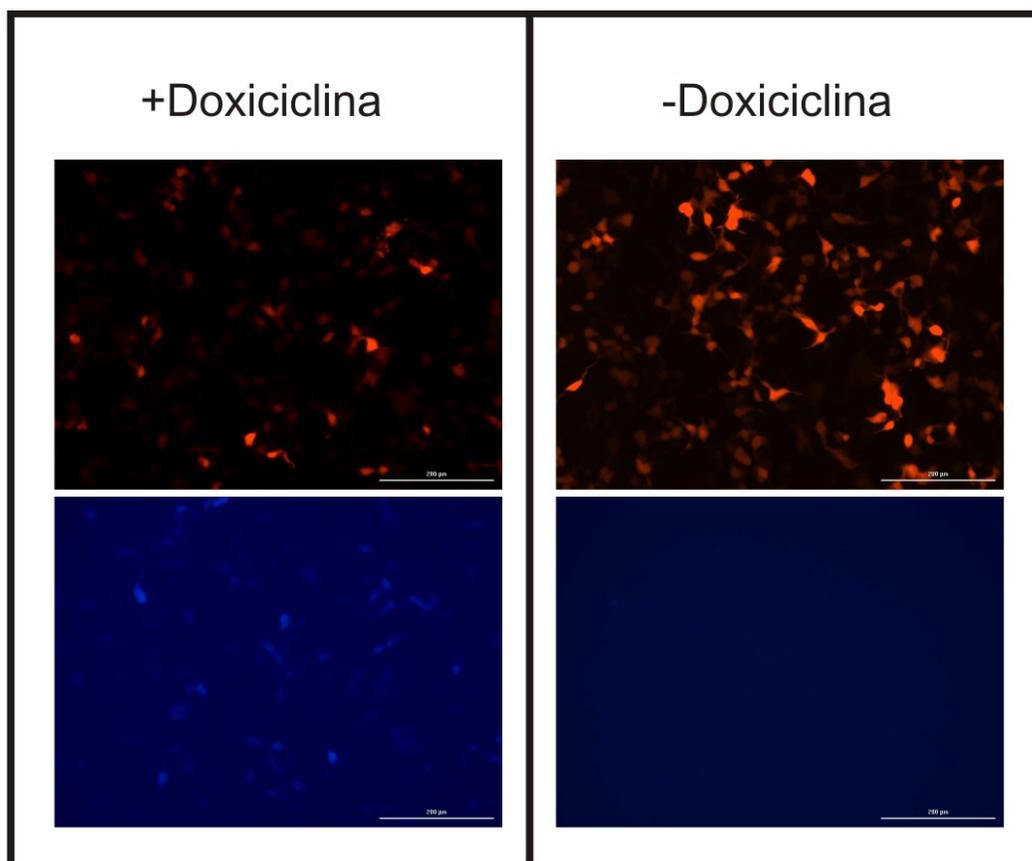


Figura 29: Ensayo de inducción de la expresión del virus BV.iCre-Inducible. Microscopías de fluorescencia (100X) de células HEK293T transducidas A MOI 100 con el virus BV.iCre-Inducible e incubadas durante 24 horas en medio con (Izquierda) y sin (Derecha) doxiciclina (DOX, 200 ng/mL).

Circuito generador de minicírculo/ministring

Ya evidenciado que era posible expresar de modo inducible a la proteína iCre, se avanzó con las construcciones genéticas liberadoras de los casetes de expresión. Así, a partir de los plásmidos pUC57-1A, pUC57-1B se generó el plásmido pUC57-MCMS (el cual contiene el promotor de CMV y un sitio de clonado múltiple –MCS– flanqueado tanto por las secuencias LoxP –generadoras del minicírculo– como telRL –generadoras del *ministring*–). A partir de este último, se generó el plásmido pUC57-MCMS-GFP mediante el clonado en el MCS del ORF del gen *gfp* y un terminador de la transcripción, y el plásmido pUC57-MCMS-GFP-ORI, el cual contiene, además, el origen de replicación del virus Epstein-Barr (Tabla 4 y Anexo I). Estas construcciones debieron ser generadas utilizando la cepa de *Escherichia coli stb3* (Invitrogen), especial para sostener secuencias inestables por la presencia de repeticiones. Esto se decidió luego de infructuosos intentos en la cepa TOP10, dado que se observaba que las secuencias telRL eran inestables y recombinaban produciendo la liberación del DNA (Figura 30). La cepa *stb3* posee el genotipo endA+, conteniendo endonucleasas que deben ser removidas durante el proceso de extracción por minipreparación de plásmidos.

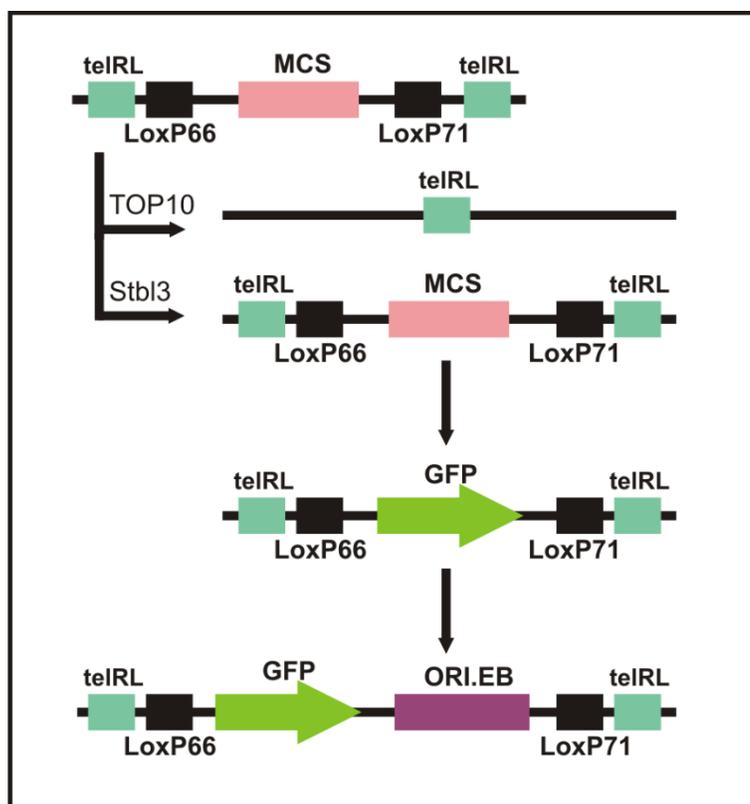


Figura 30. Esquema del Clonado molecular de los plásmidos pUC57-MCMS-GFP y pUC57-MCMS-GFP-ORI.

Esquema de la secuencia de clonado para conseguir los plásmidos conteniendo la secuencia generadora de minicírculos/*ministrings*. TelRL = Secuencias blanco de la proteína TELOMERASA generadoras del *ministring*; LoxP66/71 = Secuencias blanco de la proteína CRE generadoras del minicírculo; MCS = Sitio de clonado múltiple; GFP = Gen de la proteína fluorescente verde; ORI.EB = origen de replicación del virus Epstein-Barr (gen *ebna1* + OriP).

A partir de pUC57-MCMS-GFP y pUC57-MCMS-GFP-ORI se generaron los plásmidos pFastBac-MCMS-GFP y pFastBac-MCMS-GFP-ORI y, a partir de estos, se produjeron los virus

recombinantes AcMCMS-GFP y AcMCMS-GFP-ORI (Tabla 4 y Anexo I). La expresión del gen *gfp* en células de mamífero en ambos virus se corroboró por transducción en células HEK293T (Figura 31).

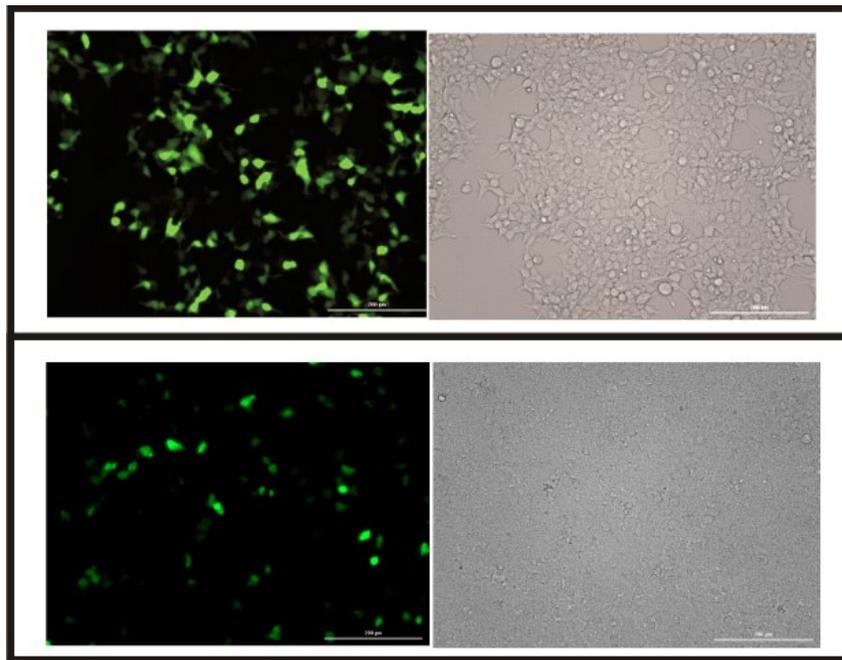


Figura 31. Transducción de células HEK293T con AcMCMS-GFP y AcMCMS-GFP-ORI a MOI 100. (Arriba) Células transducidas con AcMCMS-GFP. (Abajo) Células transducidas con AcMCMS-GFP-ORI. Microscopías de fluorescencia 100X con filtro GFP y campo claro.

También se generaron virus recombinantes de expresión constitutiva, los cuales contienen los ORF de iCre y de iTelomerasa bajo el promotor viral CMV (AcCMV-iCre y AcCMV-iTelomerasa) (Anexo I). Estos lotes virales servirán para provocar la generación de minicírculos/*ministrings* por parte de los virus AcMCMS-GFP y AcMCMS-GFP-ORI mediante la co-transducción de cualquiera de estos con los virus AcCMV-iCre o AcCMV-iTelomerasa.

Hasta el momento, solo se pudieron generar los virus recombinantes conteniendo las secuencias generadoras de minicírculos/*ministrings*, las cuales contienen el gen reportero *gfp* bajo el promotor CMV (AcMCMS-GFP) y al gen de *gfp* más un origen de replicación del virus Epstein-Barr (AcMCMS-GFP-ORI), más los virus recombinantes capaces de expresar las proteínas iCre e iTelomerasa (AcCMV-iCre y AcCMV-iTelomerasa) necesarios para la liberación del minicírculo/*ministring* en su forma constitutiva e inducible. Restan realizarse los experimentos necesarios para determinar el correcto funcionamiento de los circuitos planteados, y su capacidad de aumentar la temporalidad en la expresión génica de células de mamíferos transducidas. Estos ensayos se están llevando a cabo en la actualidad, tanto en modelo *in vitro* como en modelo animal (ratas), pero aún no se cuenta con resultados para su análisis. Así como se lograron mejoras en la transducción con la pseudotipificación con VSV-G, se esperan extender los tiempos de expresión con alguna de las estrategias en evaluación, lo que permitirá realizar una reingeniería del vector baculoviral para evaluarlo en algún modelo experimental de una enfermedad humana.

Discusión

El desarrollo de este trabajo de Tesis doctoral ha permitido evaluar y poner en práctica el uso de vectores baculovirales en mamíferos (células en cultivo *in vitro* y organismos), con el objetivo de expresar factores que brinden un servicio terapéutico, preventivo, o de diagnóstico, en acuerdo con las definiciones regulatorias que poseen los ingredientes activos de terapia génica ya disponibles en la praxis clínica (ANMAT, 2019; EMA, 2007; FDA, 2008). En particular, el morfotipo brotante (BV) del baculovirus AcMNPV posee una potencialidad natural de ingresar a células de mamíferos mediado por la proteína viral GP64, la cual sólo está presente en los miembros del Grupo 1 de los alfabaculovirus (Jiang et al, 2009). El empleo de variantes recombinantes de lotes de BV que porten transgenes de interés permiten, en consecuencia, la expresión transitoria de tales factores en los mamíferos administrados, de manera similar a lo que ocurre con otros vectores virales empleados para tales fines, como los adenovirus (Watanabe et al., 2021; Li et al., 2023). A continuación, se discuten y concluyen los principales resultados hallados sobre el uso de BV de AcMNPV en tecnologías BacMam, los que implicaron una puesta a punto de su uso en nuestro laboratorio, su evaluación preclínica en modelos celulares y animales, y otros vinculados con la ingeniería del vector para ampliar sus aplicaciones y limitar sus posibles debilidades.

Resultados A - Herramientas útiles

En primer lugar, era necesario generar un conjunto de herramientas, procedimientos y pruebas conceptuales para iniciar una línea de I+D en el uso de baculovirus como vectores virales para terapia génica en mamíferos. En tal sentido, mediante la utilización del sistema Bac to Bac (Thermo Fisher) fue posible la generación de tres BV recombinantes (AcCMV-GFP, AcCMV-BFP, AcCMV-mCherry) basados en el bácmido de AcMNPV, los cuales se construyeron para ser capaces de expresar cada uno una proteína reportera distinta (GFP, BFP y mCherry) tanto en células de insecto (gracias al promotor baculoviral de poliedrina), como en células de mamífero (gracias al promotor viral de CMV). La capacidad de expresar un gen reportero en células de insecto demostró ser de gran utilidad a la hora de la titulación de dichos virus por el método de conteo de focos infectivos en placa, permitiendo la determinación de los títulos virales de manera más simple, precisa y rápida por microscopía de fluorescencia. Además, la capacidad de expresar genes reporteros en células de mamíferos permitió realizar ensayos de eficiencia de transducción *in vitro*, demostrando la gran capacidad que tienen los BV baculovirales de ingresar material genético con buena eficiencia y mediante protocolos sencillos a un gran número de líneas celulares, de diversas estirpes y orígenes (cultivos primarios y líneas celulares). Los resultados hallados mostraron que las relaciones de viriones a células se comportaron similares a las de otros vectores virales que ya se emplean en clínica, como los adenovirus (Orlicky et al., 2001).

Del mismo modo, el diseño y puesta a punto de una reacción de qPCR para la titulación de los virus recombinantes derivados del bácmido de AcMNPV (sin importar el gen de interés a ser

expresado en mamíferos) demostró facilitar en gran medida la titulación de aquellos virus que no portan genes reporteros (como los utilizados en la sección **Resultados B**). En general, las terapias génicas con vectores virales se dosifican por el número de copias del gen terapéutico y no por el número de viriones. Dado que los baculovirus no son virus infectivos en mamíferos, es posible que el lote de BV producido cuente con variantes defectivas que no pueden generar una ronda de infección en células de insectos, pero que sí pueden transducir células de mamífero y expresar un transgén (si éste está presente). Por ello, es de esperar que los valores de titulación por capacidad infectiva de un lote viral sean inferiores a aquellos estimados por el número de copias de moléculas genómicas. Pero, para estandarizar un procedimiento, se decidió continuar con los ensayos de qPCR. Por otra parte, nuestros resultados de qPCR, expresados en N° de copias de DNA viral / mL, pudieron ser extrapolados con los valores obtenidos por titulación en placas, expresados en ufp/mL, mediante una corrección utilizando una constante R experimentalmente determinada ($R = \text{Título qPCR} / \text{Título Placa}$; $R_{\text{promedio}} = 34,25 \pm 16,2$). La imprecisión de este valor probablemente pueda ser reducida en el corto plazo reemplazando el método de extracción del DNA viral por mini preparaciones que se basen en sistemas comerciales, como PrepMan (**Thermo Fisher**).

Esta etapa del trabajo de tesis doctoral nos permitió contar con procedimientos de producción de BV en pequeña escala (Utilizando 5 *flasks* de cultivo celular de 175 cm² al 80 % de confluencia y un periodo de incubación post infección de 4 días), más un procedimiento de ultraconcentración en PBS para generar lotes de entre 5-10x10⁹ pfu/mL determinados por qPCR, más un protocolo optimizado de transducción de células de mamífero y relaciones de vectores virales a células adecuadas para tener eficacia.

Resultados B - BacMam con genes terapéuticos

Una vez obtenidas las estandarizaciones y conceptualizaciones anteriores, y en cooperación con el laboratorio de Medicina Regenerativa Cardiovascular, Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMETTYB) -Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y técnicas (CONICET) - Universidad Favaloro (Buenos Aires, Argentina), se diseñaron y produjeron varios BV con fines terapéuticos para su evaluación en modelos animales. Para ello, se eligieron dos enfermedades prevalentes en seres humanos, como lo son el infarto agudo de miocardio y la enfermedad arterial periférica, y se seleccionaron genes terapéuticos derivado de estudios propios (**Locatelli et al., 2020; Locatelli et al., 2019**) Mediante el uso de los procedimientos optimizados, se produjeron lotes de cada ingrediente activo (BV formulados en PBS), los cuales se titularon, controlaron microbiológicamente y se genotipificaron antes de ser administrados. El uso de estos IA, en conjunto al virus AcCMV-GFP o Ac.Null como placebos, se emplearon en varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar eficacia y seguridad. A partir de estos resultados, se lograron dos publicaciones en revistas científicas: “*Effect of intramuscular baculovirus encoding mutant hypoxia-inducible factor 1-alpha on neovasculogenesis and ischemic muscle protection in rabbits with peripheral arterial disease*” (**Giménez et al., 2020**); y “*Effect of intramyocardial administration of baculovirus encoding the transcription factor Tbx20 in sheep with experimental acute myocardial infarction*” (**Bauza et al., 2023**; en estado de revisión).

En el primer trabajo se demostró que la aplicación del IA BV.mHIF-1a indujo neovascularización y daño isquémico reducido en conejos con PAD. Además, utilizando el virus AcCMV-GFP se realizó un perfil de bioseguridad observándose una duración de la expresión del gen terapéutico por 14 días post-inyección y una ausencia del vector viral en los órganos periféricos. En tanto, en el segundo trabajo se demostró que el tratamiento de ovejas con IAM con el IA BV.Tbx20 disminuyó el tamaño del infarto y mejoró la función del ventrículo izquierdo. Se obtuvo, además, un perfil de bioseguridad y de expresión acorde con el obtenido en el trabajo anterior.

Los resultados obtenidos en ambos trabajos refuerzan la evidencia de que los vectores baculovirales son herramientas útiles para el diseño de tratamientos de terapia génica en mamíferos, particularmente en terapias de regeneración de tejidos, como las aquí evaluadas. Cabe señalar que por su eficacia, podrían ser una alternativa al uso de los vectores adenovirales, destacando que es posible generarlos en escala a costos razonables (**Drugmand et al., 2012**). También destacan sus perfiles de seguridad a la hora de manipular estos virus en el laboratorio, como sus perfiles bioseguridad en los pacientes, y su capacidad para transducir de manera eficiente un gran número diverso de tipos celulares. Por otro lado, estos trabajos, también pusieron en evidencia las carencias que tienen este tipo de vectores, en particular la baja temporalidad en la expresión génica de estos. Reforzando la necesidad de evaluar mejoras en este tipo de vectores para incrementar sus prestaciones y hacerlo aún más competitivo. Así, se evaluó incrementar la capacidad de transducción y su permanencia como ácido nucleico de expresión activa en el tejido de interés.

Resultados C - BacMam con mayor poder de transducción

Con el propósito de mejorar la capacidad de transducción de los vectores baculovirales, se decidió agregar la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) en la envoltura del virión brotado, para luego evaluar el impacto que esto pudiera tener en la producción de los lotes de BV recombinantes y en el ingreso a células de mamífero.

En acuerdo con lo anterior, se seleccionaron tres promotores baculovirales de AcMNPV con diferente temporalidad de expresión según la literatura [de los genes ie1 (activación antes de las 10 horas de exposición al virus), gp64 (antes de las 15 horas) y p10 (después de las 20 horas)], para así dirigir la producción de VSV-G (versión completa y sin modificar de la proteína transmembrana con rol fusogénico del virus de la estomatitis vesicular) en momentos diferentes de un ciclo de infección en células Sf9. Cabe señalar que la producción de BV comienza alrededor de las 12 horas de iniciada la infección, y continúa a lo largo del ciclo (no más de 48 horas), acrecentándose luego de las 30 horas la producción de ODV (**Rohrmann et al., 2019**). En nuestra hipótesis directriz, los tres lotes de BV recombinantes con VSV-G presentarían cantidades diferenciales de la proteína en su envoltura, lo cual debería tener impactos positivos en la transducción de células de mamífero, pero potencialmente negativos en la infectividad en células de insecto (por afectar la disposición de la proteína baculoviral GP64, necesaria para el ingreso a las células de insecto).

En primer lugar, se validó la temporalidad en la expresión de los tres promotores seleccionados mediante la producción de tres lotes virales recombinantes que expresan GFP bajo tales secuencias (AcProm.Ie1/GFP, AcProm.Gp64/GFP y AcProm.P10/GFP), y su posterior uso en infecciones sincronizadas en células Sf9 y análisis de imágenes mediante microscopía de fluorescencia. A su vez, este estudio se confrontó con una cinética de producción de BV en células de insecto Sf9 infectadas, recuperando los medios condicionados a diferentes tiempos en una ventana de 48 horas, y cuantificándolos posteriormente mediante ensayos de infección en monocapas de células Sf9 por dilución terminal. El conjunto de estas evidencias mostró que el promotor *ie1* iniciaría su actividad a las 6 horas, mientras que el de *gp64* lo haría a las 12 horas y el de *p10* a las 24 horas post infección. También, que la producción de BV se iniciaba entre las 12 y 18 horas, con incremento sostenido hacia el final del ciclo, lo cual mostraría que la producción de VSV-G con promotores tardíos podría ser la mejor opción para los fines deseados, si esto no comprometía la infectividad en células de insecto.

En función de lo anterior se generaron tres tipos de BV pseudotipados con VSV-G, donde en cada uno de ellos la expresión de esta proteína se da bajo la dirección de uno de los promotores baculovirales estudiados (AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG y AcProm.P10/VSVG), además de contener un gen común que produce la proteína reportera GFP bajo la acción de un promotor de mamíferos (promotor de Citomegalovirus, pCMV) para su análisis en tal contexto (prueba de concepto para simular un ingrediente activo de terapia génica). Estos lotes se caracterizaron genotípicamente y fenotípicamente mediante ensayos de *western blot* con anticuerpos anti-VSVG y anti-VP39 (proteína de nucleocápside), mostrando que VSV-G se asentaba adecuadamente en los BV en el siguiente orden cuantitativo: AcProm.P10/VSVG > AcProm.Gp64/VSVG > AcProm.Ie1/VSVG. Paralelamente, se generaron lotes de BV recombinantes que expresan fusiones de VSV-G-GFP y GP64-mCherry para la evaluación de la localización subcelular de estas proteínas mediante microscopía confocal (ensayos aún no completados).

Luego se evaluó si la disposición de VSV-G en la envoltura de los BV comprometía su infectividad en células susceptibles y permisivas (células de insecto Sf9), lo que podría atentar con la producción industrial de estos vectores baculovirales. Un primer análisis cualitativo mostró que los baculovirus portadores de VSV-G producían sincicios (en mayor grado el AcProm.P10/VSVG), probablemente por la actividad fusogénica de esta proteína localizada en la membrana citoplasmática. En tanto, una cinética realizada a lo largo de 48 horas con los AcProm.P10/VSVG, AcProm.Gp64/VSVG, AcProm.Ie1/VSVG y un control (AcCMV-GFP) no mostró diferencias significativas en la productividad de viriones, demostrando que la presencia de VSV-G no estaría comprometiendo la disposición de GP64, y/o que VSV-G suple sus funciones en células de insecto. Los ensayos de las fusiones con proteínas reporteras y un *western blot* para la proteína GP64 (ensayos en ejecución) permitirán sumar claridad en este aspecto.

Ya evaluado lo anterior, los ensayos de eficacia de transducción sobre células de mamíferos mostraron un incremento significativo en torno al 100 %, duplicando la cantidad de células transducidas con respecto al virus control a misma MOI. Estudios similares realizados sobre AcMNPV, donde se expresó a VSV-G bajo el promotor muy tardío de poliedrina, arrojaron mejoras equivalentes (**Pan et al., 2010; Heikura et al., 2012**). Por otra parte, es importante destacar que la versión silvestre de VSV-G ha sido funcional para disponerse en las envolturas de los BV.

Así, el conjunto de resultados generados demuestra que VSV-G es apropiada para la pseudotipificación de virus con el propósito de aumentar su capacidad de transducción de células

de mamífero, mostrando que el promotor muy tardío *p10* es el más adecuado de entre los evaluados para regular la expresión de dicha proteína, y que la presencia del pseudotipo no compromete las etapas productivas de viriones.

Resultados D - BacMam con efecto terapéutico más duradero

Finalmente, con el propósito de extender la temporalidad de la expresión de genes exógenos en células de mamífero por parte de los baculovirus recombinantes, se decidió evaluar la generación de minicírculos y de *ministrings* mediante el uso de las tecnologías Cre/LoxP y Telomerasa/TelRL, además del agregado de un origen de replicación perteneciente al virus de Epstein-Barr. Esto puede significar una mejora para ciertas condiciones patológicas que requieren de una expresión génica que acompañe al individuo durante meses a años, como ocurre con las enfermedades monogénicas. De esta manera, los vectores baculovirales no sólo se presentarán como una alternativa a los adenovirus, sino que también lo serán para otro tipo de vectores episomales de larga duración, como los virus adeno-asociados (Naso et al., 2017). En particular, existen reportes previos donde se evaluó el origen de Epstein-Barr y la producción de minicírculos en baculovirus. Sin embargo, en nuestro conocimiento nunca se ha evaluado la producción *in vivo* de *ministring*.

En acuerdo con lo anterior, se avanzó con la generación de construcciones genéticas requeridas para generar virus recombinantes que asistieran a generar pruebas de concepto útiles. Entre los inconvenientes observados se detectó las secuencias telRL poseen una gran inestabilidad genética en bacterias, generando la recombinación de ellas durante el proceso de clonado molecular, lo que requirió de la utilización de una cepa especial de *E.coli* (stb13) para alcanzar con éxito el genotipo deseado. Esta dificultad en generar el circuito génico generador de minicírculos/*ministrings* demoró la generación de los virus recombinantes, por lo que aún no se cuenta con información cuantitativa de extensión en la duración de los transgenes. Sin embargo, ya se dispone de todos los virus recombinantes para avanzar con esa etapa.

ANEXO I: Clonados Moleculares

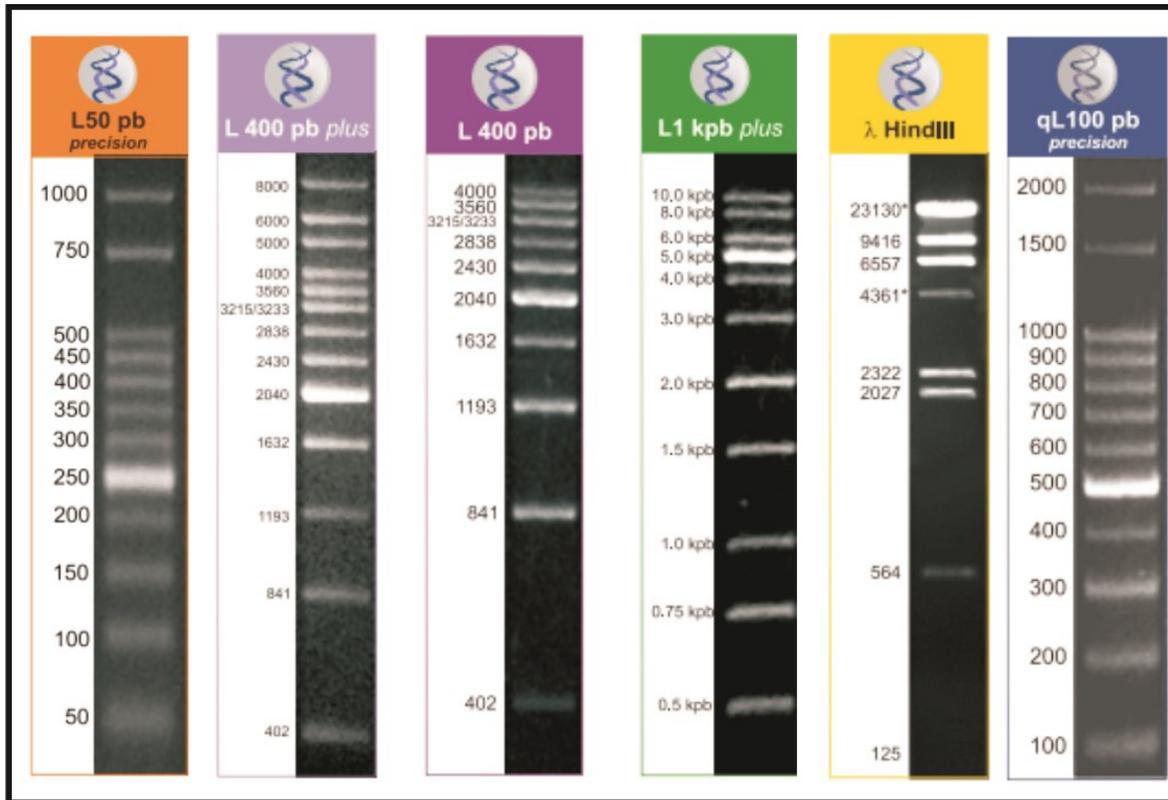


Figura 32. Imágenes de geles de agarosa (0,8-2 %p/v) teñidos con Bromuro de Etidio 0,5 µg/mL y expuestos a luz UV de los distintos *Ladders* de tamaño molecular (**Productos Bio-lógicos, PB-L**) utilizados en este trabajo. Se muestran los patrones de banda de cada uno de ellos y los tamaños de cada banda.

Resultados A: Herramientas útiles

Plásmido pFastBac-CMV-GFP

El plásmido pBSK-sintético-cintia se digirió con las enzimas BamHI/NotI con el fin de liberar el fragmento conteniendo el promotor viral CMV unido al ORF del gen eGFP (1325pb), el cual fue ligado al plásmido pFastBac-Dual entre los sitios BamHI/NotI. El ORF de eGFP quedó así bajo el promotor baculoviral del gen de la poliedrina, funcional en células de insecto, y bajo el promotor de CMV, funcional en células de mamífero. Dicha ligación se transformó por electroporación en bacterias electrocompetentes de *E. coli TOP10* (**Figura 33. A y B**). La identidad el plásmido obtenido, pFastBac-CMV-GFP, se verificó mediante digestión con la enzima BglII (3951pb, 2084pb, 470pb) (**Figura 33. C**)

El plásmido, pFastBac-CMV-GFP se transformó por *shock* térmico en *E. coli DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo el b́acmido recombinante AcCMV-GFP. Se realizaron mini-preparaciones del b́acmido recombinante (**Figura 33. D**) y se transfectoron con el reactivo PEI en ćelulas de insecto Sf9 en placas de 6 *wells* para generar part́iculas virales.

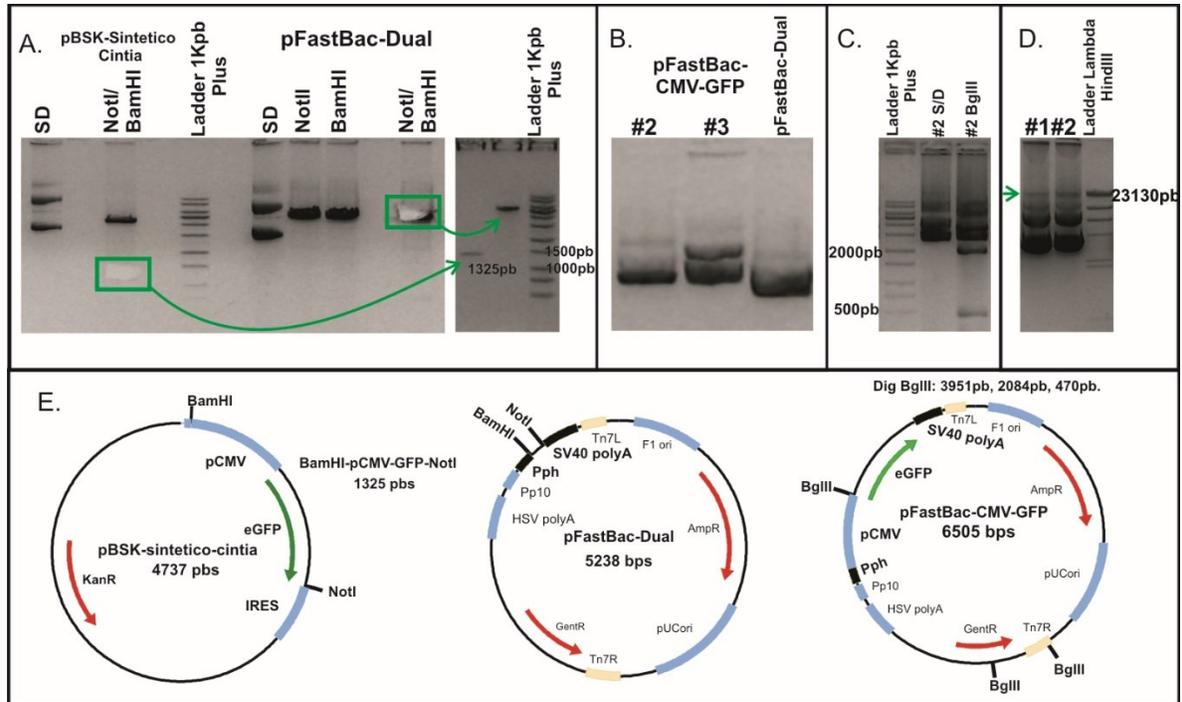


Figura 33. Clonado molecular para la generaci3n del b́acmido recombinante AcCMV-GFP. **A.** Digestiones de los plásmidos pBSK-Sintetico-Cintia y pFastBac-Dual con las enzimas NotI/BamHI. En verde se remarcan los cortes en el gel de agarosa pertenecientes a los fragmentos CMV-eGFP (NotI/BamHI) y al plásmido pFastBac-Dual lineal (NotI/BamHI) y las purificaciones de DNA realizadas a partir de dichos fragmentos de agarosa. **B.** Mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con la ligaci3n de los fragmentos obtenidos en A. **C.** Digesti3n de los plásmidos pFastBac-CMV-GFP #2 con la enzima BglII. Tamaño de los fragmentos esperados: 3951pb, 2084pb, 470pb. **D.** Mini-preparaciones del b́acmido recombinante AcCMV-GFP. En verde se marca la banda correspondiente al DNA b́acmido, el cual corre como la banda ḿas alta del Ladder Lambda HindIII. **E.** Esquemas de los plásmidos utilizados en el clonado, mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricci3n empleadas. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposici3n a luz UV. SD: Sin Digerir.

Plásmido pFastBac-CMV-BFP

El plásmido pUC57-3 se digiri3 con las enzimas BamHI/EcoRI para liberar un fragmento conteniendo el ORF de la protéina BFP (725pb), el cual se clon3 entre los mismos sitios del plásmido pUC57-1A, generando aś pUC57-BFP. La identidad de dicha construcci3n se verific3 mediante digesti3n con las enzimas StuI (2942pb y 454pb) y BspHI (2364pb y 1032pb) (**Figura 34**).

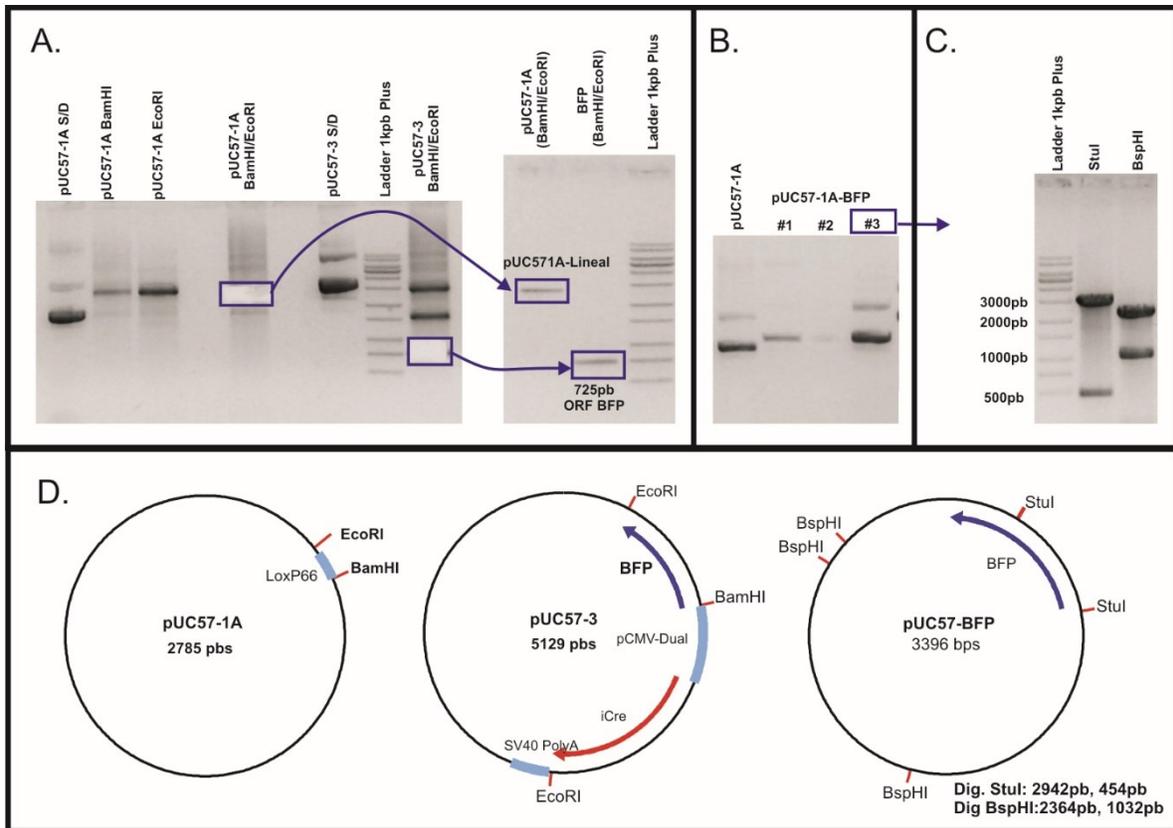


Figura 14. Clonado molecular para la generación plásmido pUC57-BFP. **A.** Digestiones de los plásmidos pUC57-1A y pUC57-3 con las enzimas EcoRI/BamHI. En azul se remarcan los cortes en el gel de agarosa pertenecientes a los fragmentos BFP y al plásmido pUC57-3 lineal, y a las purificaciones de DNA realizadas a partir de dichos fragmentos de agarosa. **B.** Mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con la ligación de los fragmentos obtenidos en A. **C.** Digestión del plásmido pUC57-BFP #3 con la enzima StuI (tamaño de los fragmentos esperados: 2492pb y 454pb) y BspHI (tamaño de los fragmentos esperados: 2364pb y 1032pb). **D.** Esquemas de los plásmidos utilizados en el clonado, mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin Digerir.

El plásmido pUC57-BFP se digirió con la enzima BamHI y se le clonó un fragmento de DNA conteniendo el promotor viral de CMV obtenido mediante la digestión del plásmido pFastBac-CMV-GFP con las enzimas BamHI/BglII (595pb), generando así a pUC57-CMV-BFP. La identidad de dicho plásmido se verificó mediante digestión con las enzimas NdeI (2695pb y 1295pb) y NdeI/EcoRI (2695pb, 1083pb y 212pb) (**Figura 35**).

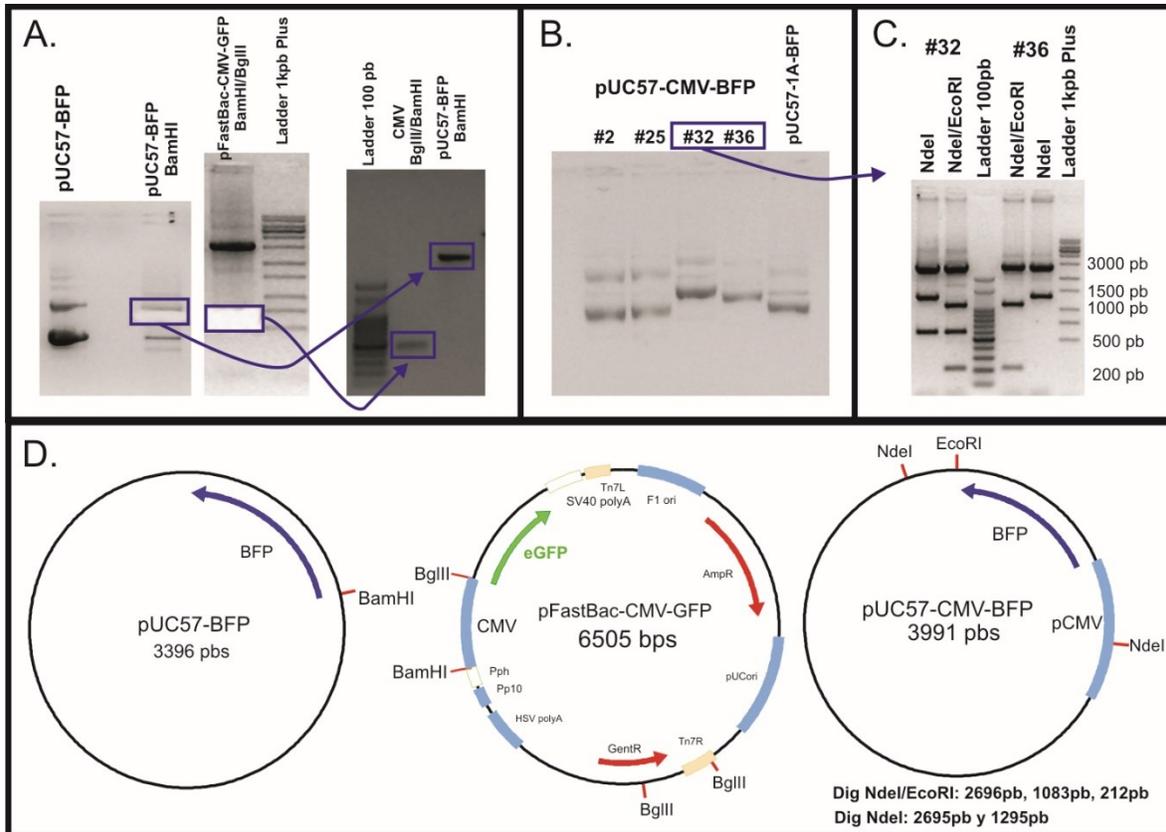


Figura 35. Clonado molecular para la generación plásmido pUC57-CMV-BFP. **A.** Digestiones de los plásmidos pUC57-BFP con la enzima BamHI y pFastBac-CMV-GFP con las enzimas BglIII/BamHI. En azul se remarcan los cortes en el gel de agarosa pertenecientes a los fragmentos CMV (595pb), al plásmido pUC57-BFP lineal, y a las purificaciones de DNA realizadas a partir de dichos fragmentos de agarosa. **B.** Mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con la ligación de los fragmentos obtenidos en A. **C.** Digestión del plásmido pUC57-CMV-BFP #32 y #36 con la enzima NdeI (tamaño de los fragmentos esperados: 2695pb y 1295pb) y NdeI/EcoRI (tamaño de los fragmentos esperados: 2695pb, 1083pb y 212pb). Se observa que el clon 36 presenta las bandas esperadas mientras que el clon 32 parece haber incorporado 2 secuencias del promotor de CMV. **D.** Esquemas de los plásmidos utilizados en el clonado, mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin Digerir.

El plásmido pUC57-CMV-BFP se digirió con las enzimas BamHI/EcoRI liberando un fragmento conteniendo el promotor CMV y el ORF de la proteína BFP (1320pb), el cual se clonó entre los sitios BamHI/EcoRI del plásmido pFastBac-Dual dando origen al plásmido pFastBac-CMV-BFP. Quedó así el ORF de BFP bajo el promotor baculoviral del gen de la poliedrina, funcional en células de insecto, y bajo el promotor de CMV, funcional en células de mamífero (**Figura 36**).

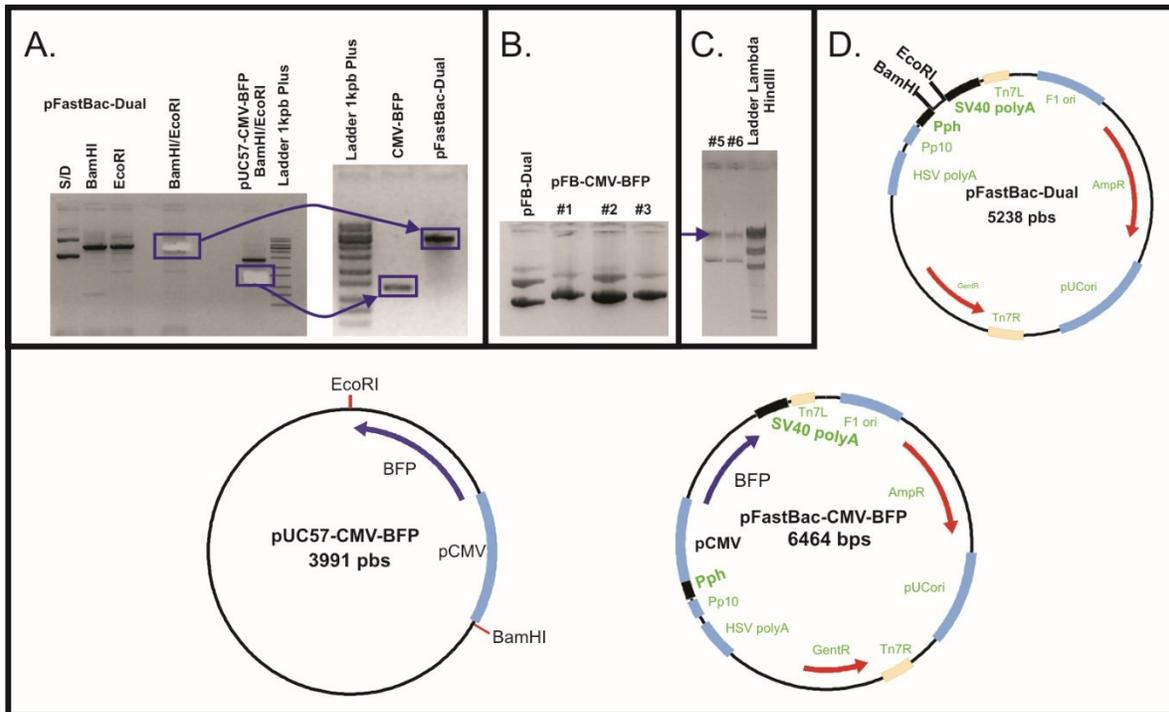


Figura 36. Clonado molecular para la generación plásmido pFastBac-CMV-BFP. **A.** Digestiones de los plásmidos pUC57-CMV-BFP con las enzimas BamHI/EcoRI, y pFastBac-Dual con las mismas enzimas. En azul se remarcan los cortes en el gel de agarosa pertenecientes a los fragmentos CMV-BFP (1320pb), al plásmido pFastBac-Dual lineal, y a las purificaciones de DNA realizadas a partir de dichos fragmentos de agarosa. **B.** Mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con la ligación de los fragmentos obtenidos en A. **C.** Mini-preparaciones del bécimido recombinante AcCMV-BFP. En azul se marca la banda correspondiente al DNA bécimido, el cual corre como la banda más alta del *Ladder* Lambda HindIII. **D.** Esquemas de los plásmidos utilizados en el clonado, mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin Digerir.

El plásmido obtenido, pFastBac-CMV-BFP, se transformó por *shock* térmico en *E. coli* *DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo el bécimido recombinante. Se realizaron mini-preparaciones del bécimido recombinante AcCMV-BFP (**Figura 36C**) y se transfectaron con el reactivo PEI en células Sf9 en placas de 6 *wells* para generar partículas virales.

Plásmido pFastBac-CMV-mCherry

El plásmido pUC57-CIN se digirió con las enzimas PstI/BglII con el fin de eliminar un fragmento de DNA y dejar el ORF de la proteína mCherry bajo el promotor de CMV. El plásmido digerido se religó, previa reacción de *polishing* para compatibilizar extremos, dando lugar al plásmido pUC57-CMV-mCherry. La identidad de dicho plásmido se verificó mediante digestión con las enzimas NdeI (2822pb y 1733pb) y NcoI (3886pb y 669pb) (**Figura 37**).

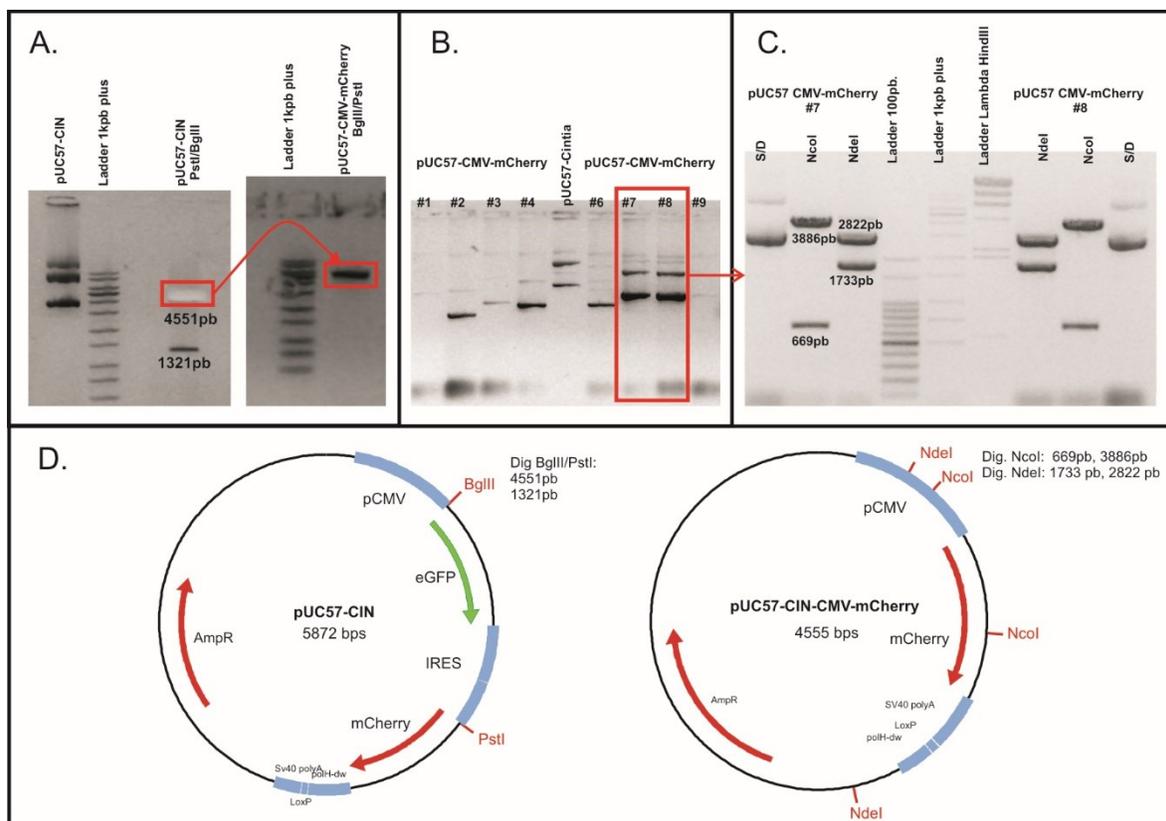


Figura 37. Clonado molecular para la generación plásmido pUC57-CMV-mCherry. **A.** Digestión del plásmido pUC57-CIN con la enzima PstI/BglII para eliminar el fragmento de 1321pb conteniendo el ORF de GFP y la secuencia IRES. En rojo se remarca el corte en el gel de agarosa perteneciente al fragmento deseado y a la purificación de DNA realizada a partir de dicho fragmento de agarosa. **B.** Mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con la ligación del fragmento obtenido en A, previa reacción de *polishing* para compatibilizar extremos. **C.** Digestión del plásmido pUC57-CMV-mCherry #7 y #8 con las enzimas NdeI (tamaño de los fragmentos esperados: 2822pb y 1733pb) y NcoI (tamaño de los fragmentos esperados: 3886pb y 669pb). **D.** Esquemas de los plásmidos utilizados en el clonado, mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. Las electroforesis se realizaron en gels de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin Digerir.

El plásmido pUC57-CMV-mCherry se digirió con las enzimas BamHI/XbaI para liberar el fragmento de DNA conteniendo el promotor CMV y el ORF de la proteína mCherry (1328pb), el cual se clonó entre los sitios BamHI/XbaI del plásmido pFastBac-Dual dando origen a pFastBac-CMV-mCherry (**Figura 38**). La identidad de dicha construcción se verificó mediante digestión con las enzimas PvuII (5004pb y 1490pb) y NcoI (5159pb y 660pb) (**Figura 39A**).

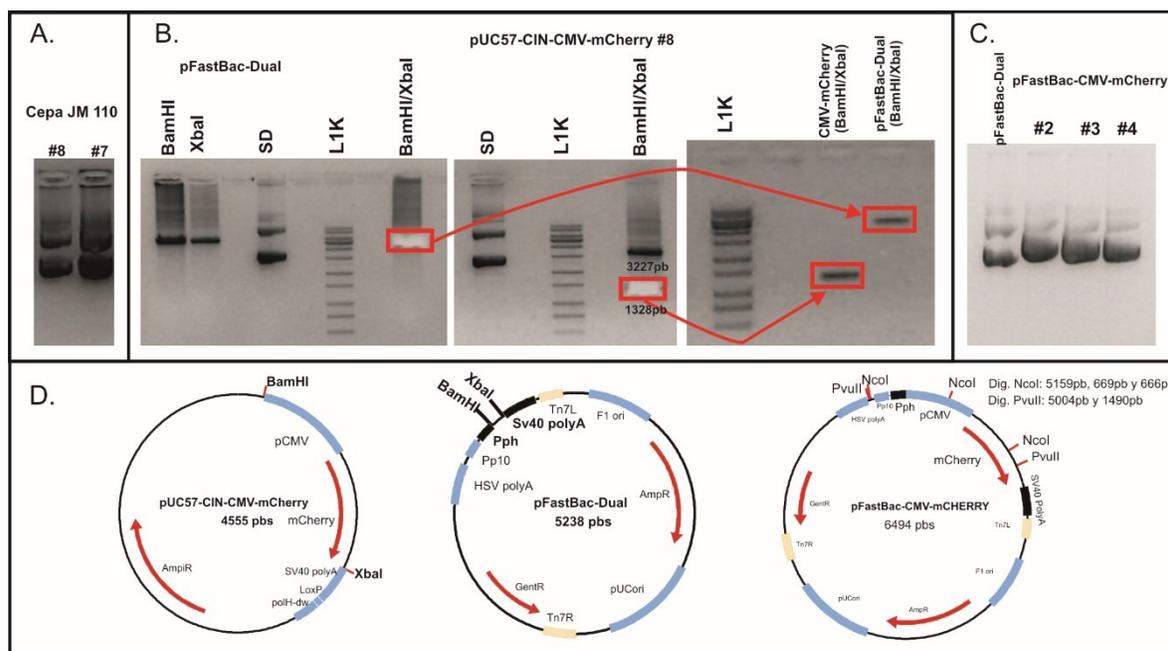


Figura 38. Clonado molecular para la generación plásmido pFastBac-CMV-mCherry. **A.** Mini-preparaciones de DNA plasmídico de pUC57-CMV-mCherry generados con la cepa no metiladora de *E. coli JM110* necesaria para cortar dicho plásmido con la enzima XbaI. **B.** Digestión de los plásmidos pFastBac-Dual y pUC57-CMV-mCherry con las enzimas BamHI/XbaI. En rojo se remarcan los cortes en el gel de agarosa pertenecientes a los fragmentos CMV-mCherry (1328pb) y a pFastBac-Dual lineal, y a la purificación de DNA realizada a partir de dicho fragmento de agarosa. **C.** Mini-preparaciones obtenidas a partir de bacterias transformadas con la ligación de los fragmentos obtenidos en B. **D.** Esquemas de los plásmidos utilizados en el clonado, mostrando los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin Digerir.

El plásmido obtenido, pFastBac-CMV-mCherry se transformó por shock térmico en *E. coli DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo el bécido recombinante. Se realizaron minipreparaciones del bécido recombinante AcCMV-mCherry (**Figura 39B**), y se transfectaron con el reactivo PEI en células Sf9 en placas de 6 wells para generar partículas virales.

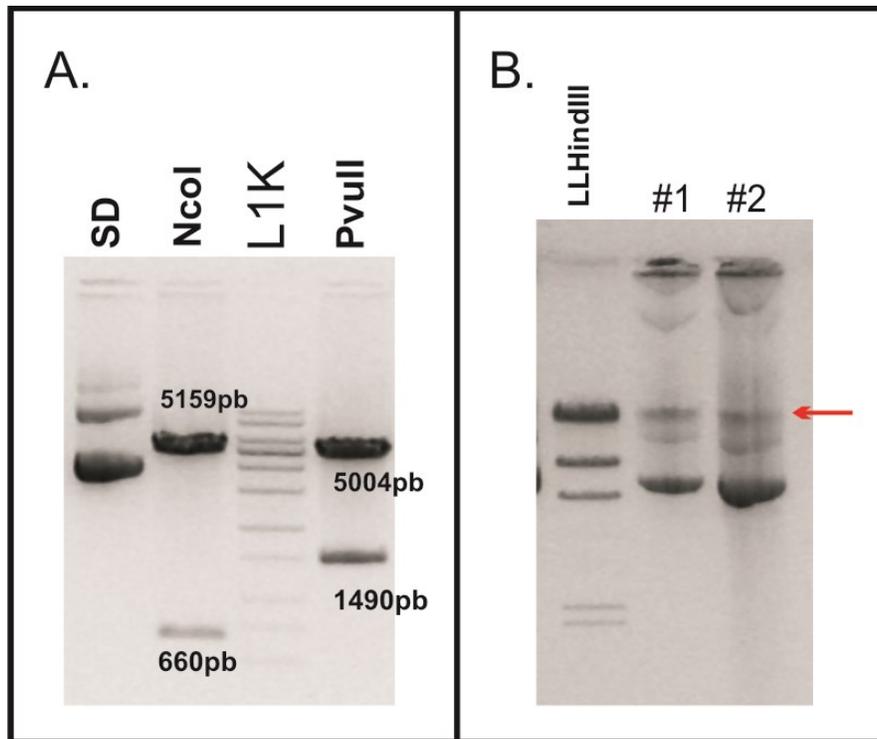


Figura 39. Digestión plásmido pFastBac-CMV-mCherry y bacmido AcCMV-mCherry. A. Digestion del plasmido pFastBac-CMV-mCherry con las enzimas NcoI (tamaño de los fragmentos esperados: 5159pb y 660pb) y PvuII (tamaño de los fragmentos esperados: 5004pb y 1490pb) B. Mini-preparaciones del báculo recombinante AcCMV-mCherry. En rojo se marca la banda correspondiente al DNA báculo el cual corre como la banda más alta del *Ladder* Lambda HindIII. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 – 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin Digerir. L1K: *Ladder* 1kpb Plus, LLHindIII: *Ladder* lambda HindIII.

Plásmido pGMT-IE1 p/qPCR

El gen *ie1* de AcMNPV se amplificó a partir del genoma viral mediante PCR utilizando los primers **FwAcMNPV.IE1** y **RvAcMNPV.IE1** y la enzima Taq DNA polimerasa. El fragmento de 1888pb obtenido se purificó a partir de un taco de gel de agarosa utilizando un kit de extracción comercial (**PB-I**). Dicho fragmento se ligó en un vector de clonado rápido pGEM-T (**Promega**) dando lugar al plásmido pGMT-IE1 p/qPCR. (**Figura 40**). Minipreparaciones de este plásmido se cuantificaron utilizando el equipo Qubit 2.0 (**Thermo Fisher**) y se utilizaron para la generación de una curva de calibración de qPCR para virus derivados de AcMNPV.

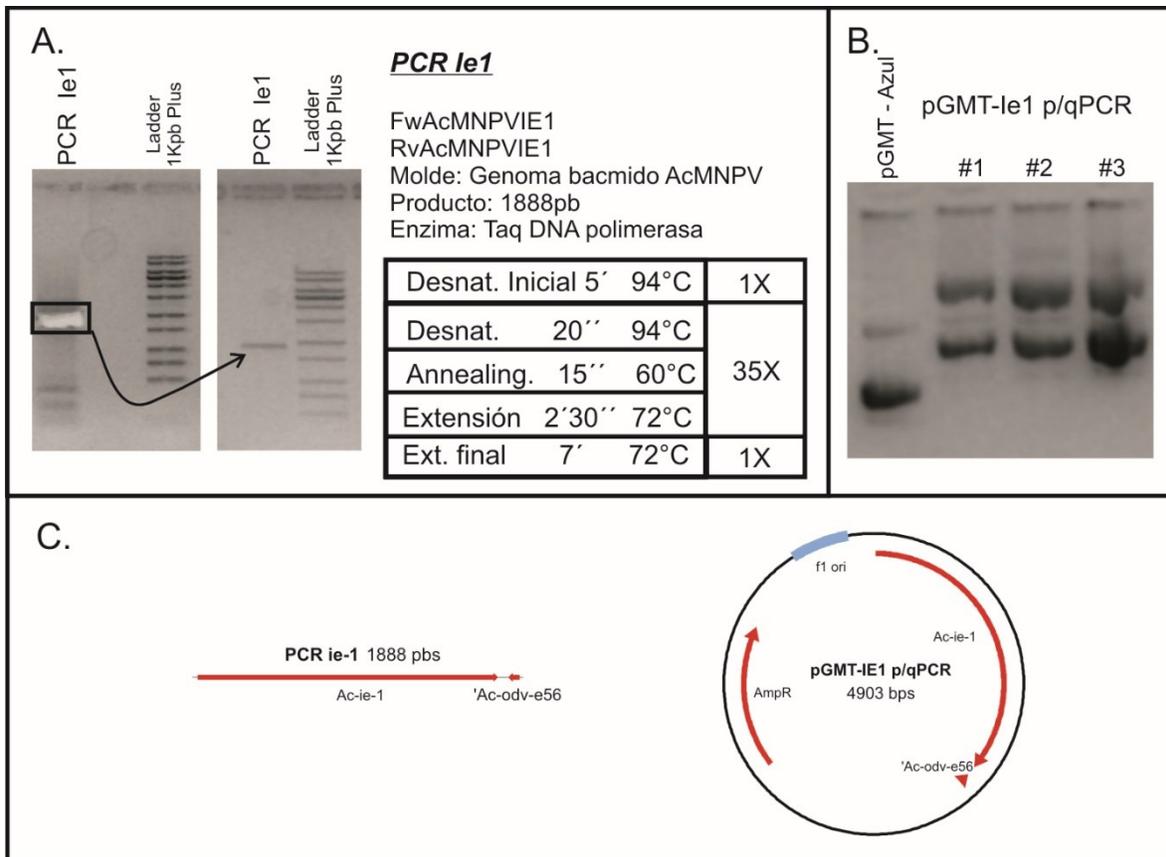


Figura 40. Clonado del gen *ie1* en el vector pGEM-T. **A.** Reacción de PCR para amplificar el gen *ie1* a partir del genoma del virus AcMNPV y la purificación del fragmento obtenido a partir del tacho de agarosa. **B.** Mini preparaciones de los plásmidos obtenidos a partir de la transformación de la ligación del fragmento de DNA generado por PCR en el vector pGMT. **C.** Esquemas del fragmento esperado por la reacción de PCR y el plásmido pGMT-IE1 p/qPCR obtenido. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV.

Resultados B: BacMam con genes terapéuticos

Las secuencias correspondientes a los genes terapéuticos bajo el control del promotor CMV y de los shRNA bajo el promotor humano pU6 se diseñaron *in silico* y se adquirieron en la empresa **GeneUniversal** (Newark, DE, USA), que se encargó de la síntesis y del clonado entre los sitios XbaI y KpnI del vector pFastBac-Dual para los genes terapéuticos bajo el promotor de CMV (pFastBac-TbX20, pFastBac-mHif1-alpha y pFastBac-Meis), y entre los sitios XhoI y KpnI para los shRNA bajo el promotor pU6 (pFastBac-shRNA-A y pFastBac-shRNA-B) (**Figura 41**).

Estos plásmidos se transformaron en bacterias electrocompetentes de *E. coli* TOP10 y se les realizaron mini preparaciones de DNA plasmídico, a las cuales se les realizaron digestiones para corroborar su identidad. El plásmido pFastBac-mHif1-alpha se digirió con la enzima HindIII (6800pb, 1126pb), el plásmido pFastBac-TbX20 con las enzimas Accl (5012pb y 1802pb) y KpnI (5172pb y 894pb), y el plásmido pFastBac-Meis con la enzima NdeI (5521pb y 1458pb) (**Figura 42**). En tanto, que los plásmidos pFastBac-shRNA-A y pFastBac-shRNA-B se digirieron con la enzima Accl (4444pb, 894pb y 188pb) (**Figura 43**).

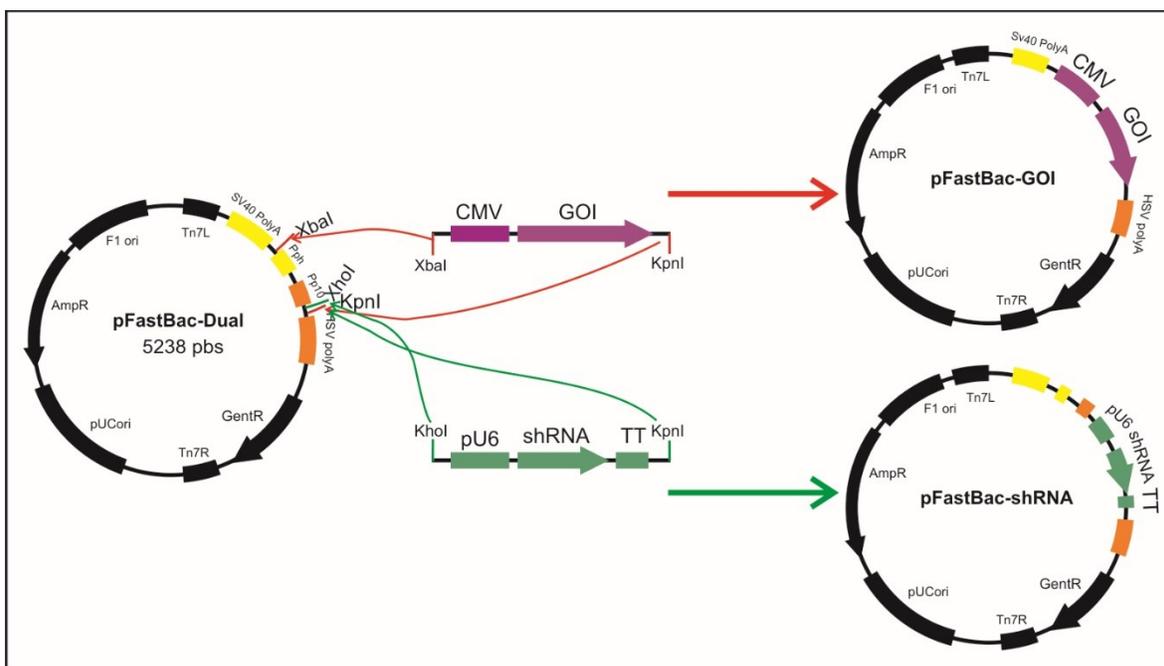


Figura 41. Esquema de las secuencias sintetizadas por la empresa GeneUniversal. Se muestra el clonado de los genes terapéuticos bajo el promotor de CMV entre los sitios XbaI y KpnI del plásmido pFastBac-Dual y de los shRNAs anti Meis bajo el promotor pU6 entre los sitios XhoI y KpnI del plásmido pFastBac-Dual.

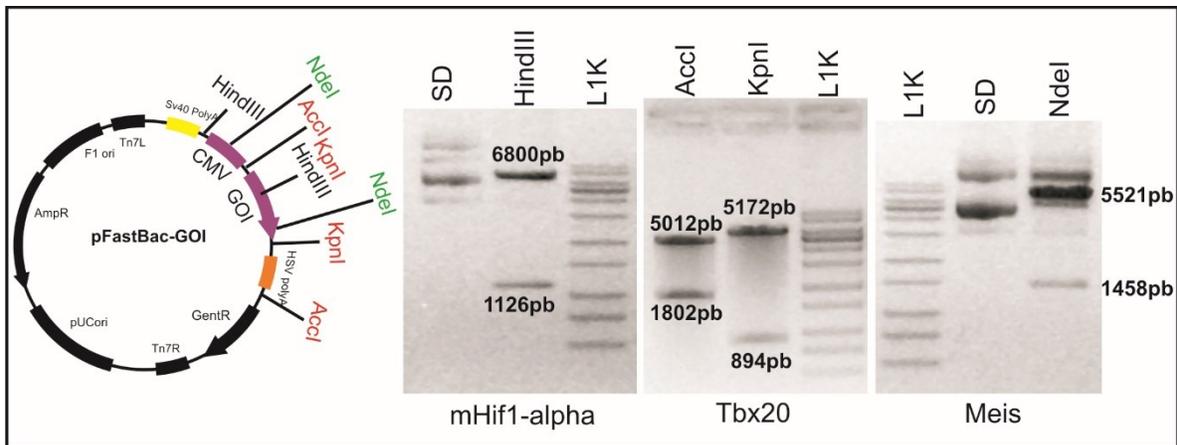


Figura 42. Digestiones enzimáticas de los plásmidos conteniendo genes terapéuticos basados en el vector pFastBac-Dual. De izquierda a derecha: Esquema de los plásmidos mostrando los sitios de corte de las enzimas usadas en cada caso; pFastBac-mHif1-alpha digerido con la enzima HindIII (fragmentos esperados: 6800pb, 1126pb); pFastBac-Tbx20 digerido con las enzimas Accl (fragmentos esperados 5012pb y 1802pb) y KpnI (fragmentos esperados: 5172pb y 894pb) y pFastBac-Meis digerido con la enzima NdeI (fragmentos esperados: 5521pb y 1458pb). Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin digerir. L1K: Ladder 1kbp plus.

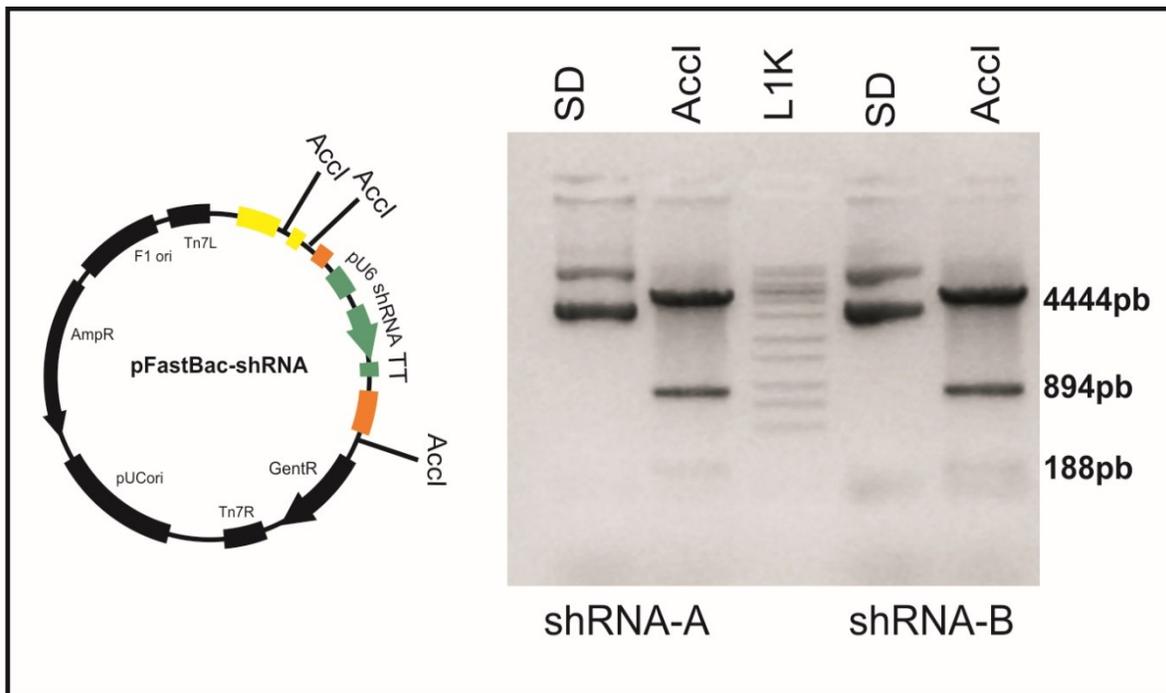


Figura 43. Digestiones enzimáticas de los plásmidos conteniendo shRNA basados en el vector pFastBac-Dual. De izquierda a derecha: Esquema de los plásmidos mostrando los sitios de corte de la enzima utilizada Accl; pFastBac-shRNA-A y pFastBac-shRNA-B digeridos con Accl (fragmentos esperados: 4444pb y 894pb y 188). Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,8 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV. SD: Sin digerir. L1K: Ladder 1kbp plus.

Los plásmidos obtenidos, se transformaron por *shock* térmico en *E. coli DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo los bácmidos recombinantes. Se realizaron mini-preparaciones de dichos bácmidos recombinantes (**Figura 44**) y se transfectaron luego con el reactivo PEI en células Sf9 en placas de 6 *wells* para generar partículas virales.

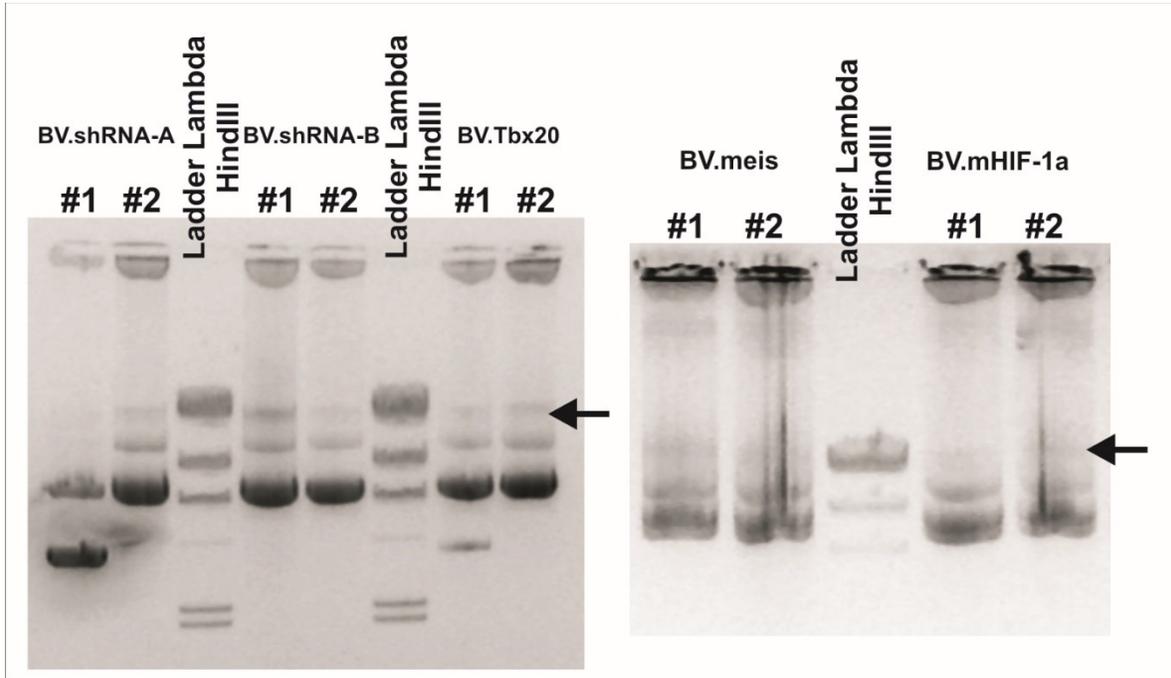


Figura 44. Mini-preparaciones de los bácmidos recombinantes (BV.shRNA-A, BV.shRNA-B, BV.Tbx20, BV.meis, BV.mHif-1a) generados con los plásmidos pFastBac-Tbx20, pFastBac-mHif1-alpha, pFastBac-Meis, pFastBac-shRNA-A y pFastBac-shRNA-B. La flecha marca la banda correspondiente al DNA bácmidico, el cual corre como la banda más alta del *Ladder* Lambda HindIII. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 0,6 p/v con BrEt 0,5 µg/mL y exposición a luz UV.

Secuencia diseñada para pFastBac-Tbx20

>XhoI + Promotor CMV (Human CMV early enhancer + early promoter) + Sall + Secuencia Kozak + Tbx20 ORF Humano (NCBI Reference Sequence: NM_001077653.2) + PvuII + EcoRV

```
TCTAGACTCGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG
CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATG
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG
CCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
GCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTG
CAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTGCG
TAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT
TTAGTGAACCGTCAGATCGTCGACACCGTGGAGTTACGGCGTCCCCCAAGCCCCAACTCTCCTCTCGGGCCA
ACGCCTTCTCCATTGCCGCGCTCATGTGCGAGCGGCGCTCTAAGGAGAAGGAGGCGACGGAGAACAACAATCAA
ACCCCTGGAGCAATTTGTGGAGAAGTCGTCTGTGCCAGCCCCCTGGGTGAGCTGACCAGCCTGGATGCTCAT
GGGGAGTTTTGGTGGAGGCAGTGGCAGCAGCCCGTCTCCTCCTCTCTGTGCACTGAGCCACTGATCCCCACCA
```

```
CCCCCATCATCCCCAGTGAGGAAATGGCCAAAATTGCCTGCAGCCTGGAGACCAAGGAGCTTTGGGACAAATT  
CCATGAGCTGGGCACCGAGATGATCATCACCAAGTCGGGCAGGAGGATGTTTCCAACCATCCGGGTGTCCCTTT  
TCGGGGGTGGATCCTGAGGCCAAGTACATAGTCTGATGGACATCGTCCCTGTGGACAACAAGAGGTACCGCT  
ACGCCTACCACCGGTCTCTGGCTGGTGGCTGGCAAGGCCGACCCGCCGTTGCCAGCCAGGCTCTATGTGCA  
TCCAGATTCTCCTTTTACCGGTGAGCAACTACTCAAACAGATGGTGTCTTTTGAAAAGGTGAAACTCACCAAC  
AATGAACTGGATCAACATGGCCATATAATTTTGAAGTCAATGCATAAGTACCAGCCAAGGGTGCACATCATT  
AGAAGAAAGACCACACAGCCTCATTGCTCAACCTGAAGTCTGAAGAATTTAGAAGTTTCATCTTTCCAGAAAC  
AGTTTTTACGGCAGTCACTGCCTACCAGAATCAACTGATAACGAAGCTGAAAATAGATAGCAATCCTTTTGCC  
AAAGGATTCCGGGATTCTCCAGGCTCACTGACATTGAGAGGGAAAGTGTGGAGAGCCTGATTCAAAAAGCATT  
CCTATGCACGCTCACCCATCCGTACCTACGGAGGAGAAGAAGATGTCTTGGGGGATGAGAGTCAGACAACCC  
AAATCGAGGGTACAGCTTTACAACATCTGATAATTTGTCTCTCAGCTCCTGGGTATCATCTTCTTCCAGTTTT  
CCTGGGTTTACAGCACCCACAGTCCCTGACTGCTCTTGGCACCAGCACAGCATCCATAGCAACACCCATTCTC  
ACCCCATCCAGGGTTCTCTGCCACCATATAGCCGACTGGGAATGCCTCTGACACCATCGGCCATTGCCAGCTC  
CATGCAAGGGAGTGGCCCCACATTCCCTTCATTCCACATGCCCGGATACCATCACTATTTTACAGCAGGGGCC  
TATGCTGCCATTCAAGGACTACGCCATTCTCTGCTGTGATGACGCCATTTGTATGACAGCTGGATATC
```

Secuencia diseñada para pFastBac-mHif1-alpha

>Nsil + Promotor CMV (Human CMV early enhancer + early promoter) + BamHI + Secuencia Kozak
+ ORF mHif-1 alpha + KpnI

```
TCTAGAATGCATCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGG  
CGTTACATAAECTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATG  
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG  
CCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC  
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC  
GCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTC  
CAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTG  
TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT  
TTAGTGAACCGTCAGATCGGATCCACCTGGAGGGCGCCGGCGCGAACGACAAGAAAAAGATAAGTTCTG  
AACGTGCAAAAAGAAAAGTCTCGAGATGCAGCCAGATCTCGGCGAAGTAAAGAATCTGAAGTTTTTATGAGCT  
TGCTCATCAGTTGCCACTTCCACATAATGTGAGTTTCGCATCTTGATAAGGCCTCTGTGATGAGGCTTACCATC  
AGCTATTTGCGTGTGAGGAACTTCTGGATGCTGGTGAATTTGGATATTGAAGATGACATGAAAGCACAGATGA  
ATTGCTTTTATTTGAAAGCCTTGGATGGTTTTGTTATGGTTCTCACAGATGATGGTGCATGATTTACATTT  
TGATAATGTGAACAAAATACATGGGATTAAGTCAAGTAACTGGACACAGTGTGTTGATTTTACTCAT  
CCATGTGACCATGAGGAAATGAGAGAAATGCTTACACACAGAAATGGCCTTGTGAAAAAGGGTAAAGAAACAA  
ACACACAGCGAAGCTTTTTTCTCAGAATGAAGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAAGAACTATGAACATAAAGTC  
TGCAACATGGAAGGTATTGCACTGCACAGGCCACATTACGTATATGATACCAACAGTAACCAACCTCAGTGT  
GGGTATAAGAAACCACCTATGACCTGCTTGGTGTGATTTGTGAACCCATTCTCACCATCAAATATTGAAA  
TTCTTTAGATAGCAAGACTTTCTCAGTCGACACAGCCTGGATATGAAATTTCTTATTGTGATGAAAGAAT  
TACCGAATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAAGTCTTAGGCCGCTCAATTTATGAATATTATCATGCTTTGGAC  
TCTGATCATCTGACCAAACTCATCATGATATGTTTACTAAAGGACAAGTCACCACAGGACAGTACAGGATGC  
TTGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGGGTTGAAACTCAAGCAACTGTCATATATAACACCAAGAATTTCTCAACC  
ACAGTGCATTGTATGTGTGAATTACGTTGTGAGTGGTATTATTCAGCACGACTTGATTTTTCTCCCTTCAACAA  
ACAGAATGTGTCTTAAACCGGTTGAATCTTCAGATATGAAAATGACTCAGCTATTACCAAAAGTTGAATCAG  
AAGATACAAGTAGCCTCTTTGACAACTTAAGAAGGAACCTGATGCTTTAACTTTGCTGGCCGACCCGCTGG  
AGACACAATCATATCTTTAGATTTTGGCAGCAACGACACAGAACTGATGACCAGCAACTTGAGGAAGTACCA  
TTATATAATGATGTAATGCTCCCTCACCAACGAAAATACAGAATATAAATTTGGCAATGTCTCCATTAC  
CCACCGCTGAAACGCCAAAGCCACTTCGAAGTAGTGCTGACCCTGCACTCAATCAAGAAGTTGCATTAATAAT  
AGAACCAATCCAGAGTCACTGGAAGTTCTTTTACCATGCCCCAGATTACAGGATCAGACACCTAGTCCTTCC  
GATGGAAGCACTAGACAAAAGTTCACCTGAGCCTAATAGTCCCAGTGAATATTGTTTTTATGTGGATAGTGATA
```

TGGTCAATGAATTCAAGTTGGAATTGGTAGAAAACTTTTTGCTGAAGACACAGAAGCAAAGAACCCATTTTC
TACTCAGGACACAGATTTAGACTTGGAGATGTTAGCTGCTTATATCCCAATGGATGATGACTTCCAGTTACGT
TCCTTCGATCAGTTGTCACCATTAGAAAGCAGTTCGCAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCCTCAAAGCACAGTTA
CAGTATTCAGCAGACTCAAATACAAGAACCTACTGCTAATGCCACCCTACCCTGCCACCCTGATGAATT
AAAAACAGTGACAAAAGACCGTATGGAAGACATTAATAATATTGATTGCATCTCCATCTCTACCCACATACAT
AAAGAACTACTAGTGCCACATCATCACCATATAGAGATACTCAAAGTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGCAG
GAAAAGGAGTCATAGAACAGACAGAAAAATCTCATCCAAGAAGCCCTAACGTGTTATCTGTGCTTTGAGTCA
AAGAACTACAGTTCTGAGGAAGAATAAATCCAAAGATACTAGCTTTGCAGAATGCTCAGAGAAAAGCGAAAA
ATGGAACATGATGGTTCACTTTTTCAAGCAGTAGGAATTGGAACATTATTACAGCAGCCAGACGATCATGCAG
CTACTACATCACTTTCTTGGAAACGTGTAAGGATGCAAATCTAGTGAACAGAATGGAATGGAGCAAAAAGAC
AATTATTTTAATACCCTCTGATTTAGCATGTAGACTGCTGGGGCAATCAATGGATGAAAAGTGGATTACCACAG
CTGACCAGTTATGATTGTGAAGTTAATGCTCTATAACAAGGCAGCAGAAAACCTACTGCAGGGTGAAGAATTAC
TCAGAGCTTTGGATCAAGTTAACTGAGGTACC

Secuencia diseñada para pFastBac-Meis

> XhoI + Promotor CMV (Human CMV early enhancer + early promoter) + SalI + Secuencia Kozak +
ORF meis1 humano (NM_002398.3) + KpnI

CTCGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTAC
ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTAT
GTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTG
GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
ACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCTAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG
GGAGGTCTATACGTCGACACCTGGCGCAAAGGTACGACGATCTACCCATTACGGGGCATGGATGGAGTAG
GCATCCCCTCCACGATGTATGGGGACCCGCATGCAGCCAGGTCCATGCAGCCGGTCCACCACCTGAACCACGG
GCCTCCTCTGCACTCGCATCAGTACCCGCACACAGCTCATACCAACGCCATGGCCCCCAGCATGGGCTCCTCT
GTCAATGACGCTTTAAAGAGAGATAAAGATGCCATTTATGGACACCCCTCTTCCCTCTCTTAGCACTGATTT
TTGAGAAATGTGAATTAGCTACTTGTACCCCCGCGAGCCGGGGTGGCGGGCGGGACGCTCTGCTCGTCAGA
GTCATTCAATGAAGATATAGCCGTGTTCCGCAACAGATTCGCGCAGAAAAACCTCTATTTTCTTCTAATCCA
GAACTGGATAACTTGATGATTCAAGCCATACAAGTATTAAGGTTTCATCTATTGGAATTAGAGAAGGTACACG
AATTATGTGACAATTTCTGCCACCGGTATATTAGCTGTTTGAAGGGAAAAATGCCTATCGATTTGGTGATAGA
CGATAGAGAAGGAGGATCAAAATCAGACAGTGAAGATATAACAAGATCAGCAAATCTAACTGACCAGCCCTCT
TGAACAGAGATCATGATGACACGGCATCTACTCGTTCAGGAGGAACCCAGGCCCTTCCAGCGGTGGCCACA
CGTCACACAGTGGGACAACAGCAGTGAGCAAGGTGATGGCTTGGACAACAGTGTAGCTTCCCCAGCACAGG
TGACGATGATGACCCTGATAAGGACAAAAAGCGTCACAAAAAGCGTGGCATCTTTCCAAAAGTAGCCACAAAT
ATCATGAGGGCGTGGCTGTTCCAGCATCTAACACACCCTTACCCTTCTGAAGAACAGAAAAAGCAGTTGGCAC
AAGACACGGGACTCACCATCCTTCAAGTGAACAATTGGTTTATTAATGCCCGGAGAAGAATAGTGCAGCCAT
GATAGACCAGTCCAACCGAGCAGTAAGTCAAGGAACACCTTATAATCCTGATGGACAGCCATGGGAGGTTTC
GTAATGGACGGTCAGCAACATATGGGAATTAGAGCACCAGGACCTATGAGTGGAAATGGGCATGAATATGGGCA
TGGAGGGGCGAGTGGCACTACATGTAAAGGTACC

Secuencia diseñada para pFastBac-shRNA-A y pFastBac-shRNA-B

> XhoI + Promotor U6 + shRNA-A Anti meis1 + terminador + KpnI

```
CTCGAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTG
TTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTA
ATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGA
AAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGCGGGATCCGGTGATAGACGATAGAGAATT
GGATCCAATTCTCTATCGTCTATCACC TTTTTTGGTACC
```

> XhoI + Promotor U6 + shRNA-B Anti meis1 + terminador + KpnI

```
CTCGAGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTG
TTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTA
ATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGA
AAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGCGGGATCCGGCATCTACTCGTTCAGGATC
AAGAGTCCTGAACGAGTAGATGCC TTTTTTGGTACC
```

Resultados C: BacMam con mayor poder de transducción

Obtención de promotores de *ie1* y *gp64*, y del ORF del gen *vsv-g*

Los promotores de los genes *ie1* (662 pb) y *gp64* (272 pb) de AcMNPV se amplificaron mediante PCR utilizando los *primers* **Fw.pIE1, Rv.pIE1** y **Fw.pGP64, Rv.pGP64**, respectivamente, y el genoma viral de AcMNPV como molde (**Figura 45**). Los amplicones obtenidos se ligaron al plásmido tipo TOPO pEasy-T1 (**TransGen Biotech**), y se transformaron por *shock* térmico en competentes químicas de bacterias *E. coli TOP10*. Las colonias de interés fueron identificadas en función de su color al crecer en un medio suplementado con X-Gal e IPTG. La dirección del clonado e identidad de los clones obtenidos se verificó mediante la realización de mapas físicos, empleando la enzima *AseI* para el caso de *ie1* (registrándose fragmentos de 2706, 1235 y 591 pb para la primera orientación, y 2854, 1235 y 591 pb para la segunda), y *BstHI* para el de *gp64* (registrándose fragmentos de 2876 y 1325 pb en la primera orientación, y 2982 y 1219 pb para la segunda). De esta forma, fueron generadas las siguientes construcciones: pEasy-IE1 y pEasy-GP64.

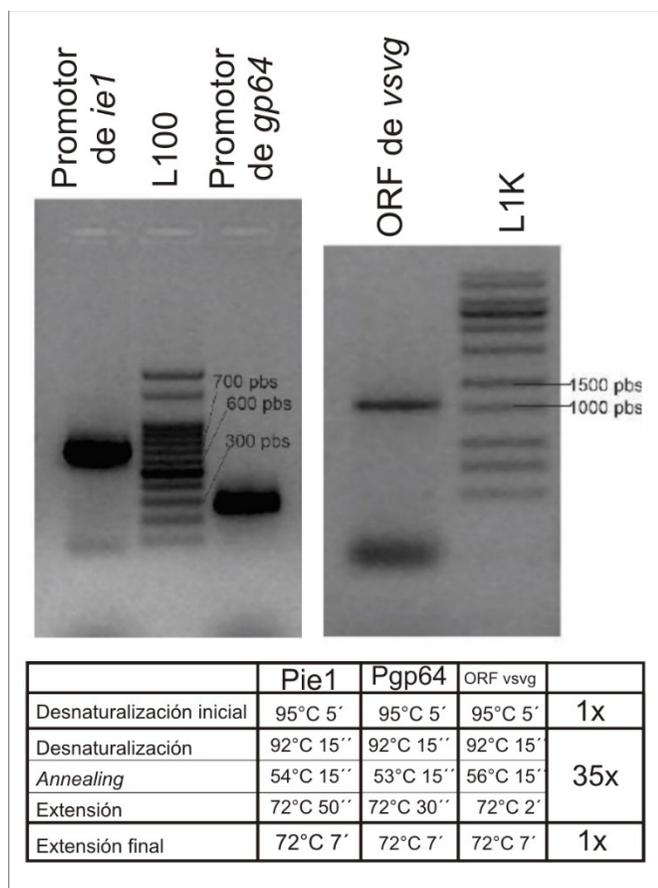


Figura 45. Amplificación por PCR de los promotores de los genes *ie-1* y *gp64* de AcMNPV y del ORF del gen *vsv-g*. **(Izquierda):** PCR sobre el virus AcMNPV con los *primers* Fw.pIE1, Rv.pIE1 para amplificar el promotor *ie-1*. (Amplificación esperada: 662 pb).y con los *primers* Fw.pGP64, Rv.pGP64 para amplificar el promotor *gp64*. (Amplificación esperada: 272 pb). **(Derecha)** PCR sobre el plásmido pCAG-VSVG con los *primers* Fw.pIE1, Rv.pIE1 para amplificar el ORF *vsv-g* (Amplificación esperada: 1567 pb). En la tabla se muestran los perfiles de ciclado utilizados para cada PCR. En todas las imágenes, se muestran electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñidas con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV. L1K: Ladder 1kpb Plus, L100: Ladder 100pb.

El ORF del gen *vsv-g* fue recuperado mediante PCR (1567 pb), utilizando los *primers* **FwVSVG** y **RvVSVG** y el plásmido pCAG-VSVG (**Addgene**) como molde (**Figura 45**). El amplicón obtenido se ligó al plásmido pFastBac-CMV-GFP, previamente linealizado con la enzima PvuII. Dicha ligación se transformó por electroporación en *E. coli TOP10*. Los clones de interés se determinaron por retardo electroforético. La dirección de clonado e identidad de los clones obtenidos se verificó mediante la realización de un mapa físico por digestión enzimática con la enzima EcoRV, obteniéndose un fragmento de 1373 pb y otro de 6699 pb, en el caso de la dirección correcta. De esta forma, se obtuvo al plásmido pFB PromP10/VSVG.

Clonado de GFP bajo los promotores de *ie1* y *gp64* en pFastBac-Dual

Los vectores pEasy-IE1 y pEasy-GP64 contando con los promotores virales *ie1* y *gp64* respectivamente, se digirieron con las enzimas HindIII y BamHI, a fin de abrir el vector y permitir el posterior clonado del ORF de GFP. Para recuperar dicho ORF, se efectuó una digestión del plásmido pFastBac-CMV-GFP con las enzimas HindIII y BglII, y se recuperó el fragmento de 765 pb. Este fue ligado a los plásmidos pEasy-IE1 (HindIII/BamHI) y pEasy-GP64 (HindIII/BamHI) y, posteriormente, se transformó por electroporación a *E. coli TOP10*. Las construcciones resultantes fueron luego digeridas con las enzimas HindIII y XhoI, recuperando un fragmento correspondiente a pIE1-GFP y otro correspondiente a pGP64-GFP (siendo de 1421 pb para el caso de *ie1*, y 1031 pb para el caso de *gp64*), los cuales fueron ligados al plásmido pFastBac-Dual (**Invitrogen**), previamente linealizado con las mismas enzimas (**Figura 46**) y transformados por electroporación en *E. coli TOP10*. Así, se obtuvieron las construcciones finales (pFastBacProm.*ie1*/GFP y pFastBacProm.Gp64/GFP), las cuales fueron identificadas por retardo electroforético, y la realización de mapas físicos empleando la enzima AseI, esperando fragmentos de 3413, 1601 y 1257 pb para el primer caso, y de 3157, 1466 y 1257 pb para el segundo caso (**Figura 47**). Para el promotor de *p10* no fue requerido un clonado molecular, ya que se contaba previamente con un baculovirus compatible con los objetivos del trabajo.

Los plásmidos pFastBacProm.*ie1*/GFP y pFastBacProm.Gp64/GFP se transformaron por *shock* térmico en *E. coli DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo los bácmidos recombinantes AcProm.*ie1*/GFP y AcProm.GP64/GFP. Se realizaron mini-preparaciones de los bácmidos recombinantes, y se transfectaron con el reactivo PEI en células de insecto Sf9 en placas de 6 *wells* para generar partículas virales.

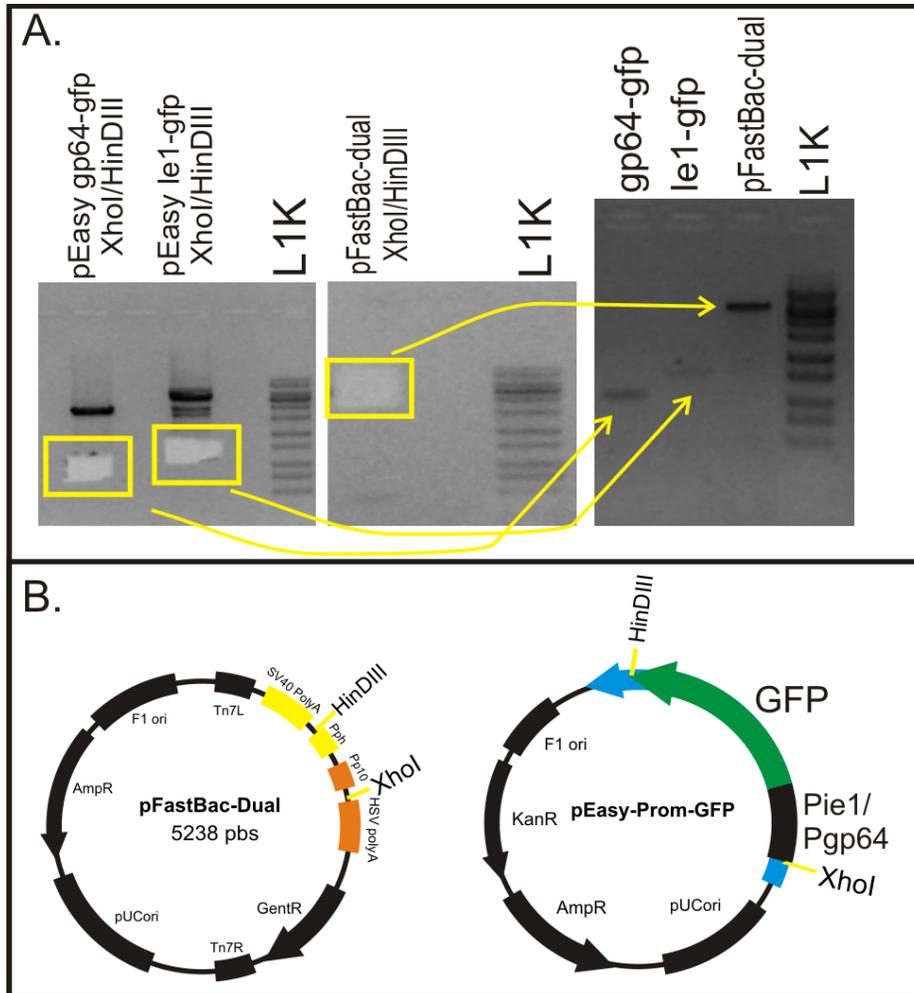


Figura 46. Clonado molecular de los plásmidos pFastBacProm.le-1/GFP y pFastBacProm.Gp64/GFP (A) Se muestran electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñidas con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV de la etapa final del clonado para obtener dichos plásmidos. En amarillos se remarcan los fragmentos pertenecientes a ple-1-gfp (XhoI/HinDIII), pGp64-gfp (XhoI/HinDIII) y pFastBac-Dual (XhoI/HinDIII) mostrando con flechas las purificaciones por *kit* de cada uno de esos fragmentos. **(B)** Esquemas de los plásmidos digeridos mostrando los sitios de corte para las enzimas XhoI y HinDIII. L1K: Ladder 1kpb Plus.

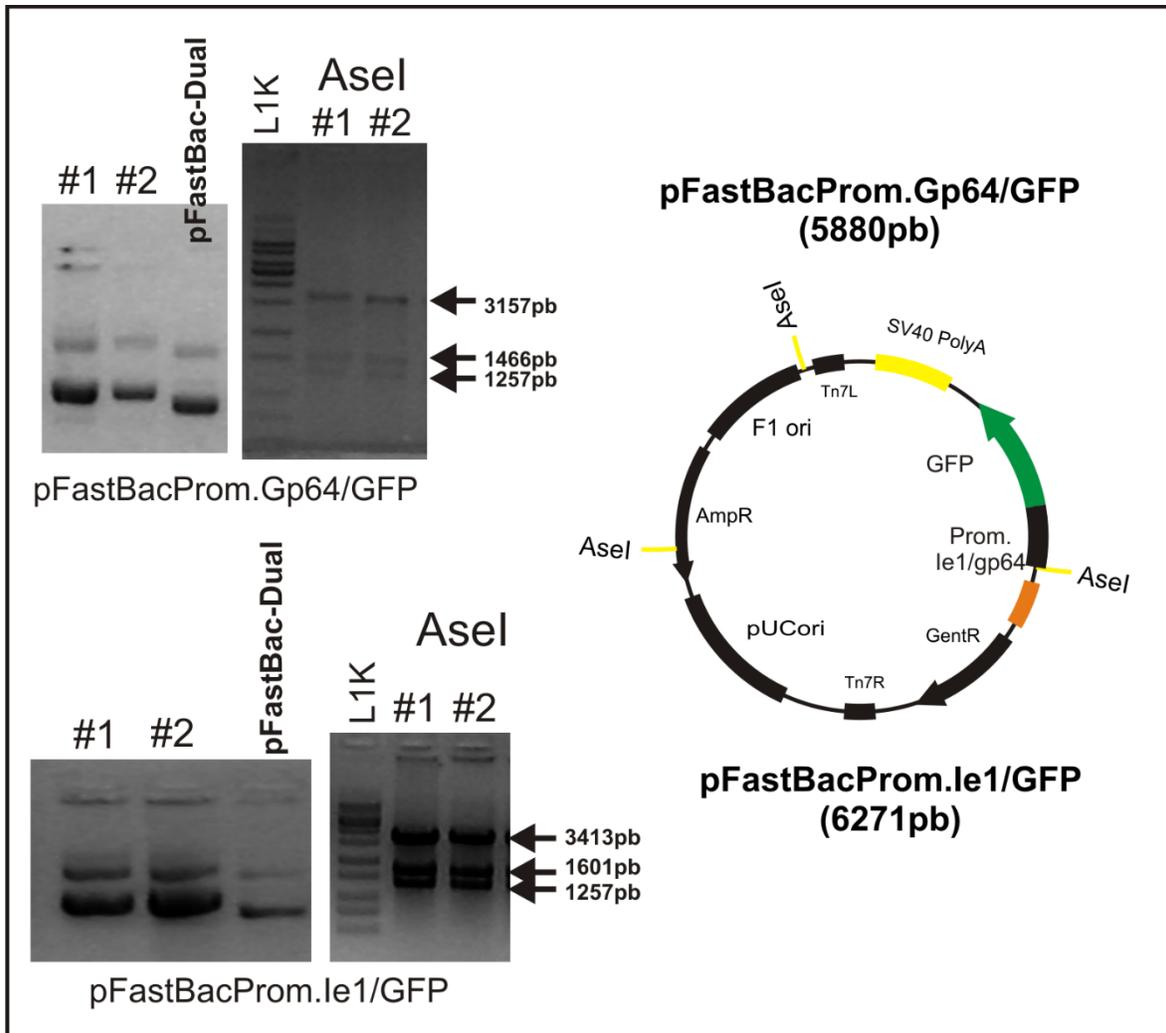


Figura 47. Clonado molecular de los plásmidos pFastBacProm.le-1/GFP y pFastBacProm.Gp64/GFP. Se muestran electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñidas con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV de minipreparaciones de los plásmidos pFastBacProm.le-1/GFP y pFastBacProm.Gp64/GFP, y digestiones de los mismos con la enzima AseI. Las flechas negras indican los fragmentos obtenidos por dicha digestión, indicando sus tamaños. El esquema de la derecha muestra a ambos plásmidos indicando los sitios de corte de la enzima AseI. L1K: *Ladder 1kpb Plus*.

Clonado del gen *vsv-g* bajo los promotores *p10*, *ie1* y *gp64*

El plásmido pFastBac.Prom.P10/VSVG, conteniendo el ORF de la proteína viral VSV-G bajo el promotor *p10*, generado anteriormente, fue digerido con la enzima BamHI (**Thermo Fisher Scientific**), a fin de eliminar el promotor y linealizar el vector (registrando un tamaño de 7756 pb). Paralelamente, también fueron digeridas con la misma enzima las construcciones correspondientes al plásmido pEasy-IE1 y pEasy-GP64, con el fin de liberar los fragmentos correspondientes a los promotores *ie1* y *gp64* (registrando tamaños de interés de 698 y 308 pb, respectivamente). Estos fueron ligados al vector linealizado, y luego fueron transformados por electroporación en *E. coli TOP10*. Así, se obtuvieron las construcciones finales pFastBac.Prom.Ie-1/VSVG y pFastBac.Prom.Gp64/VSVG. Para determinar la direccionalidad del clonado molecular, en ambos casos se procedió a la realización de un mapa físico con la enzima Aval (**Fermentas**), dando como resultado fragmentos de 5173, 3017 y 264 pb para la construcción deseada correspondiente a *ie1*, y de 5173, 2627 y 264 pb para *gp64*. También se realizaron ensayos de PCR empleando un *primer* específico del promotor, y otro del ORF de VSV-G. La región de los plásmidos pFastBac.Prom.Ie-1/VSVG, pFastBac.Prom.Gp64/VSVG y pFastBac.Prom.P10/VSVG correspondiente a los promotores, y al ORF de *vsv-g*, se secuenciaron por el método automático de Sanger (**Macrogen**) utilizando los *primers* **RvCMV** y **FwVSVG** (**Figura 48**).

Los plásmidos pFastBac.Prom.Ie-1/VSVG, pFastBac.Prom.Gp64/VSVG y pFastBac.Prom.P10/VSVG se transformaron por *shock* térmico en *E. coli DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo los bácmidos recombinantes AcProm.Ie1/VSVG, AcProm.GP64/VSVG y AcProm.P10/VSVG. Se realizaron mini-preparaciones de los bácmidos recombinantes, y se transfectaron luego con el reactivo PEI en células de insecto Sf9 en placas de 6 *wells* para generar partículas virales.

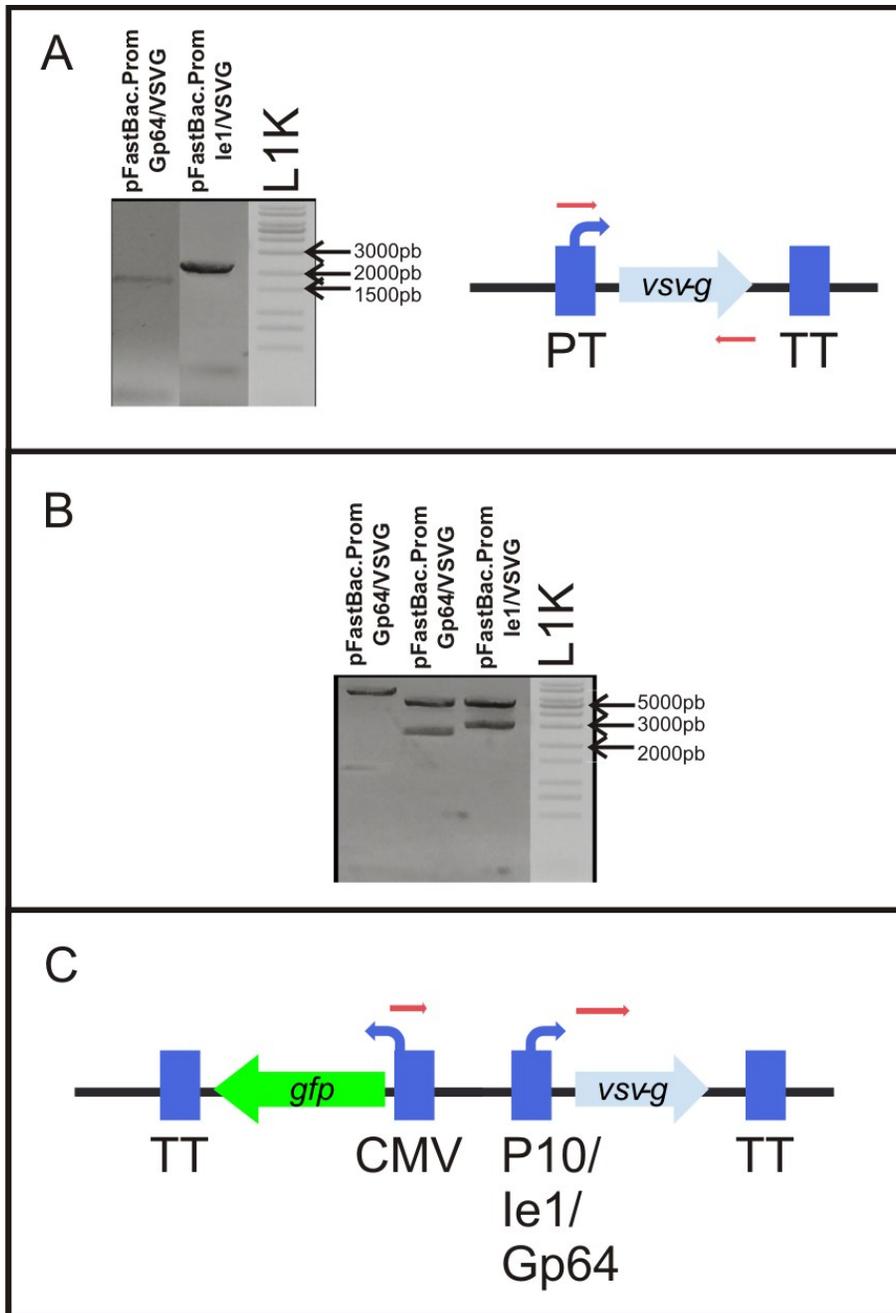


Figura 48. Clonado molecular de los plásmidos pFastBacProm.Ie1/VSVG y pFastBacProm.Gp64/VSVG. (A) Se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñida con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV de las PCR realizadas para genotipificar los plásmidos pFastBacProm.Ie1/VSVG y pFastBacProm.Gp64/VSVG, más un esquema en el que se muestran los sitios de hibridación de los *primers* utilizados. **(B)** Se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñida con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV de las digestiones realizadas a los plásmidos pFastBacProm.Ie1/VSVG, pFastBacProm.Gp64/VSVG y pFastBacPromP10/VSVG con la enzima *Ava*I. **(C)** Esquema mostrando los *primers* utilizados para la secuenciación por el método de Sanger de los plásmidos pFastBacProm.Ie1/VSVG, pFastBacProm.Gp64/VSVG y pFastBacPromP10/VSVG. TT = terminador de transcripción.

Resultados D: BacMam con efecto terapéutico más duradero

Diseño de secuencias necesarias a sintetizar

Las secuencias necesarias para la generación de los circuitos génicos productores de minicírculos usando la tecnología Cre/LoxP y *ministrings* usando la tecnología Telomerasa/TelLR, y un circuito de inducción por tetraciclina de la expresión basado en la tecnología TetON/TetOFF se diseñaron *in silico* y se compraron a la empresa **GeneUniversal** (Newark, DE, USA) encargada de la síntesis de dichas secuencias y de clonarlas en el vector pUC57 dando lugar a los plásmidos pUC57-1A, pUC57-1B, pUC57-2, pUC57-3 (Figura 49).

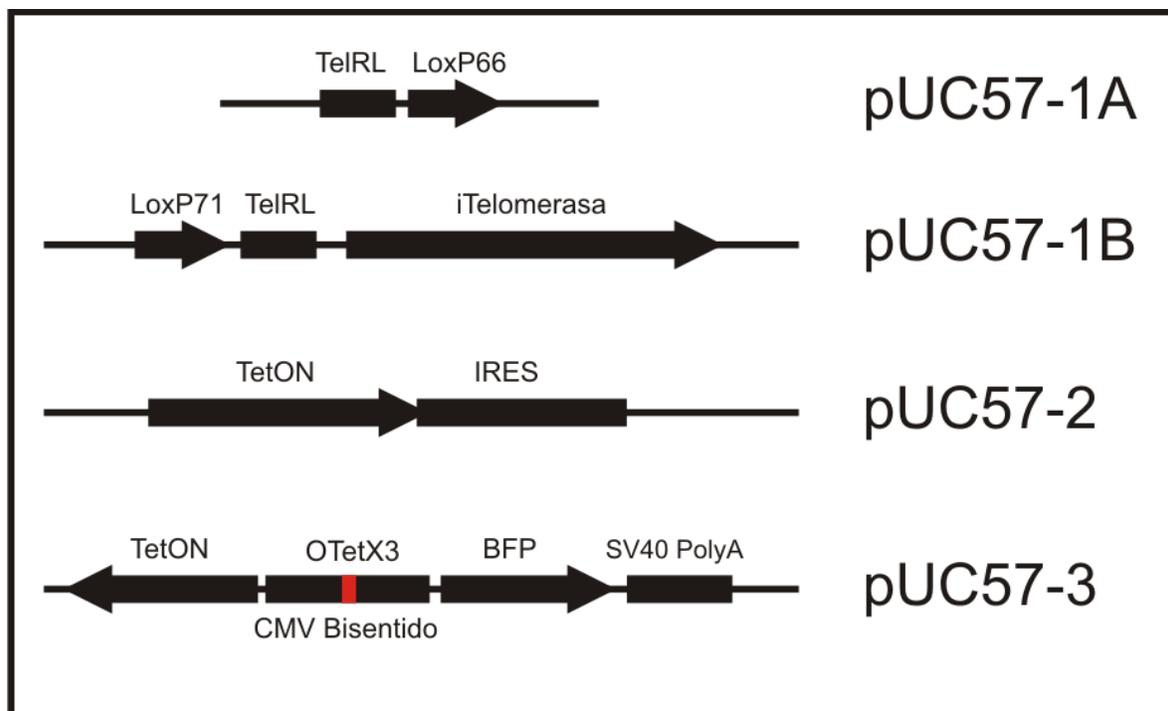


Figura 49: Ilustración mostrando las secuencias de DNA compradas a la empresa GeneUniversal las cuales se clonaron en el vector pUC57

>pUC57-1A Contiene las secuencias **TeIRL** y **LoxP66** colonda entre los sitios SacI y BamHI del vector de clonado pUC57

GAGCTCGAAGACCCCGGGTATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGGTATAATGGACTATTGTGTGCTGAT
AATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAACGGTAGGATCC

>pUC57-1B Contiene las secuencias **LoxP71** y **TeIRL** mas el **ORF de iTelomerasa** (Con los codones cambiados para su expresión en células de mamíferos + una secuencia de localización nuclear) clonada entre los sitios EcoRV y HindIII del vector de clonado pUC57

GGATCCTCATGATGATCAGATATCAGCGCTTACCGTTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTATCAGCAC
ACAATTGCCCATTTATACGCGCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA GAATTCAGGCCTGGTACCATGAGCAA
GGTGAAGATCGGGCAGCTGATCAACACCCTGGTGAACGAGGTGGAGGCCATCGACGCCAGCGACCGCCCCAG
GGCGACAAGACCAAGCGCATCAAGGCCGCCGCCGCCCTACAAGAACGCCCTGTTCAACGACAAGCGCAAGT
TCCGCGCAAGGGCCTGCAGAAGCGCATCACCGCCAACACCTTCAACGCCTACATGAGCCGCGCCCCGCAAGCG
CTTCGACGACAAGCTGCACCACAGCTTCGACAAGAACATCAACAAGCTGAGCGAGAAGTACCCCCGTACAGC
GAGGAGCTGAGCAGCTGGCTGAGCATGCCACCGCCAACATCCGCCAGCACATGAGCAGCCTGCAGAGCAAGC
TGAAGGAGATCATGCCCCGGCCGAGGAGCTGAGCAACGTGCGCATCGGCAGCAAGGGCAGCGACGCCAAGAT
CGCCCCGCTGATCAAGAAGTACCCCCGACTGGAGCTTCGCCCTGAGCGACCTGAACAGCGACGACTGGAAGGAG
CGCCCGACTACCTGTACAAGCTGTTCCAGCAGGGCAGCGCCCTGCTGGAGGAGCTGCACCAGCTGAAGGTGA
ACCACGAGGTGCTGTACCACCTGCAGCTGAGCCCCGCCGAGCGCACCAGCATCCAGCAGCGCTGGGCCGACGT
GCTGCGCGAGAAGAAGCGCAACGTGGTGGTGTGACTACCCACCTACATGCAGAGCATCTACGACATCCTG
AACAACCCCGCCACCCTGTTACGCCTGAACACCCGACGCGGCATGGCCCCCTGGCCTTCGCCCTGGCCGCCG
TGAGCGGCCGCCCATGATCGAGATCATGTTCCAGGGCGAGTTCGCCGTGAGCGGCAAGTACACCCTGAACTT
CAGCGGCCAGGCCAAGAAGCGCAGCGAGGACAAGAGCGTGACCCGACCATCTACACCCTGTGCGAGGCCAAG
CTGTTTCGTGGAGCTGCTGACCGAGCTGCGCAGCTGCAGCGCCGCCAGCGACTTCGACGAGGTGGTGAAGGGCT
ACGGCAAGGACGACACCCGACGCGAGAACGGCCGCATCAACGCCATCCTGGCCAAGGCCTTCAACCCCTGGGT
GAAGAGCTTCTTCGGCGACGACCGCCCGCTGTACAAGGACAGCCGCGCCATCTACGCCCGCATCGCCTACGAG
ATGTTCTTCGCGTGGACCCCCGCTGGAAGAAGCTGGACGAGGACGTGTTCTTCATGGAGATCCTGGGCCACG
ACGACGAGAACACCCAGCTGCACTACAAGCAGTTCAGCTGGCCAACCTTCAGCCGCACCTGGCGCCCCGAGGT
GGCGACGAGAACACCCGCTGGTGGCCCTGCAGAAGCTGGACGACGAGATGCCCGCTTCGCCCGCGGCGAC
GCCGGCGTGCCTGCACGAGACCGTGAAGCAGCTGGTGGAGCAGGACCCAGCGCCAAGATCACCAACAGCA
CCCTGCGCGCCTTCAAGTTCAGCCCCACCATGATCAGCCGCTACCTGGAGTTCGCCCGCGACGCCCTGGGCCA
GTTTCGTGGGCGAGAACGGCCAGTGGCAGCTGAAGATCGAGACCCCGCCATCGTGTGCCCCGACGAGGAGAGC
GTGGAGACCATCGACGAGCCGACGACGAGAGCCAGGACGACGAGCTGGACGAGGACGAGATCGAGCTGGACG
AGGGCCCGCGGACGAGCCACCCGAGGAGGAGGGCCCCGAGGAGCACCAGCCACCGCCCTGAAGCCCGTGT
CAAGCCCGCGAAGAACAACGGCGACGGCACCTACAAGATCGAGTTCGAGTACGACGGCAAGCACTACGCCTGG
AGCGCCCCCGACAGCCCCATGGCCGCCATGCGCAGCGCCTGGGAGACCTACTACAGCCCCAAGAAGAAGA
GGAAAGTCTAAACTAGTAAGCTT

>pUC57-2 Contiene las secuencias **TetON3G-IRES (de virus EMCV)** clonada entre los sitios EcoRI-SphI del vector pUC57

GAATTCGAGCTCGTCGACGGATCCACCATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAGTCATAAACTCTGCTCTGGAAT
TACTCAATGGAGTCGGTATCGAAGGCCTGACGACAAGGAACTCGCTCAAAAGCTGGGAGTTGAGCAGCCTAC
CCTGTACTGGCACGTGAAGAACAAGCGGGCCCTGCTCGATGCCCTGCCAATCGAGATGCTGGACAGGCATCAT
ACCCACTCCTGCCCCCTGGAAGGCGAGTCATGGCAAGACTTCTGCGGAACAACGCCAAGTCATAACCGCTGTG
CTCTCCTCTCACATCGCGACGGGGCTAAAGTGCATCTCGGCACCCGCCAACAGAGAAACAGTACGAAACCTT
GGAAAATCAGCTCGCGTTCCTGTGTGTCAGCAAGGCTTCTCCCTGGAGAACGCACTGTACGCTCTGTCCGCCGTG
GGCCACTTTACACTGGGCTGCGTATTGGAGGAACAGGAGCATCAAGTAGCAAAAGAGGAAAGAGAGACACCTA
CCACCGATTCTATGCCCCACTTCTGAAACAAGCAATTGAGCTGTTGACCCGGCAGGGAGCCGAACCTGCCTT
CCTTTTCGGCCTGGAATAATCATATGTGGCCTGGAGAAACAGCTAAAGTGCAGAAAGCGGGCGGGCCGACCGAC
GCCCTTGACGATTTTACTTAGACATGCTCCCAGCCGATGCCCTTGACGACTTTGACCTTGATATGCTGCCTG
CTGACGCTCTTGACGATTTTACTTGACATGCTCCCCGGGTAA GCGGCCGC CCCCTCTCCCTCCCCCCCCC
TAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTG
CCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCC
CTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACA
AACAACGTCTGTAGCGACCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAG
CCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCACTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAA
GAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAAGGTACCCCATTTGTATGGG
ATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTGTGAGGTTAAAAAACGTTCTAGGCCCCCCGA
ACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAATATGGCCACAACCATG GACTAGTGAGCTCGCA

TGC

>pUC57-3 Contiene las secuencias del ORF de **iCre (+terminador SV40 PolyA)** y **BFP** bajo el promotor bidireccional de **CMV** conteniendo las secuencias operadoras **OTet3X** clonada entre los sitios EcoRI y HindIII del vector pUC57

```

GAATTTCGCATGCTCATGCATC TAATTAAGCTTGTGCCCCAGTTTGTAGGGAGGTTCGCAGTATCTGGCCACTG
CCACCTCGTGCTGCTCGACGTAGGTCTCGTTGTTGGCCTCCTTGATTCTTTCCAGTCTGTAGTCCACATAGTA
GACGCCAGGCATCTTGAGGTTCTTAGCGGGTTTCTTGGATCTATATGTGGTCTTGATGTTTGCATCAGATGG
CTCCCGCCACGAGCTTCAGGGCCATGTCGTTTCTGCCTTCCAGGCCGCCGTCAGCGGGGTACAGCGTCTCGG
TGAAGGCCCTCCCAGCCGAGTGTTTTCTTCTGCATCACAGGGCCGTTGGATGTGAAGTTCACCCCTCTGATCTT
GACGTTGTAGATGAGGCAGCCGTCCTGGAGGCTGGTGTCTGGGTAGCGGTGAGCAGCCCCCGTCTTCGTAT
GTGGTGACTCTCTCCCATGTGAAGCCCTCAGGGAAGGACTGCTTGAAGAAGTCGGGGATGCCCTGGGTGTGGT
TGATGAAGGTCTTGCTGCCGTAGAGGAAGCTAGTAGCCAGGATGTGGAAGGCGAAGGGGAGAGGGCCGCCCTC
GACCACCTTGATTCTCATGGTCTGGGTGCCCTCGTAGGGCTTGCCTTCGCCCTCGGATGTGCACTTGAAGTGA
TGGTTGTCCACGGTGCCCTCCATGTACAGCTTCATGTGCATGTTCTCCTTAATCAGCTCGCTCATGGTGGATC
CGGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTACACGCCACCTCGACATACTC
GAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGAAGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGCAG
ACTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATAAGGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGACCA
GTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATCTACAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATATCCAG
TTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATAAGCTTTAGGCGTGTACGGTGGGCGCCTATAAAAGCAGAGCTC
GTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGCAATTCACAACACTTTTGTCTTATAACCAACTTTCCGTACCACTT
CCTACCCTCGTAAA GGTACC ATGGTGCCCAAGAAGAAGAGGAAAAGTCTCCAACCTGCTGACTGTGCACCAAAA
CCTGCCTGCCCTCCCTGTGGATGCCACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAACCTGATGGACATGTTTCAGGGACAGG
CAGGCCTTCTCTGAACACACCTGGAAGATGCTCCTGTCTGTGTGCAGATCCTGGGCTGCCTGGTGAAGCTGA
ACAACAGGAAATGGTTCCCTGCTGAACCTGAGGATGTGAGGGACTACCTCCTGTACCTGCAAGCCAGAGGCCT
GGCTGTGAAGACCATCCAACAGCACCTGGGCCAGCTCAACATGCTGCACAGGAGATCTGGCCTGCCTCGCCCT
TCTGACTCCAATGCTGTGTCCCTGGTGTGAGGAGAATCAGAAAAGGAGAATGTGGATGCTGGGGAGAGAGCCA
AGCAGGCCCTGGCCTTTGAACGCACTGACTTTGACCAAGTCAGATCCCTGATGGAGAACTCTGACAGATGCCA
GGACATCAGGAACCTGGCCTTCCCTGGGCATTGCCTACAACACCCTGCTGCGCATTGCCGAAATTTGCCAGAATC
AGAGTGAAGGACATCTCCCGCACCGATGGTGGGAGAATGCTGATCCACATTGGCAGGACCAAGACCCTGGTGT
CCACAGCTGGTGTGGAGAAGGCCCTGTCCCTGGGGGTTACCAAGCTGGTGGAGAGATGGATCTCTGTGTCTGG
TGTGGCTGATGACCCCAACAACCTACCTGTTCTGCCGGGTGAGAAAAGAATGGTGTGGCTGCCCCCTTCTGCCACC
TCCCAACTGTCCACCCGGGCCCTGGAAGGGATCTTTGAGGCCACCCACCGCTGATCTATGGTGCCAAGGATG
ACTCTGGGCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGCCACTCTGCCAGAGTGGGTGCTGCCAGGGACATGGCCAGGGC
TGGTGTGTCCATCCCTGAAATCATGCAGGCTGGTGGCTGGACCAATGTGAACATTGTGATGAACTACATCAGA
AACCTGGACTCTGAGACTGGGGCCATGGTGAGGCTGCTCGAGGATGGGGACTGAATTCTAGACTTCATAATCA
GCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAA
AATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA
AATTCACAAATAAAGCATTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAG
GTCGACCTGCAGAAGCTT

```

Clonado de p-iCre-Inducible

El gen de mCherry se amplificó por PCR utilizando los *primers* **FwBSTXI-mCHERRY y RvSpeI-mCHERRY** y se clonó en el vector pGMT dando lugar al plásmido pGMT-mCherry. Mientras que el promotor de CMV se amplificó por PCR utilizando los *primers* **FwCMV-XhoI y RvCMV-BamHI** dando lugar al plásmido pGMT-CMV. **(Figura 50)** El plásmido pGMT-mCherry digirió con las enzimas BstXI y SpeI y se clonó entre los mismos sitios del vector pUC57-2, dando lugar al plásmido pUC57-2-mCherry **(Figura 51)**. A continuación se le clonó entre los sitios BamHI/SalI el promotor de CMV el cual fue liberado del vector pGMT-CMV con las enzimas BamHI/XhoI dando lugar al plásmido pUC57-CMV-TetON-IRES-mCherry. **(Figura 52)**.

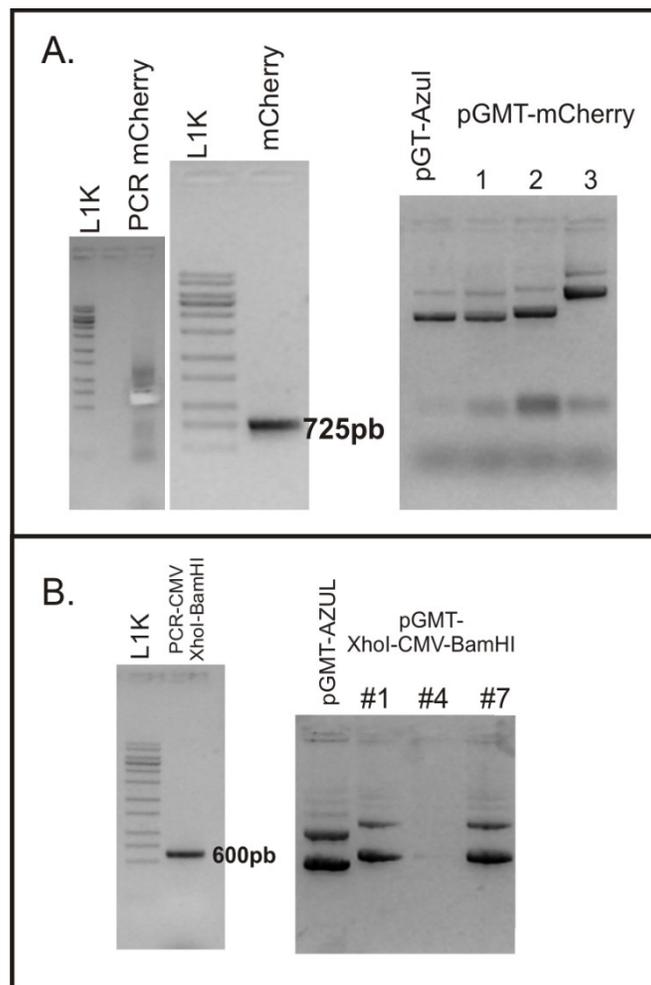


Figura 50: Clonado molecular para la generación de los plásmidos pGMT-CMV y pGMT-mCherry .A. Reacción de PCR utilizando los *primers* FwBSTXI-mCHERRY y RvSpeI-mCHERRY y el plásmido pFastBac-CMV-mCherry como molde para amplificar el ORF de la proteína reportera de mCherry y su clonado en el vector pGMT. **B.** Reacción de PCR utilizando los *primers* FwCMV-XhoI y RvCMV-BamHI y el plásmido pFastBac-CMV-mCherry como molde para amplificar el promotor de CMV y su clonado en el vector pGMT. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL. y exposición a luz UV. L1K = Ladder 1kbp plus.

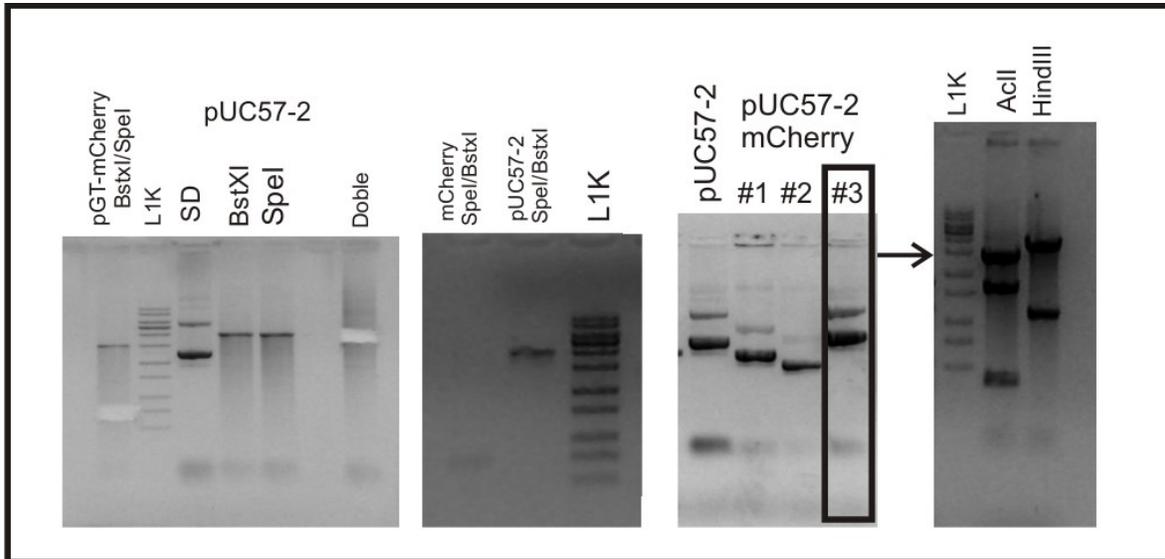


Figura 51: Clonado molecular para la generación del plásmido pUC57-2-mCherry. A la izquierda se muestran las digestiones de los plásmidos pUC57-2 y pGMT-mCherry con las enzimas BstXI y SpeI y las purificaciones de los fragmentos cortados a partir del primer gel. A la derecha se muestran las minipreparaciones obtenidas de la transformación en *E. coli* TOP10 de la ligación de esos fragmentos, remarcándose el clon 3 el cual se digirió con las enzimas AclI y HindIII para verificar su identidad. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL y exposición a luz UV. L1K = *Ladder* 1kbp plus.

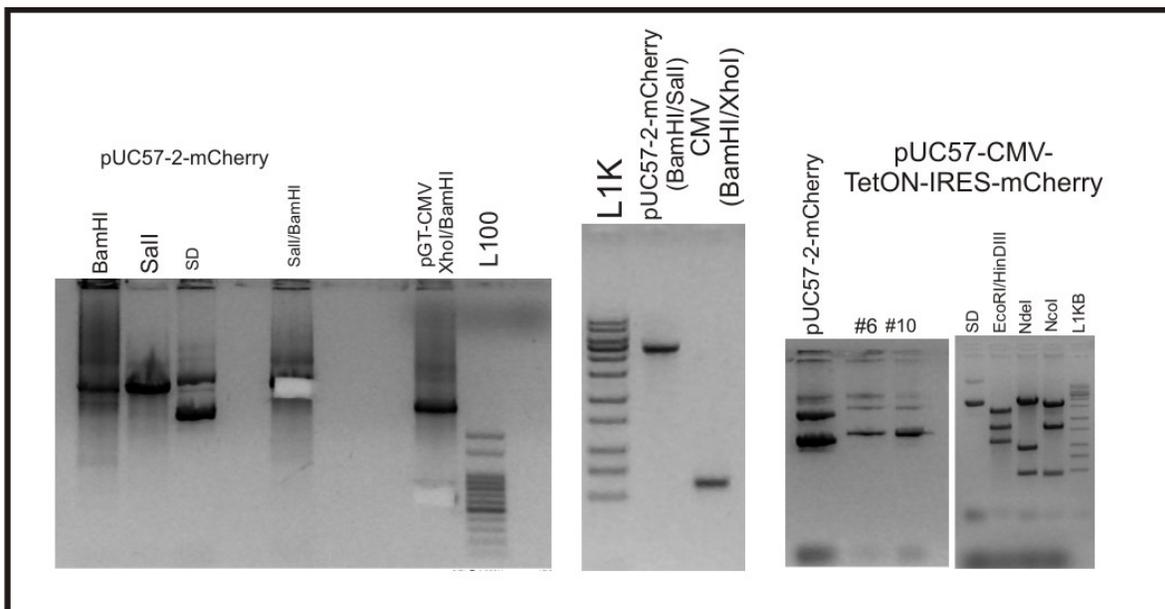


Figura 52: Clonado molecular para la generación del plásmido pUC57-CMV-TetON-IRES-mCherry. Se muestra el clonado del promotor de CMV obtenido por digestión del plásmido pGMT-CMV con las enzimas XhoI y BamHI entre los sitios SalI y BamHI del plasmido pUC57-2-mCherry. Los clones con retardo electroforético obtenidos (pUC57-CMV-TetON-IRES-mCherry) y la digestión de uno de estos con las enzimas EcoRI/HindIII (2631pb, 1597pb y 1091pb), NdeI (3914pb, 944pb y 465pb) y NcoI (3310pb, 1578pb y 435pb) para corroborar su identidad. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL y exposición a luz UV. L1K = *Ladder* 1kbp plus. L100 = *Ladder* 100pb. SD = Sin digerir.

El plásmido pUC57-CMV-TetON-IRES-mCherry se digirió con las enzimas EcoRI y SpeI liberando el fragmento -CMV-TetON-IRES-mCherry- el cual se clono entre los sitios EcoRI y XbaI del vector pFastBac-Dual dando lugar al plásmido pFastBac-CMV-TetON-IRES-mCherry (**Figura 53**). Dicho plásmido se linealiza mediante digestión con las enzimas NsiI y Sall y se le clono el fragmento liberado producto de la digestión pUC57 3 con las enzimas NsiI y Sall dando lugar al plásmido pFB-iCre-Inducible (**Figura 54**).

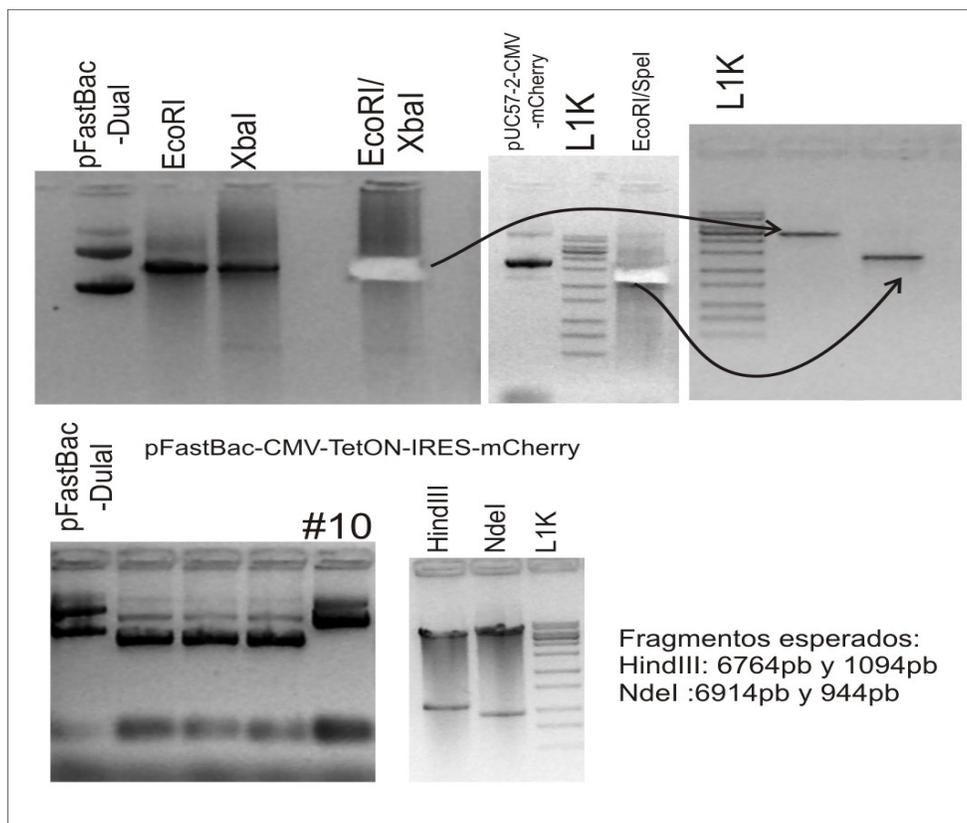


Figura 53: Clonado molecular para la generación del plásmido pFastBac-CMV-TetON-IRES-mCherry. Se muestra el clonado del fragmento conteniendo CMV-TetON-IRES-mCherry obtenido por digestión del plásmido pUC57 CMV-TetON-IRES-mCherry con las enzimas EcoRI y SpeI entre los sitiosEcoRI yXbaI del plasmido pFastBac-Dual. Los clones con retardo electroforético obtenidos (pFasatBac-CMV-TetON-IRES-mCherry) y la digestión de uno de estos con las enzimas HindIII y NdeI para corroborar su identidad. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL y exposición a luz UV. L1K = *Ladder* 1kbp plus.

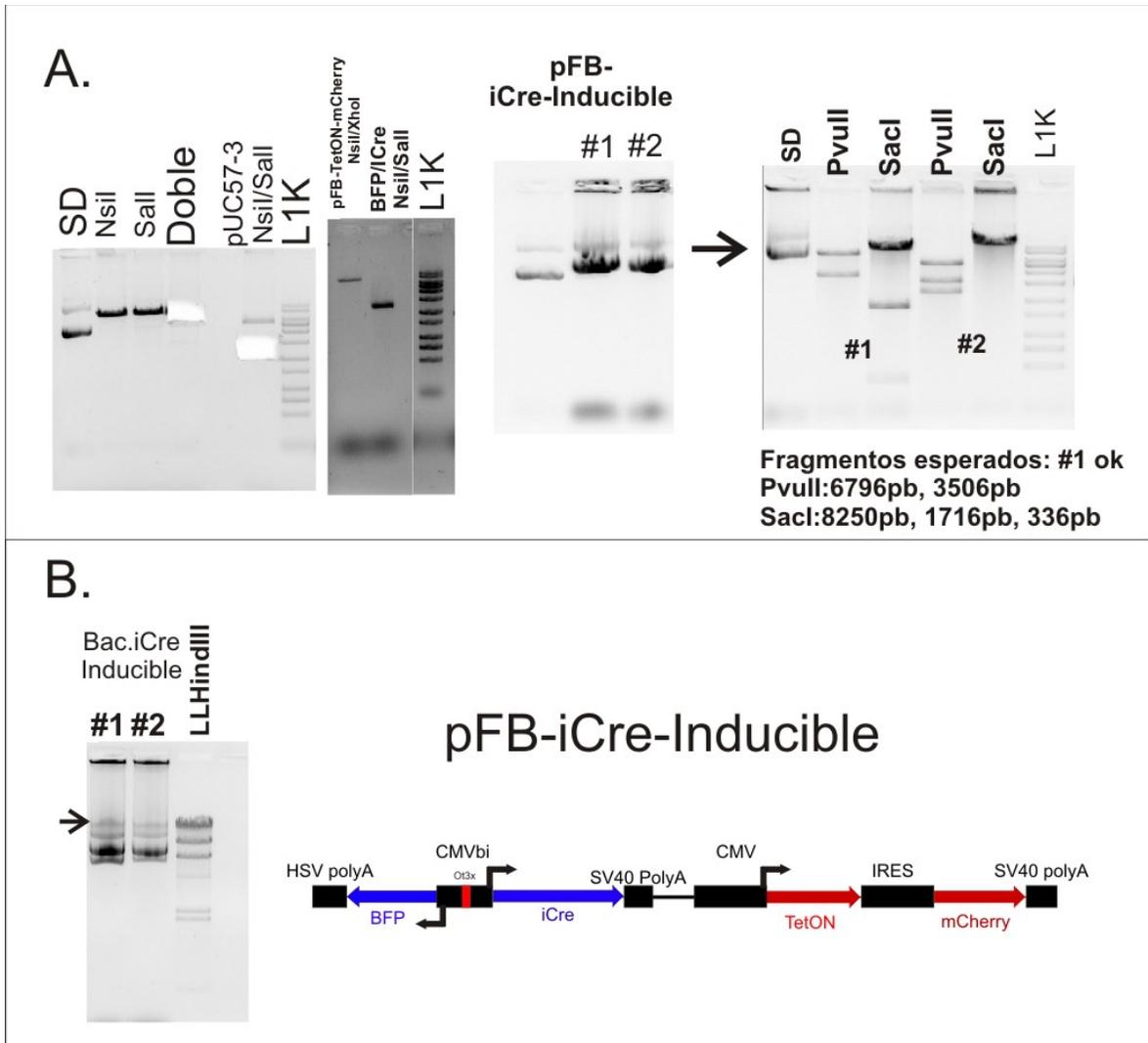


Figura 54: Clonado molecular para la generación del plásmido pFB-iCre-Inducible. (A) Se muestra el clonado del fragmento conteniendo BFP-CMVbi-iCre obtenido por digestión del plásmido pUC57 3-con las enzimas NsiI y Sall entre los mismos sitios del plásmido pFasatBac-CMV-TetON-IRES-mCherry. Los clones con retardo electroforético obtenidos (pFB-iCre-Inducible) y la digestión de estos con las enzimas PvuII y SacI para corroborar su identidad. (B) Se muestra una minipreparación del báculo recombinante Ac-iCre-Inducible y un esquema del circuito génico clonado en este. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL y exposición a luz UV. SD = Sin digerir, L1K = *Ladder* 1kbp plus, LLHindIII = *Ladder* lambda HindIII.

Clonado de pFastBac-CMV-iCre y FastBac-CMV-iTelomerasa

Los fragmentos pertenecientes a los ORF de iCre y iTelomerasa se obtuvieron por digestión de los plásmidos pFastBac-iCre con las enzimas BamHI y pFastBac-iTelomerasa con las enzimas BamHI y SpeI y se clonaron en el vector pFastBac-CMV entre los sitios BamHI y XbaI dando lugar a los plásmidos pFastBac-CMV-iCre Y pFastBac-CMV-iTelomerasa. (Figura 55)

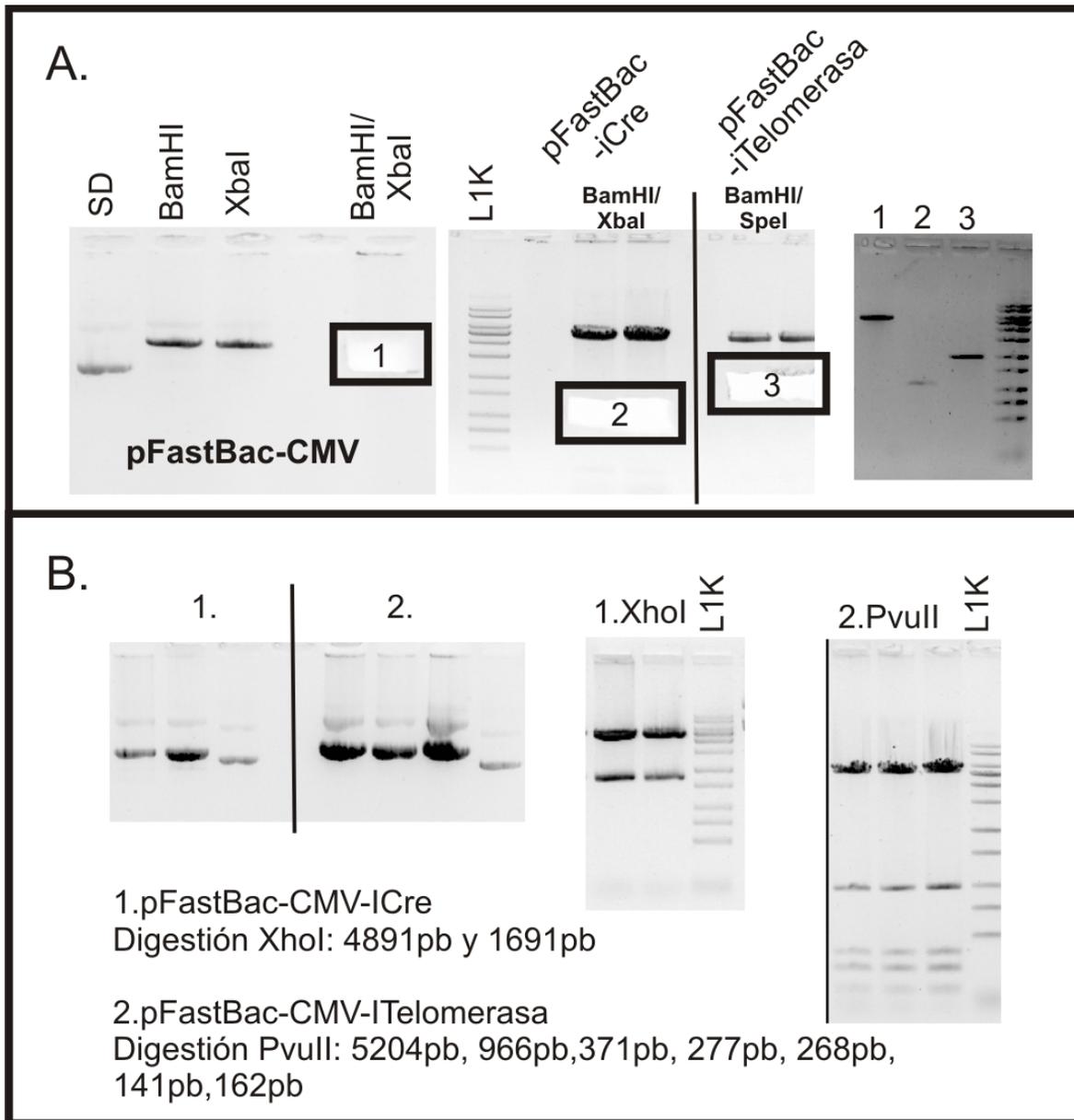


Figura 55: Clonado molecular para la generación de los plásmidos pFastBac-CMV-iCre y pFastBac-CMV-iTelomerasa. A. Digestiones de los plásmidos pFastBac-CMV, pFastBac-iCre y pFastBac-iTelomerasa y purificaciones de los fragmentos cortados. **B.** Minipreparaciones de los plásmidos pFastBac-CMV-iCre y pFastBac-CMV-iTelomerasa y los patrones de digestión con las enzimas XhoI y PvuII de dichos plásmidos para corroborar su identidad. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL. y exposición a luz UV. L1K: *Ladder* 1kb plus.

Clonado de pFastBac conteniendo el miniciruclo/*ministring* (MCMS)

Un fragmento perteneciente al promotor de CMV y las secuencias *TelRL* y *LoxP66* se obtuvo por digestión del plásmido pUC57-1A-CMV con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* se clonaron en el vector pUC571B entre los sitios *EcoRI* y *HinDIII*, utilizando la cepa de *E. coli Stb13* (Invitrogen), para secuencias inestables, dando lugar al plásmido pUC57-MCMS. La identidad del plásmido se corrobora mediante digestión del mismo con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* (Figura 56). La integridad de las secuencias *LoxP* e *TelRL* se verifico mediante secuenciación por el método de Sanger (Macrogen) utilizando los *primers* CMV-F y M13F-pUC (Figura 57)

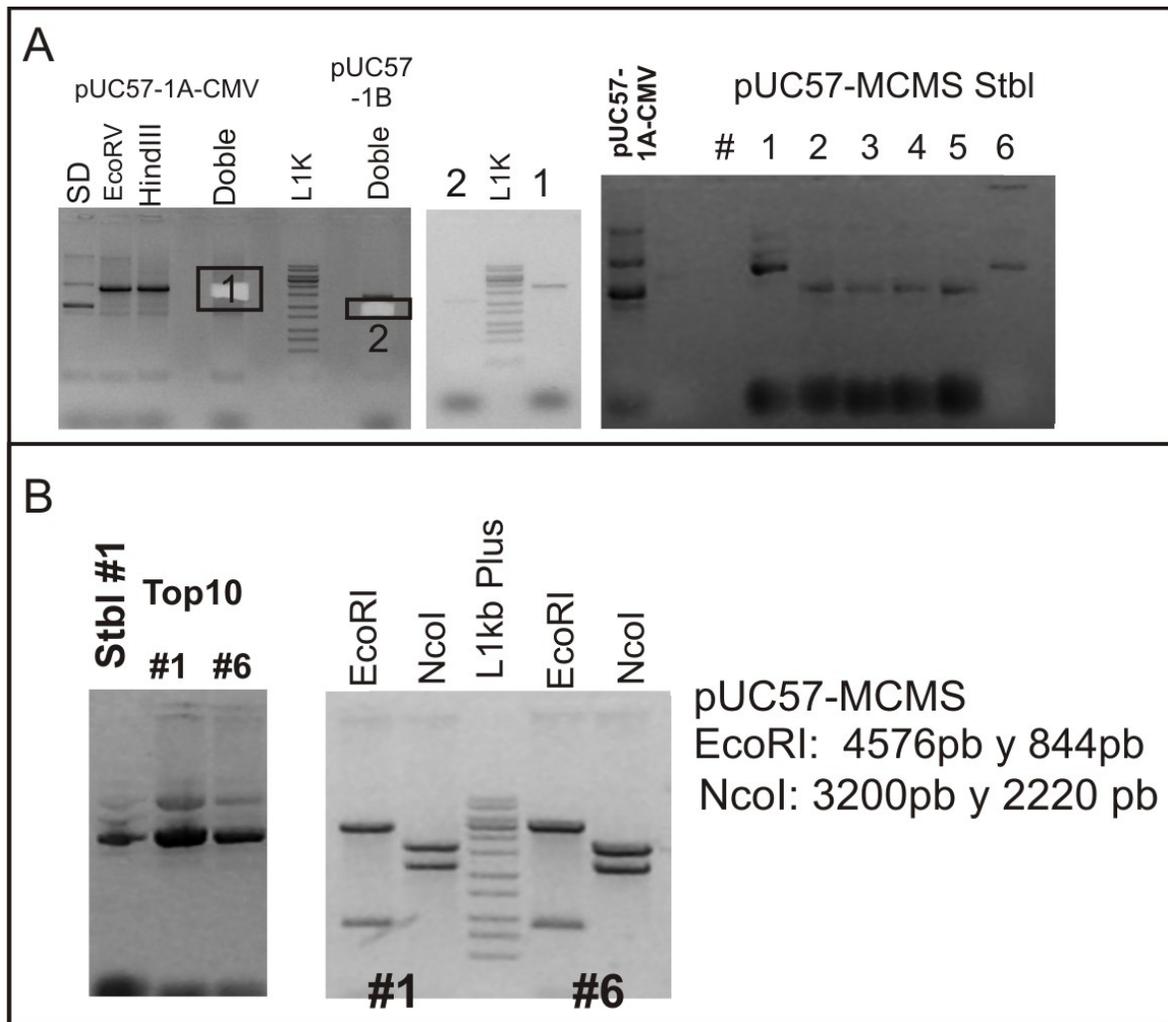


Figura 56: Clonado molecular para la generación del plásmido pUC57-MCMS (A). Digestiones de los plásmidos pUC57-1A-CMV y pUC57-1B con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, purificaciones de los fragmentos cortados y minipreparaciones de los clones obtenidos mediante la ligación de dichos fragmentos y su transformación en *E. coli Stb13*. **(B).** Pasaje de los clones plasmídicos obtenidos en la cepa *Stb13* a la cepa TOP10 y digestión de estos con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* para corroborar la identidad del plásmido pUC57-MCMS. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL. y exposición a luz UV. L1K = *Ladder* 1kbp plus.

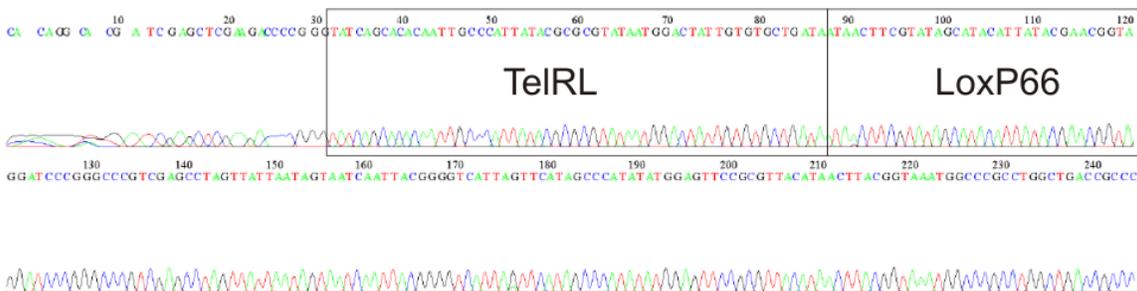
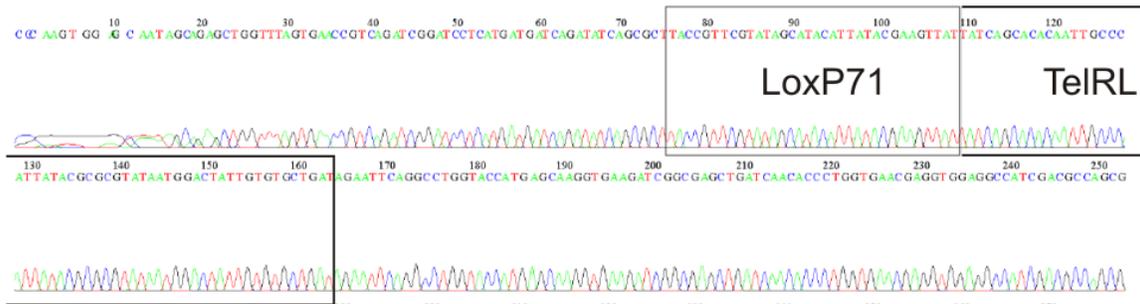


Figura 57: Secuenciación por el método de Sanger del plásmido pUC57-MCMS. Se muestran los resultados de la secuenciación utilizando los primers CMV-F y M13F-pUC. Recuadradas se muestran las secuencias correspondientes a los sitios TelRL y loxP, mostrando la integridad de secuencia de estos.

El plásmido pUC57-MCMS-GFP se obtuvo mediante el clonado del fragmento GFP-SV40 PolyA, obtenido por digestión del plásmido pFastBac-CMV-GFP con las enzimas BclI y BamHI, entre el sitio BamHI del plásmido pUC57-MCMS. La identidad del plásmido obtenido se corrobora mediante digestión del mismo con las enzimas SacI y SfoI (**Figura 58**). La secuencia correspondiente al origen de replicación de Epstein-Barr se obtuvo mediante amplificación por PCR con los primers **Fw.ORI Epst-Bar-BamHI** y **Rv.Ebna1-BamHI** a partir del plásmido pCRISPER-S12 (**Addgene**) utilizando una *High fidelity* DNA taq polimerasa (**New English Biolabs**). Dicha secuencia se clonó entre el sitio BamHI del plásmido pUC57-MCMS-GFP para generar el plásmido pUC57-MCMS-GFP-ORI. La identidad del plásmido obtenido se corrobora mediante digestión del mismo con las enzimas SacI y SfoI. (**Figura 59**)

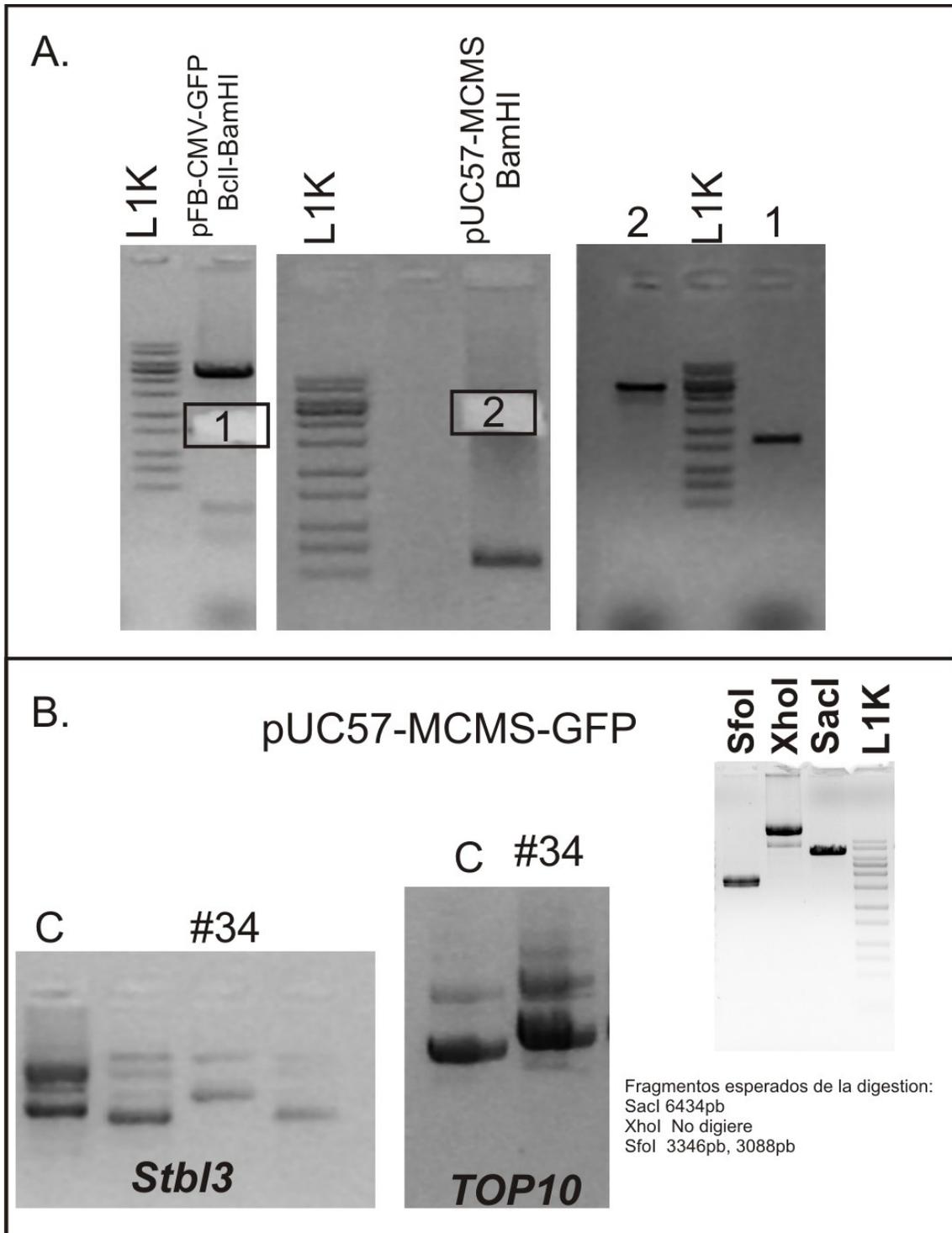


Figura 58: Clonado molecular para la generación del plásmido pUC57-MCMS-GFP (A). Digestiones de los plásmidos pUC57-MCMS con BamHI y pFastBac-CMV-GFP con las enzimas BclI y BamHI, purificaciones de los fragmentos cortados (B) Minipreparaciones de los clones obtenidos mediante la ligación de dichos fragmentos y su transformación en *E. coli Stbl3*. Pasaje de los clones plasmídicos obtenidos en la cepa *Stbl3* a la cepa *TOP10* y digestión de uno estos con las enzimas SfoI y SacI para corroborar la identidad del plásmido pUC57-MCMS-GFP. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL. y exposición a luz UV. L1K = *Ladder* 1kbp plus, C = Plásmido control de retardo electroforético.

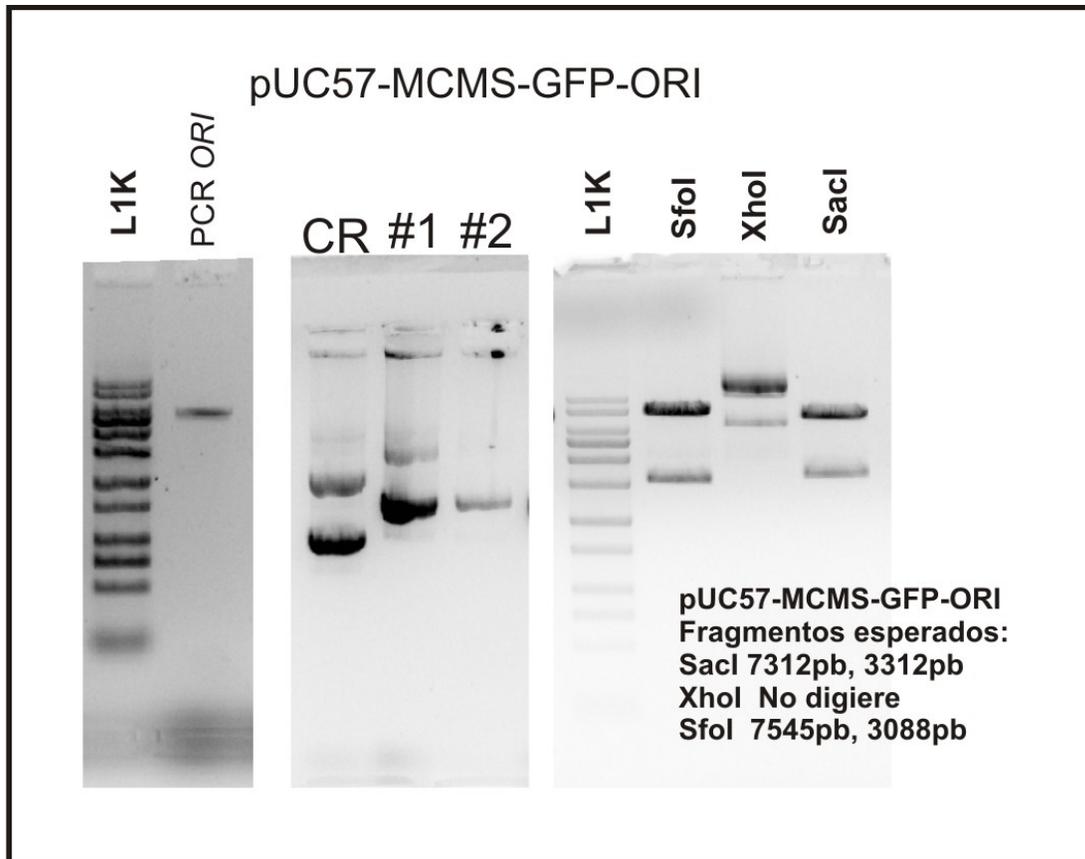


Figura 59: Clonado molecular para la generación del plásmido pUC57-MCMS-GFP-ORI. Reacción de PCR correspondiente a la amplificación del origen de replicación de Epstein-Barr, Minipreparaciones de los clones obtenidos mediante el clonado de dicho fragmento en el sitio BamHI del plásmido pUC57-MCMS-GFP, digestión de uno estos con las enzimas SfoI y SacI para corroborar la identidad del plásmido pUC57-MCMS-GFP-ORI. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL. y exposición a luz UV. L1K = *Ladder* 1kbp plus, CR = Plásmido control de retardo electroforético.

El plásmido pFastBac-MCMS-GFP se obtuvo mediante el clonado del fragmento conteniendo la secuencia generadora de minicírculos/ministrings conteniendo el gen reportero de *gfp* entre los sitios KpnI y SacI del plásmido pFastBac-Dual, la cual se obtuvo mediante digestión del plásmido pUC57-MCMS-GFP con las mismas enzimas. La identidad del plásmido obtenido se corroboró mediante digestión del mismo con las enzimas EcoRV y XbaI. El plásmido pFastBac-MCMS-GFP-ORI se obtuvo mediante el clonado del fragmento conteniendo la secuencia generadora de minicírculos/ministrings conteniendo el gen reportero de *gfp* y el origen de replicación viral entre los sitios KpnI y PvuII, la cual se obtuvo mediante digestión del plásmido pUC57-MCMS-GFP-ORI con las mismas enzimas. La identidad del plásmido obtenido se corroboró mediante digestión del mismo con la enzima SacI. (**Figura 60**)

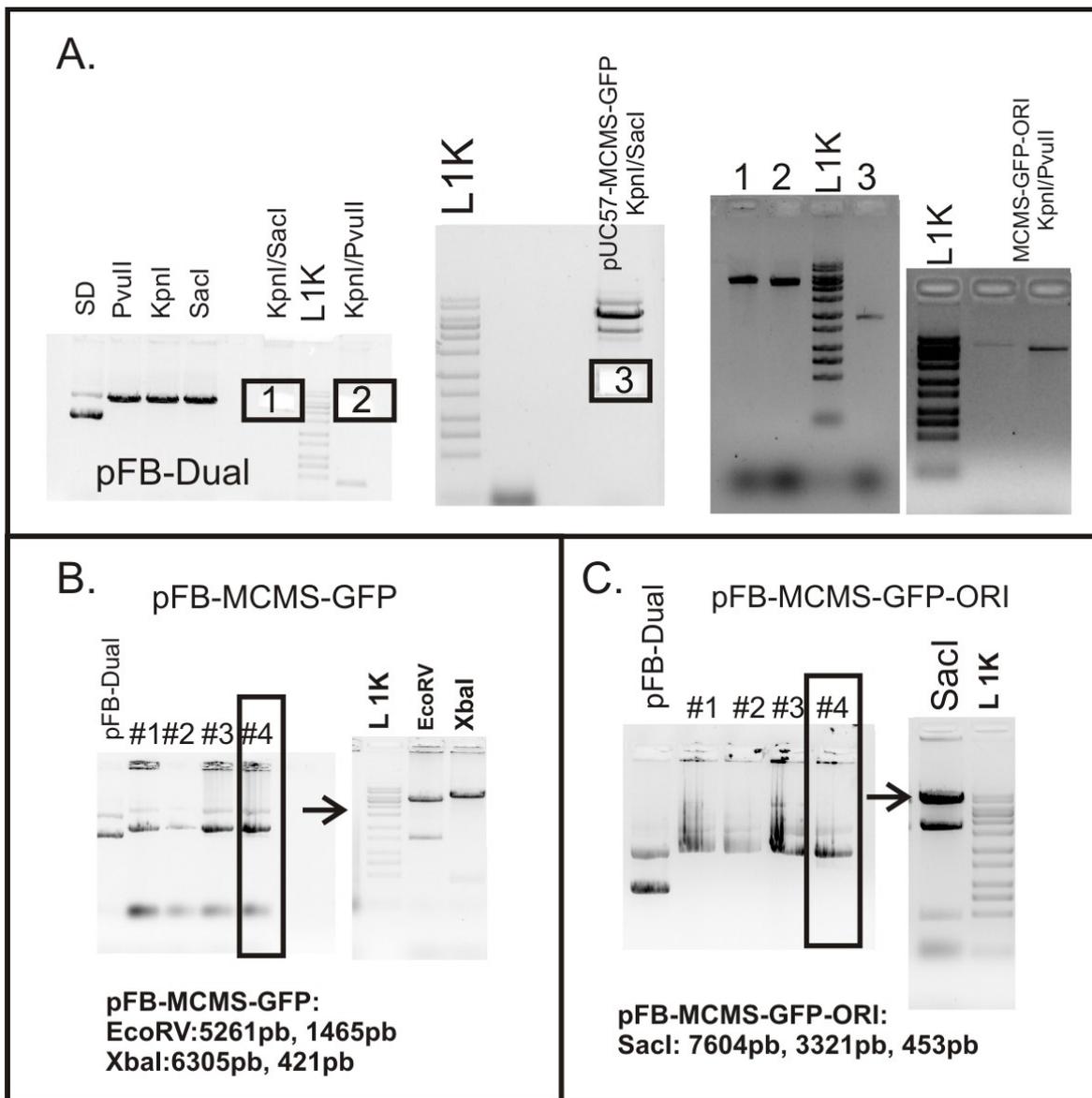


Figura 60: Clonado molecular para la generación de los plásmidos pFB-MCMS-GFP y pFB-MCMS-GFP-ORI. (A) Digestión del plásmido pFastBac-Dual con las enzimas KpnI y SacI y con las enzimas KpnI y PvuII, del plásmido pUC57-MCMS-GFP con las enzimas KpnI y SacI y del plásmido pUC57-MCMS-GFP-ORI KpnI y PvuII. Purificación de los fragmentos cortados del gel. (B) Minipreparaciones de los clones obtenidos mediante la transformación en *E. coli* de la ligación de los fragmentos pFastBac (KpnI/SacI) y MCMS-GFP (KpnI/SacI). Digestión de uno de estos con las enzimas EcoRV y XbaI para corroborar la identidad del plásmido pFastBac-MCMS-GFP. (C) Minipreparaciones de los clones obtenidos mediante la transformación en *E. coli* de la ligación de los fragmentos pFastBac (KpnI/PvuII) y MCMS-GFP-ORI (KpnI/PvuII). Digestión de uno de estos con las enzimas EcoRV y XbaI para corroborar la identidad del plásmido pFastBac-MCMS-GFP-ORI. Geles de agarosa 0.8 p/v con BrEt 0.5 µg/mL y exposición a luz UV. L1K = Ladder 1kbp plus, SD = Sin Digerir.

Todos los plásmidos obtenidos en esta sección provenientes del plásmido pFastBac, se transformaron por *shock* térmico en *E. coli DH10Bac* y se seleccionaron las colonias blancas, conteniendo los bácmidos recombinantes correspondientes en cada caso (**Tabla 4**). Se realizaron mini-preparaciones de bácmidos recombinantes y se transfectaron con el reactivo PEI en células Sf9 en placas de 6 *wells* para generar partículas virales.

ANEXO II: Generación de bácmidos mediante el sistema BAC-TO-BAC (Thermo Fisher Scientific)

El vector baculoviral (bácmido) contiene el origen de replicación mini-F de bajo número de copias, un marcador de resistencia al antibiótico Kanamicina, y un gen procariota que codifica para el péptido LacZ α . Insertado en el extremo N-terminal del marco de lectura de LacZ α , existe un segmento corto que contiene el sitio de inserción para el transposón bacteriano Tn7 (mini-attTn7) que no introduce mutaciones a nivel proteico. El bácmido se propaga en la cepa de *E. coli* DH10 BAC como un megaplásmido que le confiere resistencia a kanamicina, y puede complementar la delección de LacZ presente en el cromosoma bacteriano para formar colonias azules (lac+) en presencia del sustrato cromogénico X-gal y el inductor IPTG.

Los bácmidos recombinantes se generan mediante transposición del elemento mini-Tn7, desde el plásmido donante pFastBac al sitio de inserción mini-attTn7 localizado en el bácmido, cuando la enzima transposasa, que cataliza la transposición, se provee en *trans* por medio de un plásmido *helper*. El casete que se va a transponer desde el vector donante contiene un promotor baculoviral específico (*poliedrina*, *p10*, o ambos en el caso de un vector dual que permite la coexpresión de 2 proteínas), un gen de resistencia a gentamicina, un sitio de clonado múltiple, y una señal de poliadenilación insertada entre los brazos derecho e izquierdo del Tn7. La transposición interrumpe el marco de lectura del péptido LacZ α , permitiendo identificar aquellas bacterias que llevan bácmidos recombinantes mediante el desarrollo de colonias blancas. Luego, el DNA recombinante es extraído de la bacteria y utilizado para transfectar células de insecto. Dado que el DNA baculoviral desnudo es infeccioso *per se*, se inicia el ciclo replicativo en las células desencadenando la producción de viriones brotantes (BV) que portan el transgén bajo el control del promotor tardío fuerte de *poliedrina* o *p10* (o el que se desee insertar).

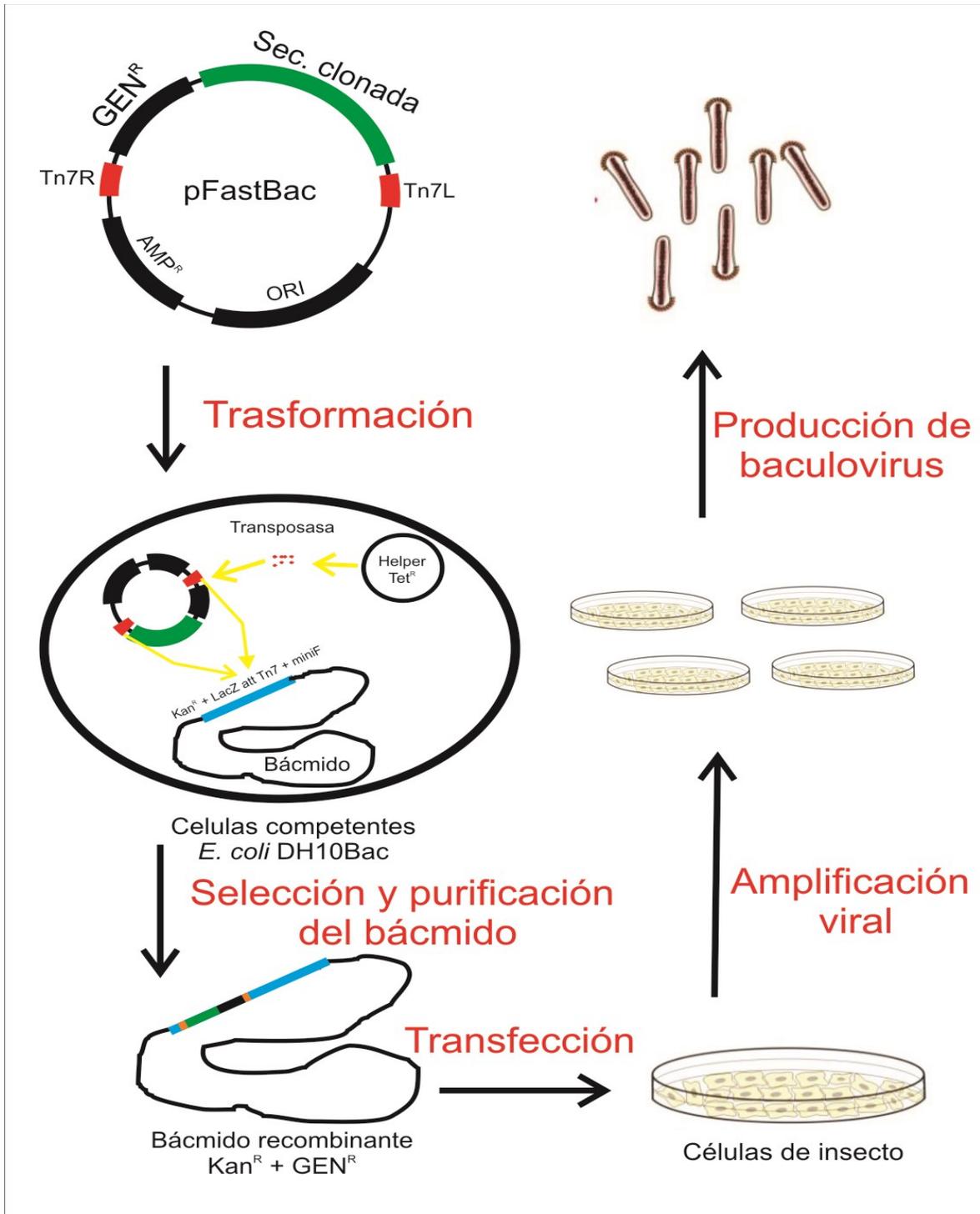


Figura 61: Diagrama de los pasos seguidos para la generación de los virus recombinantes. Se observan las construcciones utilizadas y un esquema de la cepa DH10 Bac conteniendo el plásmido *helper* que codifica para la transposasa (además presenta resistencia a Tetraciclina), y el genoma de AcMNPV con origen mini F, el cual se replica como megaplásmido y recibe la transposición sitio específica del casete de expresión en el *locus* de LacZ α .

ANEXO III: Citometría de flujo

Resultados A: Transducción de células de mamíferos *In vitro*.

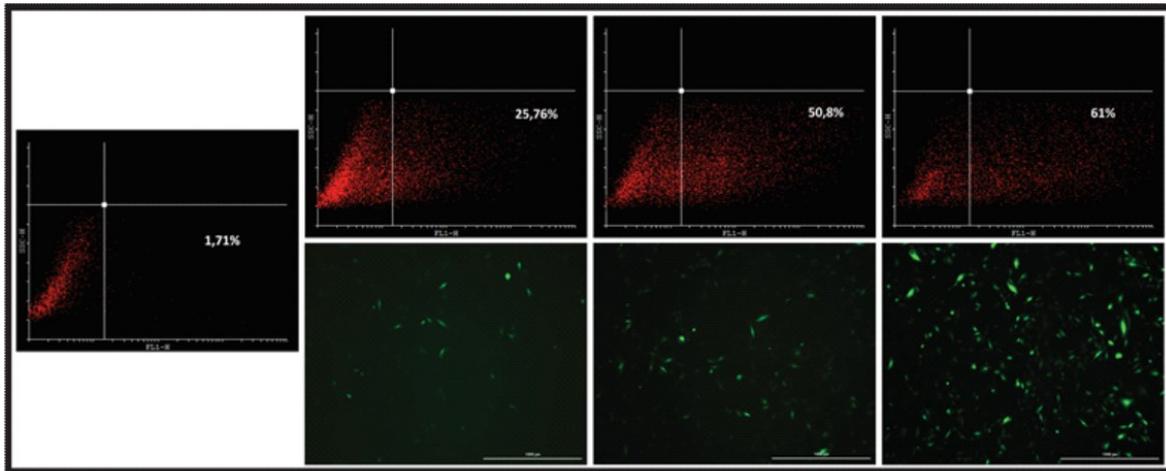


Figura 62. Transducción de células H9c2 (mioblastos de rata) con el virus AcCMV-GFP. Las mediciones se realizaron a las 24 horas post transducción. Panel superior: *Dot plot* representativo de citometría de flujo mostrando eficiencias de transducción de H9c2 a MOI 0, 100, 300 y 900. Panel inferior: microscopía de fluorescencia, 25 X, barras: 1000 µm.

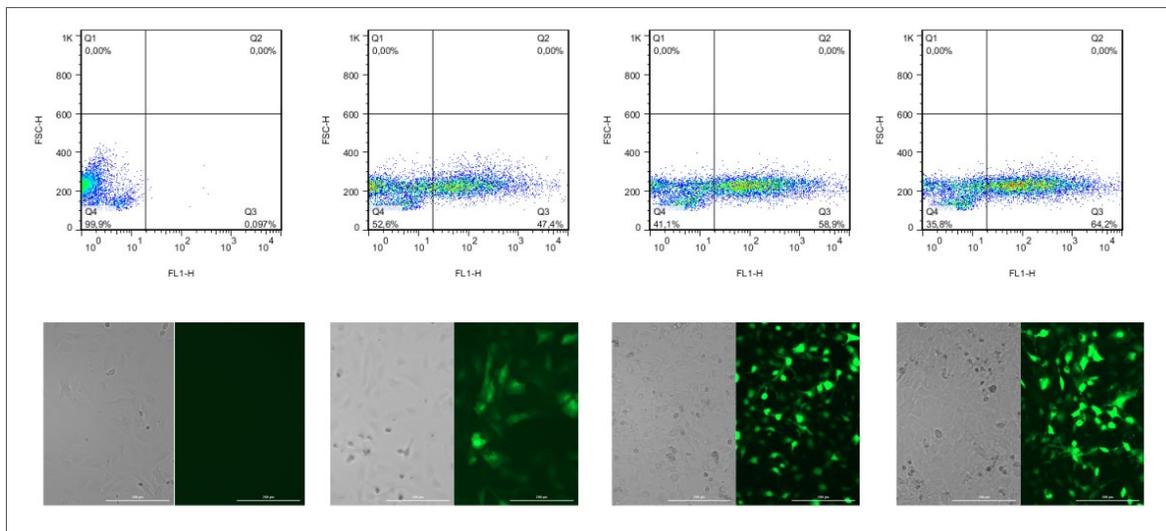


Figura 63. Transducción de células CMFR (Cardiomiocitos de rata neonatal) con el virus AcCMV-GFP. Las mediciones se realizaron a las 24 horas post transducción. Panel superior: *Dot plot* representativo de citometría de flujo mostrando eficiencias de transducción de CMFR a MOI 0, 100, 200 y 400. Panel inferior: microscopía de fluorescencia, 100 X, barras: 200 µm.

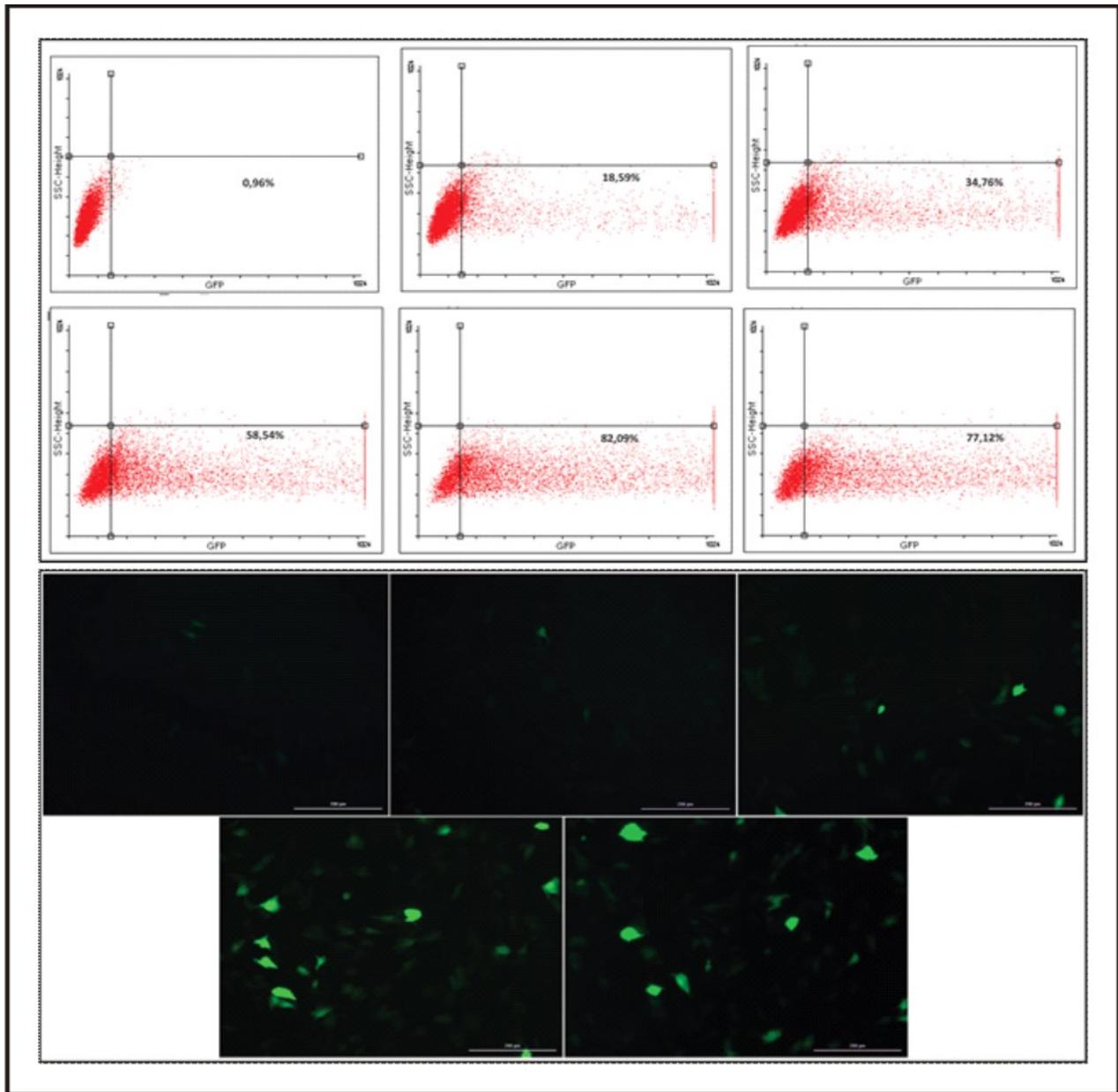


Figura 64. Transducción de células AC16 (Cardiomiocitos ventriculares humanos) con el virus AcCMV-GFP. Las mediciones se realizaron a las 24 horas post transducción. Panel superior: *Dot plot* representativo de citometría de flujo mostrando eficiencias de transducción de AC16 a MOI 0, 50, 100, 200, 400 y 800. Panel inferior: Microscopía de fluorescencia de AC16 MOI 50, 100, 200, 400 y 800. 100 X, barras: 200 μm.

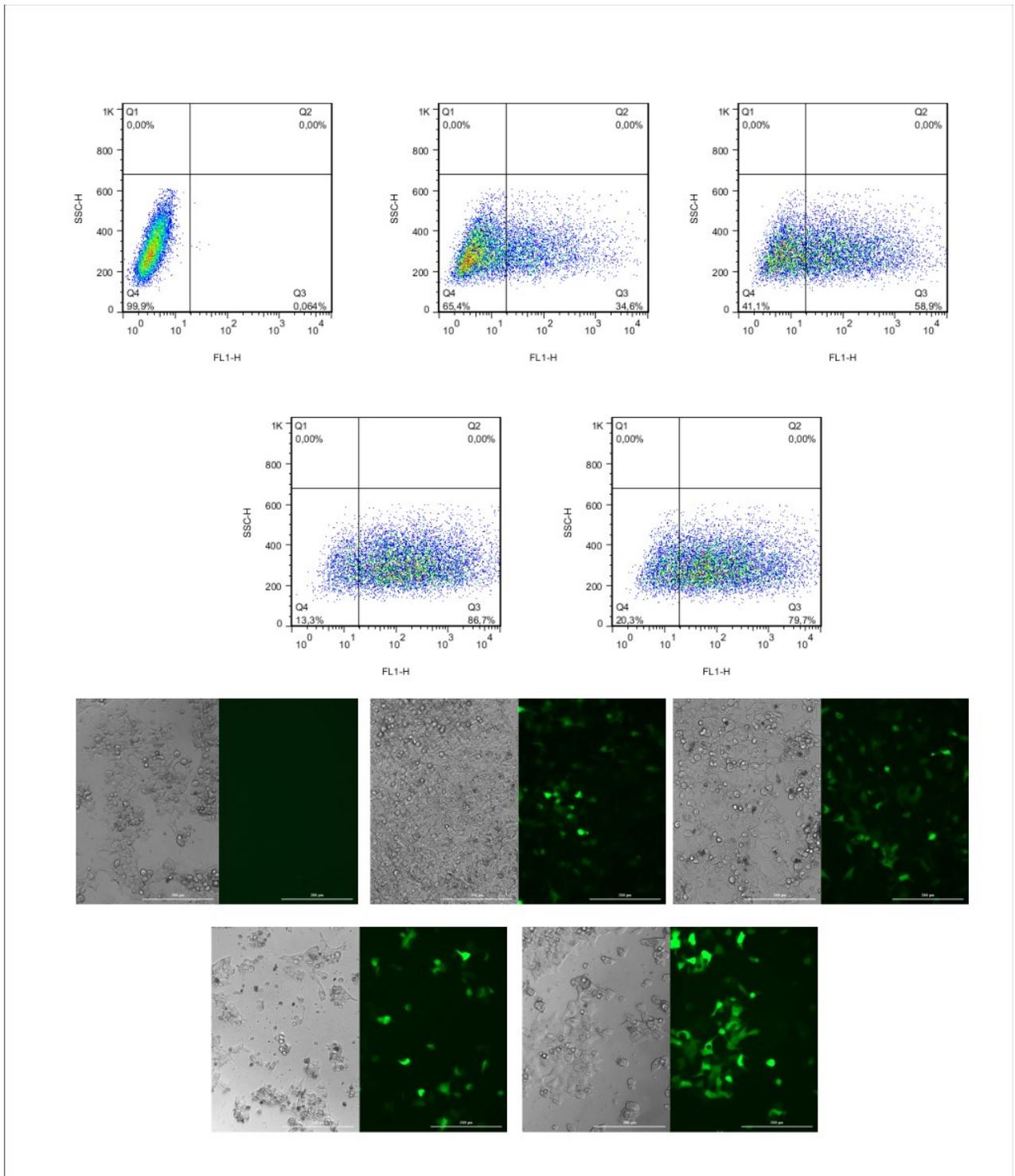


Figura 65. Transducción de células HEK293T (Línea celular de riñón humano) con el virus AcCMV-GFP. Las mediciones se realizaron a las 24 horas post transducción. Panel superior: *Dot plot* representativo de citometría de flujo mostrando eficiencias de transducción de HEK293T a MOI 0, 50, 100, 200 y 400. Panel inferior: Microscopía de fluorescencia de HEK293T a MOI 50, 100, 200 y 400, 100 X, barras: 200 μm.

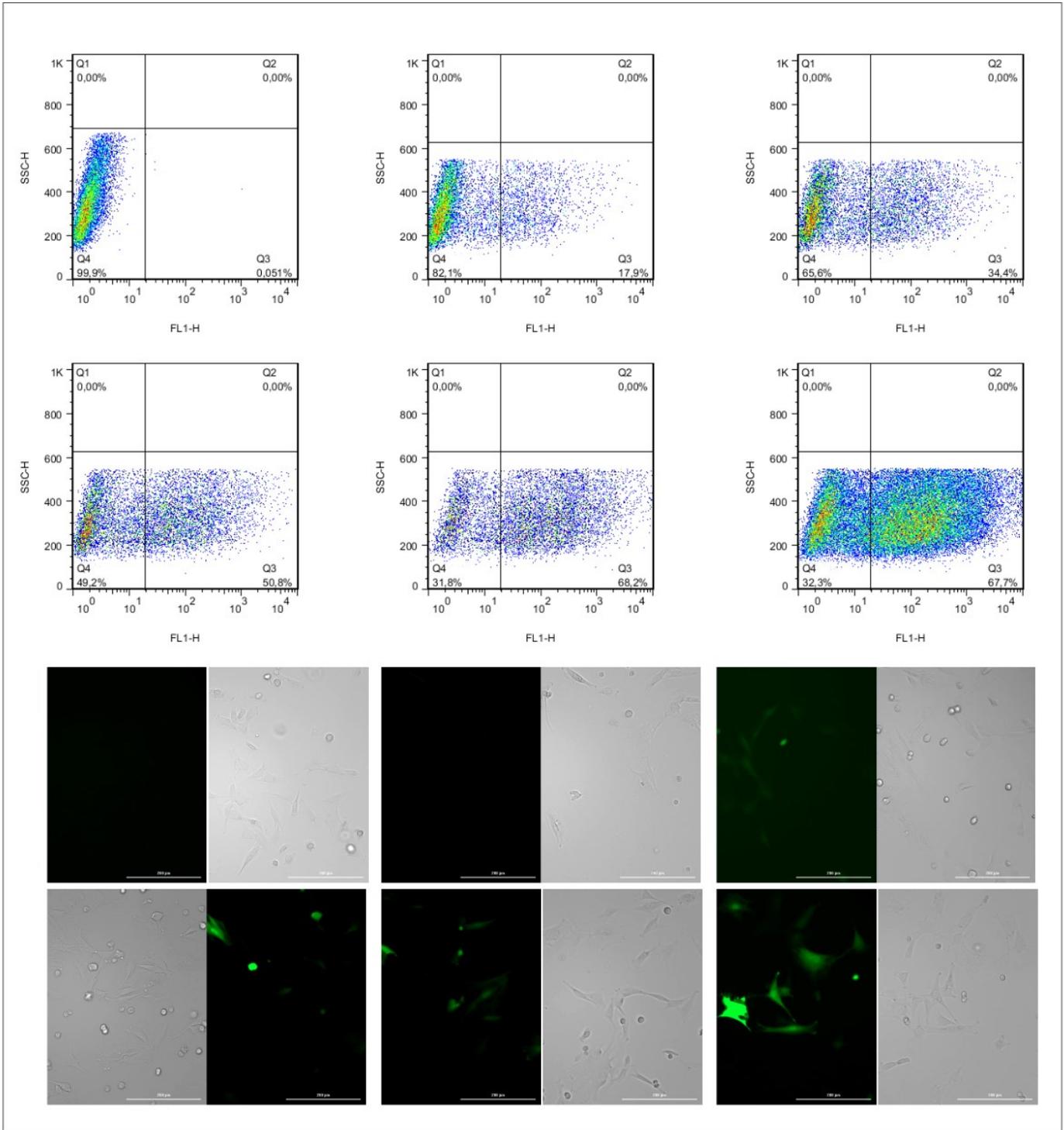


Figura 66. Transducción de células SkM (*Skeletal muscle cells* de conejo) con el virus AcCMV-GFP. Las mediciones se realizaron a las 24 horas post transducción. Panel superior: *Dot plot* representativo de citometría de flujo mostrando eficiencias de transducción de SkM a MOI 0, 25, 50, 100, 200 y 500. Panel inferior: Microscopía de fluorescencia de SkM MOI 0, 25, 50, 100, 200 v 500. 100 X. barras: 200 μ m.

Resultados C: Ensayo de capacidad de transducción de los BV pseudotipados con VSV-G

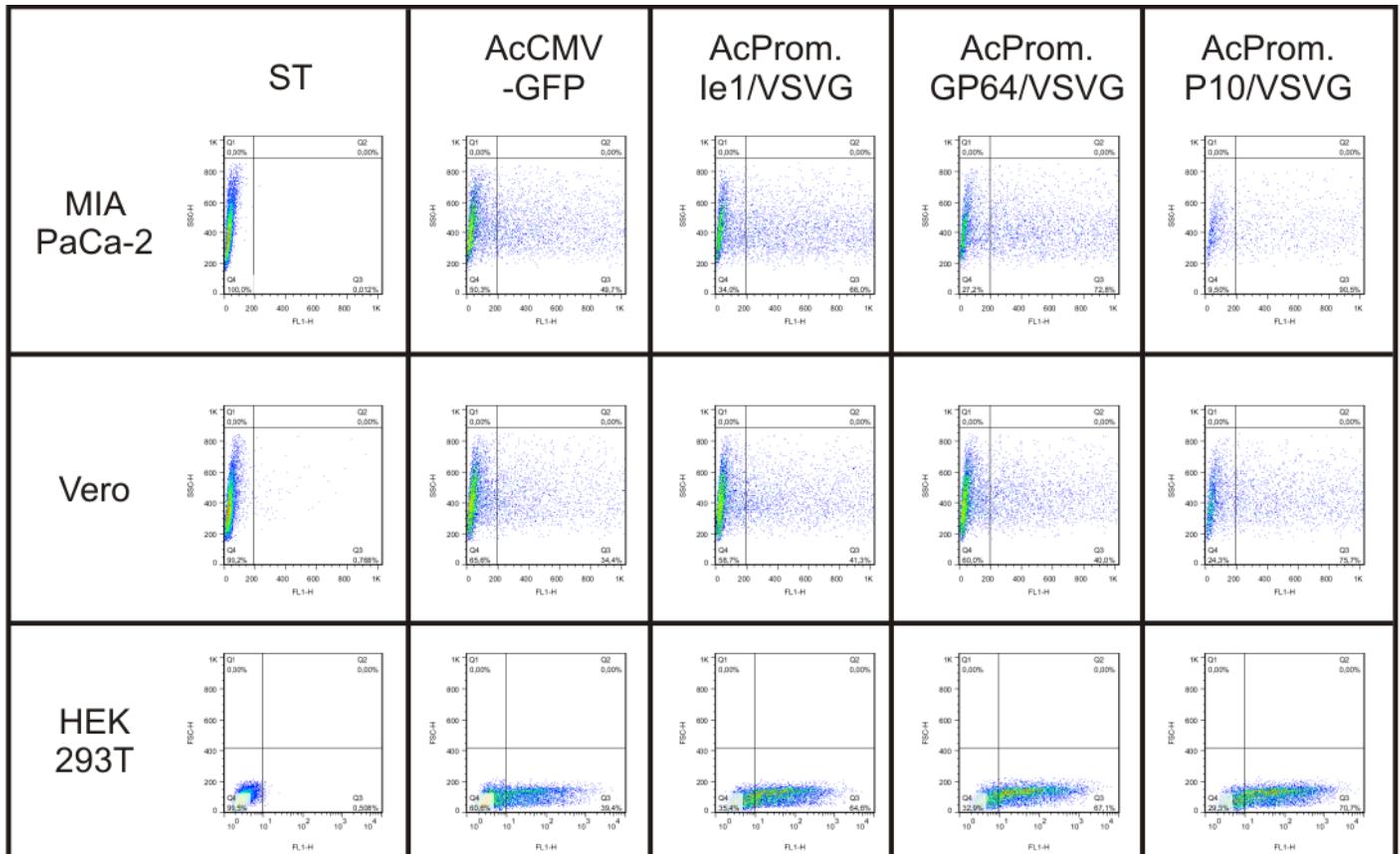


Figura 67. Transducción de células MIA PaCa-2, Vero y HEK293T con los virus pseudotipados con VSV-G y con AcCMV-GFP. Las transducciones se realizaron a MOI 100 y las mediciones se realizaron a las 24 horas post transducción. *Dot plots* representativos de citometría de flujo mostrando las eficiencias de transducción obtenidas para cada tipo celular. ST: Sin transducir.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director y co-directores, Dr. Mariano N. Belaich, Dr. P. Daniel Ghiringhelli y Dra Carolina Cerrudo por haberme permitido desarrollar este trabajo. Su orientación y apoyo fue esencial para llevar adelante este proceso. También, expresar mi gratitud con la Universidad Nacional de Quilmes, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por proveer de subsidios y espacio para desarrollar el trabajo presentado. También agradecer a todos los integrantes del laboratorio LIGBCM-AVI, Universidad Nacional de Quilmes y a todos los integrantes del Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMETTYB), Universidad Favaloro-CONICET.

Bibliografía

Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., & Matsuura, Y. (2005). Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *Journal of virology*, 79(5), 2847–2858. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2847-2858.2005>

Amalfi, S., Molina, G. N., Bevacqua, R. J., López, M. G., Taboga, O., & Alfonso, V. (2020). Baculovirus Transduction in Mammalian Cells Is Affected by the Production of Type I and III Interferons, Which Is Mediated Mainly by the cGAS-STING Pathway. *Journal of virology*, 94(21), e01555-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01555-20>

Ang, W. X., Zhao, Y., Kwang, T., Wu, C., Chen, C., Toh, H. C., Mahendran, R., Esuvaranathan, K., & Wang, S. (2016). Local Immune Stimulation by Intravesical Instillation of Baculovirus to Enable Bladder Cancer Therapy. *Scientific reports*, 6, 27455. <https://doi.org/10.1038/srep27455>

ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) <https://www.argentina.gob.ar/anmat>. ANMAT-MED-BIO 006-00. **2017**.

Bak, X. Y., Lam, D. H., Yang, J., Ye, K., Wei, E. L., Lim, S. K., & Wang, S. (2011). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells as cellular delivery vehicles for prodrug gene therapy of glioblastoma. *Human gene therapy*, 22(11), 1365–1377. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.212>

Balasundaram, G., Kwang, T. W., & Wang, S. (2017). cDNA microarray assays to evaluate immune responses following intracranial injection of baculoviral vectors in non-human primates. *Journal of neurochemistry*, 140(2), 320–333. <https://doi.org/10.1111/jnc.13884>

Banerjee, A. D., Abraham, G., & Colonno, R. J. (1977). Vesicular stomatitis virus: mode of transcription. *The Journal of general virology*, 34(1), 1–8. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-1-1>

Barry M. (2018). Single-cycle adenovirus vectors in the current vaccine landscape. *Expert review of vaccines*, 17(2), 163–173. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1419067>

Barsoum, J., Brown, R., McKee, M., & Boyce, F. M. (1997). Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Human gene therapy*, 8(17), 2011–2018. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.17-2011>

Bentley, E. M., Mather, S. T., & Temperton, N. J. (2015). The use of pseudotypes to study viruses, virus sero-epidemiology and vaccination. *Vaccine*, 33(26), 2955–2962. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.071>

Benz, G. A. (1986). Introduction: Historical perspectives. In “The Biology of Baculoviruses, Volume I Biological Properties and Molecular Biology” (R. R. Granados and B. A. Federici, Eds.), pp. 1-35. CRC Press, Boca Raton.

Blissard G. W. (1996). Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechnology*, 20(1-3), 73–93. <https://doi.org/10.1007/BF00350390>

Blissard, G. W., & Theilmann, D. A. (2018). Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. *Annual review of virology*, 5(1), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>

Blomberg, P., & Smith, C. I. (2003). Gene therapy of monogenic and cardiovascular disorders. *Expert opinion on biological therapy*, 3(6), 941–949. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.6.941>

Boulaire, J., Zhao, Y., & Wang, S. (2009). Gene expression profiling to define host response to baculoviral transduction in the brain. *Journal of neurochemistry*, 109(5), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06015.x>

Burattini, S., & Falcieri, E. (2013). Analysis of cell death by electron microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1004, 77–89. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-383-1_7

Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., & Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8033–8037. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8033>

Capurro N, Daniel, & Rada G, Gabriel. (2007). El proceso diagnóstico. *Revista médica de Chile*, 135(4), 534-538. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872007000400018>

Cerrudo, C. S., Motta, L. F., Cuccovia Warlet, F. U., Lassalle, F. M., Simonin, J. A., & Belaich, M. N. (2023). Protein-Gene Orthology in *Baculoviridae*: An Exhaustive Analysis to Redefine the Ancestrally Common Coding Sequences. *Viruses*, 15(5), 1091. <https://doi.org/10.3390/v15051091>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). <https://www.cdc.gov/> (Última visita 7/4/2021)

Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R. D., & King, L. A. (2018). Overview of the Baculovirus Expression System. *Current protocols in protein science*, 91, 5.4.1–5.4.6. <https://doi.org/10.1002/cpps.47>

Chen, B. D., He, C. H., Chen, X. C., Pan, S., Liu, F., Ma, X., Li, X. M., Gai, M. T., Tao, J., Ma, Y. T., Yang, Y. N., & Gao, X. M. (2015). Targeting transgene to the heart and liver with AAV9 by different promoters. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 42(10), 1108–1117. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12453>

Chen, C. L., Tseng, Y. W., Wu, J. C., Chen, G. Y., Lin, K. C., Hwang, S. M., & Hu, Y. C. (2015). Suppression of hepatocellular carcinoma by baculovirus-mediated expression of long non-coding RNA PTENP1 and MicroRNA regulation. *Biomaterials*, 44, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.023>

Chen, H. C., Lee, H. P., Ho, Y. C., Sung, M. L., & Hu, Y. C. (2006). Combination of baculovirus-mediated gene transfer and rotating-shaft bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 27(16), 3154–3162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.018>

Chen, Y. R., Zhong, S., Fei, Z., Gao, S., Zhang, S., Li, Z., Wang, P., & Blissard, G. W. (2014). Transcriptome responses of the host *Trichoplusia ni* to infection by the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of virology*, 88(23), 13781–13797. <https://doi.org/10.1128/JVI.02243-14>

Cheng, X. W., & Lynn, D. E. (2009). Baculovirus interactions in vitro and in vivo. *Advances in applied microbiology*, 68, 217–239. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01205-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01205-2)

Chuang, C. K., Wong, T. H., Hwang, S. M., Chang, Y. H., Chen, G. Y., Chiu, Y. C., Huang, S. F., & Hu, Y. C. (2009). Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(5), 889–896. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.30>

Coil, D. A., & Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *Journal of virology*, 78(20), 10920–10926. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.10920-10926.2004>

Irons, S. L., Chambers, A. C., Lissina, O., King, L. A., & Possee, R. D. (2018). Protein production using the baculovirus expression system. *Current Protocols in Cytometry*, 91, 5.5.1– 5.5.22. <https://doi.org/10.1002/cpps.45>

Coligan J.E., Dunn B. M. Speicher, D. W., Wingfield P. T. Current Protocols in Protein Science || Overview of the Baculovirus Expression System. 5.4.1–5.4.6, 2001.

Cox M. M. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30(10), 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>

Criado, M. T., Sánchez, S., & Ferreirós, C. M. (2008). Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas [Classic vaccinology and advances in vaccine design]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 26(9), 564–572. <https://doi.org/10.1157/13128274>

Cronin, J., Zhang, X. Y., & Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Current gene therapy*, 5(4), 387–398. <https://doi.org/10.2174/1566523054546224>

Dalal, B.; Quinn, T. J.; Foster, L; Lin, M.; Matthews ; Yuhan, B. (2018). Ligand-directed tumor targeting with hybrid viralphage nanoparticles. Chapter 13 in *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00013-6>.

Dalwadi, D. A., Calabria, A., Tiyaboonchai, A., Posey, J., Naugler, W. E., Montini, E., & Grompe, M. (2021). AAV integration in human hepatocytes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 29(10), 2898–2909. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.08.031>

De Lima, M. E., Figueiredo, S. G., Pimenta, A. M. C., Santos, D. M., Borges, M. H., Cordeiro, M. N., Richardson, M., Oliveira, L. C., Stankiewicz, M., & Pelhate, M. (2007). Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 146(1-2), 264–279. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.10.010>

Deneke, J., Ziegelin, G., Lurz, R., & Lanka, E. (2000). The protelomerase of temperate *Escherichia coli* phage N15 has cleaving-joining activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 7721–7726. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7721>

Drugmand, J. C., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology advances*, 30(5), 1140–1157. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.014>

EMA (European Medicines Agency) <https://www.ema.europa.eu/> (Última visita 4/4/2023)

Esencay, M., Sarfraz, Y., & Zagzag, D. (2013). CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 α . *BMC cancer*, 13, 347. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-347>

Espíritu-Ramírez, P., Ortega-Balderas, N. Y., Sevilla-Tapia, L., Montiel-Martínez, A. G., Pastor-Flores, A. R., Palomares, L. A., & Torres-Vega, M. A. (2018). Gene Therapy for Treatment of Chronic Hyperammonemia in a Rat Model of Hepatic Encephalopathy. *Annals of hepatology*, 17(6), 1026–1034. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7203>

FDA (U.S. Food & Drug). <https://www.fda.gov/> (Última visita 6/4/2023)

Felberbaum R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology journal*, 10(5), 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>

Fujita, R., Matsuyama, T., Yamagishi, J., Sahara, K., Asano, S., & Bando, H. (2006). Expression of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene. *Journal of virology*, 80(5), 2390–2395. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2390-2395.2006>

García-Hernández, M; Guerrero-Ramírez, G; Castro-Corona M.; Medina-de-la-Garza, C. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Medicina Universitaria*, 11(45), 247-259. <https://www.elsevier.es/en-revista-medicina-universitaria-304-articulo-inmunomoduladores-como-terapia-adyuvante-enfermedad-X1665579609481115>

Gaspar, V., de Melo-Diogo, D., Costa, E., Moreira, A., Queiroz, J., Pichon, C., Correia, I., & Sousa, F. (2015). Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert opinion on biological therapy*, 15(3), 353–379. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.996544>

Ghosh, S., Parvez, M. K., Banerjee, K., Sarin, S. K., & Hasnain, S. E. (2002). Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 6(1), 5–11. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0643>

Giménez, C. S., Castillo, M. G., Simonin, J. A., Núñez Pedrozo, C. N., Pascuali, N., Bauzá, M. D. R., Locatelli, P., López, A. E., Belaich, M. N., Mendiz, A. O., Crottogini, A. J., Cuniberti, L. A., & Olea, F. D. (2020). Effect of intramuscular baculovirus encoding mutant hypoxia-inducible factor 1-alpha on neovascuogenesis and ischemic muscle protection in rabbits with peripheral arterial disease. *Cytotherapy*, 22(10), 563–572. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.06.010>

Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M., & Abedi, M. R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The journal of gene medicine*, 20(5), e3015. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>

Gómez Valderrama, Juliana, & Villamizar, Laura. (2013). Baculovirus: Hospederos y especificidad. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 143-155. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41273>

González A, Fillat MF. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Educ Bioquímica*, 37(1), 14-27. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=78883>

Gottardo, M. F., Pidre, M. L., Zuccato, C., Asad, A. S., Imsen, M., Jaita, G., Candolfi, M., Romanowski, V., & Seilicovich, A. (2018). Baculovirus-based gene silencing of Humanin for the treatment of pituitary tumors. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 23(2), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1444-0>

Grasselli, M. (2015) Proteínas puras: entre el laboratorio y la industria. Universidad Nacional de Quilmes Editorial, Buenos Aires, Argentina.

Graves, L. P., Aksular, M., Alakeely, R. A., Ruiz Buck, D., Chambers, A. C., Murguia-Meca, F., Plata-Muñoz, J. J., Hughes, S., Johnson, P. R. V., Possee, R. D., & King, L. A. (2018). Improved Baculovirus Vectors for Transduction and Gene Expression in Human Pancreatic Islet Cells. *Viruses*, 10(10), 574. <https://doi.org/10.3390/v10100574>

Grzywacz, D. (2017). Chapter 3 - Basic and Applied Research: Baculovirus, in *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, 27-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00003-2>

Guerrero-Fonseca, Carlos Arturo, López-Baquero, Miguel Andrés, & Bedoya-Rodríguez, Angie Andrea. (2019). Virus oncolíticos: un arma contra el cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 67(2), 313-324. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v67n2.68347>

Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–2267. <https://doi.org/10.3390/v7052230>

Han, S. R., Lee, C. H., Im, J. Y., Kim, J. H., Kim, J. H., Kim, S. J., Cho, Y. W., Kim, E., Kim, Y., Ryu, J. H., Ju, M. H., Jeong, J. S., & Lee, S. W. (2020). Targeted suicide gene therapy for liver cancer based on ribozyme-mediated RNA replacement through post-transcriptional regulation. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 23, 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.10.036>

Heikura, T., Nieminen, T., Roschier, M. M., Karvinen, H., Kaikkonen, M. U., Mähönen, A. J., Lesch, H. P., Rissanen, T. T., Laitinen, O. H., Airene, K. J., & Ylä-Herttuala, S. (2012). Baculovirus-mediated vascular endothelial growth factor-D(Δ N Δ C) gene transfer induces angiogenesis in rabbit skeletal muscle. *The journal of gene medicine*, 14(1), 35–43. <https://doi.org/10.1002/jgm.1637>

Hernández-Hernández, F.deL., & Rodríguez, M. H. (2009). Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas [Biotechnological advances in infectious diseases diagnosis]. *Salud publica de Mexico*, 51 Suppl 3, S424–S438. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342009000900008>

High, K. A., & Roncarolo, M. G. (2019). Gene Therapy. *The New England journal of medicine*, 381(5), 455–464. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706910>

Hitchman, E., Hitchman, R. B., & King, L. A. (2017). BacMam Delivery of a Protective Gene to Reduce Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Human gene therapy*, 28(9), 747–756. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.100>

Hitchman, R. B., Murguía-Meca, F., Locanto, E., Danquah, J., & King, L. A. (2011). Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation. *Journal of invertebrate pathology*, 107 Suppl, S49–S58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.005>

Heinrich, J., Schultz, J., Bosse, M., Ziegelin, G., Lanka, E., & Moelling, K. (2002). Linear closed mini DNA generated by the prokaryotic cleaving-joining enzyme TelN is functional in mammalian cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 80(10), 648–654. <https://doi.org/10.1007/s00109-002-0362-2>

Hnatiuk, A. P., Ong, S. G., Olea, F. D., Locatelli, P., Riegler, J., Lee, W. H., Jen, C. H., De Lorenzi, A., Giménez, C. S., Laguens, R., Wu, J. C., & Crottogini, A. (2016). Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Overexpressing Mutant Human Hypoxia-Inducible Factor 1- α (HIF1- α) in an Ovine Model of Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, 5(7), e003714. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003714>

Hsu, C. S., Ho, Y. C., Wang, K. C., & Hu, Y. C. (2004). Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering*, 88(1), 42–51. <https://doi.org/10.1002/bit.20213>

Hsu, M. N., Liao, H. T., Truong, V. A., Huang, K. L., Yu, F. J., Chen, H. H., Nguyen, T. K. N., Makarevich, P., Parfyonova, Y., & Hu, Y. C. (2019). CRISPR-based Activation of Endogenous Neurotrophic Genes in Adipose Stem Cell Sheets to Stimulate Peripheral Nerve Regeneration. *Theranostics*, 9(21), 6099–6111. <https://doi.org/10.7150/thno.36790>

Hu, L., Li, Y., Deng, F., Hu, Z., Wang, H., & Wang, M. (2019). Improving Baculovirus Transduction of Mammalian Cells by Incorporation of Thogotovirus Glycoproteins. *Virologica Sinica*, 34(4), 454–466. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00133-0>

Hu, L., Li, Y., Ning, Y. J., Deng, F., Vlak, J. M., Hu, Z., Wang, H., & Wang, M. (2019). The Major Hurdle for Effective Baculovirus Transduction into Mammalian Cells Is Passing Early Endosomes. *Journal of virology*, 93(15), e00709-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00709-19>

Hu, Y.C. (2006). Baculovirus vectors for gene therapy. *Adv. Virus Res*, 68, 287-320. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68008-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68008-1)

Huang, N., Wu, W., Yang, K., Passarelli, A. L., Rohrmann, G. F., & Clem, R. J. (2011). Baculovirus infection induces a DNA damage response that is required for efficient viral replication. *Journal of virology*, 85(23), 12547–12556. <https://doi.org/10.1128/JVI.05766-11>

Huang, M., Chen, Z., Hu, S., Jia, F., Li, Z., Hoyt, G., Robbins, R. C., Kay, M. A., & Wu, J. C. (2009). Novel minicircle vector for gene therapy in murine myocardial infarction. *Circulation*, 120(11 Suppl), S230-S237. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841155>

Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., & Hammock, B. D. (2006). Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in virus research*, 68, 323–360. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68009-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68009-3)

INDEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). <https://www.indec.gov.ar/>. (última visita 5/4/2021)

Jarvis D. L. (2009). Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods in enzymology*, 463, 191–222. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63014-7)

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology*, 151(7), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>

Jiang, Y., Deng, F., Rayner, S., Wang, H., & Hu, Z. (2009). Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. *Virus research*, 142(1-2), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.015>

Jinn, T. R., Tu, W. C., Lu, C. I., & Tzen, J. T. (2006). Enhancing insecticidal efficacy of baculovirus by early expressing an insect neurotoxin, LqhIT2, in infected *Trichoplusia ni* larvae. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0431-5>

Joglekar, A. V., & Sandoval, S. (2017). Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises. *Human gene therapy methods*, 28(6), 291–301. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.084>

Kawahara, M., & Takaku, H. (2013). Intradermal immunization with combined baculovirus and tumor cell lysate induces effective antitumor immunity in mice. *International journal of oncology*, 43(6), 2023–2030. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2125>

Kenoutis, C., Efrose, R. C., Swevers, L., Lavdas, A. A., Gaitanou, M., Matsas, R., & Iatrou, K. (2006). Baculovirus-mediated gene delivery into Mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression. *Journal of virology*, 80(8), 4135–4146. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4135-4146.2006>

Kim, Y. K., Choi, J. Y., Jiang, H. L., Arote, R., Jere, D., Cho, M. H., Je, Y. H., & Cho, C. S. (2009). Hybrid of baculovirus and galactosylated PEI for efficient gene carrier. *Virology*, 387(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.001>

Kioukia, N., Nienow, A. W., Emery, A. N., & al-Rubeai, M. (1995). Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *Journal of biotechnology*, 38(3), 243–251. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)00128-y](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)00128-y)

Kitagawa, Y., Tani, H., Limn, C. K., Matsunaga, T. M., Moriishi, K., & Matsuura, Y. (2005). Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *Journal of virology*, 79(6), 3639–3652. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3639-3652.2005>

- Kolangath, S. M., Basagoudanavar, S. H., Hosamani, M., Saravanan, P., & Tamil Selvan, R. P. (2014). Baculovirus mediated transduction: analysis of vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyping. *Virusdisease*, 25(4), 441–446. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0229-5>
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567–575. <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Kost, T. A., & Kemp, C. W. (2016). Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications. *Advances in experimental medicine and biology*, 896, 187–197. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_12
- Lam, P., & Steinmetz, N. F. (2018). Plant viral and bacteriophage delivery of nucleic acid therapeutics. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 10(1), 10.1002/wnan.1487. <https://doi.org/10.1002/wnan.1487>
- Scully J. L. (2004). What is a disease?. *EMBO reports*, 5(7), 650–653. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400195>
- Lesch, H. P., Turpeinen, S., Niskanen, E. A., Mähönen, A. J., Airene, K. J., & Ylä-Herttuala, S. (2008). Generation of lentivirus vectors using recombinant baculoviruses. *Gene therapy*, 15(18), 1280–1286. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.76>
- Li, K. C., Chang, Y. H., Hsu, M. N., Lo, S. C., Li, W. H., & Hu, Y. C. (2017). Baculovirus-Mediated miR-214 Knockdown Shifts Osteoporotic ASCs Differentiation and Improves Osteoporotic Bone Defects Repair. *Scientific reports*, 7(1), 16225. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16547-3>
- Li, K. C., Chang, Y. H., Yeh, C. L., & Hu, Y. C. (2016). Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing MicroRNA sponges. *Biomaterials*, 74, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.046>
- Li, S., Yu, X., & Feng, Q. (2019). Fat Body Biology in the Last Decade. *Annual review of entomology*, 64, 315–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112007>
- Li, S., Zhang, Q. N., Zhang, X. T., Zheng, X. Y., Lv, Y. F., & Hao, Z. M. (2014). Cytomegalovirus immediate-early promoter efficiently drives heterogeneous gene expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 60(1), 6–11.
- Li, X., Le, Y., Zhang, Z., Nian, X., Liu, B., & Yang, X. (2023). Viral Vector-Based Gene Therapy. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 7736. <https://doi.org/10.3390/ijms24097736>
- Liao J. C. (2016). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expressing Baculovirus-Engineered Bone Morphogenetic Protein-7 Enhance Rabbit Posterolateral Fusion. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 1073. <https://doi.org/10.3390/ijms17071073>
- Liao J. C. (2016). Cell Therapy Using Bone Marrow-Derived Stem Cell Overexpressing BMP-7 for Degenerative Discs in a Rat Tail Disc Model. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 147. <https://doi.org/10.3390/ijms17020147>

- Lin, C. Y., Chang, Y. H., Sung, L. Y., Chen, C. L., Lin, S. Y., Li, K. C., Yen, T. C., Lin, K. J., & Hu, Y. C. (2014). Long-term tracking of segmental bone healing mediated by genetically engineered adipose-derived stem cells: focuses on bone remodeling and potential side effects. *Tissue engineering. Part A*, *20*(9-10), 1392–1402. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0314>
- Lin, C. Y., Lin, K. J., Kao, C. Y., Chen, M. C., Lo, W. H., Yen, T. C., Chang, Y. H., & Hu, Y. C. (2011). The role of adipose-derived stem cells engineered with the persistently expressing hybrid baculovirus in the healing of massive bone defects. *Biomaterials*, *32*(27), 6505–6514. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.059>
- Lin, C. Y., Lu, C. H., Luo, W. Y., Chang, Y. H., Sung, L. Y., Chiu, H. Y., & Hu, Y. C. (2010). Baculovirus as a gene delivery vector for cartilage and bone tissue engineering. *Current gene therapy*, *10*(3), 242–254. <https://doi.org/10.2174/156652310791321242>
- Lin, C. Y., Wang, Y. H., Li, K. C., Sung, L. Y., Yeh, C. L., Lin, K. J., Yen, T. C., Chang, Y. H., & Hu, Y. C. (2015). Healing of massive segmental femoral bone defects in minipigs by allogenic ASCs engineered with FLPo/Frt-based baculovirus vectors. *Biomaterials*, *50*, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.052>
- Xiaoman Liu, Aocheng Cao, Dongdong Yan, Canbin Ouyang, Qiuxia Wang & Yuan Li (2021) Overview of mechanisms and uses of biopesticides, *International Journal of Pest Management*, *67*:1, 65-72. [10.1080/09670874.2019.1664789](https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789)
- Liu, X., Zhang, J., Zhu, K.Y. (2019). Chitin in Arthropods: Biosynthesis, Modification, and Metabolism. In: Yang, Q., Fukamizo, T. (eds) Targeting Chitin-containing Organisms. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1142. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_9
- Lowman, Henry. (2013). Phage Display for Protein Binding. Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition, NGM Biopharmaceuticals, Inc. 431-436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00061-X>
- Locatelli, P., Giménez, C. S., Vega, M. U., Crottogini, A., & Belaich, M. N. (2019). Targeting the Cardiomyocyte Cell Cycle for Heart Regeneration. *Current drug targets*, *20*(2), 241–254. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180801122551>
- Locatelli, P., Belaich, M. N., López, A. E., Olea, F. D., Uranga Vega, M., Giménez, C. S., Simonin, J. A., Bauzá, M. D. R., Castillo, M. G., Cuniberti, L. A., Crottogini, A., Cerrudo, C. S., & Ghiringhelli, P. D. (2020). Novel insights into cardiac regeneration based on differential fetal and adult ovine heart transcriptomic analysis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *318*(4), H994–H1007. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00610.2019>
- Lo, H. R., & Chao, Y. C. (2004). Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology progress*, *20*(1), 354–360. <https://doi.org/10.1021/bp034132i>
- Lu, H. Y., Chen, Y. H., & Liu, H. J. (2012). Baculovirus as a vaccine vector. *Bioengineered*, *3*(5), 271–274. <https://doi.org/10.4161/bioe.20679>

Luo M. (2012). The nucleocapsid of vesicular stomatitis virus. *Science China. Life sciences*, 55(4), 291–300. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4307-x>

Luo, W. Y., Shih, Y. S., Hung, C. L., Lo, K. W., Chiang, C. S., Lo, W. H., Huang, S. F., Wang, S. C., Yu, C. F., Chien, C. H., & Hu, Y. C. (2012). Development of the hybrid Sleeping Beauty: baculovirus vector for sustained gene expression and cancer therapy. *Gene therapy*, 19(8), 844–851. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.129>

Madhan, S., Prabakaran, M., & Kwang, J. (2010). Baculovirus as vaccine vectors. *Current gene therapy*, 10(3), 201–213. <https://doi.org/10.2174/156652310791321233>

Mähönen, A. J., Airene, K. J., Puroola, S., Peltomaa, E., Kaikkonen, M. U., Riekkinen, M. S., Heikura, T., Kinnunen, K., Roschier, M. M., Wirth, T., & Ylä-Herttua, S. (2007). Post-transcriptional regulatory element boosts baculovirus-mediated gene expression in vertebrate cells. *Journal of biotechnology*, 131(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016>

Makarevich, P. I., Boldyreva, M. A., Gluhanyuk, E. V., Efimenko, A. Y., Dergilev, K. V., Shevchenko, E. K., Sharonov, G. V., Gallinger, J. O., Rodina, P. A., Sarkisyan, S. S., Hu, Y. C., & Parfyonova, Y. V. (2015). Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165. *Stem cell research & therapy*, 6, 204. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0199-6>

Mangor, J. T., Monsma, S. A., Johnson, M. C., & Blissard, G. W. (2001). A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of virology*, 75(6), 2544–2556. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2544-2556.2001>

Marín-García, M., Benseny-Cases, N., Camacho, M., Suades, J., & Barnadas-Rodríguez, R. (2017). Low-toxicity metallosomes for biomedical applications by self-assembly of organometallic metallosurfactants and phospholipids. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 53(60), 8455–8458. <https://doi.org/10.1039/c7cc04945e>

Mason, J. (1978). La epidemiología de la estomatitis vesicular: una revisión de la literatura y propuestas para estudios de campo. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa*, 29(30), 13-33. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50220>

Ardisson-Araújo, D. M., de Melo, F. L., Andrade, M. de S., Sihler, W., Bão, S. N., Ribeiro, B. M., & de Souza, M. L. (2014). Genome sequence of Erinnyis ello granulovirus (ErelGV), a natural cassava hornworm pesticide and the first sequenced sphingid-infecting betabaculovirus. *BMC genomics*, 15(1), 856. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-856>

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular biology and evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Nafissi, N., Alqawlaq, S., Lee, E. A., Foldvari, M., Spagnuolo, P. A., & Slavcev, R. A. (2014). DNA ministring: highly safe and effective gene delivery vectors. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 3(6), e165. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.16>

Nagamine, Toshihiro. (2021). Apoptotic arms races in insect-baculovirus coevolution. *Physiological Entomology*, 47, 1-10. <https://doi.org/10.1111/phen.12371>

Nasimuzzaman, M., van der Loo, J. C. M., & Malik, P. (2018). Production and Purification of Baculovirus for Gene Therapy Application. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (134), 57019. <https://doi.org/10.3791/57019>

Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., 3rd, & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 31(4), 317–334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>

Nava-Pérez E., García-Gutiérrez C., Camacho-Báez J. R., Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas; una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3b), 17-29.

NHGRI (National Human Genome Research Institute). <https://www.genome.gov/> (Última visita 7/4/2021)

Olea, F. D., Vera Janavel, G., Cuniberti, L., Yannarelli, G., Cabeza Meckert, P., Cors, J., Valdivieso, L., Lev, G., Mendiz, O., Bercovich, A., Criscuolo, M., Melo, C., Laguens, R., & Crottogini, A. (2009). Repeated, but not single, VEGF gene transfer affords protection against ischemic muscle lesions in rabbits with hindlimb ischemia. *Gene therapy*, 16(6), 716–723. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.30>

Orlicky, D. J., & Schaack, J. (2001). Adenovirus transduction of 3T3-L1 cells. *Journal of lipid research*, 42(3), 460–466. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31671-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31671-0)

Iatrou, K. (1993). Baculovirus expression vectors: A laboratory manual D. R. O'Reilly, L. K. Miller, and V. A. Luckow. New York: W. H. Freeman and Co. *Cell*, 74, 7-8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90288-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90288-2)

OMS (Organización Mundial de la Salud). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Última visita 7/4/2021)

Ono, C., Okamoto, T., Abe, T., & Matsuura, Y. (2018). Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses*, 10(9), 510. <https://doi.org/10.3390/v10090510>

Pan, Y., Fang, L., Fan, H., Luo, R., Zhao, Q., Chen, H., & Xiao, S. (2010). Antitumor effects of a recombinant pseudotype baculovirus expressing Apoptin in vitro and in vivo. *International journal of cancer*, 126(11), 2741–2751. <https://doi.org/10.1002/ijc.24959>

Pan, Y., Liu, S., Wu, H., Lv, J., Xu, X., & Zhang, Y. (2013). Baculovirus as an ideal radionuclide reporter gene vector: a new strategy for monitoring the fate of human stem cells in vivo. *PLoS one*, 8(4), e61305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061305>

Paredes, D., Campos, M., Cayuela, L. (2013). El control biológico de plagas de artrópodos por conservación: técnicas y estado del arte. *Ecosistemas*, 22(1), 56-61. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2013.22-1.10>

Parsza, C. N., Gómez, D. L. M., Simonin, J. A., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2021). Evaluation of the Nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* as a Vector for Gene Therapy in Mammals. *Current gene therapy*, 21(2), 177–189. <https://doi.org/10.2174/1566523220999201217155945>

Paul, A., Binsalamah, Z. M., Khan, A. A., Abbasia, S., Elias, C. B., Shum-Tim, D., & Prakash, S. (2011). A nanobiohybrid complex of recombinant baculovirus and Tat/DNA nanoparticles for delivery of Ang-1 transgene in myocardial infarction therapy. *Biomaterials*, 32(32), 8304–8318. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.042>

Paul, A., Elias, C. B., Shum-Tim, D., & Prakash, S. (2013). Bioactive baculovirus nanohybrids for stent based rapid vascular re-endothelialization. *Scientific reports*, 3, 2366. <https://doi.org/10.1038/srep02366>

Paul, A., Nayan, M., Khan, A. A., Shum-Tim, D., & Prakash, S. (2012). Angiopoietin-1-expressing adipose stem cells genetically modified with baculovirus nanocomplex: investigation in rat heart with acute infarction. *International journal of nanomedicine*, 7, 663–682. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26882>

Pilkington, E. H., Suys, E. J. A., Trevaskis, N. L., Wheatley, A. K., Zukancic, D., Algarni, A., Al-Wassiti, H., Davis, T. P., Pouton, C. W., Kent, S. J., & Truong, N. P. (2021). From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta biomaterialia*, 131, 16–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.06.023>

Premanand, B., Zhong Wee, P., & Prabakaran, M. (2018). Baculovirus Surface Display of Immunogenic Proteins for Vaccine Development. *Viruses*, 10(6), 298. <https://doi.org/10.3390/v10060298>

Quinley, E. D.; Schwartz, J. (2019). Quality and Regulatory Issues in Cellular Therapy. In *Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition)*, Beth H. Shaz, Christopher D. Hillyer, Morayma Reyes Gil. Elsevier, 543-551. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813726-0.00089-1>

Quintavalle, C., Garofalo, M., Zanca, C., Romano, G., Iaboni, M., del Basso De Caro, M., Martinez-Montero, J. C., Incoronato, M., Nuovo, G., Croce, C. M., & Condorelli, G. (2012). miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTP μ . *Oncogene*, 31(7), 858–868. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.280>

Rehmann-Sutter C. (2018). Why Human Germline Editing is More Problematic than Selecting Between Embryos: Ethically Considering Intergenerational Relationships. *The New bioethics : a multidisciplinary journal of biotechnology and the body*, 24(1), 9–25. <https://doi.org/10.1080/20502877.2018.1441669>

Ren, C., Zhao, M., Yang, X., Li, D., Jiang, X., Wang, L., Shan, W., Yang, H., Zhou, L., Zhou, W., & Zhang, H. (2006). Establishment and applications of epstein-barr virus-based episomal vectors in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1338–1347. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0338>

Roelvink, P. W., Corsaro, B. G., & Granados, R. R. (1995). Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *The Journal of general virology*, 76 (Pt 11), 2693–2705. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-11-2693>

Rohrmann, G. F. (2019). *Baculovirus Molecular Biology*. (4th ed.). National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543458/>

Rychlowska, M., Gromadzka, B., Bieńkowska-Szewczyk, K., & Szewczyk, B. (2011). Application of baculovirus-insect cell expression system for human therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(11), 1840–1849. <https://doi.org/10.2174/138920111798377012>

Sambrook, J., & W Russell, D. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=YTxBWUjBeUC&printsec=frontcover%5Cnpapers2://publication/uuid/BBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB>

Schakowski, F., Gorschlüter, M., Buttgereit, P., Märten, A., Lilienfeld-Toal, M. V., Junghans, C., Schroff, M., König-Merediz, S. A., Ziske, C., Strehl, J., Sauerbruch, T., Wittig, B., & Schmidt-Wolf, I. G. (2007). Minimal size MIDGE vectors improve transgene expression in vivo. *In vivo (Athens, Greece)*, 21(1), 17–23.

Schmid G. (1996). Insect cell cultivation: growth and kinetics. *Cytotechnology*, 20(1-3), 43–56. <https://doi.org/10.1007/BF00350388>

Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(6), 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>

Shin, H. Y., Choi, H., Kim, N., Park, N., Kim, H., Kim, J., & Kim, Y. B. (2020). Unraveling the Genome-Wide Impact of Recombinant Baculovirus Infection in Mammalian Cells for Gene Delivery. *Genes*, 11(11), 1306. <https://doi.org/10.3390/genes11111306>

Shrestha, A., Bao, K., Chen, Y. R., Chen, W., Wang, P., Fei, Z., & Blissard, G. W. (2018). Global Analysis of Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Gene Expression in the Midgut of the Lepidopteran Host *Trichoplusia ni*. *Journal of virology*, 92(23), e01277-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01277-18>

Sung, L. Y., Chen, C. L., Lin, S. Y., Li, K. C., Yeh, C. L., Chen, G. Y., Lin, C. Y., & Hu, Y. C. (2014). Efficient gene delivery into cell lines and stem cells using baculovirus. *Nature protocols*, 9(8), 1882–1899. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.130>

Thiem S. M. (2009). Baculovirus genes affecting host function. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 45(3-4), 111–126. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9170-5>

Suzuki, H., Matsumoto, N., Suzuki, T., Chang, M. O., & Takaku, H. (2009). Stable replication of the EBNA1/OriP-mediated baculovirus vector and its application to anti-HCV gene therapy. *Virology journal*, 6, 156. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-156>

Takata, Y., Kishine, H., Sone, T., Andoh, T., Nozaki, M., Poderycki, M., Chesnut, J. D., & Imamoto, F. (2011). Generation of iPS cells using a BacMam multigene expression system. *Cell structure and function*, 36(2), 209–222. <https://doi.org/10.1247/csf.11008>

- Tamura, T., Kawabata, C., Matsushita, S., Sakaguchi, M., & Yoshida, S. (2016). Malaria sporozoite protein expression enhances baculovirus-mediated gene transfer to hepatocytes. *The journal of gene medicine*, 18(4-6), 75–85. <https://doi.org/10.1002/jgm.2879>
- Tani, H., Limn, C. K., Yap, C. C., Onishi, M., Nozaki, M., Nishimune, Y., Okahashi, N., Kitagawa, Y., Watanabe, R., Mochizuki, R., Moriishi, K., & Matsuura, Y. (2003). In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *Journal of virology*, 77(18), 9799–9808. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.18.9799-9808.2003>
- Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., & Matsuura, Y. (2001). Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*, 279(1), 343–353. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0699>
- Targovnik, A. M., Simonin, J. A., Mc Callum, G. J., Smith, I., Cuccovia Warlet, F. U., Nugnes, M. V., Miranda, M. V., & Belaich, M. N. (2021). Solutions against emerging infectious and noninfectious human diseases through the application of baculovirus technologies. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(21-22), 8195–8226. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11615-1>
- Tavira Montalván, C. A., Ortega García A., Dávila González I., Estrada Mondaca S., Meneses Acosta A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(4).
- Torres-Vega, M. A., Vargas-Jerónimo, R. Y., Montiel-Martínez, A. G., Muñoz-Fuentes, R. M., Zamorano-Carrillo, A., Pastor, A. R., & Palomares, L. A. (2015). Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vectors: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia. *Gene therapy*, 22(1), 58–64. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.89>
- Tsai, C. H., Wei, S. C., Lo, H. R., & Chao, Y. C. (2020). Baculovirus as Versatile Vectors for Protein Display and Biotechnological Applications. *Current issues in molecular biology*, 34, 231–256. <https://doi.org/10.21775/cimb.034.231>
- Turunen, T. A., Laakkonen, J. P., Alasaarela, L., Airene, K. J., & Ylä-Herttua, S. (2014). Sleeping Beauty-baculovirus hybrid vectors for long-term gene expression in the eye. *The journal of gene medicine*, 16(1-2), 40–53. <https://doi.org/10.1002/jgm.2756>
- van Beek, N., & Davis, D. C. (2016). Baculovirus Insecticide Production in Insect Larvae. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1350, 393–405. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3043-2_20
- van Oers, M. M., & Vlak, J. M. (2007). Baculovirus genomics. *Current drug targets*, 8(10), 1051–1068. <https://doi.org/10.2174/138945007782151333>
- Vanarsdall, A. L., Mikhailov, V. S., & Rohrmann, G. F. (2007). Baculovirus DNA replication and processing. *Current drug targets*, 8(10), 1096–1102. <https://doi.org/10.2174/138945007782151397>
- Vega, M. C. (2016). Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications. In *Advanced technologies for protein complex production and characterization*, Vega, M. C. (Ed.). Springer, 896, 187–197. 10.1007/978-3-319-27216-0

Wang C. (2008). Hybrid baculovirus-Adeno-associated virus vectors for prolonged transgene expression in human neural cells. *Journal of neurovirology*, 14(6), 563–568. <https://doi.org/10.1080/13550280802290606>

Wang, G., Na, S., Duan, X., Leng, Z., Jiang, Y., Shi, S., Yang, R., & Qin, L. (2019). Transcriptome sequencing to unravel the molecular mechanisms underlying the cuticle liquefaction of *Antheraea pernyi* following *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus challenge. *Molecular immunology*, 109, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.03.009>

Wang, J., Kong, D., Zhu, L., Wang, S., & Sun, X. (2020). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Modified Hybrid Baculovirus-Adeno-Associated Viral Vectors Targeting ¹³¹I Therapy of Hypopharyngeal Carcinoma. *Human gene therapy*, 31(23-24), 1300–1311. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.081>

Wang, J., Zhu, L., Chen, X., Huang, R., Wang, S., & Dong, P. (2019). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Functionalized by Hybrid Baculovirus-Adeno-Associated Viral Vectors for Targeting Hypopharyngeal Carcinoma. *Stem cells and development*, 28(8), 543–553. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0252>

Wang, X., Shang, Y., Chen, C., Liu, S., Chang, M., Zhang, N., Hu, H., Zhang, F., Zhang, T., Wang, Z., Liu, X., Lin, Z., Deng, F., Wang, H., Zou, Z., Vlak, J. M., Wang, M., & Hu, Z. (2019). Baculovirus Per Os Infectivity Factor Complex: Components and Assembly. *Journal of virology*, 93(6), e02053-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02053-18>

Wang, Q., Bosch, B. J., Vlak, J. M., van Oers, M. M., Rottier, P. J., & van Lent, J. W. M. (2016). Budded baculovirus particle structure revisited. *Journal of invertebrate pathology*, 134, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.001>

Wang, X., Liu, X., Makallawa, G. A., Li, J., Wang, H., Hu, Z., & Wang, M. (2017). Per os infectivity factors: a complicated and evolutionarily conserved entry machinery of baculovirus. *Science China. Life sciences*, 60(8), 806–815. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9127-1>

Wang, P., & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6977–6982. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6977>

Wang, P., Hammer, D. A., & Granados, R. R. (1997). Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells. *The Journal of general virology*, 78 (Pt 12), 3081–3089. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-12-3081>

Watanabe, M., Nishikawaji, Y., Kawakami, H., & Kosai, K. I. (2021). Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy. *Viruses*, 13(12), 2502. <https://doi.org/10.3390/v13122502>

Whelan, S. P. J. (2008). Vesicular Stomatitis Virus. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 291-299). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00529-X>

Williams, T., Virto, C., Murillo, R., & Caballero, P. (2017). Covert Infection of Insects by Baculoviruses. *Frontiers in microbiology*, 8, 1337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01337>

World Health Organization. (1946). Preamble to the Constitution of the World Health Organization. WHO, New York, USA. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(12), 981-984. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/268691>

Wong, S., Lam, P., Nafissi, N., Denniss, S., & Slavcev, R. (2016). Production of Double-stranded DNA Ministrings. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (108), 53177. <https://doi.org/10.3791/53177>

Yeh, T. S., Fang, Y. H., Lu, C. H., Chiu, S. C., Yeh, C. L., Yen, T. C., Parfyonova, Y., & Hu, Y. C. (2014). Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials*, 35(1), 174-184. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.080>

Yu, Q., Bai, L., Ji, N., Yue, X., Jiang, Y., & Li, Z. (2020). Critical Residues and Contacts within Domain IV of Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus GP64 Contribute to Its Refolding during Membrane Fusion. *Journal of virology*, 94(19), e01105-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01105-20>

Yunta Rodríguez, Eduardo. (2003). Terapia génica y principios éticos. *Acta bioethica*, 9(1), 69-79. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2003000100007>

Yurchenco, P. D., & O'Rear, J. J. (1994). Basal lamina assembly. *Current opinion in cell biology*, 6(5), 674-681. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90093-0)

Zhao, J., Zhao, S., Ou, J., Zhang, J., Lan, W., Guan, W., Wu, X., Yan, Y., Zhao, W., Wu, J., Chodosh, J., & Zhang, Q. (2020). COVID-19: Coronavirus Vaccine Development Updates. *Frontiers in immunology*, 11, 602256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.602256>

Zhang, Z., & Lutz, B. (2002). Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic acids research*, 30(17), e90. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf089>

Zhu, F. C., Li, Y. H., Guan, X. H., Hou, L. H., Wang, W. J., Li, J. X., Wu, S. P., Wang, B. S., Wang, Z., Wang, L., Jia, S. Y., Jiang, H. D., Wang, L., Jiang, T., Hu, Y., Gou, J. B., Xu, S. B., Xu, J. J., Wang, X. W., Wang, W., Chen, W. (2020). Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet (London, England)*, 395(10240), 1845-1854. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31208-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31208-3)

Zylberberg, C., Gaskill, K., Pasley, S., & Matosevic, S. (2017). Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene therapy*, 24(8), 441-452. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.41>