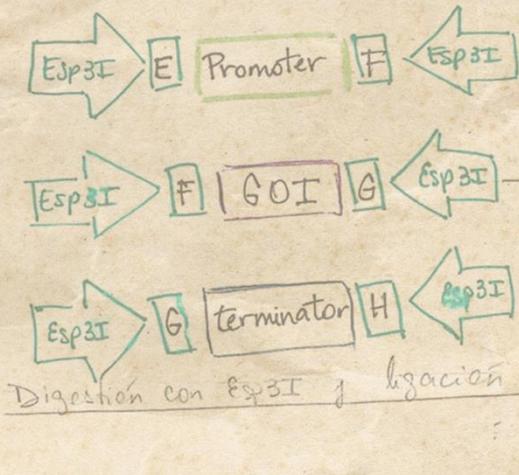
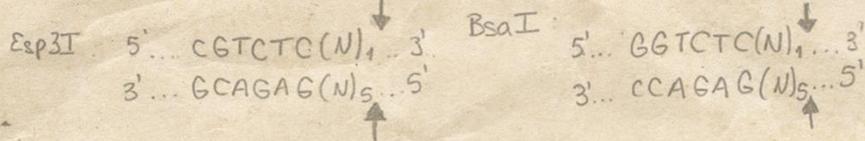


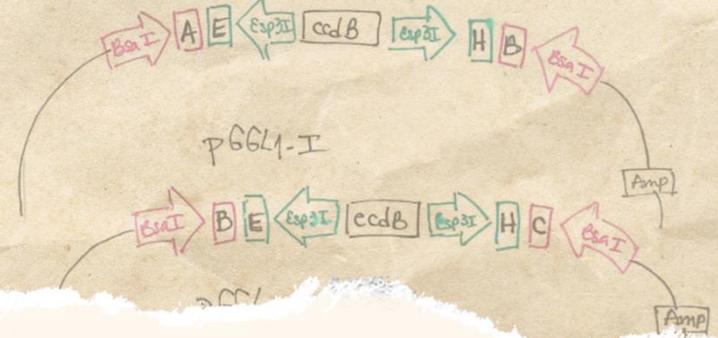
Nivel 0:



Enzimas tipo II utilizadas:



Nivel 1: pUC57 mini (Amp^R)

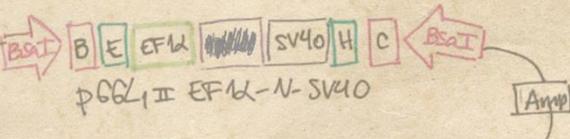
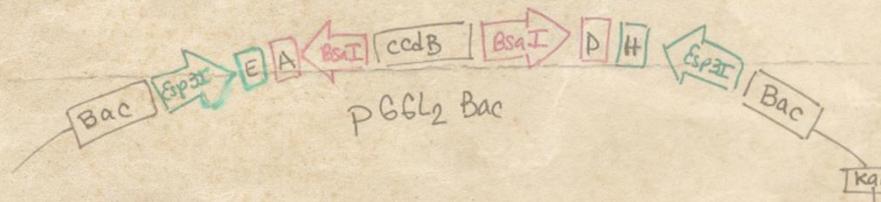
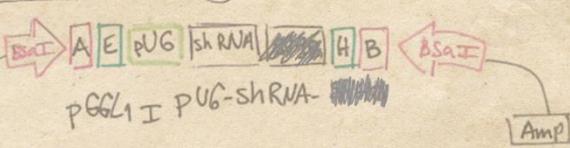


Desarrollo de una plataforma de baculovirus recombinantes destinados a la expresión de múltiples genes terapéuticos en células de mamíferos

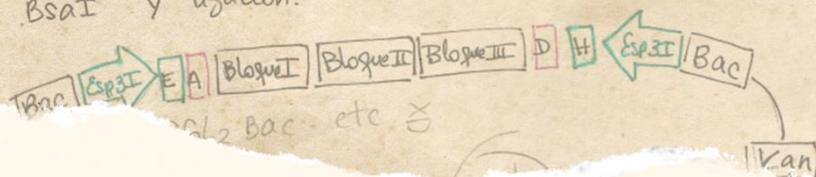
Digestión con Esp3I y ligación con los pGGL1



Nivel 2: pUC57 (kan^R)



Digestión de los pGGL1 I-IV + insertos y del pGGL2 Bac con BsaI y ligación:



Lic. Leslie C. Amorós Morales
 Director: Dr. Víctor Romanowski
 Co-director: Dr. Matías L. Pidre



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Desarrollo de una plataforma de baculovirus recombinantes
destinados a la expresión de múltiples genes terapéuticos en
células de mamífero***

Tesista: Leslie C. Amorós Morales

Director: Víctor Romanowski

Codirector: Matías Luis Pidre

Año: 2024

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP, CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Víctor Romanowski y la codirección del Dr. Matías Luis Pidre.

Diseño de tapa, contratapa y portadas

Silvana Rodríguez Oro

Índice

Resumen	12
Abreviaturas	14
Publicaciones y actividades de transferencia tecnológica	18
Publicaciones aceptadas con referato.....	18
Publicaciones bajo revisión en formato <i>pre-print</i>	19
Actividades de Transferencia Tecnológica.....	19
Capítulo 1. Introducción General.....	24
Baculovirus	24
Descubrimiento de los baculovirus.....	24
Biología de los baculovirus.....	25
Aplicaciones biotecnológicas de los Baculovirus	34
Producción de Baculovirus recombinantes	35
Los BV y las líneas celulares.....	36
Entrada de los baculovirus en células de mamíferos: transducción	37
Estrategias para mejorar la eficiencia de transducción	38
Terapia génica	41
Clonado por Golden Gate.....	43
Cáncer.....	45
Estadísticas del cáncer.....	47
Referencias	52
Hipótesis	66
Objetivos	67
Objetivo general	67
Objetivos específicos	67
Referencias	68
Capítulo 2. PluriBAC: un sistema modular versátil basado en baculovirus para expresar genes heterólogos en diferentes plataformas biotecnológicas.	72
Introducción.....	72
Objetivo general	74
Objetivos específicos	74
Resultados.....	74

Descripción del sistema PluriBAC.....	74
Obtención de AcMNPV recombinantes y verificación de infectividad y capacidad transductora.....	79
Ensamblado de múltiples insertos en el sistema de expresión Bac-to-Bac™	85
Diseño y obtención de un baculovirus AcMNPV triple reportero	88
Discusión.....	90
Referencias	95
Capítulo 3. Rol de RIPK1 y PRLR en la patología de los gliomas difusos.....	100
Introducción.....	100
Vías de muerte celular regulada y cáncer	101
RIPK1 y muerte celular programada	103
Prolactina y cáncer.....	104
Bases de datos de pacientes	105
Objetivo general	106
Objetivos específicos	106
Resultados	106
Expresión de RIPK1 y supervivencia	108
RIPK1 y vías relevantes para la fisiología tumoral	110
Proliferación	115
Transición epitelio-mesenquimal	116
Expresión de RIPK1 e infiltración de células inmunes	117
Expresión de PRLR y supervivencia	119
Expresión de PRLR y proliferación	121
Discusión.....	122
Referencias	125
Capítulo 4. Generación de recBV con aplicación terapéutica contra GBM y validación pre-clínica <i>in vitro</i>.....	134
Introducción.....	134
Terapia combinada contra el cáncer	134
RIPK1: regulador de la supervivencia celular, la inflamación y la muerte ...	137
Inhibidores de RIPK1.....	139
<i>Short hairpin</i> RNA (shRNA) para el silenciamiento de genes.....	139

El rol de la vía del receptor de prolactina en GBM.....	142
Objetivos generales	143
Objetivos específicos	143
Resultados	144
El inhibidor de RIPK1 no afectó la proliferación de células de glioblastoma	144
Efecto del inhibidor de RIPK1 sobre la quimiorresistencia	144
Generación de un recAcMNPV con capacidad silenciadora de RIPK1	147
El shRIPK1 incrementa la eficiencia de transducción baculoviral y los niveles de expresión de transgenes en células de GBM.	150
El recAcMNPV Ac shRIPK1 reduce la proliferación celular e induce la apoptosis en células de GBM transducidas	152
Generación del recAcMNPV que codifica un antagonista de prolactina (aPRL), utilizando el sistema PluriBAC	153
El recAcMNPV Ac aPRL afecta la viabilidad de las células de GBM	154
Discusión.....	155
Referencias	159
Capítulo 5. Conclusiones generales y perspectivas.....	166
Conclusiones generales	166
Optimización de la producción de recBV: sistema PluriBAC.....	166
Vías de señalización y moléculas blanco para la terapia génica de GBM....	168
Perspectivas.....	172
Referencias	172
Capítulo 6. Materiales y métodos	178
Agradecimientos	196
Notas	¡Error! Marcador no definido.

Resumen

El baculovirus AcMNPV (*Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus) ha sido ampliamente utilizado para la producción de bioinsumos. En ese sentido, el mejoramiento de las tecnologías usadas para la producción de AcMNPV recombinantes (recAcMNPV) resulta de particular interés. El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de un nuevo sistema llamado PluriBAC, basado en la tecnología de clonado por Golden Gate utilizando enzimas de restricción (ER) tipo IIS para el ensamblado simultáneo de múltiples fragmentos en un mismo vector. PluriBAC consta de tres niveles que permiten la combinación de módulos. Los vectores del nivel 1 poseen las secuencias compatibles con los módulos provenientes del nivel 0. Asimismo, a partir del nivel 1, se obtendrá el plásmido del nivel 2 con el ensamblado final de los múltiples bloques. Mientras que los vectores del nivel 2 contienen secuencias que permiten la recombinación homóloga con el plásmido bApGOZA, plásmidos del nivel 1 se adaptaron para permitir la generación de recAcMNPV a través de trasposición en bacterias (Bac-to-Bac). En este trabajo presentamos un sistema versátil, basado en Golden Gate, para la generación de baculovirus recombinantes. Presentamos diferentes baculovirus reporteros generados con este sistema que nos permitieron evidenciar que conservaron tanto la capacidad infectiva como transductora en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Como campo de aplicación de este nuevo sistema, elegimos la terapia antitumoral aplicada, en particular, al Glioblastoma Multiforme (GBM). El GBM representa el 49% de los tumores cerebrales malignos y se caracteriza por su invasividad y resistencia intrínseca a la terapia convencional, por lo que el tumor recurre y es letal de 6 a 15 meses luego del diagnóstico. A pesar de los esfuerzos para mejorar el tratamiento de este tumor, la supervivencia de los pacientes con GBM no ha mejorado en los últimos 20 años. Por este motivo, con el fin último de incrementar el abanico de alternativas terapéuticas contra esta enfermedad, nos propusimos caracterizar nuevos posibles blancos moleculares mediante, en primer lugar, análisis *in silico* a partir de bases de datos de biopsias de pacientes y, en segundo lugar, a través de validaciones experimentales en modelos de GBM *in vitro*.

Uno de los blancos terapéuticos que estudiamos fue la proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1 (RIPK1), considerada como un regulador maestro de la decisión celular entre la señalización pro-supervivencia y la muerte celular. A partir de nuestros estudios *in silico* pudimos concluir que los niveles de expresión de RIPK1 se encuentran fuertemente asociados a los gliomas más agresivos y con un peor pronóstico, y al sostenimiento de la inflamación crónica característica del GBM mediante la regulación positiva de vías de muerte celular inflamatorias como la piroptosis y la necroptosis. Esto a su vez podría conducir a una mayor infiltración inmunológica en el microambiente tumoral. Para validar experimentalmente este blanco molecular utilizamos dos estrategias diferentes. Por un lado, utilizamos un inhibidor comercial de la actividad quinasa de RIPK1 y observamos un efecto positivo sobre la sensibilización de las células de GBM ante el tratamiento combinado con el quimioterápico cisplatino, disminuyendo significativamente la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis. En segundo lugar, diseñamos y

generamos un baculovirus recombinante, utilizando el sistema PluriBAC, capaz de silenciar la expresión de RIPK1, observando un efecto aún más marcado sobre la proliferación y la muerte celular programada.

El segundo blanco terapéutico abordado fue el receptor de la prolactina (PRLR). La prolactina es una hormona que se encuentra relacionada con la supervivencia y la proliferación celular en diferentes tipos de tumores respondedores a hormonas y también en los GBM. Nuestros análisis *in silico* revelaron que la expresión de PRLR se correlaciona con aquellos tumores más agresivos y con algunos de los genes involucrados en las vías proliferativas. Análogamente, para las validaciones *in vitro*, generamos un baculovirus recombinante que codifica para un antagonista de la prolactina, capaz de inhibir la vía de señalización de PRLR. Al tratar las células de GBM con este baculovirus observamos una significativa disminución de la viabilidad celular.

La sumatoria de los resultados obtenidos sugieren que los recAcMNPV generados mediante el sistema PluriBAC, destinados a regular negativamente a RIPK1 y a PRLR, podrían ser candidatos promisorios para el tratamiento contra el Glioblastoma Multiforme.

Abreviaturas

AAV: virus adeno asociados (del inglés *adeno associated virus*)
AdV: adenovirus
AcMNPV: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus
aPRL: antagonista de la prolactina
BEVS: sistema de vectores de expresión de baculovirus
BSA: seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)
BSL: del inglés *Bio-Safety Level*
BV: viriones brotantes o brotados (del inglés *budded virus*); baculovirus
CDDP: cisplatino
CMV: citomegalovirus
DAMPs: *damage-associated molecular patterns*
DC: células dendríticas (del inglés *dendritic cells*)
d.C: después de Cristo
DD: del inglés *death domain*
DEG: gen diferencialmente expresado
DG: gliomas difusos (*Diffuse Gliomas*)
DNA: ácido desoxirribonucleico (ADN)
DNApol: DNA polimerasa
DSB: *Double Strand Break*
dsRNA: RNA de doble cadena (*double stranded RNA*)
EBV: *Epstein Barr Virus*
ER: enzima de restricción
FDA: del inglés *Food and Drug Administration*
FDR: tasa de falsos descubrimientos
GBM: Glioblastoma Multiforme
GG: Golden Gate
Globocan: Observatorio Global del Cáncer (*Global Cancer Observatory*)
gra: granulina
GV: granulovirus
hr: región homóloga (*homologous region*)
HR: recombinación homóloga (*homologous recombination*)
hs: horas
IARC: del inglés *International Agency for Cancer Research*
IDH: Isocitrato deshidrogenasa
IDHm: Isocitrato deshidrogenasa mutada
IDHwt: Isocitrato deshidrogenasa *wild type*
IFN: interferón
IFN- β : interferón β
IL: interleuquina
INBIOMED: Instituto de Investigaciones Biomédicas (Facultad de Medicina, UBA;
CONICET; Buenos Aires)
IP: Ioduro de propidio
kpb: kilopares de bases (1000 pb)
LGGGBM: *Low Grade Glioma and Glioblastoma Multiforme*
MNPV: *Multiple Nucleopolyhedrovirus*

MW: marcador de peso molecular (del inglés *molecular weight*)
 MOI: multiplicidad de infección (del inglés *multiplicity of infection*)
 miRNA: micro RNA
 mRNA: RNA mensajero
 NC: nucleocápside
 Nec-1: necrostatina-1
 no-*hr*: región no homóloga
 NPV: *Nucleopolyhedrovirus*
 NK: *natural killer*
 OB: cuerpo de oclusión (del inglés *occlusion body*)
 ODV: viriones derivados de oclusión (del inglés *occlusion-derived virus*)
 OMS: Organización Mundial de la Salud
 ORF: marco abierto de lectura (del inglés *open reading frame*)
ori: origen de replicación
 PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*
 pb: pares de bases
 PBS: buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffer saline*)
 PCD: muerte celular programada (*programmed cell death*)
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
 polh: poliedrina (*polyhedrin*)
 PRL: prolactina
 PRLR: receptor de prolactina
 recBV: baculovirus recombinante
 RHIM: motivo de interacción homotípico RIP
 RIPK1: proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1
 RIPK3: proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 3
 RNA: ácido ribonucleico (ARN)
 RNAi: RNA de interferencia
 ROS: especies reactivas de oxígeno
 rpm: revoluciones por minuto
 shRNA: del inglés *short hairpin* RNA
 SNC: Sistema Nervioso Central
 SNPV: *Single Nucleopolyhedrovirus*
 TA: temperatura ambiente
 TB: terabyte
 TCGA: *The Cancer Genome Atlas*
 TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (en inglés: *transforming growth factor β*)
 TIME: *tumor immune microenvironment*
 TME: *tumor microenvironment*
 TMZ: Temozolomida
 TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: *tumor necrosis factor α*)
 TUNEL: Determinación microscópica de la fragmentación del DNA por incorporación enzimática de dUTP con transferasa terminal en los extremos 3' (del inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)
 UCSC: *University of California, Santa Cruz*
 UFP: unidades formadoras de placa

UV: ultravioleta

VLP: *virus-like particles*

VSV: virus de la estomatitis vesicular (*vesicular stomatitis virus*)

VSV-G: proteína G del virus de la estomatitis vesicular

wt: del inglés *wild type*

Publicaciones y actividades de transferencia tecnológica

La presente tesis doctoral se realizó en el período 2018-2024. Durante este período se obtuvieron resultados derivados específicamente de la tesis o en el marco de colaboraciones científicas que dieron lugar a diferentes publicaciones que se enlistan a continuación.

Publicaciones aceptadas con referato

- **Exploring the metastatic role of the inhibitor of apoptosis BIRC6 in Breast Cancer.** Gómez Bergna SM, Marchesini A, Amorós Morales LC, Arrías PN, Romanowski V, Gottardo MF & Pidre ML. (2022), JCO, Clinical Cancer Informatics. DOI: 10.1200/CCI.22.00093
- **The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health.** Pidre, ML*, Arrías PN*, Amorós Morales, LC, Romanowski, V. 2022. Viruses, Mdpi. DOI: 10.3390/v15010080
- **Evaluation of Baculoviruses as Gene Therapy Vectors for Brain Cancer.** Garcia Fallit M*, Pidre ML*, Asad AS, Peña Agudelo JA, Vera MB, Nicola Candia AJ, Sagripanti SB, Pérez Kuper M, Amorós Morales LC, Marchesini A, Gonzalez N, Caruso CM, Romanowski V, Seilicovich A, Videla-Richardson GA, Zanetti FA & Candolfi M. (2023). Viruses. Mdpi. DOI: 10.3390/v15030608.
- **Mitochondrial Peptide Humanin Facilitates Chemoresistance in Glioblastoma Cells.** Peña Agudelo JA, Pidre ML, Garcia Fallit M, Pérez Küper M, Zuccato C, Nicola Candia AJ, Marchesini A, Vera MB, De Simone E, Giampaoli C, Amorós Morales LC, Gonzalez N, Romanowski V, Videla-Richardson GA, Seilicovich A & Candolfi M. Cancers 2023, 15, 4061. DOI: 10.3390/cancers15164061.
- **PluriBAC: A Versatile Baculovirus-Based Modular System to Express Heterologous Genes in Different Biotechnological Platforms.** Amorós Morales LC, Marchesini A, Gómez Bergna SM, García Fallit M, Tongiani SE, Vásquez L, Ferrelli ML, Videla-Richardson GA, Candolfi M, Romanowski V & Pidre ML. Viruses 2023, 15, 1984. DOI: 10.3390/v15101984.
- **Silica-Coated Magnetic Particles for Efficient RNA Extraction for SARS-CoV-2 Detection.** Capriotti N*, Amorós Morales LC*, De Sousa E, Juncal L, Pidre ML, Traverso L, López MF, Ferelli ML, Lavorato G, Lillo C,

Vazquez Robaina O, Mele N, Vericat C, Schilardi P, Cabrera AF, Stewart S, Fonticelli MH, Mendoza Zéliz P, Ons S, Romanowski V, Rodríguez Torres C. (*Contribución equivalente). Heliyon. 2024 Jan 27;10(3):e25377 DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25377.

Publicaciones bajo revisión en formato *pre-print*

- **Role of RIPK1 in Diffuse Gliomas pathology.** Amorós Morales LC; Gómez Bergna SM; Marchesini A; Scalise ML; González N; Candolfi M; Romanowski V; Pidre ML. Preprint in bioRxive. DOI: 10.1101/2023.11.11.566709.

Actividades de Transferencia Tecnológica

Es importante destacar que, en el mismo período de tiempo, durante el ASPO/DISPO ocasionado por la pandemia de la COVID-19, se realizaron diferentes tareas de investigación y transferencia tecnológica por fuera del plan de trabajo con el fin último de realizar un aporte al diagnóstico de SARS-CoV-2 y al manejo epidemiológico de la enfermedad. En ese contexto durante los años 2020 y 2021, en el marco de una colaboración interdisciplinaria entre becarios/as, técnicos/as e investigadores/as del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), el Instituto de Física de La Plata (IFLP), el Instituto de Investigaciones Físico-Químicas, Teóricas y Aplicadas (INIFTA) y el Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG), desarrollamos un kit rápido de extracción de RNA viral basado en nanopartículas magnéticas el cual fue desafiado mediante su utilización en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, el Hospital Evita Pueblo de Lanús y el Hospital Rossi de La Plata. Este desarrollo tecnológico además de dar lugar a una publicación (enlistada anteriormente), recibió dos premios y distinciones y permitió la realización de Informes Técnicos, Convenios específicos de colaboración y asistencia recíproca con el Ministerio de Salud y el Ministerio de Producción, Ciencia e Innovación Tecnológica de la Provincia de Buenos Aires y Convenios de transferencia tecnológica con diferentes actores del sector privado:

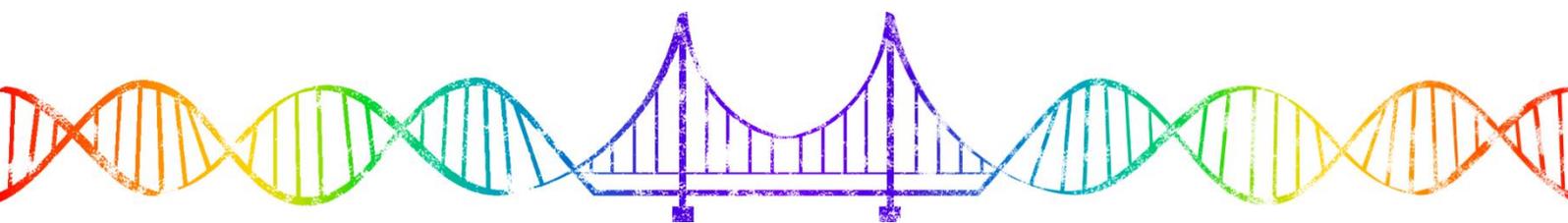
- **CONVENIO ESPECÍFICO DE COLABORACIÓN Y ASISTENCIA RECÍPROCA** entre el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, el Ministerio de Producción, Ciencia e Innovación Tecnológica de la Provincia de Buenos Aires, el CONICET y la Universidad Nacional de La Plata. En el marco del proyecto: “Desarrollo de kits para la extracción rápida de ARN, basado en el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, con el fin de reducir el tiempo de diagnóstico de infección por SARS-CoV-2”. Inicio año 2020.

- **CONVENIO DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA CON LA EMPRESA INBIO HIGHWAY.** En el marco del proyecto: “Desarrollo de kits para la extracción rápida de ARN, basado en el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, con el fin de reducir el tiempo de diagnóstico de infección por SARS-CoV-2”. 2022-2023.
- **CONVENIO DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA CON LA EMPRESA MAGNOLIA EBT.** En el marco del proyecto: “Desarrollo de kits para la extracción rápida de ARN, basado en el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, con el fin de reducir el tiempo de diagnóstico de infección por SARS-CoV-2”. 2022-actualidad.
- **Mención especial COVID-19 concurso Innova Salud 2021.** “Desarrollo de kit de extracción de ácidos ribonucleicos para detección de Sars-CoV-2”.
- **Premio al mejor trabajo presentado.** “Método para la extracción de RNA basado en el uso de nanopartículas magnéticas”. SAPROBIO, 2021.

Estos resultados no han sido incorporados en el presente trabajo de tesis doctoral debido a que no formaban parte del plan original y se encuentran parcialmente protegidos bajo acuerdos de confidencialidad en el marco de los convenios establecidos.

Capítulo 1.

Introducción general



Capítulo 1. Introducción General

Baculovirus

Descubrimiento de los baculovirus

El descubrimiento de los baculovirus está relacionado con el desarrollo de la industria de la seda en China alrededor de 5000 años atrás. La cría y aprovechamiento de los gusanos de la seda se extendió a través de Asia y alcanzó Japón vía Corea para el 300 d.C, llegando a Europa en el 550 d.C. Años después, la industria se vió amenazada por diversas enfermedades que afectaban a los gusanos de la seda, por lo que se desarrollaron varios métodos para mitigar los efectos de dichas enfermedades. Con la llegada de la microscopía óptica, se descubrió la presencia de cuerpos altamente refractarios en insectos afectados. Generalmente, estos cuerpos poseían una forma poliédrica dándole la denominación de “poliedrosis” a la enfermedad asociada con dichas estructuras. Aunque ya se había sugerido la existencia de partículas infecciosas dentro de los cuerpos de oclusión, recién en la década de 1940, con la microscopía electrónica, se demostró la presencia de viriones con forma de bastón. Más tarde surgiría el nombre baculovirus, derivado del latín *baculus*, que hace alusión a la forma de bastón de los viriones [1].

Posteriormente, se distinguieron dos tipos de poliedrosis: aquellas en la que los poliedros se desarrollaban en el núcleo llamada poliedrosis nuclear y en las que los cuerpos de oclusión se encontraban en el citoplasma dando lugar a las poliedrosis citoplasmáticas. Sin embargo, esta segunda enfermedad era causada por virus con genoma RNA con cápsides icosaédricas, en lugar de tener forma de bastón y fueron ubicados dentro de la familia Reoviridae.

Una segunda categoría de baculovirus caracterizada por la presencia de cuerpos de oclusión pequeños, granulados, con forma elipsoidal fue originalmente reportada en los años 1920 y los virus que pertenecían a la misma se denominaron virus de la granulosis, actualmente granulovirus (GV). La división de los baculovirus en dos grupos principales, los nucleopoliedrovirus (NPV) y los granulovirus (GV) basada en la morfología de los cuerpos de oclusión (*occlusion bodies*, OB) definió la división taxonómica más importante hasta la llegada de la biología molecular [1]. Ambos presentan cuerpos de oclusión característicos, visibles al microscopio óptico. Los OB de los NPV resultan fácilmente distinguibles, debido a que presentan una estructura poliédrica más grande y refringente (0.8-2 μm). Los OB de los GV aparecen como gránulos ovoides oscuros que son más difíciles de distinguir debido a su menor tamaño (~0.5 μm). Debido a ello los OB de los NPV se conocen como poliedros y los de los GV se denominan gránulos. En correspondencia con esta denominación, la proteína principal que compone los OB de los NPV se llama

poliedrina y la que compone los OB de los GV, granulina. En cada OB de un NPV se ocuyen muchos viriones, mientras que en cada OB de un GV se ocuye un único virión. A su vez, en los NPV, cada virión puede contener varias o una única nucleocápside envuelta en una membrana lipoproteica, distinguiéndose de esta forma los NPV múltiples (MNPV) y simples (SNPV) [2] (figura 1).

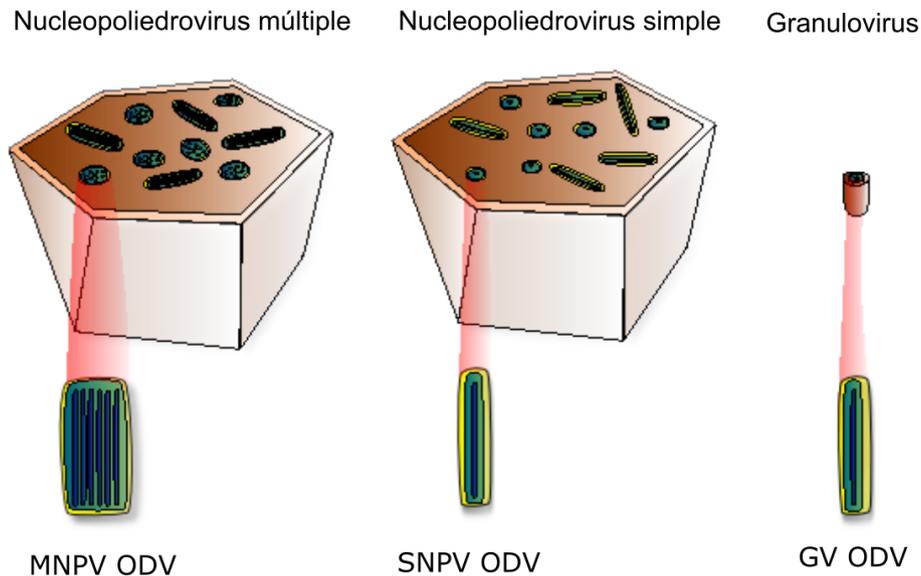


Figura 1.1 Esquemas de los tres principales tipos de viriones de ODV. Los OB de GV tienen forma granular y contienen un único virión, en tanto que los OB de NPV, mucho más grandes que los primeros, son poliedros que contienen múltiples ODV. Los NPV se dividen, a su vez, en NPV múltiples y simples, de acuerdo con el número de nucleocápsides encontradas en cada ODV. Adaptado de Haase, 2013 [2].

La información aportada por la creciente cantidad de genomas de baculovirus secuenciados condujo a la reformulación de la clasificación taxonómica de los baculovirus [3–5], en la cual se discriminan cuatro géneros de acuerdo al hospedador: *Alphabaculovirus* (NPV específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específicos de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPV específicos de dípteros). Dentro del género de los *Alphabaculovirus*, *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), es el más estudiado y utilizado en biotecnología.

Biología de los baculovirus

Los baculovirus son un grupo muy diverso de virus con un genoma de DNA doble hebra, circular, superenrollado, con tamaños que varían desde los 80 hasta los 180 kpb, que codifica entre 90 y 180 genes. De todos estos genes, alrededor de 38 han sido identificados en todos los genomas baculovirales identificados hasta la fecha (*core genes*). De los genes conservados, alrededor del 50% está involucrado en la estructura de la cápside, la envoltura y la infectividad de las larvas. Mientras que el

resto está mayormente relacionado con la replicación del DNA, el procesamiento y la transcripción tardía y muy tardía.

El genoma se encuentra empaquetado en nucleocápsides en forma de bastón, con una longitud que varía entre 230 y 385 nm de longitud y 40-60 nm de diámetro [6,7]. Durante el ciclo de infección, los viriones se presentan en dos tipos distintos: viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) o viriones brotantes (BV) que, aunque comparten similitudes en la estructura de la nucleocápside, difieren en el origen y composición de sus envolturas y en sus roles durante el ciclo infeccioso. Los BV obtienen su envoltura al brotar a través de la membrana plasmática del hospedador, modificada por proteínas virales. En contraste, la envoltura de los ODV es obtenida en el núcleo y puede ser derivada de membranas nucleares modificadas con una serie de proteínas virales expresadas durante el ciclo de infección. Por otro lado, estos viriones difieren en sus eficiencias de infección para distintos tejidos; los ODV infectan las células epiteliales del intestino medio 10000 veces más eficientemente que los BV; mientras que los BV son más de 1000 veces más eficientes que los ODV a la hora de infectar células en cultivo [8,9] (figura 1.2).

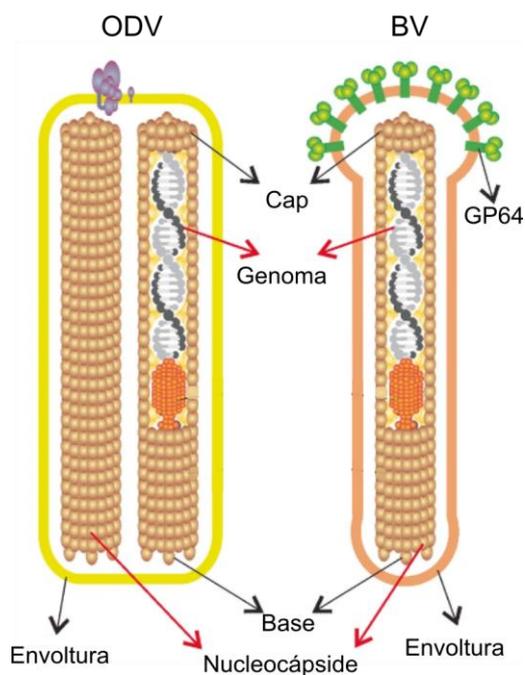


Figura 1.2. Ilustración comparativa entre ODV y viriones brotantes (BV). Las nucleocápsides son iguales, pero las envolturas son diferentes (el de ODV deriva de la membrana nuclear de la célula infectada, mientras que el de BV deriva de la membrana plasmática). La proteína fusogénica GP64 está presente sólo en el envoltorio de BV de los alfabaculovirus del Grupo I. Imagen adaptada de Targovnik, A.M et. al. [10]

Infección primaria

El tracto gastrointestinal del insecto es el sitio de inicio de la infección y se encuentra compuesto de tres secciones: el intestino anterior, el intestino medio y el posterior. En insectos del género Lepidoptera, el intestino medio es el mayor sitio de digestión de la comida, carece de una cutícula, pero está delimitado por una membrana peritrófica (MP), compuesta por quitina, mucopolisacáridos y proteínas [11]. Se cree que esta matriz protege la superficie del intestino de posibles abrasiones causadas por la comida y limita el acceso de microorganismos. El

intestino medio está involucrado en la secreción de enzimas y en la absorción del alimento digerido y presenta un gradiente de pH. En la entrada y en la salida del intestino medio, el pH es cercano a 7,0 mientras que en el centro puede variar desde 10,0 hasta 12,0 según la especie del lepidóptero [12].

Una característica común del ciclo infectivo de los baculovirus es la presencia de viriones contenidos en cuerpos de oclusión que son producidos en la etapa final del ciclo de replicación para ser luego liberados durante la muerte y licuefacción del insecto. Los cuerpos de oclusión ofrecen estabilidad y protección al virus frente a distintos factores ambientales. Luego de la ingesta de material foliar contaminado, el pH alcalino del intestino medio causa la disolución de la matriz proteica de los cuerpos de oclusión y la liberación de los ODV. Luego de esta liberación desde los OB, la primera barrera con la que los virus se encuentran en el intestino medio es la membrana peritrófica, que es degradada por la acción de proteínas presentes en el OB permitiendo el ingreso de los ODV en las células epiteliales [13,14] (figura 1. 3).

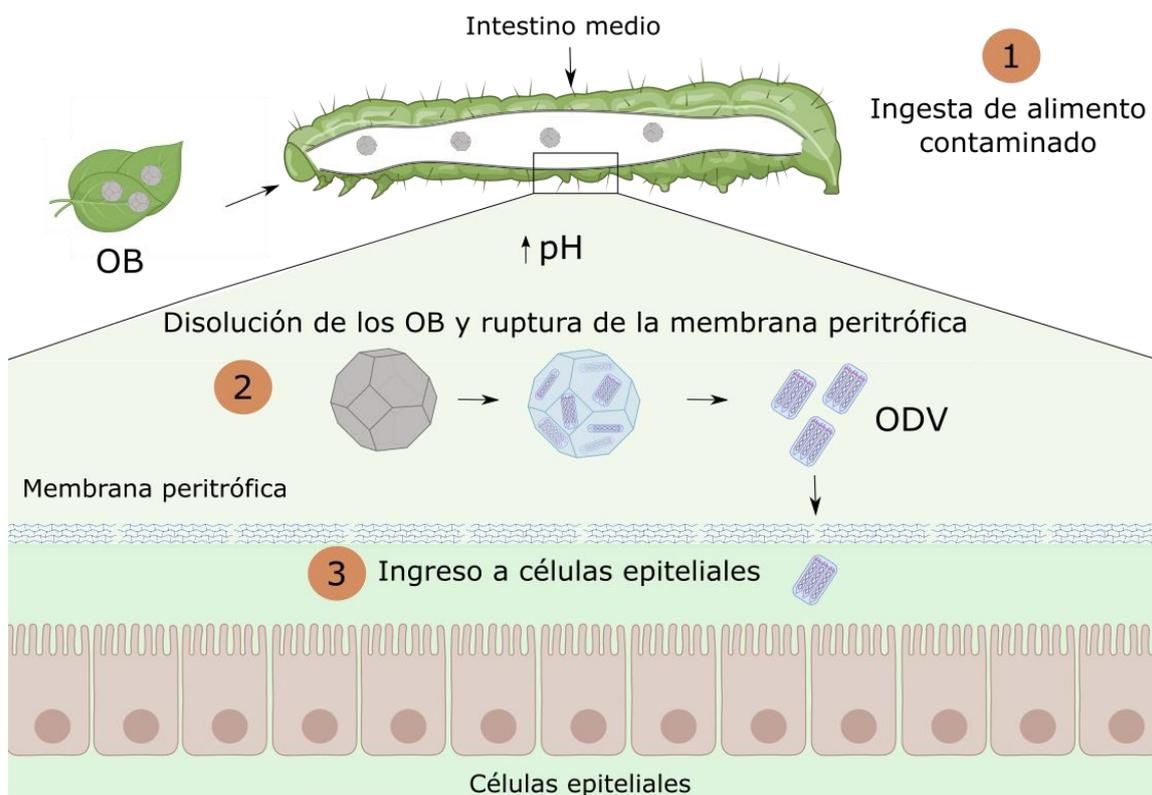


Figura 1.3. Representación de una larva de lepidóptero. (1) Un cuerpo de oclusión (OB) presente en el ambiente es ingerido por la larva comenzando un nuevo ciclo de infección. (2) Cuando el OB alcanza el intestino medio se disuelve en el medio alcalino, liberando los ODV. (3) La membrana peritrófica es degradada por la acción de proteínas presentes en el OB permitiendo el ingreso de los ODV en las células epiteliales. (Creado con BioRender.com)

Infeción secundaria

La progenie viral de la infección primaria consiste en los viriones brotantes que llevan adelante la infección secundaria o sistémica de la larva. En contraste con los OB que evolucionaron para infectar el intestino medio, los BV han desarrollado un mecanismo completamente diferente para iniciar la infección. El ingreso de los BV de AcMNPV a la célula hospedadora es mediado por una glicoproteína viral de clase III en la superficie del virión denominada GP64 que interacciona con un receptor celular poco caracterizado. La proteína fusogénica GP64 está presente sólo en la envoltura de los BV del grupo I de los *Alphabaculovirus*, mientras que en el resto de los clados este rol es llevado a cabo por la proteína F. Esta interacción desencadena la vía de internalización endosomal dependiente de clatrina y la subsecuente acidificación de la vesícula internalizada, llamada endosoma o vesícula endocítica. Dicha variación en el pH genera un cambio conformacional en la proteína viral GP64 que acerca tanto la membrana del virión como la membrana vesicular dando como resultado la fusión de ambas, proporcionando una apertura o poro a través del cual la nucleocápside puede entrar al citoplasma y migrar al núcleo celular donde el DNA resulta accesible permitiendo el inicio de la cascada transcripcional (figura 1.4)

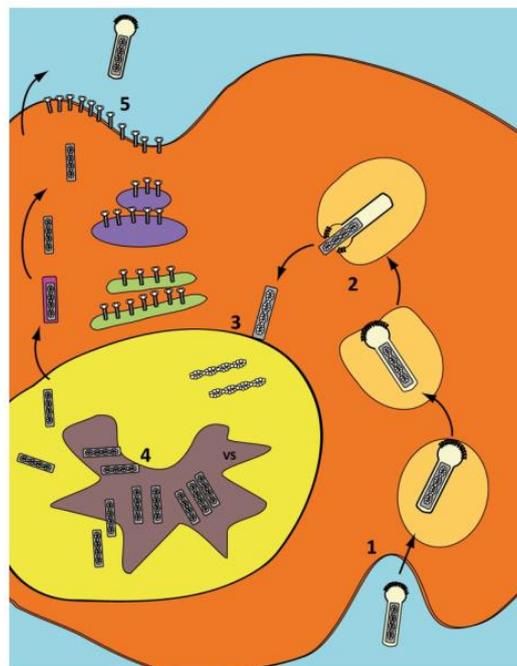


Figura 1.4. El ciclo de infección en las células somáticas de la larva (excepto en células del intestino medio) comienza cuando un virión brotante interacciona con la superficie celular y es endocitado (1). Cuando la vesícula endocítica se acidifica, la proteína de fusión GP64 media la fusión de la membrana plasmática y la envoltura viral liberando la nucleocápside en el citoplasma (2). La nucleocápside es entonces transportada al núcleo (3) donde es desensamblada y el DNA viral puede ser transcrito y replicado en el estroma virogénico (4). Allí nuevas nucleocápsides son ensambladas, egresan del núcleo y son transportadas hacia la membrana plasmática donde brotan adquiriendo su envoltura conteniendo la glicoproteína GP64 (5).

El genoma de AcMNPV codifica para más de 150 genes que se transcriben de forma coordinada. En primer lugar, la RNA polimerasa II celular transcribe los genes de la etapa inmediata temprana que codifican generalmente para factores de transcripción, como IE1, y controlan la transcripción subsiguiente de otros genes e incrementan la propia. A continuación, el DNA es replicado y el ciclo ingresa en un período de transición en la que el DNA se encuentra relajado y los promotores tardíos expuestos para la transcripción.

Los baculovirus codifican en su genoma una RNA polimerasa que transcribe los genes tardíos y muy tardíos reconociendo la secuencia promotora viral consenso que incluye los nucleótidos DTAAG (donde D representa A, T o G). Durante la infección sistémica, las nucleocápsides son ensambladas en el estroma virogénico. Las proteínas de la envoltura son traducidas en asociación con el retículo endoplásmico, glicosiladas y transportadas e incorporadas a la membrana plasmática (vía secretoria).

Una vez que las nucleocápsides son replicadas en el núcleo, la polimerización de actina está relacionada con la propulsión de las mismas dentro del núcleo y con la disrupción de la membrana nuclear para permitir la liberación al citoplasma [15]. Se ha reportado que, durante la infección de AcMNPV, se altera la estructura de la envoltura nuclear [16]. Las nucleocápsides destinadas a convertirse en BV dejan el núcleo y son transportadas hacia la membrana plasmática donde las proteínas de la envoltura (GP64 y proteína F) se concentran y finalmente brotan obteniendo de ese modo sus envolturas [17].

De esta manera, en primer lugar, son producidos los BV y se desarrolla la infección sistémica de todo el insecto. Finalmente, en momentos más tardíos de la infección se producen los viriones ocluidos en el núcleo, que se carga de OB y, finalmente, éstos se liberan al ambiente al desintegrarse las células (en muchos casos se observa la licuación de la larva).

Regulación temporal de la expresión génica

Los baculovirus comienzan su ciclo de infección de manera similar a otros virus a DNA utilizando *enhancers* y activadores transcripcionales para explotar la maquinaria transcripcional del hospedador. Este programa está enfocado en establecer la infección y producir los componentes necesarios para iniciar la replicación del DNA viral y otras funciones tempranas.

En este proceso, uno de los primeros genes virales sintetizados es un factor de transcripción que activa un conjunto de genes, incluido un segundo factor de transcripción. Este segundo factor activa la transcripción de un segundo conjunto de genes y así sucesivamente hasta que la cascada de transcripción está completa [1]. Esto produce una progresión regulada a través de un programa de transcripción

de categorías de genes tempranos y tardíos que llevan a cabo las funciones necesarias para cada etapa de la replicación viral.

En este sentido, se observó que, durante la infección de AcMNPV en células de *Trichoplusia ni*, la mayoría de los transcriptos del hospedador disminuyen entre 6 y 48 horas post infección (hpi), de tal manera que en el último momento comprenden alrededor del 10% del total. Sin embargo, aproximadamente el 6% de los genes del hospedador son regulados positivamente de 0 a 6 hpi y luego disminuyen durante el resto del ciclo de infección. Además, la expresión de un pequeño grupo de genes relacionados con el metabolismo y la respuesta al estrés se eleva entre 18 y 24 hpi y luego disminuye. Concomitantemente con la disminución de la transcripción de genes de la célula hospedadora, el RNA viral aumenta hasta representar más del 50% del total alrededor de las 13 hpi y continúa aumentando a partir de entonces [18].

Mientras los eventos tempranos dependen de genes que son transcriptos por la RNA polimerasa del hospedador, los genes tardíos se transcriben por una RNA polimerasa codificada por el baculovirus.

En resumen, la expresión génica durante el ciclo de infección por baculovirus puede ser dividida en cuatro fases temporales: fase temprana inmediata, temprana retrasada, tardía y muy tardía (figura 1.5) [1].

Genes tempranos

Los genes tempranos pueden subdividirse en dos categorías: tempranos inmediatos y tempranos retrasados (genes α y β). Ambos son transcriptos por la RNA polimerasa II de la célula hospedadora. Los genes α y β difieren en sus promotores y en las secuencias activadoras a distancia (*enhancers*). Los genes tempranos inmediatos son expresados dentro de los 30 min post-infección, una vez que las nucleocápsides han alcanzado el núcleo [19]. Para utilizar la maquinaria transcripcional de la célula hospedadora, los baculovirus han desarrollado promotores que se asemejan mucho a los promotores celulares sensibles a la RNA polimerasa II que contienen el elemento TATA [20]. Para iniciar la cascada transcripcional que da inicio al ciclo de replicación viral, muchos baculovirus utilizan el activador transcripcional IE1. IE1 es transcripto de forma temprana en la infección (de ahí el nombre "*immediate early gene 1*" o gen temprano inmediato, ie1) y continúa transcribiéndose hasta la última fase [21].

Los genes tempranos retrasados requieren de la unión de transactivadores virales (sintetizados previamente) a los *enhancers* para alcanzar niveles de expresión máximos. En los virus de DNA, los transactivadores virales potentes se sintetizan en una fase temprana para estimular la expresión temprana de genes virales, mientras la concentración de DNA viral en la célula hospedadora aún es baja [20].

Replicación

La replicación del DNA se produce en el núcleo de la célula infectada, una vez que se acumularon los productos génicos virales expresados durante la etapa temprana. Los elementos que actúan en *cis* requeridos para la replicación (origen de replicación u *ori*) han sido identificados por el análisis de genomas defectivos obtenidos luego de varios pasajes virales en cultivo de células de insecto [22,23] y por ensayos de replicación transitorios [24,25]. La actividad de *ori* fue encontrada en los baculovirus por estar asociada con las “regiones homólogas” (*hr*, por *homologous region*) [26]. Las *hr* contienen secuencias palindrómicas espaciadas con repeticiones directas cortas capaces de formar estructuras secundarias y se encuentran dispersas a lo largo del genoma del baculovirus. Estas secuencias también pueden actuar como *enhancers* transcripcionales. La presencia de las secuencias *hr* es una característica común de los baculovirus, aunque aún su función no se conoce en profundidad. Además de los *ori* tipo *hr*, se identificaron secuencias no-*hr* con actividad de *ori* mediante ensayos de replicación transitoria en los genomas del nucleopoliedrovirus de *Orgyia pseudotsugata* [27], de *Autographa californica* [23], de *Spodoptera exigua* [28] y de *Spodoptera litura* [29]. Estos *ori* llamados de tipo no-*hr* carecen de las secuencias palindrómicas o repeticiones encontradas en los *ori* tipo *hr*. Los *ori* no-*hr* de diferentes baculovirus no tienen homología estructural entre ellos ni semejanza con los *ori* tipo *hr* en el mismo genoma. Sin embargo, poseen elementos básicos que se encuentran en el consenso de los *ori* eucariotas tales como múltiples repeticiones invertidas y directas, palíndromos y secuencias ricas en AT [30]. A diferencia de los *ori* tipo *hr*, la presencia y distribución de motivos de estructura secundaria dentro de las secuencias *ori* no-*hr* es probablemente más importante para la actividad *ori* que la secuencia nucleotídica en sí misma.

Por su parte, los elementos que actúan en *trans* requeridos para la replicación del DNA viral incluyen, entre otros, la DNA polimerasa viral (*dnapol*), *p143* (helicasa), *lef-1* (DNA primasa) y *lef-2*, cuatro genes que han sido encontrados en todos los baculovirus secuenciados hasta el momento [31]. Se han identificado cinco genes esenciales (*p143*, *ie-1*, *lef-1*, *lef-2*, y *lef-3*) y cinco genes estimulantes de la replicación del DNA (*dnapol*, *p35*, *ie-2*, *lef-7*, y *pe38*) en AcMNPV [32].

Genes tardíos y muy tardíos

Entre las 8 y 24 hpi ocurre la transcripción y expresión de genes tardíos (o genes γ), la producción de proteínas estructurales y la formación de BV. Estos genes así como también los genes muy tardíos tienen un sitio de inicio de la transcripción invariante y universal de secuencia (A/G/T) TAAG y son transcritos por la RNA polimerasa codificada por el propio virus. Además, en estudios de expresión transitoria se demostró que dieciocho genes de AcMNPV son esenciales para lograr niveles de expresión óptimos de un gen indicador bajo el control de promotores tardíos y muy

tardíos [26]. En la fase tardía se expresan, entre otros, los genes que codifican las proteínas estructurales dando comienzo a la etapa de ensamblaje de nucleocápsides (NC) en el núcleo de la célula infectada [33]. La expresión génica muy tardía comienza alrededor de las 18-24 hpi y se caracteriza por un dramático incremento de la transcripción y expresión de genes muy tardíos, y la reducción de la transcripción de genes tardíos. En los promotores muy tardíos, a diferencia de los tardíos, el nivel de expresión no depende del contexto inmediato en el que se encuentra la secuencia TAAG sino de una secuencia denominada *burst sequence* que se localiza entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de la traducción. En los promotores muy tardíos esta secuencia es rica en AT e influye en la actividad del promotor. Esta región interactúa con proteínas celulares, las cuales son imprescindibles para asegurar altos niveles de transcripción de genes tales como poliedrina (*polh*) o granulina (*gra*), *p10* y otros que codifican proteínas necesarias para formar los cuerpos de oclusión [34]. El producto del gen *p10* está asociado con la formación de extensas estructuras fibrilares en el núcleo y citoplasma de células infectadas [35]. También se ha sugerido que podría contribuir a la ruptura de la membrana nuclear y la liberación de los cuerpos de oclusión desde las células infectadas [36].

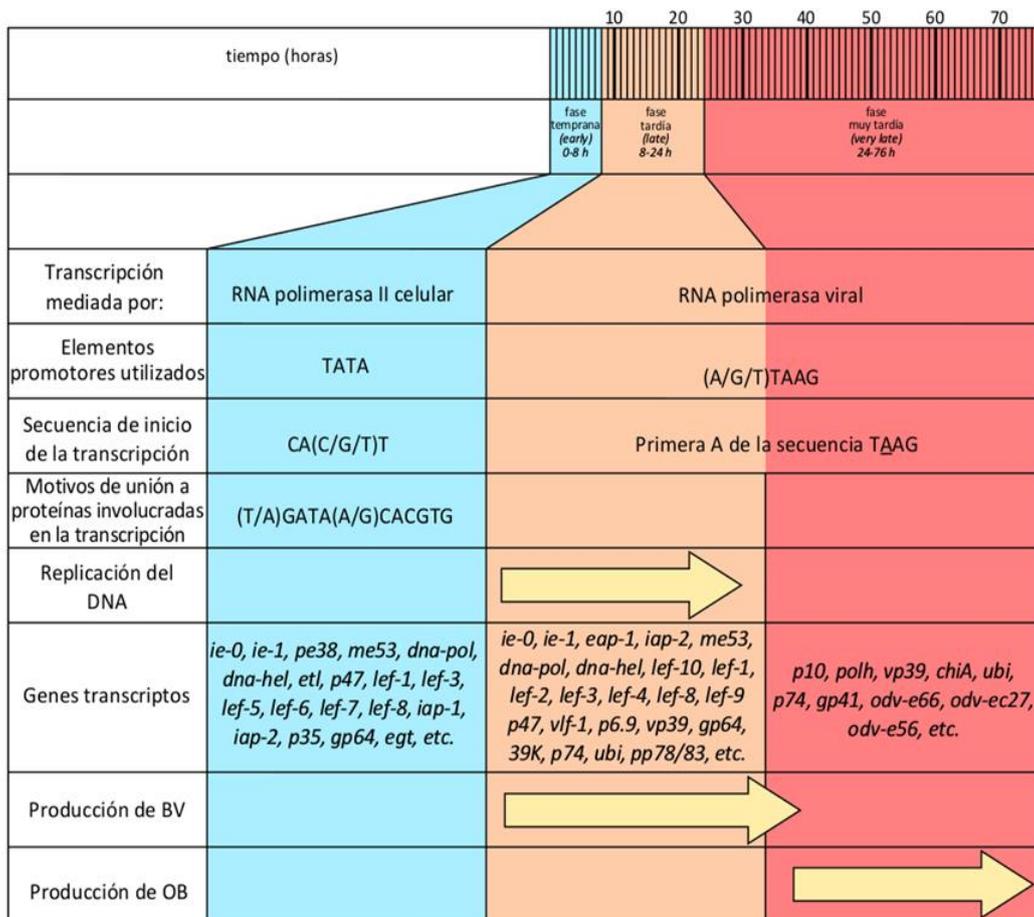


Figura 1.5. Etapas en la infección con NPV. La expresión de los genes de los baculovirus ocurre en forma de cascada (factores codificados en una etapa son necesarios para el desarrollo en las etapas posteriores) y se divide en tres etapas: temprana, tardía y muy tardía. La transcripción de genes tempranos depende de la RNA polimerasa celular, aunque, con la excepción de los genes inmediatos, requiere de factores adicionales codificados por el virus. La replicación del DNA es un requisito para la expresión de genes tardíos y muy tardíos, los cuales se transcriben utilizando la RNA polimerasa viral. (Adaptado de: Romanowski, V. y Ghiringhelli, P.D.: "Biología molecular de los baculovirus. Replicación y regulación de la expresión génica", Capítulo V, En: "Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas" P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams, eds. [37])

Oclusión, la etapa final de la infección viral

La producción inicial de BV permite la diseminación viral a través del insecto, mientras que, en una etapa tardía de la infección, los viriones son confinados al núcleo donde son ocluidos. La transición de BV a ODV podría ser el resultado de cambios físicos en la organización nuclear que limita el tránsito de la nucleocápside al citoplasma, o la depleción de un componente requerido para el tránsito a través del citoplasma. También es posible que, a medida que la infección progresa, las proteínas de envoltura del ODV se acumulan en el núcleo y, una vez que las nucleocápsides son envueltas, ya no pueden salir del mismo.

La mayoría de las nucleocápsides ensambladas parecerían estar destinadas a mantenerse en el núcleo y ser ocluidas. En las infecciones de lepidópteros llevadas a cabo por nucleopoliedrovirus, la evidencia sugiere que componentes de la membrana nuclear interna y externa pueden invaginarse y contribuir a la formación de microvesículas que formarían la superficie de la envoltura del ODV [38]. Éstas son modificadas con proteínas de envoltura específicas codificadas en el ODV [39]. Una característica de la etapa final de la replicación de los baculovirus que ocurre luego de que la mayoría del DNA se hubiera replicado, es la hiperexpresión de genes muy tardíos resultando en la producción de altos niveles de poliedrina y P10. La poliedrina se acumula en el núcleo y en algún momento cristaliza en una red que rodea a los viriones. Por otro lado, P10, expresada en altos niveles, forma estructuras tubulares que penetran tanto el núcleo como el citoplasma [40,41]. Cuando el cuerpo de oclusión madura, las fibrillas de P10 se alinean con la superficie de los poliedros y parecen estar íntimamente involucradas con el ensamblaje de la envoltura del poliedro en la superficie del cuerpo de oclusión (figura 1.6).

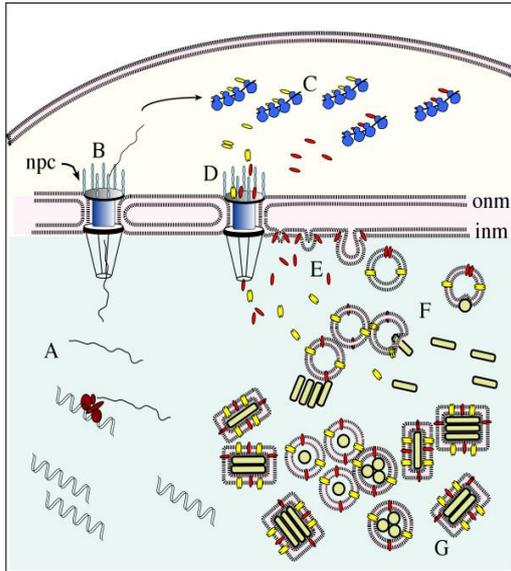


Figura 1.6. Un diagrama hipotético de la morfogénesis de la membrana de ODV. En este diagrama, el RNAm que codifica las proteínas de la envoltura de ODV se transcribe (A) y se exporta (B) al citoplasma para su traducción (C) y luego las proteínas se dirigen al núcleo (D). Algunas de estas proteínas pueden dirigirse a la membrana nuclear interna e inducir a invaginarse, formando así microvesículas (E). Las microvesículas pueden modificarse aún más mediante la incorporación de proteínas de la envoltura ODV adicionales codificadas por el virus, y luego los viriones quedan envueltos (F, G). Se muestran la membrana nuclear externa, la membrana nuclear interna y los complejos de poros nucleares (npc). Imagen tomada de Rohrmann et al., 2019 [1].

Aplicaciones biotecnológicas de los Baculovirus

El conjunto de características intrínsecas de los baculovirus que fueron abordadas anteriormente, en sumatoria con la búsqueda de plataformas biotecnológicas versátiles y la relativa facilidad con la que los baculovirus pueden modificarse genéticamente, permitió su posicionamiento como vectores virales sumamente útiles para aplicaciones tecnológicas de lo más diversas. La figura 1.7 resume de manera esquemática las aplicaciones biotecnológicas más difundidas de los baculovirus que incluyen el manejo integrado de plagas de interés agronómico aplicándolos como agentes de control biológico, la expresión de proteínas recombinantes explotando las similitudes en la modificación post-traduccional entre las células de insecto y las células de vertebrados, la producción de vacunas ya sea utilizando los baculovirus como plataforma para la expresión de inmunógenos o empleando las partículas virales de forma directa en la formulación vacunal, y, más recientemente, como vectores de terapia génica incluyendo material genético con potencial terapéutico en su genoma y utilizando los viriones brotantes como vehículo hacia el tejido u órgano blanco.

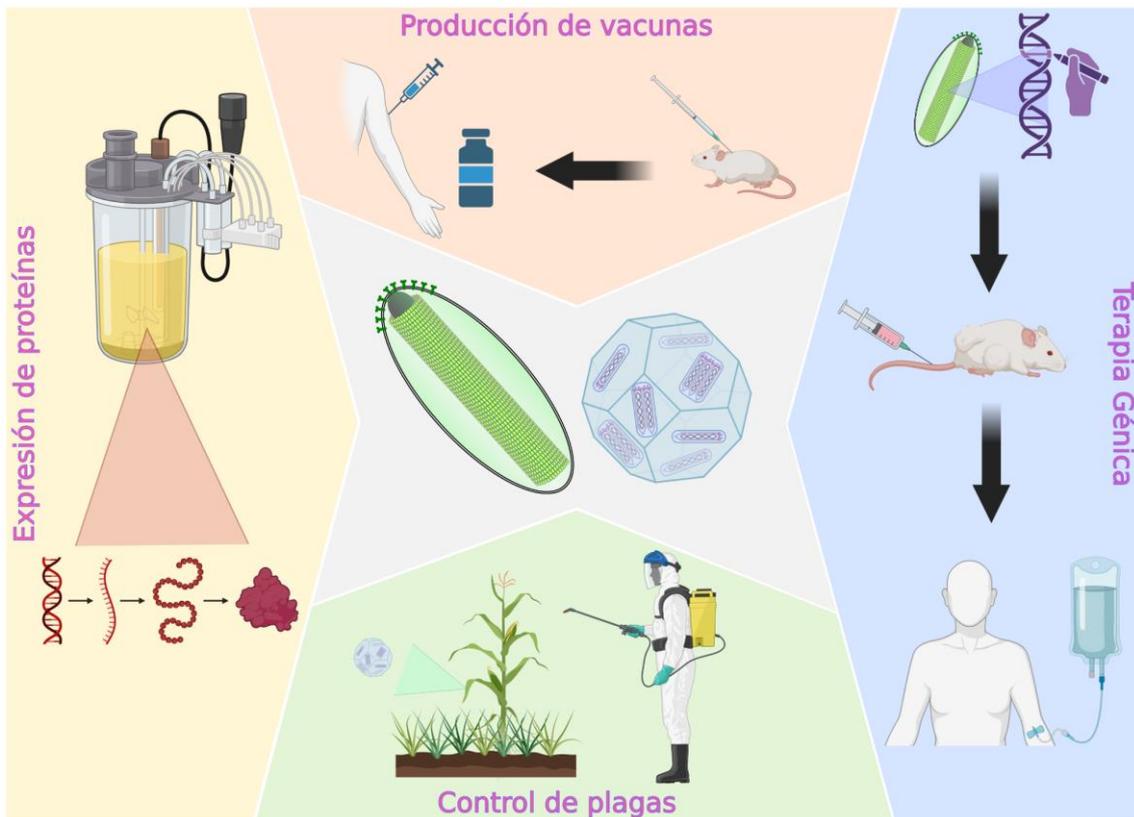


Figura 1.7. Representación esquemática de las principales aplicaciones de las tecnologías basadas en baculovirus. Figura elaborada con BioRender.com y adaptada de Pidre et. al. 2022 [42].

Producción de Baculovirus recombinantes

El sistema de expresión de baculovirus (BEVS, “*baculovirus expression vector system*”) generalmente requiere la generación de al menos un baculovirus recombinante que codifique para un gen de interés (GOI, “*gene of interest*”). Aunque existen múltiples sistemas disponibles comercialmente para la producción de baculovirus recombinantes, la mayoría de ellos se basan en una de dos estrategias. La primera implica la recombinación homóloga dentro de células de insectos entre un genoma de baculovirus modificado para replicarse en *Escherichia coli* (un b ác mido), que lleva toda la información genética para la generación del virus pero que está truncado en un gen esencial para que no pueda producir progenie viral, y un plásmido de transferencia, que lleva la secuencia del GOI bajo el control de un promotor adecuado. Este cassette de expresión (promotor, GOI y señal de terminación de transcripción) está flanqueado por dos regiones de secuencia viral, una de las cuales contiene el gen esencial que el b ác mido tiene deletado. Estas regiones flanqueantes permitirán la recombinación homóloga con el b ác mido, restituyendo el gen esencial y restaurando la capacidad del baculovirus que lleva el GOI para replicarse en células de insectos. La plataforma flashBAC™ de Oxford Expression Technologies emplea este procedimiento [43–45].

La otra estrategia comercialmente disponible implica la transposición sitio específica del GOI en un b́acmido mediante sitios Tn7. El sistema de expresi3n Bac-to-Bac (Invitrogen Inc.) disponible comercialmente se basa en este enfoque. Brevemente, consiste en un vector plasmídico de transferencia que lleva el GOI bajo el control de un promotor espećfico flanqueado por sitios de transposici3n Tn7 que permiten la transposici3n dentro de c3lulas de *E. coli* DH10Bac, que contienen tanto el b́acmido como un plásmido auxiliar que codifica para la transposasa Tn7. Despu3s de la transposici3n en c3lulas bacterianas, el b́acmido recombinante se purifica y se transfecta en c3lulas de insectos para generar progenie viral [46].

Es importante destacar que un informe reciente de Jacob *et al.* [47] muestra que los sistemas basados en HR (del ingl3s, *Homologous Recombination*) para la generaci3n de baculovirus recombinantes tienen una mayor estabilidad en comparaci3n con los basados en Tn7, lo que sugiere que los sistemas HR podrían ser preferibles para la obtenci3n de productos biol3gicos ḿs seguros. Adeḿs, tambi3n se han realizado ḿltiples esfuerzos para identificar el genoma ḿnimo del baculovirus y mejorar la construcci3n de vectores de expresi3n ḿs eficientes [48,49].

Los BV y las ĺneas celulares

Aunque el uso de los baculovirus como agentes de control biol3gico de plagas utiliza los OB para la generaci3n de formulaciones biol3gicamente activas, la mayoría de las aplicaciones biotecnol3gicas de los baculovirus utilizan los BV. A pesar de que los baculovirus tienen un rango de hu3spedes muy limitado en t3rminos de su patogenicidad y replicaci3n, los virus envueltos pueden ingresar con 3xito en ḿltiples tipos de c3lulas. En t3rminos de ĺneas celulares de insectos, las derivadas de los ovarios de *Trichoplusia ni* y *Spodoptera frugiperda* son las ḿs difundidas. Las ĺneas celulares disponibles comercialmente incluyen Sf9, Sf21 y High Five (BTI-Tn-5B1-4), entre otras, en las que el baculovirus ḿs ampliamente utilizado en la biotecnoloǵa, AcMNPV, es capaz de desarrollar su ciclo infectivo. Aunque los insectos son eucariotas, los patrones de N-glicosilaci3n de estos animales difieren de los de los mamíferos; mientras que los insectos producen N-glicanos relativamente simples con residuos de manosa terminal, los mamíferos tienen una amplia variedad de enzimas que resultan en N-glicanos ḿs complejos con residuos de ́cido siálico terminal. Dependiendo de la protéina, la N-glicosilaci3n puede ser de extrema importancia para su funci3n. Por esta raz3n, se han desarrollado ĺneas celulares modificadas gen3ticamente que incluyen, pero no se limitan a, c3lulas que pueden agregar residuos terminales de N-acetilglucosamina, galactosa y ́cido siálico a las N-glucanos, pero tambi3n c3lulas que pueden prevenir la adici3n de residuos de fucosa a los N-glucanos [50].

Entrada de los baculovirus en células de mamíferos: transducción

Aunque AcMNPV no es capaz de replicar en vertebrados ni producir nuevas partículas virales, puede ingresar a las células de mamíferos, traslocar su genoma al núcleo (sin presentar integración genómica) y conducir a la expresión de genes heterólogos, siempre y cuando se encuentren bajo el control de promotores adecuados. Este proceso es conocido como transducción génica. La capacidad de los baculovirus para transducir células de mamíferos se ha utilizado para inducir respuestas inmunes específicas [51] y, más recientemente, para el desarrollo de diferentes estrategias de terapia génica. Sin embargo, el mecanismo de entrada del AcMNPV en las células mamíferas aún no está claro. Inicialmente, se sugirió que las interacciones electrostáticas entre las membranas virales y celulares desempeñaban un papel crucial en la entrada viral [52]. Se demostró que los baculovirus interactúan con proteoglicanos de heparán sulfato, más específicamente sindecanos, presentes en las membranas celulares, para unirse y transducir células de mamíferos [53]. Basado en el mecanismo de fusión de membranas mediado por la glicoproteína GP64 y la ruta de entrada del baculovirus en las células de insectos, se propuso que la endocitosis mediada por clatrina, de manera dependiente del descenso de pH, es el mecanismo primario de entrada en las células de mamíferos. Además, se observó que la fusión del virus en los endosomas tempranos parece ser el principal obstáculo para una transducción eficiente [54]. Interesantemente, se ha informado que las caveolas podrían estar involucradas, de manera negativa, en la entrada del baculovirus en las células de mamíferos, ya que la eficiencia de transducción aumentó en la línea celular BHK21 en presencia de genisteína, un inhibidor que interfiere con la formación de caveosomas [55]. Por otro lado, algunos resultados indican que los baculovirus pueden ingresar a ciertas líneas celulares de mamíferos, como los hepatocitos, a través de un mecanismo diferente a la endocitosis mediada por clatrina o la macropinocitosis, lo que sugiere que la fagocitosis también podría estar involucrada [56].

Aunque el mecanismo de entrada de AcMNPV parece variar de acuerdo con el tipo de célula y requiere seguir siendo estudiado, la relevancia de la glicoproteína GP64 en la mediación de la entrada viral es muy clara [57]. GP64 es crucial para la unión viral, la internalización y la fusión de membranas endosomales durante la entrada del baculovirus tanto en células de mamíferos como en células de insectos [58]. La unión de AcMNPV comienza cuando GP64 interactúa con moléculas presentes en la superficie celular y un cambio de pH dentro del endosoma desencadena un cambio conformacional de la glicoproteína. Una vez dentro de la célula, los virus son transportados al endosoma, las nucleocápsides son liberadas en el citoplasma y son inmediatamente transportadas al núcleo por la motilidad dependiente de actina que permite la translocación a través de los complejos del poro nuclear. En

el núcleo, el DNA viral es reconocido y transcrito por la maquinaria hospedadora; observándose una alteración de la distribución de la cromatina celular durante esta etapa [59].

Estrategias para mejorar la eficiencia de transducción

Aunque los baculovirus pueden ingresar a múltiples tipos de células, este proceso no siempre es eficiente. En los últimos años se han desarrollado múltiples estrategias para mejorar la eficiencia de transducción mediada por baculovirus.

Algunas de esas estrategias implican la modificación de interacciones electrostáticas entre el virus y la membrana celular mediante agentes químicos como la polietilenimina (PEI) o el polietilenglicol (PEG) [57,60]. Otro método implica el pseudotipado del BV con proteínas de fusión de otros virus. Además, se informó que los baculovirus que expresan en su superficie la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) fueron más eficientes para transducir células de mamíferos que aquellos que no la exponían [61] (figura 1.8B). Por otro lado, se han utilizado otras proteínas para pseudotipar baculovirus, incluida la neuraminidasa del virus de la influenza A [62] o la glicoproteína del Thogotovirus [63].

Asimismo, se han utilizado quimeras de la proteína VSV-G fusionada con ligandos tumorales (LyP-1, F3 y CGK RK) mejorando la unión tumoral y la expresión de transgenes de dos a cinco veces [64]. Otra estrategia para aumentar la eficiencia de transducción implica la generación de baculovirus que expongan en su superficie a la avidina. Esta modificación de la superficie da como resultado un aumento significativo en la entrada del virus a la célula y, en consecuencia, en el *delivery* de genes [65].

Sin embargo, la eficiencia de transducción no sólo depende de la entrada celular, sino también de la capacidad general para expresar los transgenes y evadir los mecanismos de respuesta intrínseca antiviral propios de la célula. Una estrategia para aumentar la eficiencia de transducción mediada por los baculovirus y que mejora la expresión génica, consiste en la supresión de genes implicados en la respuesta antiviral. Wang y colaboradores demostraron que el silenciamiento de la proteína RIPK1, que desempeña un papel importante en la respuesta antiviral intrínseca y en la regulación de la muerte celular, produjo un aumento significativo en la eficiencia de transducción baculoviral y en la expresión de transgenes en diferentes líneas celulares humanas (figura 1.8D) [66].

Por otra parte, los promotores utilizados en los sistemas de *delivery* de genes pueden contribuir también a la eficiencia de transducción en terapia génica. Cuando el objetivo es que un gen terapéutico se exprese en una célula de mamífero, es necesario elegir un promotor que pueda ser reconocido correctamente por la maquinaria transcripcional de la célula. La eficiencia con la que se transcribe el promotor dependerá en gran medida del tipo celular y del estado fisiológico de la

célula. Además, los promotores se pueden combinar con potenciadores transcripcionales para aumentar la expresión del transgén [67]. Las numerosas combinaciones de promotores virales y de mamíferos que pueden utilizarse en sistemas de *delivery* derivados de baculovirus, los convierten en una alternativa con una versatilidad extremadamente alta y una notable capacidad de personalización [68].

A pesar de sus muchas ventajas, los baculovirus recombinantes tienen una ventana relativamente corta de expresión génica *in vivo* de hasta 21 días [67]. Una de las razones que podría explicar esto es que los baculovirus activan tanto la vía clásica como alternativa del complemento que conduce a la inactivación viral [69]. Se han desarrollado diferentes estrategias para prevenir la activación del complemento y prolongar la expresión génica. Algunos ejemplos incluyen la expresión de proteínas quiméricas en la superficie baculoviral que contienen algunas proteínas inhibitoras del complemento como DAF y la proteína de unión a C4b, entre otros [70,71]. Kawai *et al.* concluyeron que la fusión de las proteínas CD46 y CD59 con DAF y su exposición en la superficie del baculovirus permite proteger las partículas virales de la inactivación mediada por el complemento (figura 1.8C) [72].

Aunque la expresión génica sostenida por tiempos cortos puede ser útil para ciertas aplicaciones, algunos tipos de terapias como la terapia contra el cáncer pueden requerir una expresión génica más prolongada. En ese sentido, Sung y colaboradores demostraron que la formación de episomas de expresión no replicativos a partir de la transducción de células tumorales con dos vectores baculovirales diferentes (uno que codifica una recombinasa y otro que codifica el gen de interés flanqueado por sitios de recombinación específicos de la recombinasa), conduce a un aumento tanto en el tiempo como en los niveles de expresión de los transgenes utilizados [73]. Además, han utilizado la misma estrategia para generar un episoma replicativo que proporciona una expresión génica constante durante hasta 48 días [74]. Aquí la estrategia es similar, un vector codifica para la recombinasa Cre y esta escinde parte del genoma del otro vector, formando un episoma que contiene el gen terapéutico, la secuencia del origen de replicación oriP y la secuencia codificante para la proteína EBNA1 del virus de Epstein Barr (EBV) capaz de reconocer este origen y promover la replicación (figura 1.8A) [73–75].

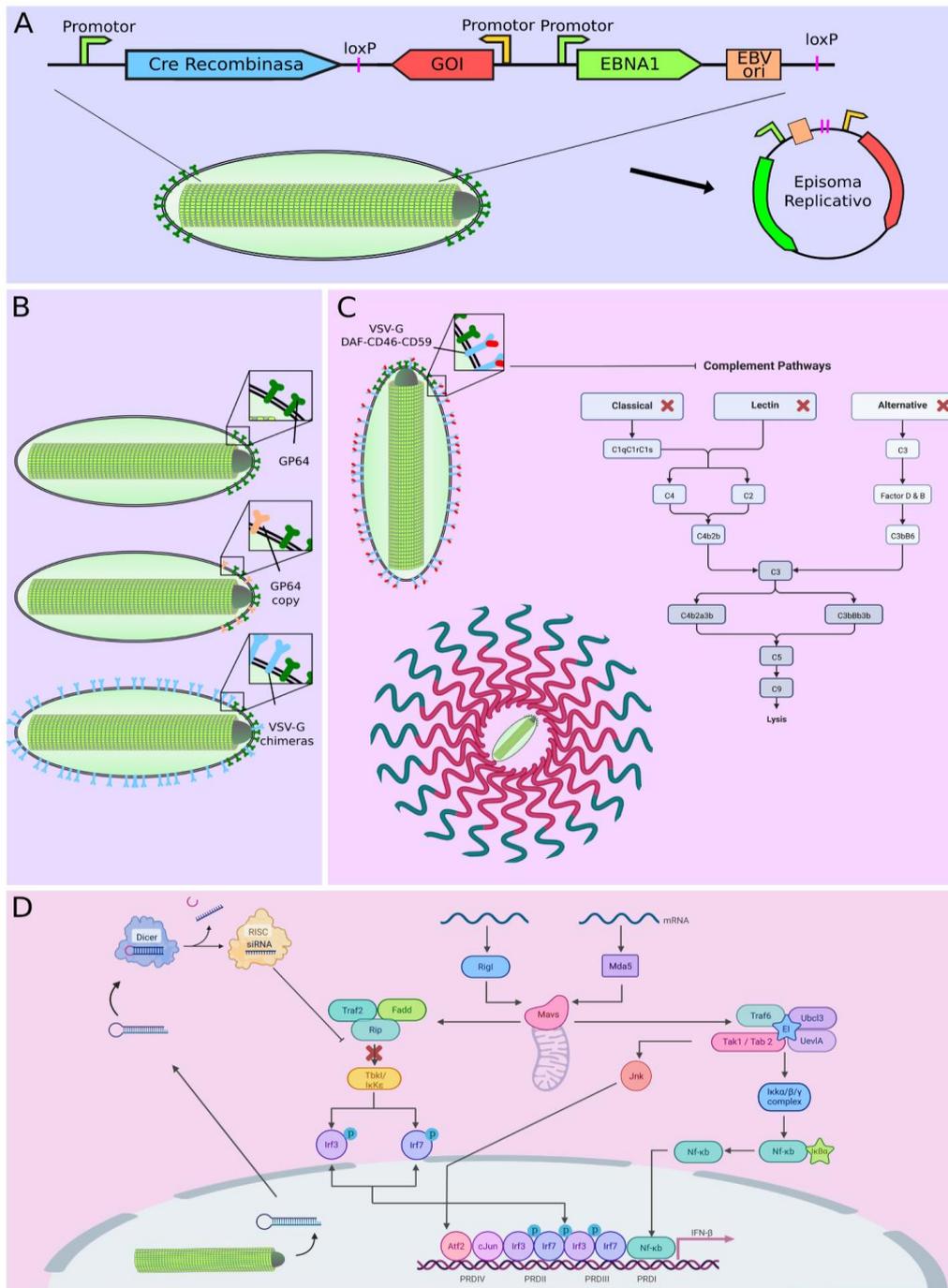


Figura 1.8. Aproximaciones experimentales orientadas al mejoramiento de la eficiencia de transducción. **(A)** Producción de episomas de expresión replicativos en células transducidas mediante la utilización de una recombinasa sitio específica. **(B)** Pseudotipado de baculovirus mediante la inclusión en la superficie viral de copias adicionales de la proteína GP64 o bien otras glicoproteínas virales como la proteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV-G). **(C)** Inhibición del complemento para mejorar la eficiencia y duración de la transducción *in vivo* mediante Baculovirus surface display de inhibidores de la cascada del complemento o el recubrimiento de las partículas virales con polímeros. **(D)** Silenciamiento de proteínas involucradas en la respuesta antiviral intrínseca para aumentar la eficiencia de transducción así como los niveles de expresión de los transgenes. Figura elaborada con BioRender.com y adaptada de Pidre et. al. 2022 [42].

Terapia génica

La terapia génica comprende un conjunto de estrategias terapéuticas con gran versatilidad ya que puede adaptarse a cada persona para tratar una variedad de enfermedades, incluido el cáncer. Hay dos categorías generales en las que se pueden clasificar los vectores de terapia génica: vectores no virales y virales. Los vectores no virales consisten principalmente en polímeros poli catiónicos conjugados que permiten la entrega del DNA. Los liposomas cargados positivamente combinados con plásmidos son un ejemplo de este tipo de vector. Aunque estos vectores son ventajosos en cuanto a la bioseguridad, su aplicación está restringida por una baja eficiencia en la entrega y expresión de transgenes [76]. Por otro lado, los vectores virales, como los vectores baculovirales, retrovirales, lentivirales, adenovirales y adenoasociados (AAV), tienen una mayor eficiencia en la entrada celular y la transducción al expresar diferentes transgenes. Las ventajas y desventajas dependen de cada vector viral en particular [77]. Actualmente, los vectores AAV, los lentivirus y los retrovirus se han implementado con éxito y representan 19 productos de terapia génica aprobados por la FDA.

Sin embargo, los vectores lentivirales y retrovirales tienen una capacidad de clonado baja y existe la posibilidad de mutagénesis debido a la probabilidad de integración en el genoma del huésped. El alto costo de producción, la baja escalabilidad y los posibles problemas de bioseguridad asociados con los vectores virales actuales resaltan el gran potencial de utilizar baculovirus en terapia génica [42,78].

Debido a su versatilidad y baja toxicidad, los sistemas de *delivery* génico basados en baculovirus permiten la administración en sitios específicos, así como el diseño y clonado de genes terapéuticos complejos y grandes, mitigando los efectos adversos y mejorando las terapias [79,80]. Este sistema de terapia génica es fácilmente modificable y podría convertirse en una herramienta valiosa para la terapia génica dirigida. Los baculovirus (fenotipo BV) ya se han utilizado en varios estudios exitosos, incluido el tratamiento del cáncer, vacunas y medicina regenerativa, mostrando su versatilidad [71,81–84].

En comparación con otros vectores virales más difundidos, los baculovirus poseen varias ventajas. En primer lugar, la transducción mediada por baculovirus no presenta ningún efecto tóxico contra las células de mamíferos y no interrumpe el crecimiento celular incluso a altas MOI. Además, los baculovirus no replican en células de mamíferos transducidas. Estas características son particularmente importantes porque otros vectores virales son patógenos humanos o se integran en el genoma del huésped y, en consecuencia, representan un riesgo biológico.

Otra ventaja de los baculovirus como vectores de terapia génica consiste en su gran capacidad de clonado. El genoma del baculovirus (AcMNPV) tiene una capacidad

de clonado de al menos 38 kb. Esta flexibilidad es particularmente ventajosa en comparación con las capacidades de clonado limitadas de los vectores retrovirales y AAV [10].

En comparación con otros vectores virales, los baculovirus son fáciles de producir. Los vectores retrovirales, lentivirales y AAV requieren la transfección de plásmidos que codifican genes esenciales en células de empaquetamiento para su producción. En contraste, los baculovirus pueden propagarse infectando células de insectos en cultivos en suspensión o monocapa y recogiendo el sobrenadante 3 a 4 días después de la infección. Además, todo el proceso de construcción, propagación y manipulación de baculovirus se puede realizar en laboratorios de Nivel de Bioseguridad (BSL) 1 sin necesidad de equipos especializados. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza del transgén incluido en su genoma, pueden requerirse niveles de bioseguridad superiores a BSL-2.

Finalmente, una de las ventajas más importantes es que los mamíferos no presentan inmunidad preexistente contra los baculovirus. En contraste, uno de los problemas más comunes asociados con otros vectores virales es que la mayoría de las personas están expuestas a estos virus durante su vida y desarrollan respuestas humorales específicas. Por lo tanto, los anticuerpos circulantes pueden reducir significativamente la eficiencia de la transducción del vector viral [42,85,86].

Sin embargo, los baculovirus también tienen desventajas como vectores de terapia génica. Una de ellas es que inducen una expresión transitoria de transgenes en células de mamíferos. *In vivo*, la expresión del transgén generalmente disminuye para el día 7 y desaparece para el día 14 a 21 [87]. Además, la duración de la expresión del transgén *in vitro* mediante baculovirus es significativamente más corta que la expresión mediada por vectores retrovirales y AAV.

Los vectores baculovirales difieren de otros vectores virales en el tiempo que los genes transportados pueden persistir en el núcleo del huésped. El DNA de los vectores retrovirales, lentivirales y adenovirales puede permanecer en el núcleo ya sea en forma integrada o episomal, durante largos períodos. En contraste, Tjia *et al.* demostraron que el DNA baculoviral persiste en los núcleos de las células de mamíferos transducidas sólo durante 24-48 horas [88].

Como se mencionó anteriormente, otra desventaja de utilizar baculovirus como vectores de terapia génica es la inactivación por el complemento. El contacto entre los baculovirus y el complemento sérico resulta en una rápida inactivación de los BV. Se necesitan varias modificaciones para reducir el efecto negativo del complemento en la transducción mediada por baculovirus (se realizaron avances que fueron comentados en párrafos anteriores). Sin embargo, el sistema de complemento no es un problema solo para los baculovirus; también es una barrera

potente para la administración *in vivo* de otros sistemas de entrega génica como liposomas, retrovirus murinos y varios complejos de DNA sintético [84].

Además, los baculovirus, al igual que otros virus envueltos, son muy frágiles. La estructura de la envoltura es esencial para la infectividad y la capacidad de transducción del virus debido al GP64 anclado, responsable de la fusión de las membranas virales y celulares [89]. Debido a esto, el virus es vulnerable a la fuerza de corte mecánica, lo que resulta en una estabilidad relativamente baja del virus. Este problema común también se observa en otros virus envueltos, como los retrovirus, por lo que su manipulación debe ser cuidadosa.

Clonado por Golden Gate

La tecnología del DNA recombinante constituye un conjunto de herramientas esenciales para la biotecnología. Desde los años 70 cuando Herbert Boyer y Stanley Cohen demostraron la posibilidad de insertar y replicar fragmentos de DNA foráneo en bacterias, se han desarrollado numerosos métodos para clonar fragmentos de DNA de interés. Los métodos convencionales habitualmente requieren varios pasos de clonado para generar una construcción. En cada paso, un solo fragmento de DNA se transfiere de un plásmido donante o producto de PCR a un vector receptor. El número de pasos, en este caso, dependerá del número de fragmentos que se desee clonar en el vector de destino. En los últimos años, se han desarrollado varios métodos para facilitar y acelerar este proceso. Uno de estos métodos, el clonado por Golden Gate, permite ensamblar múltiples fragmentos a la vez (en un solo paso) en un mismo plásmido receptor [90].

Brevemente, la estrategia de Golden Gate ensambla moléculas de DNA mediante el apareamiento de extremos “pegajosos” o cohesivos de DNA de cadena sencilla, que son generados por una endonucleasa de restricción de Tipo IIS. Estas enzimas de restricción cortan el DNA a una distancia fija por fuera de su secuencia de reconocimiento, lo que significa que su secuencia de reconocimiento sólo determina dónde la endonucleasa cortará el DNA, pero no en qué bases (figura 1.9).

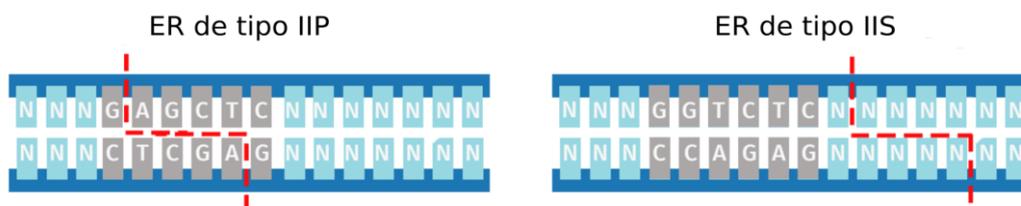


Figura 1.9. Comparación del tipo de corte catalizado por las endonucleasas de restricción de tipo IIP (las enzimas más ampliamente utilizadas en la biología molecular) y las endonucleasas de restricción de tipo IIS utilizadas en los protocolos de ensamblado por Golden Gate. Figura tomada del Manual de Uso de Golden Gate Assembly de Snapgene [91].

Una sola endonucleasa de Tipo IIS puede generar extremos cohesivos de DNA de cadena sencilla con diferentes secuencias de nucleótidos arbitrarias simplemente colocando una secuencia de reconocimiento de endonucleasa a la distancia correcta desde el sitio de corte objetivo. Un diseño adecuado de la posición y orientación de los sitios de corte también asegura que las secuencias de reconocimiento no se retengan en la construcción final, volviéndola resistente a una posterior digestión [92,93]

En principio, una reacción de Golden Gate sólo requiere una endonucleasa, sin importar la cantidad de extremos cohesivos que se utilicen en el ensamblado: se han reportado ensamblados exitosos y de alto rendimiento de hasta 35 fragmentos. Además, Golden Gate logra un rendimiento y una fidelidad mayor a otros métodos, ya que cualquier producto secundario no deseado se convierte nuevamente en reactivo y solo el producto final es estable y se acumula en la mezcla de reacción. Esta característica permite que la DNA ligasa pueda incluirse junto con la endonucleasa en la misma mezcla, lo que resulta en una reacción de un solo paso que puede realizarse fácilmente en un termociclador [93]. Luego, el producto resultante puede ser directamente transformado en una célula competente para proceder a la selección e identificación de la construcción deseada (figura 1.10).

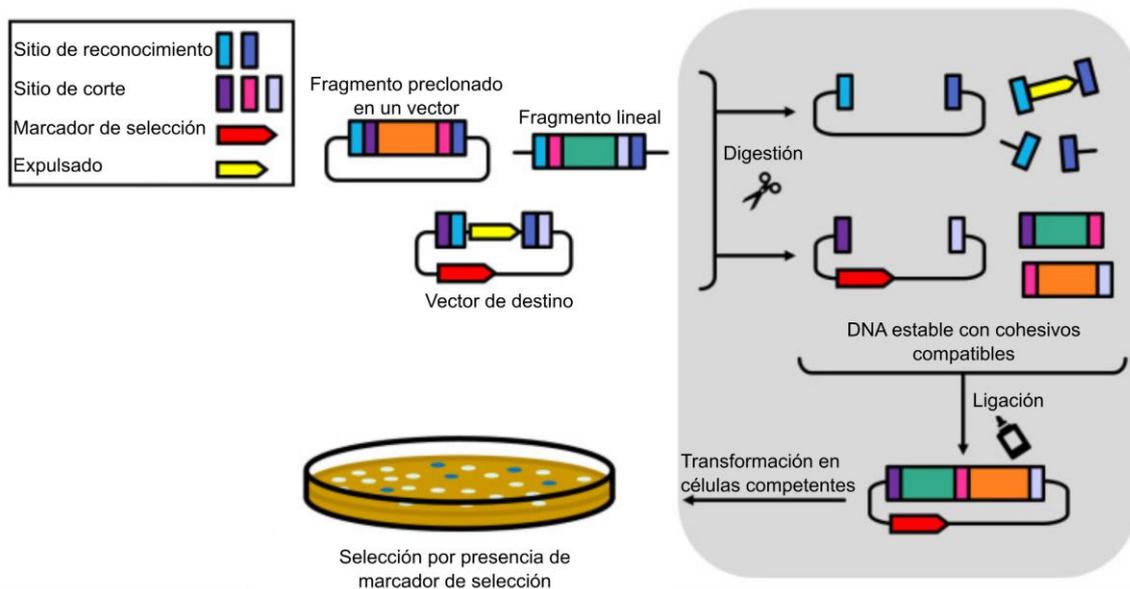


Figura 1.10. Imagen que esquematiza una reacción de Golden Gate estándar, donde un fragmento previamente clonado en un vector y otro fragmento lineal son ensamblados en un vector de destino luego de la digestión/ligación que ocurren en simultáneo. Por último, la mezcla de reacción es transformada en bacterias competentes y ocurre la selección por la presencia del marcador de selección, generalmente un antibiótico. Adaptado de Bird *et al.* [94].

Los métodos de ensamblado por Golden Gate representan una herramienta poderosa para proyectos en los que los mismos fragmentos de DNA se reutilizarán múltiples veces, ya sea porque se ensamblarán de diferentes maneras como parte de una biblioteca combinatoria, o porque posteriormente se unirán en ensamblados jerárquicos [94]. Desde la publicación del método original de Golden Gate en 2008 [92], ha habido un aumento en la generación de “kits” con niveles variables de estandarización. Dada la utilidad y adaptabilidad de los métodos Golden Gate, no sorprende que haya un gran avance en el desarrollo de nuevos conjuntos de herramientas basados en esta estrategia de clonado, para ser utilizados con distintos propósitos.

Cáncer

La organización mundial de la salud define al cáncer como término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Por definición, las células cancerosas proliferan desafiando los controles normales, es decir, son neoplásicas y capaces de invadir y colonizar los tejidos de su entorno formando un tumor primario. Además, pueden originar tumores secundarios o metástasis que ya resultan muy difíciles de erradicar quirúrgicamente o mediante irradiación local. Existe evidencia que indica que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una sola célula que ha experimentado una mutación inicial [95,96], pero posteriormente la progenie de esta célula debe sufrir otros cambios, necesitando numerosas mutaciones adicionales y acontecimientos epigenéticos para convertirse en cancerosa. La célula original de un cáncer puede ser una célula progenitora del tejido, que ya dispone intrínsecamente de la capacidad para autorrenovarse, o una célula más diferenciada que ha adquirido esta capacidad para autorrenovarse de forma indefinida.

La progresión tumoral dura por lo general muchos años y refleja la operación de un proceso evolutivo en el cual las células somáticas sufren mutaciones y cambios epigenéticos acompañados por una selección natural.

Las células cancerosas adquieren una gran variedad de propiedades especiales al progresar, multiplicarse y extenderse (figura 1.11). Estas propiedades incluyen alteraciones en las vías de señalización celular, que capacitan a las células del tumor para “ignorar” las señales que proceden del entorno y que normalmente mantienen la proliferación celular bajo un estricto control. Como parte del proceso evolutivo de la progresión tumoral, las células cancerosas adquieren defectos en la diferenciación y en los mecanismos de control que paran de forma permanente la división celular o inducen apoptosis en respuesta al estrés celular o al daño en el DNA. Todos estos cambios aumentan la capacidad de las células tumorales para sobrevivir, crecer y dividirse en su tejido original y entonces metastatizar, este

proceso requiere la supervivencia y la proliferación en entornos extraños. Sin embargo, la evolución de un tumor no depende simplemente de los cambios en las propias células tumorales, también depende de otras células presentes en el microentorno del tumor, llamadas de forma colectiva células del estroma, que incluyen los nuevos vasos sanguíneos que permiten al tumor crecer de tamaño y metastatizar a través de la sangre [97,98].

Puesto que son necesarias muchísimas mutaciones y cambios epigenéticos para proporcionar estos comportamientos anormales, no es sorprendente que casi todas las células cancerosas sean genéticamente inestables. La inestabilidad genética puede surgir de defectos en su capacidad para reparar el DNA dañado o corregir errores en la replicación de diversos tipos, que comportan cambios en la secuencia del DNA. También son comunes los defectos en la segregación de los cromosomas durante la mitosis, que comportan la inestabilidad de los cromosomas y cambios en el cariotipo. Esta inestabilidad genética está seleccionada para los clones de células aberrantes capaces de producir tumores, puesto que acelera en gran medida la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos posteriores necesarios para la progresión del tumor [96,99].

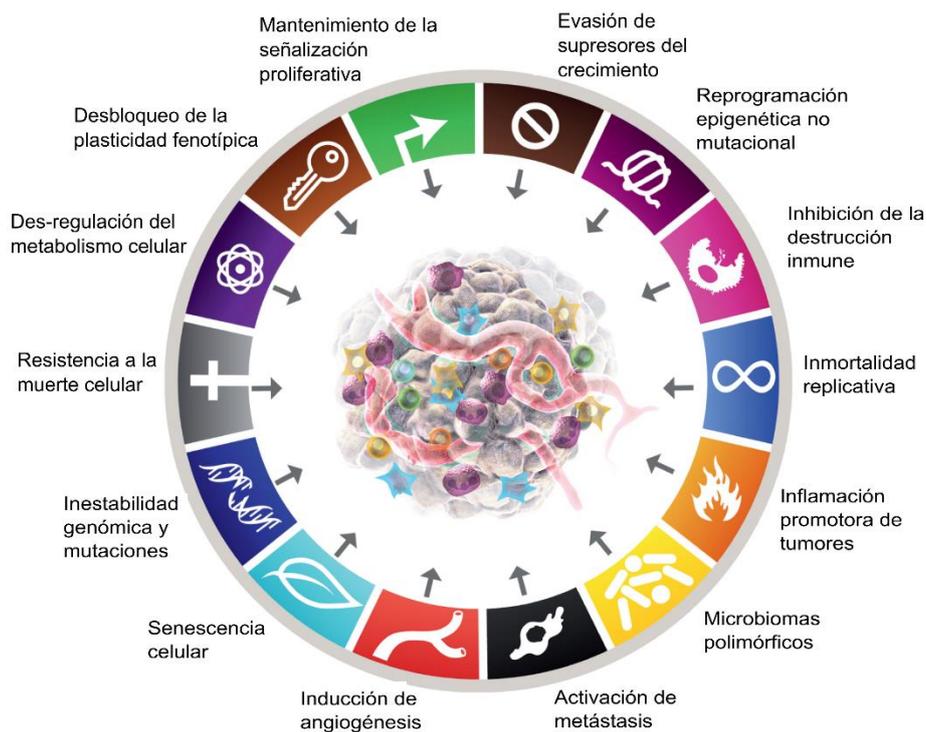


Figura 1.11. Características del cáncer. Imagen adaptada de Hannah 2022 [100].

Estadísticas del cáncer

Según las estimaciones realizadas por el Observatorio Global del Cáncer (Globocan), de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, *International Agency for Cancer Research*), a partir de los datos producidos por registros de cáncer de base poblacional de nuestro país, en Argentina ocurrieron 133.420 nuevos casos de cáncer en ambos sexos en el año 2022. La mayoría de estos casos corresponden al cáncer de mama en primer lugar (16,2% de incidencia) y al colorrectal en segundo lugar con 11,9% de incidencia (figura 1.12). Respecto a la distribución por sexos, el 51% de los casos totales corresponden a mujeres, con el cáncer de mama (31,6%), el colorrectal (10,6%) y el uterino (6,9%) como los de mayor incidencia. Mientras que el 51% restante de los casos totales corresponde a hombres, con los cánceres de próstata (19,7%), colorrectal (13,3%) y pulmón (13,2%), como los más prevalentes.

Dentro de los tipos de cáncer con una menor incidencia se encuentran los gliomas difusos cuya relevancia reside en su malignidad y baja tasa de supervivencia.

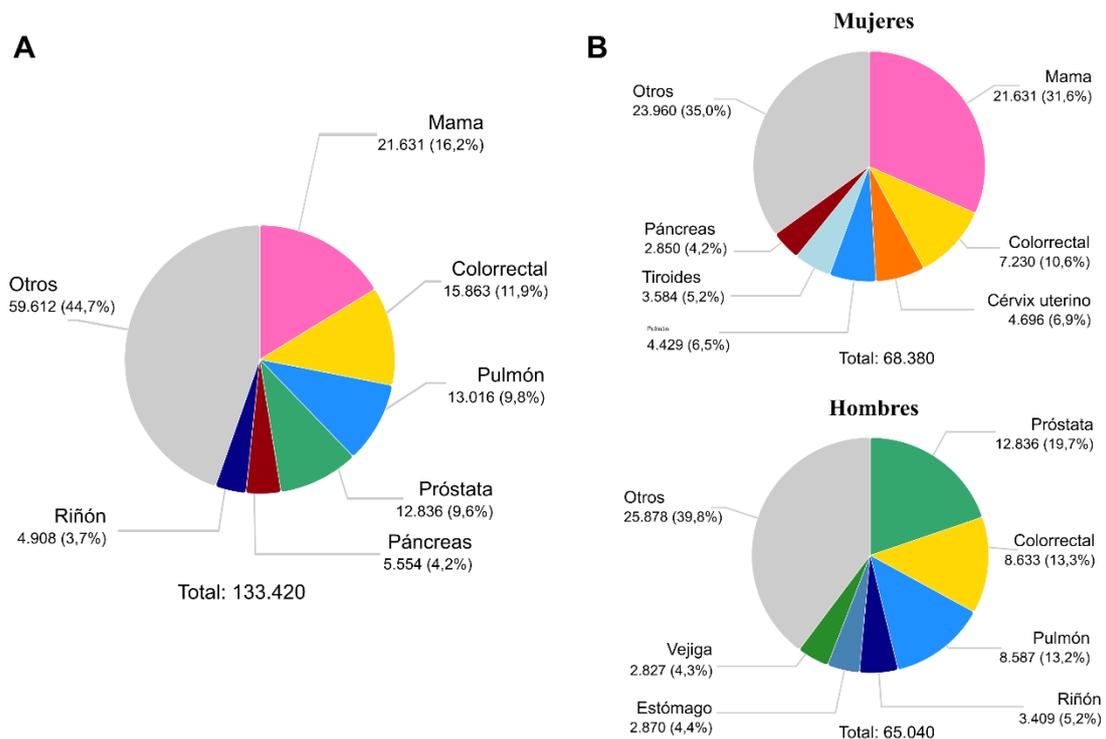


Figura 1.12. Incidencia de distintos tipos de cáncer en Argentina, 2022. **(A)** Se tuvieron en cuenta ambos sexos para el análisis de los datos. **(B)** El estudio de la incidencia se realizó teniendo en cuenta el sexo de la población: mujeres (arriba) y hombres (abajo). Datos tomados del Observatorio Global del Cáncer (Globocan), de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) [101].

Gliomas difusos

Los gliomas son los tumores intrínsecos más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) y comprenden dos grandes subgrupos: los gliomas difusos (DG, del inglés *Diffuse Gliomas*) y aquellos que muestran un patrón de crecimiento más circunscrito (gliomas no-difusos). Los gliomas difusos están caracterizados por un crecimiento infiltrativo extenso en el parénquima circundante del SNC [102], y han sido históricamente diagnosticados como astrocitomas difusos (con el glioblastoma como el representante más frecuente y más maligno), oligodendrogliomas o como tumores con un fenotipo mixto astrocítico y oligodendroglioma (oligoastrocitomas) [103].

Aunque la mayoría de los gliomas ocurren en los cuatro lóbulos del cerebro: frontal (23.6%), temporal (17.4%), parietal (10.6%) y occipital (2.8%); una pequeña proporción puede aparecer en el tronco encefálico, el cerebelo y la médula espinal [104].

Considerando solamente el cáncer de cerebro y del SNC, la tasa de incidencia en nuestro país ajustada por edad fue de 3,7 casos por 100.000 habitantes, cifra que posiciona a Argentina dentro de los países del mundo con incidencia media-alta de este tipo de cáncer (rango 3,3 a 5,1 por 100.000 habitantes) (figura 1.13).

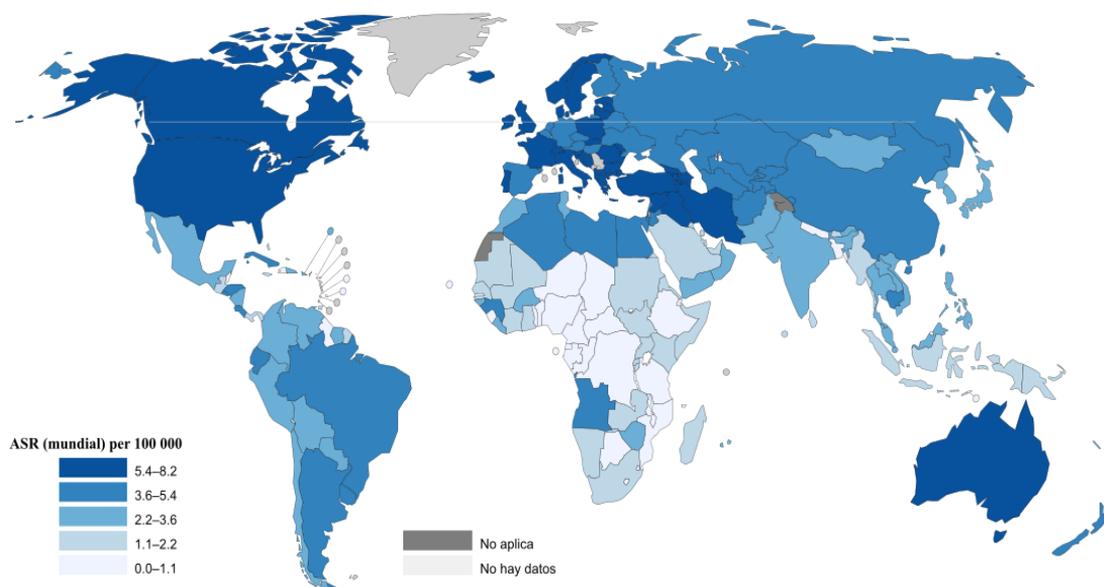


Figura 1.13. Estimaciones de incidencia de cáncer de cerebro a nivel mundial, 2022. Ambos sexos. Tasas estandarizadas por edad según la población mundial por 100.000 habitantes. Fuente: Observatorio Global del Cáncer. GLOBOCAN, 2022 [101].

Clasificación de los gliomas

Aunque tradicionalmente a los gliomas les han sido asignados cuatro grados según la malignidad (del I al IV, siendo los de grado IV los más agresivos), esta clasificación ha estado basada solamente en sus características histológicas. Sin embargo, se

observaron altas frecuencias de mutaciones puntuales recurrentes en la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1/IDH2) en aquellos tumores de bajo grado [105–107], además de la evidente diferencia en la clínica para tumores con características histológicas idénticas con IDH mutada (IDHm) e IDH *wild type* (IDHwt) [108,109]. Por otro lado, muchos tumores clasificados histológicamente como de grado II y III en adultos, que presentaban IDH wt, no sólo mostraban las características moleculares, sino que se comportaban como glioblastoma [110,111].

Estas observaciones condujeron a la adición de parámetros moleculares para graduar más precisamente los gliomas y para estimar el pronóstico en múltiples tipos de tumores. El marcador genético más utilizado para la clasificación de los gliomas en la actualidad es el estado mutacional de IDH. Aunque IDH1 e IDH2 son altamente similares y catalizan reacciones idénticas, su expresión difiere en distintos tipos de cáncer y sus subtipos. Las mutaciones de IDH1 predominan en gliomas [107,112] y casi todas son causadas por una única sustitución de aminoácidos en el codón 132 [113]. Las mutaciones de IDH1 asociadas al cáncer producen R(-)-2-hidroxiglutarato (2HG) en lugar de alfa-cetoglutarato [114], este último altera el metabolismo del cáncer y crea estrés oxidativo [115]. Los niveles de alfa-cetoglutarato influyen en la subunidad HIF-1 α del factor de transcripción inducible por hipoxia, que promueve el crecimiento tumoral cuando los niveles de oxígeno son bajos [116] e inhiben la desmetilación de histonas, que es esencial para la diferenciación terminal de las células progenitoras específicas de la línea [117]. La producción de NADPH está comprometida en gliomas con mutaciones de IDH1, lo que puede sensibilizar a los tumores a la radiación y la quimioterapia, explicando por qué los pacientes con neoplasias mutantes de IDH viven más tiempo [118]. En pacientes adultos, la mutación de IDH tiene la mayor importancia en el pronóstico y la mayor utilidad clínica [119]. Recientemente, González y colaboradores han establecido un flujo de trabajo para la estratificación de biopsias de pacientes con gliomas difusos empleando el estado mutacional de IDH1/2 y la presencia de la co-deleción 1p/19q (pérdida combinada del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19). Los grupos resultantes de esta estratificación mostraron diferencias significativas en la supervivencia y otros atributos clínicos relevantes [120] (figura 1.14).

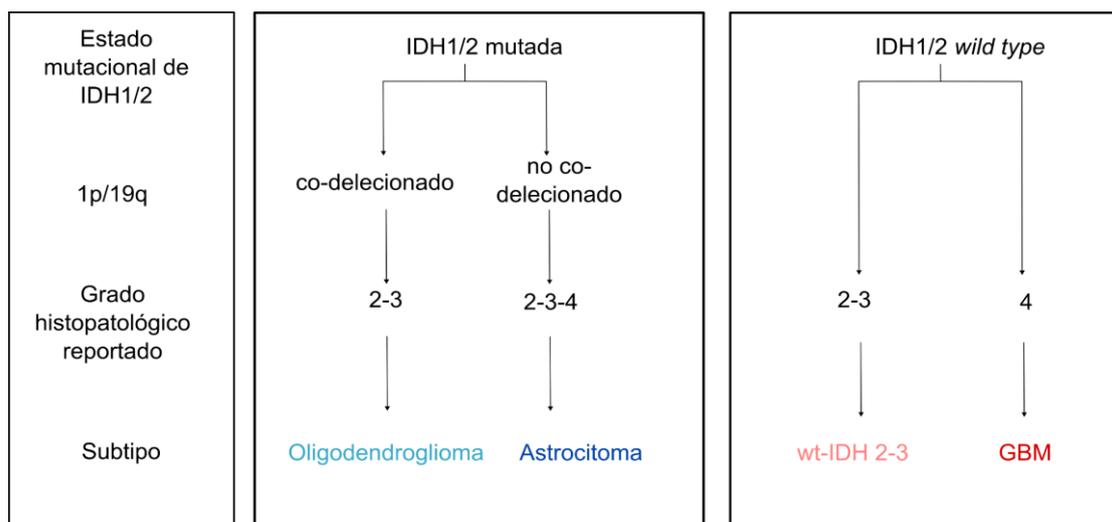


Figura 1.14. Estratificación de biopsias de pacientes con glioma de la base de datos TCGA LGG-GBM realizada por González y colaboradores, en base al estado mutacional de las enzimas IDH1/2 y la presencia de la co-delección 1p/19q [120].

Glioblastoma multiforme (GBM)

Aproximadamente el 49% de los tumores cerebrales malignos son glioblastomas, y el 30% son gliomas de bajo grado de infiltración difusa. Otros tumores cerebrales malignos incluyen linfomas primarios del sistema nervioso central (SNC) (7%) y formas malignas de ependimomas (3%) y meningiomas (2%). Los síntomas de los tumores cerebrales malignos incluyen dolor de cabeza (50%), convulsiones (20%-50%), deterioro neurocognitivo (30%-40%), y déficits neurológicos focales (10%-40%) [121]. La resonancia magnética antes y después de un agente de contraste a base de gadolinio es la modalidad de imagen preferida para evaluar los tumores cerebrales. El diagnóstico requiere biopsia del tumor con consideración de las características histopatológicas y moleculares. La quinta edición de la Clasificación de Tumores de la Organización Mundial de la Salud del Sistema Nervioso Central (OMS SNC5) es el estándar internacional actual para la nomenclatura y el diagnóstico de gliomas.

El GBM se caracteriza por su invasividad y resistencia intrínseca a la terapia convencional, por lo que el tumor recurre y es letal de 6 a 15 meses luego del diagnóstico. A pesar de los esfuerzos para mejorar el tratamiento de este tumor, la supervivencia de los pacientes con GBM no ha mejorado en los últimos 20 años, desde la introducción de la temozolomida a la terapia estándar [122].

Tratamiento y sus limitaciones

El manejo inicial de los gliomas generalmente consiste en la remoción quirúrgica máximamente segura. Además de reducir el volumen del tumor, permite la adquisición de tejido para un diagnóstico histológico preciso y la genotipificación del tumor [123] que a menudo es seguido de una combinación de quimioterapia y

radiación. Actualmente, el fármaco más utilizado para el tratamiento de pacientes con GBM recién diagnosticados es la temozolomida (TMZ), y bevacizumab para el caso de tumores recurrentes [122,124]. Sin embargo, los tratamientos actuales tienen un impacto muy limitado en la supervivencia de los pacientes con GBM debido a la naturaleza altamente invasiva del tumor y a su resistencia intrínseca a la terapia estándar, mostrando 15 meses de supervivencia media y menos del 5% de una tasa de supervivencia de 5 años [120].

Tratamientos experimentales

Las limitaciones intrínsecas de las terapias convencionales frente a los gliomas difusos y en particular frente al GBM, han planteado la necesidad de aunar esfuerzos en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y en el desarrollo de nuevos esquemas que permitan reducir la progresión tumoral e incrementar la supervivencia.

Entre los múltiples tratamientos contra este tipo de tumores que se encuentran en fase clínica experimental, la terapia génica permite que los transgenes terapéuticos se expresen localmente en el área adyacente a la masa tumoral principal después de la cirugía [125]. La administración local de vectores de terapia génica, principalmente adenovirales (AdV) y retrovirales, ha sido ampliamente evaluada en pacientes con glioblastoma multiforme (GBM), mostrando una buena eficiencia de transducción y perfil toxicológico [126,127]. La viroterapia oncolítica también ha experimentado un enorme desarrollo y el tratamiento local con AdVs oncolíticos ha sido evaluado en varios ensayos clínicos en pacientes con GBM. Sin embargo, la eficacia de esta estrategia aún está por determinarse [128].

Los vectores AdV son los vectores virales más ampliamente utilizados en neurooncología y son el estándar de referencia en la terapia génica para el GBM, ya que incluyen muchas ventajas: transducen células en división o en reposo, su genoma viral se modifica con relativa facilidad utilizando tecnología de DNA recombinante, pueden producirse en altos títulos (10^9 – 10^{13} UFP/mL), y su genoma permanece en forma de episoma, lo que reduce el riesgo de mutagénesis insercional [129–131]. Sin embargo, dado que prácticamente toda la población tiene inmunidad anti-AdV preexistente a través de la vacunación o la infección natural, la expresión de transgenes puede no ser estable, ya que se ha demostrado que el sistema inmunológico elimina el vector en 7–14 días después de su administración, incluso cuando se inyecta en el cerebro [132]. De hecho, se observa un aumento en los títulos de anticuerpos anti adenovirales circulantes tras la inyección intratumoral con AdVs terapéuticos en pacientes con GBM [133]. Por lo tanto, es importante aumentar la disponibilidad de vectores de terapia génica, idealmente de distinta naturaleza, para diversificar la caja de herramientas biotecnológica y contar con más opciones a la hora de diseñar nuevas

aproximaciones terapéuticas orientadas a tratar el cáncer cerebral y otros trastornos neurológicos.

A pesar de que las opciones terapéuticas han ido mejorando, el glioblastoma sigue siendo un cáncer difícil de tratar. El manejo óptimo requiere un enfoque multidisciplinario y conocimiento de las posibles complicaciones tanto de la enfermedad como de su tratamiento.

En este trabajo de tesis doctoral nos centramos en el uso del baculovirus AcMNPV como vector de terapia génica, desarrollando primeramente un sistema de obtención de baculovirus recombinantes basado en la tecnología de Golden Gate, que nos permite generarlos con una mayor versatilidad y eficiencia. En segunda instancia, tomando como campo de aplicación los gliomas difusos, caracterizamos posibles blancos terapéuticos y desarrollamos vectores baculovirales con el potencial de convertirse en vectores de terapia génica antitumoral.

Referencias

1. Rohrmann, G.F. *Baculovirus Molecular Biology*; 4th ed.; National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2019;
2. Haase, S.; Ferrelli, L.; Pidre, M.L.; Romanowski, V. Genetic Engineering of Baculoviruses. In *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*; Romanowski, V., Ed.; InTech, 2013 ISBN 978-953-51-1207-5.
3. 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. On the Classification and Nomenclature of Baculoviruses: A Proposal for Revision. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 1257–1266, doi:10.1007/s00705-006-0763-6.
4. Jehle, J.A.; Lange, M.; Wang, H.; Hu, Z.; Wang, Y.; Hauschild, R. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* **2006**, *346*, 180–193, doi:10.1016/j.virol.2005.10.032.
5. Thézé, J.; Bézier, A.; Periquet, G.; Drezen, J.-M.; Herniou, E.A. Paleozoic Origin of Insect Large dsDNA Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 15931–15935, doi:10.1073/pnas.1105580108.
6. Ackermann, H.-W.; Smirnoff, W.A. A Morphological Investigation of 23 Baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* **1983**, *41*, 269–280, doi:10.1016/0022-2011(83)90244-6.
7. Federici Brian A.; Granados, Robert Red Ultrastructure of Baculoviruses. In *The biology of baculoviruses*; CRC Press: Boca Ratón, Florida, 1986; Vol. I, pp. 61–88.
8. Volkman, L.E.; Summers, M.D. Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus: Comparative Infectivity of the Occluded, Alkali-Liberated, and

- Nonoccluded Forms. *J. Invertebr. Pathol.* **1977**, *30*, 102–103, doi:10.1016/0022-2011(77)90045-3.
9. Volkman, L.E.; Summers, M.D.; Hsieh, C.H. Occluded and Nonoccluded Nuclear Polyhedrosis Virus Grown in *Trichoplusia Ni*: Comparative Neutralization Comparative Infectivity, and in Vitro Growth Studies. *J. Virol.* **1976**, *19*, 820–832, doi:10.1128/JVI.19.3.820-832.1976.
 10. 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. Solutions against Emerging Infectious and Noninfectious Human Diseases through the Application of Baculovirus Technologies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 8195–8226, doi:10.1007/s00253-021-11615-1.
 11. Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annu. Rev. Entomol.* **2009**, *54*, 285–302, doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090559.
 12. Dow, J.A. pH Gradients in Lepidopteran Midgut. *J. Exp. Biol.* **1992**, *172*, 355–375, doi:10.1242/jeb.172.1.355.
 13. Wang, P.; Granados, R.R. An Intestinal Mucin Is the Target Substrate for a Baculovirus Enhancin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6977–6982, doi:10.1073/pnas.94.13.6977.
 14. Toprak, U.; Harris, S.; Baldwin, D.; Theilmann, D.; Gillott, C.; Hegedus, D.D.; Erlandson, M.A. Role of Enhancin in *Mamestra Configurata* Nucleopolyhedrovirus Virulence: Selective Degradation of Host Peritrophic Matrix Proteins. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 744–753, doi:10.1099/vir.0.038117-0.
 15. Ohkawa, T.; Welch, M.D. Baculovirus Actin-Based Motility Drives Nuclear Envelope Disruption and Nuclear Egress. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 2153–2159.e4, doi:10.1016/j.cub.2018.05.027.
 16. Wei, W.; Wang, H.; Li, X.; Fang, N.; Yang, S.; Liu, H.; Kang, X.; Sun, X.; Ji, S. Cloning and Characterization of Sf9 Cell Lamin and the Lamin Conformational Changes during *Autographa Californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Infection. *Viruses* **2016**, *8*, 126, doi:10.3390/v8050126.
 17. Backovic, M.; Jardetzky, T.S. Class III Viral Membrane Fusion Proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *714*, 91–101, doi:10.1007/978-94-007-0782-5_3.
 18. Chen, Y.-R.; Zhong, S.; Fei, Z.; Gao, S.; Zhang, S.; Li, Z.; Wang, P.; Blissard, G.W. Transcriptome Responses of the Host *Trichoplusia Ni* to Infection by the Baculovirus *Autographa Californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* **2014**, *88*, 13781–13797, doi:10.1128/JVI.02243-14.
 19. Chisholm, G.E.; Henner, D.J. Multiple Early Transcripts and Splicing of the *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus IE-1 Gene. *J. Virol.* **1988**, *62*, 3193–3200, doi:10.1128/JVI.62.9.3193-3200.1988.
 20. Jiang, S.S.; Chang, I.-S.; Huang, L.-W.; Chen, P.-C.; Wen, C.-C.; Liu, S.-C.; Chien, L.-C.; Lin, C.-Y.; Hsiung, C.A.; Juang, J.-L. Temporal Transcription Program of Recombinant *Autographa Californica* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus. *J.*

- Viol.* **2006**, *80*, 8989–8999, doi:10.1128/JVI.01158-06.
21. Kovacs, G.R.; Guarino, L.A.; Graham, B.L.; Summers, M.D. Identification of Spliced Baculovirus RNAs Expressed Late in Infection. *Virology* **1991**, *185*, 633–643, doi:10.1016/0042-6822(91)90534-i.
 22. Lee, H.; Krell, P.J. Reiterated DNA Fragments in Defective Genomes of Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Are Competent for AcMNPV-Dependent DNA Replication. *Virology* **1994**, *202*, 418–429, doi:10.1006/viro.1994.1358.
 23. Kool, M.; Voeten, J.T.; Goldbach, R.W.; Vlak, J.M. Functional Mapping of Regions of the Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Viral Genome Required for DNA Replication. *Virology* **1994**, *198*, 680–689, doi:10.1006/viro.1994.1080.
 24. Leisy, D.J.; Rohrmann, G.F. Characterization of the Replication of Plasmids Containing Hr Sequences in Baculovirus-Infected Spodoptera Frugiperda Cells. *Virology* **1993**, *196*, 722–730, doi:10.1006/viro.1993.1529.
 25. Pearson, M.N.; Rohrmann, G.F. Lymantria Dispar Nuclear Polyhedrosis Virus Homologous Regions: Characterization of Their Ability to Function as Replication Origins. *J. Virol.* **1995**, *69*, 213–221, doi:10.1128/JVI.69.1.213-221.1995.
 26. Lu, A.; Miller, L.K. Differential Requirements for Baculovirus Late Expression Factor Genes in Two Cell Lines. *J. Virol.* **1995**, *69*, 6265–6272, doi:10.1128/JVI.69.10.6265-6272.1995.
 27. Pearson, M.N.; Bjornson, R.M.; Ahrens, C.; Rohrmann, G.F. Identification and Characterization of a Putative Origin of DNA Replication in the Genome of a Baculovirus Pathogenic for Orgyia Pseudotsugata. *Virology* **1993**, *197*, 715–725, doi:10.1006/viro.1993.1647.
 28. Heldens, J.G.; Broer, R.; Zuidema, D.; Goldbach, R.W.; Vlak, J.M. Identification and Functional Analysis of a Non-Hr Origin of DNA Replication in the Genome of Spodoptera Exigua Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78* (Pt 6), 1497–1506, doi:10.1099/0022-1317-78-6-1497.
 29. Levin, D.B.; Huang, J. Spodoptera Littoralis Type B Nucleopolyhedrovirus Infection of a Grasshopper Cell Line. *J. Invertebr. Pathol.* **1999**, *74*, 184–192, doi:10.1006/jipa.1999.4874.
 30. Depamphilis, M.L. Origins of DNA Replication That Function in Eukaryotic Cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 434–441, doi:10.1016/0955-0674(93)90008-E.
 31. Herniou, E.A.; Olszewski, J.A.; Cory, J.S.; O'Reilly, D.R. The Genome Sequence and Evolution of Baculoviruses. *Annu. Rev. Entomol.* **2003**, *48*, 211–234, doi:10.1146/annurev.ento.48.091801.112756.
 32. Crouch, E.A.; Passarelli, A.L. Genetic Requirements for Homologous Recombination in Autographa Californica Nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* **2002**, *76*, 9323–9334, doi:10.1128/jvi.76.18.9323-9334.2002.
 33. Kool, M.; Ahrens, C.H.; Vlak, J.M.; Rohrmann, G.F. Replication of Baculovirus DNA. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76* (Pt 9), 2103–2118, doi:10.1099/0022-1317-76-9-

2103.

34. Braunagel, S.C.; Burks, J.K.; Rosas-Acosta, G.; Harrison, R.L.; Ma, H.; Summers, M.D. Mutations within the *Autographa Californica* Nucleopolyhedrovirus FP25K Gene Decrease the Accumulation of ODV-E66 and Alter Its Intranuclear Transport. *J. Virol.* **1999**, *73*, 8559–8570, doi:10.1128/JVI.73.10.8559-8570.1999.
35. Quant-Russell, R.L.; Pearson, M.N.; Rohrmann, G.F.; Beaudreau, G.S. Characterization of Baculovirus P10 Synthesis Using Monoclonal Antibodies. *Virology* **1987**, *160*, 9–19, doi:10.1016/0042-6822(87)90038-9.
36. van Oers, M.M.; Flipsen, J.T.; Reusken, C.B.; Sliwinsky, E.L.; Goldbach, R.W.; Vlak, J.M. Functional Domains of the P10 Protein of *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Gen. Virol.* **1993**, *74* (Pt 4), 563–574, doi:10.1099/0022-1317-74-4-563.
37. Romanowski, V.; Ghiringhelli, P.D. Biología molecular de los baculovirus. In *Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*; Universidad Pública de Navarra ; Phytoma-España: Pamplona, Valencia, 2001 ISBN 84-932056-0-5.
38. Shi, Y.; Li, K.; Tang, P.; Li, Y.; Zhou, Q.; Yang, K.; Zhang, Q. Three-Dimensional Visualization of the *Autographa Californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virion Envelopment Process Gives New Clues as to Its Mechanism. *Virology* **2015**, *476*, 298–303, doi:10.1016/j.virol.2014.11.030.
39. Braunagel, S.C.; Summers, M.D. Molecular Biology of the Baculovirus Occlusion-Derived Virus Envelope. *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 1084–1095, doi:10.2174/138945007782151315.
40. Patmanidi, A.L.; Possee, R.D.; King, L.A. Formation of P10 Tubular Structures during AcMNPV Infection Depends on the Integrity of Host-Cell Microtubules. *Virology* **2003**, *317*, 308–320, doi:10.1016/j.virol.2003.08.035.
41. Carpentier, D.C.J.; Griffiths, C.M.; King, L.A. The Baculovirus P10 Protein of *Autographa Californica* Nucleopolyhedrovirus Forms Two Distinct Cytoskeletal-like Structures and Associates with Polyhedral Occlusion Bodies during Infection. *Virology* **2008**, *371*, 278–291, doi:10.1016/j.virol.2007.09.043.
42. Pidre, M.L.; Arrías, P.N.; Amorós Morales, L.C.; Romanowski, V. The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. *Viruses* **2022**, *15*, 80, doi:10.3390/v15010080.
43. Je, Y.H.; Chang, J.H.; Roh, J.; Jin, B.R. Generation of Baculovirus Expression Vector Using Defective *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome Maintained in *Escherichia Coli* for Occ Virus Production+. *Int J Indust Entomol* **2001**, *2*, 155–160.
44. Je, Y.H.; Jin, B.R.; Park, H.W.; Roh, J.Y.; Chang, J.H.; Seo, S.J.; Olszewski, J.A.; O'Reilly, D.R.; Kang, S.K. Baculovirus Expression Vectors That Incorporate the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies. *BioTechniques* **2003**, *34*, 81–87.
45. Je, H.Y.; Hee Chang, J.; Young Choi, J.; Yul Roh, J.; Rae Jin, B.; O'Reilly, D.R.; Kwon Kang, S. A Defective Viral Genome Maintained in *Escherichia Coli* for the

- Generation of Baculovirus Expression Vectors. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 575–582, doi:10.1023/A:1010301404445.
46. Luckow, V.A.; Lee, S.C.; Barry, G.F.; Olins, P.O. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia Coli*. *J. Virol.* **1993**, *67*, 4566–4579, doi:10.1128/jvi.67.8.4566-4579.1993.
 47. Shang, Y.; Hu, H.; Wang, X.; Wang, H.; Deng, F.; Wang, M.; Hu, Z. Construction and Characterization of a Novel Bacmid AcBac-Syn Based on a Synthesized Baculovirus Genome. *Virol. Sin.* **2021**, *36*, 1566–1574, doi:10.1007/s12250-021-00449-w.
 48. Fedson, D.S.; Dunnill, P. New Approaches to Confronting an Imminent Influenza Pandemic. *Perm. J.* **2007**, *11*, 63–69, doi:10.7812/TPP/07-044.
 49. Cox, M.M.J.; Patriarca, P.A.; Treanor, J. FluBlok, a Recombinant Hemagglutinin Influenza Vaccine. *Influenza Other Respir. Viruses* **2008**, *2*, 211–219, doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00053.x.
 50. Palmberger, D.; Wilson, I.B.H.; Berger, I.; Grabherr, R.; Rendic, D. Correction: SweetBac: A New Approach for the Production of Mammalianised Glycoproteins in Insect Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, doi:10.1371/annotation/bd906c17-a44b-443d-9051-7d31d8e47afa.
 51. Tavarone, E.; Molina, G.N.; Amalfi, S.; Peralta, A.; Molinari, P.; Taboga, O. The Localization of a Heterologous Displayed Antigen in the Baculovirus-Budded Virion Determines the Type and Strength of Induced Adaptive Immune Response. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 4175–4184, doi:10.1007/s00253-017-8183-y.
 52. Duisit, G.; Saleun, S.; Douthe, S.; Barsoum, J.; Chadeuf, G.; Moullier, P. Baculovirus Vector Requires Electrostatic Interactions Including Heparan Sulfate for Efficient Gene Transfer in Mammalian Cells. *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 93–102, doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199903/04)1:2<93::AID-JGM19>3.0.CO;2-1.
 53. Makkonen, K.-E.; Turkki, P.; Laakkonen, J.P.; Ylä-Herttuala, S.; Marjomäki, V.; Airene, K.J. 6- O - and N -Sulfated Syndecan-1 Promotes Baculovirus Binding and Entry into Mammalian Cells. *J. Virol.* **2013**, *87*, 11148–11159, doi:10.1128/JVI.01919-13.
 54. Ohkawa, T.; Volkman, L.E.; Welch, M.D. Actin-Based Motility Drives Baculovirus Transit to the Nucleus and Cell Surface. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 187–195, doi:10.1083/jcb.201001162.
 55. Long, G.; Pan, X.; Kormelink, R.; Vlak, J.M. Functional Entry of Baculovirus into Insect and Mammalian Cells Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **2006**, *80*, 8830–8833, doi:10.1128/JVI.00880-06.
 56. Chen, C.-Y.; Lin, C.-Y.; Chen, G.-Y.; Hu, Y.-C. Baculovirus as a Gene Delivery Vector: Recent Understandings of Molecular Alterations in Transduced Cells and Latest Applications. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 618–631, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.04.004.

57. Kim, Y.-K.; Park, I.-K.; Jiang, H.-L.; Choi, J.-Y.; Je, Y.-H.; Jin, H.; Kim, H.-W.; Cho, M.-H.; Cho, C.-S. Regulation of Transduction Efficiency by Pegylation of Baculovirus Vector in Vitro and in Vivo. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 104–109, doi:10.1016/j.jbiotec.2006.02.015.
58. Kolangath, S.M.; Basagoudanavar, S.H.; Hosamani, M.; Saravanan, P.; Tamil Selvan, R.P. Baculovirus Mediated Transduction: Analysis of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Pseudotyping. *Virus-Dis.* **2014**, *25*, 441–446, doi:10.1007/s13337-014-0229-5.
59. Laakkonen, J.P.; Kaikkonen, M.U.; Ronkainen, P.H.A.; Ihalainen, T.O.; Niskanen, E.A.; Häkkinen, M.; Salminen, M.; Kulomaa, M.S.; Ylä-Herttua, S.; Airene, K.J.; et al. Baculovirus-Mediated Immediate-Early Gene Expression and Nuclear Reorganization in Human Cells. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*, 667–681, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01074.x.
60. Yang, Y.; Lo, S.-L.; Yang, J.; Yang, J.; Goh, S.S.L.; Wu, C.; Feng, S.-S.; Wang, S. Polyethylenimine Coating to Produce Serum-Resistant Baculoviral Vectors for in Vivo Gene Delivery. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5767–5774, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.020.
61. Plastine, M.D.P.; Amalfi, S.; López, M.G.; Gravisaco, M.J.; Taboga, O.; Alfonso, V. Development of a Stable Sf9 Insect Cell Line to Produce VSV-G Pseudotyped Baculoviruses. *Gene Ther.* **2024**, *31*, 187–194, doi:10.1038/s41434-024-00442-4.
62. Borg, J.; Nevsten, P.; Wallenberg, R.; Stenstrom, M.; Cardell, S.; Falkenberg, C.; Holm, C. Amino-Terminal Anchored Surface Display in Insect Cells and Budded Baculovirus Using the Amino-Terminal End of Neuraminidase. *J. Biotechnol.* **2004**, *114*, 21–30, doi:10.1016/j.jbiotec.2004.05.014.
63. Liangbo Hu; Li, Y.; Deng, F.; Hu, Z.; Wang, H.; Wang, M. Improving Baculovirus Transduction of Mammalian Cells by Incorporation of Thogotovirus Glycoproteins. *Virol. Sin.* **2019**, *34*, 454–466, doi:10.1007/s12250-019-00133-0.
64. Mäkelä, A.R.; Matilainen, H.; White, D.J.; Ruoslahti, E.; Oker-Blom, C. Enhanced Baculovirus-Mediated Transduction of Human Cancer Cells by Tumor-Homing Peptides. *J. Virol.* **2006**, *80*, 6603–6611, doi:10.1128/JVI.00528-06.
65. Rätty, J.K.; Airene, K.J.; Marttila, A.T.; Marjomäki, V.; Hytönen, V.P.; Lehtolainen, P.; Laitinen, O.H.; Mähönen, A.J.; Kulomaa, M.S.; Ylä-Herttua, S. Enhanced Gene Delivery by Avidin-Displaying Baculovirus. *Mol. Ther.* **2004**, *9*, 282–291, doi:10.1016/j.ymthe.2003.11.004.
66. Wang, C.-H.; Naik, N.G.; Liao, L.-L.; Wei, S.-C.; Chao, Y.-C. Global Screening of Antiviral Genes That Suppress Baculovirus Transgene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2017**, *6*, 194–206, doi:10.1016/j.omtm.2017.07.002.
67. Hu, Y.; Tsai, C.; Chang, Y.; Huang, J. Enhancement and Prolongation of Baculovirus-Mediated Expression in Mammalian Cells: Focuses on Strategic Infection and Feeding. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 373–379, doi:10.1021/bp025609d.

68. Gwak, W.-S.; Kim, H.-S.; Bae, J.-S.; Kim, T.-H.; Bae, S.-M.; Woo, S.-D. Development of a Novel Enhanced Baculovirus Expression Vector via Promoter Combination. *J. Asia-Pac. Entomol.* **2020**, *23*, 909–914, doi:10.1016/j.aspen.2020.07.016.
69. Hoare, J.; Waddington, S.; Thomas, H.C.; Coutelle, C.; McGarvey, M.J. Complement Inhibition Rescued Mice Allowing Observation of Transgene Expression Following Intraportal Delivery of Baculovirus in Mice. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 325–333, doi:10.1002/jgm.671.
70. Hüser, A.; Rudolph, M.; Hofmann, C. Incorporation of Decay-Accelerating Factor into the Baculovirus Envelope Generates Complement-Resistant Gene Transfer Vectors. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 451–455, doi:10.1038/88122.
71. Kaikkonen, M.U.; Maatta, A.I.; Ylä-Herttua, S.; Airene, K.J. Screening of Complement Inhibitors: Shielded Baculoviruses Increase the Safety and Efficacy of Gene Delivery. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 987–992, doi:10.1038/mt.2010.25.
72. Kawai, Y.; Kawabata, C.; Sakaguchi, M.; Tamura, T. Protection of Baculovirus Vectors Expressing Complement Regulatory Proteins against Serum Complement Attack. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, *41*, 1600–1605, doi:10.1248/bpb.b18-00451.
73. Sung, L.-Y.; Chen, C.-L.; Lin, S.-Y.; Li, K.-C.; Yeh, C.-L.; Chen, G.-Y.; Lin, C.-Y.; Hu, Y.-C. Efficient Gene Delivery into Cell Lines and Stem Cells Using Baculovirus. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 1882–1899, doi:10.1038/nprot.2014.130.
74. Lo, W.-H.; Hwang, S.-M.; Chuang, C.-K.; Chen, C.-Y.; Hu, Y.-C. Development of a Hybrid Baculoviral Vector for Sustained Transgene Expression. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 658–666, doi:10.1038/mt.2009.13.
75. Sung, L.-Y.; Chen, C.-L.; Lin, S.-Y.; Hwang, S.-M.; Lu, C.-H.; Li, K.-C.; Lan, A.S.; Hu, Y.-C. Enhanced and Prolonged Baculovirus-Mediated Expression by Incorporating Recombinase System and in Cis Elements: A Comparative Study. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e139–e139, doi:10.1093/nar/gkt442.
76. Kost, T.A.; Condreay, J.P.; Jarvis, D.L. Baculovirus as Versatile Vectors for Protein Expression in Insect and Mammalian Cells. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 567–575, doi:10.1038/nbt1095.
77. Schaly, S.; Ghebretatios, M.; Prakash, S. Baculoviruses in Gene Therapy and Personalized Medicine. *Biol. Targets Ther.* **2021**, *Volume 15*, 115–132, doi:10.2147/BTT.S292692.
78. Gao, R.; McCormick, C.J.; Arthur, M.J.P.; Ruddell, R.; Oakley, F.; Smart, D.E.; Murphy, F.R.; Harris, M.P.G.; Mann, D.A. High Efficiency Gene Transfer into Cultured Primary Rat and Human Hepatic Stellate Cells Using Baculovirus Vectors. *Liver* **2002**, *22*, 15–22.
79. Hu, Y.-C. Baculovirus Vectors for Gene Therapy. *Adv. Virus Res.* **2006**, *68*, 287–320, doi:10.1016/S0065-3527(06)68008-1.
80. Hu, Y.-C. Baculoviral Vectors for Gene Delivery: A Review. *Curr. Gene Ther.* **2008**,

- 8, 54–65, doi:10.2174/156652308783688509.
81. Airene, K.J.; Hu, Y.-C.; Kost, T.A.; Smith, R.H.; Kotin, R.M.; Ono, C.; Matsuura, Y.; Wang, S.; Ylä-Herttuala, S. Baculovirus: An Insect-Derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 739–749, doi:10.1038/mt.2012.286.
 82. Airene, K.J.; Makkonen, K.E.; Mähönen, A.J.; Ylä-Herttuala, S. Baculoviruses Mediate Efficient Gene Expression in a Wide Range of Vertebrate Cells. *Methods Mol Biol* **2011**, *737*, 279–301.
 83. Blissard, G.W.; Wenz, J.R. Baculovirus Gp64 Envelope Glycoprotein Is Sufficient to Mediate pH-Dependent Membrane Fusion. *J. Virol.* **1992**, *66*, 6829–6835, doi:10.1128/jvi.66.11.6829-6835.1992.
 84. Kaikkonen, M.U.; Ylä-Herttuala, S.; Airene, K.J. *How to Avoid Complement Attack in Baculovirus-Mediated Gene Delivery*; 2011; Vol. 107; ISBN 1096-0805.
 85. Boyce, F.M.; Bucher, N.L. Baculovirus-Mediated Gene Transfer into Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 2348–2352, doi:10.1073/pnas.93.6.2348.
 86. Pidre, M.L. Vectores Baculovirales Combinados: Exposición Superficial de Antígenos y Transducción de Genes. PhD Thesis, Universidad Nacional de La Plata, 2017.
 87. Garcia Fallit, M.; Pidre, M.L.; Asad, A.S.; Peña Agudelo, J.A.; Vera, M.B.; Nicola Candia, A.J.; Sagripanti, S.B.; Pérez Kuper, M.; Amorós Morales, L.C.; Marchesini, A.; et al. Evaluation of Baculoviruses as Gene Therapy Vectors for Brain Cancer. *Viruses* **2023**, *15*, 608, doi:10.3390/v15030608.
 88. Tjia, S.T.; zu Altenschildesche, G.M.; Doerfler, W. Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) DNA Does Not Persist in Mass Cultures of Mammalian Cells. *Virology* **1983**, *125*, 107–117, doi:10.1016/0042-6822(83)90067-3.
 89. Fabre, M.; Arrías, P.; Massón, T.; Pidre, M.; Romanowski, V. Baculovirus-Derived Vectors for Immunization and Therapeutic Applications. In *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*; Ennaji, M., Ed.; Academic Press, United States, 2020; pp. 197–224.
 90. Engler, C.; Marillonnet, S. Golden Gate Cloning. In *DNA Cloning and Assembly Methods*; Valla, S., Lale, R., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2014; Vol. 1116, pp. 119–131 ISBN 978-1-62703-763-1.
 91. SnapGene Golden Gate Assembly.
 92. Engler, C.; Kandzia, R.; Marillonnet, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3647, doi:10.1371/journal.pone.0003647.
 93. Marillonnet, S.; Grützner, R. Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2020**, *130*, e115, doi:10.1002/cpmb.115.
 94. Bird, J.E.; Marles-Wright, J.; Giachino, A. A User's Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11*, 3551–3563,

doi:10.1021/acssynbio.2c00355.

95. Fialkow, P.J. Clonal Origin of Human Tumors. *Annu. Rev. Med.* **1979**, *30*, 135–143, doi:10.1146/annurev.me.30.020179.001031.
96. Nowell, P.C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired Genetic Lability Permits Stepwise Selection of Variant Sublines and Underlies Tumor Progression. *Science* **1976**, *194*, 23–28, doi:10.1126/science.959840.
97. Tlsty, T.D.; Coussens, L.M. TUMOR STROMA AND REGULATION OF CANCER DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, *1*, 119–150, doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224.
98. Fidler, I.J. The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The “seed and Soil” Hypothesis Revisited. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 453–458, doi:10.1038/nrc1098.
99. Jones, P.A.; Baylin, S.B. The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415–428, doi:10.1038/nrg816.
100. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
101. Cancer (IARC), T.I.A. for R. on Global Cancer Observatory Available online: <https://gco.iarc.fr/> (accessed on 15 March 2024).
102. Perry, A.; Wesseling, P. Histologic Classification of Gliomas. *Handb. Clin. Neurol.* **2016**, *134*, 71–95, doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0.
103. Wesseling, P.; Capper, D. WHO 2016 Classification of Gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2018**, *44*, 139–150, doi:10.1111/nan.12432.
104. Ostrom, Q.T.; Bauchet, L.; Davis, F.G.; Deltour, I.; Fisher, J.L.; Langer, C.E.; Pekmezci, M.; Schwartzbaum, J.A.; Turner, M.C.; Walsh, K.M.; et al. The Epidemiology of Glioma in Adults: A “State of the Science” Review. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, 896–913, doi:10.1093/neuonc/nou087.
105. Parsons, D.W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J.C.-H.; Leary, R.J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.-M.; Gallia, G.L.; et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **2008**, *321*, 1807–1812, doi:10.1126/science.1164382.
106. Balss, J.; Meyer, J.; Mueller, W.; Korshunov, A.; Hartmann, C.; Von Deimling, A. Analysis of the IDH1 Codon 132 Mutation in Brain Tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2008**, *116*, 597–602, doi:10.1007/s00401-008-0455-2.
107. Cohen, A.L.; Holmen, S.L.; Colman, H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2013**, *13*, 345, doi:10.1007/s11910-013-0345-4.
108. Sanson, M.; Marie, Y.; Paris, S.; Idbaih, A.; Laffaire, J.; Ducray, F.; El Hallani, S.; Boisselier, B.; Mokhtari, K.; Hoang-Xuan, K.; et al. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4150–4154, doi:10.1200/JCO.2009.21.9832.
109. Hartmann, C.; Hentschel, B.; Tatagiba, M.; Schramm, J.; Schnell, O.; Seidel, C.; Stein, R.; Reifenberger, G.; Pietsch, T.; Von Deimling, A.; et al. Molecular Markers in Low-Grade Gliomas: Predictive or Prognostic? *Clin. Cancer Res.*

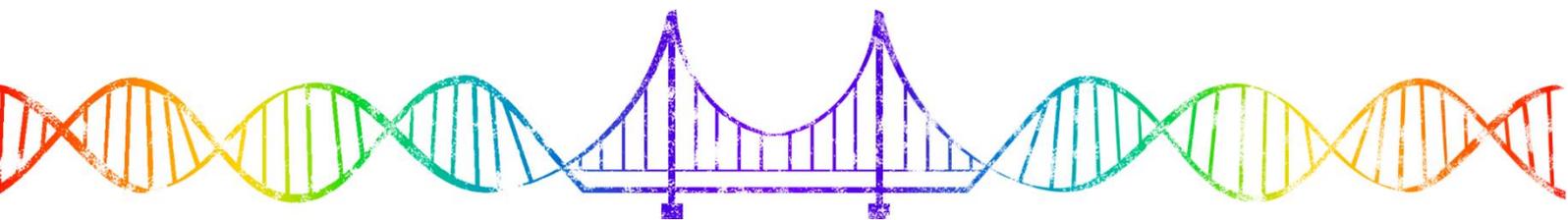
- 2011**, 17, 4588–4599, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3194.
110. Reuss, D.E.; Kratz, A.; Sahm, F.; Capper, D.; Schrimpf, D.; Koelsche, C.; Hovestadt, V.; Bewerunge-Hudler, M.; Jones, D.T.W.; Schittenhelm, J.; et al. Adult IDH Wild Type Astrocytomas Biologically and Clinically Resolve into Other Tumor Entities. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2015**, 130, 407–417, doi:10.1007/s00401-015-1454-8.
 111. The Cancer Genome Atlas Research Network Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 372, 2481–2498, doi:10.1056/NEJMoa1402121.
 112. Wang, H.-Y.; Tang, K.; Liang, T.-Y.; Zhang, W.-Z.; Li, J.-Y.; Wang, W.; Hu, H.-M.; Li, M.-Y.; Wang, H.-Q.; He, X.-Z.; et al. The Comparison of Clinical and Biological Characteristics between IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2016**, 35, 86, doi:10.1186/s13046-016-0362-7.
 113. Yang, H.; Ye, D.; Guan, K.-L.; Xiong, Y. IDH1 and IDH2 Mutations in Tumorigenesis: Mechanistic Insights and Clinical Perspectives. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 5562–5571, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1773.
 114. Dang, L.; White, D.W.; Gross, S.; Bennett, B.D.; Bittinger, M.A.; Driggers, E.M.; Fantin, V.R.; Jang, H.G.; Jin, S.; Keenan, M.C.; et al. Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate. *Nature* **2009**, 462, 739–744, doi:10.1038/nature08617.
 115. Ježek, P. 2-Hydroxyglutarate in Cancer Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2020**, 33, 903–926, doi:10.1089/ars.2019.7902.
 116. Zhao, S.; Lin, Y.; Xu, W.; Jiang, W.; Zha, Z.; Wang, P.; Yu, W.; Li, Z.; Gong, L.; Peng, Y.; et al. Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 α . *Science* **2009**, 324, 261–265, doi:10.1126/science.1170944.
 117. Lu, C.; Ward, P.S.; Kapoor, G.S.; Rohle, D.; Turcan, S.; Abdel-Wahab, O.; Edwards, C.R.; Khanin, R.; Figueroa, M.E.; Melnick, A.; et al. IDH Mutation Impairs Histone Demethylation and Results in a Block to Cell Differentiation. *Nature* **2012**, 483, 474–478, doi:10.1038/nature10860.
 118. Bleeker, F.E.; Atai, N.A.; Lamba, S.; Jonker, A.; Rijkeboer, D.; Bosch, K.S.; Tigchelaar, W.; Troost, D.; Vandertop, W.P.; Bardelli, A.; et al. The Prognostic IDH1 R132 Mutation Is Associated with Reduced NADP $^{+}$ -Dependent IDH Activity in Glioblastoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2010**, 119, 487–494, doi:10.1007/s00401-010-0645-6.
 119. Śledzińska, P.; Bebyn, M.G.; Furtak, J.; Kowalewski, J.; Lewandowska, M.A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 10373, doi:10.3390/ijms221910373.
 120. Gonzalez, N.; Asad, A.S.; Gómez Escalante, J.; Peña Agudelo, J.A.; Nicola Candia, A.J.; García Fallit, M.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. Potential of IDH Mutations as Immunotherapeutic Targets in Gliomas: A Review and Meta-Analysis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2021**, 25, 1045–1060, doi:10.1080/14728222.2021.2017422.

121. Schaff, L.R.; Mellingshoff, I.K. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA* **2023**, *329*, 574, doi:10.1001/jama.2023.0023.
122. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
123. Tan, A.C.; Ashley, D.M.; López, G.Y.; Malinzak, M.; Friedman, H.S.; Khasraw, M. Management of Glioblastoma: State of the Art and Future Directions. *CA. Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 299–312, doi:10.3322/caac.21613.
124. Cohen, M.H.; Shen, Y.L.; Keegan, P.; Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* **2009**, *14*, 1131–1138, doi:10.1634/theoncologist.2009-0121.
125. Chiocca, E.A.; Aguilar, L.K.; Bell, S.D.; Kaur, B.; Hardcastle, J.; Cavaliere, R.; McGregor, J.; Lo, S.; Ray-Chaudhuri, A.; Chakravarti, A.; et al. Phase IB Study of Gene-Mediated Cytotoxic Immunotherapy Adjuvant to Up-Front Surgery and Intensive Timing Radiation for Malignant Glioma. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 3611–3619, doi:10.1200/JCO.2011.35.5222.
126. Castro, M.G.; Candolfi, M.; Wilson, T.J.; Calinescu, A.; Paran, C.; Kamran, N.; Koschmann, C.; Moreno-Ayala, M.A.; Assi, H.; Lowenstein, P.R. Adenoviral Vector-Mediated Gene Therapy for Gliomas: Coming of Age. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2014**, *14*, 1241–1257, doi:10.1517/14712598.2014.915307.
127. Todo, T.; Ito, H.; Ino, Y.; Ohtsu, H.; Ota, Y.; Shibahara, J.; Tanaka, M. Intratumoral Oncolytic Herpes Virus G47 Δ for Residual or Recurrent Glioblastoma: A Phase 2 Trial. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 1630–1639, doi:10.1038/s41591-022-01897-x.
128. Lu, V.M.; Shah, A.H.; Vallejo, F.A.; Eichberg, D.G.; Luther, E.M.; Shah, S.S.; Komotar, R.J.; Ivan, M.E. Clinical Trials Using Oncolytic Viral Therapy to Treat Adult Glioblastoma: A Progress Report. *Neurosurg. Focus* **2021**, *50*, E3, doi:10.3171/2020.11.FOCUS20860.
129. Sadeghi, H.; Hitt, M.M. Transcriptionally Targeted Adenovirus Vectors. *Curr. Gene Ther.* **2005**, *5*, 411–427, doi:10.2174/1566523054546189.
130. Syam, A.; Nawaz, A.; Ijaz, A.; Sajjad, U.; Fazil, A.; Irfan, S.; Muzaffar, A.; Shahid, M.; Idrees, M.; Malik, K.; et al. Adenovirus Vector System: Construction, History and Therapeutic Applications. *BioTechniques* **2022**, *73*, 297–305, doi:10.2144/btn-2022-0051.
131. Araújo, N.M.; Rubio, I.G.S.; Toneto, N.P.A.; Morale, M.G.; Tamura, R.E. The Use of Adenoviral Vectors in Gene Therapy and Vaccine Approaches. *Genet. Mol. Biol.* **2022**, *45*, e20220079, doi:10.1590/1678-4685-GMB-2022-0079.
132. Barcia, C.; Jimenez-Dalmaroni, M.; Kroeger, K.M.; Puntel, M.; Rapaport, A.J.; Larocque, D.; King, G.D.; Johnson, S.A.; Liu, C.; Xiong, W.; et al. One-Year Expression From High-Capacity Adenoviral Vectors in the Brains of Animals With Pre-Existing Anti-Adenoviral Immunity: Clinical Implications. *Mol. Ther.* **2007**,

15, 2154–2163, doi:10.1038/sj.mt.6300305.

133. Umemura, Y.; Orringer, D.; Junck, L.; Varela, M.L.; West, M.E.J.; Faisal, S.M.; Comba, A.; Heth, J.; Sagher, O.; Leung, D.; et al. Combined Cytotoxic and Immune-Stimulatory Gene Therapy for Primary Adult High-Grade Glioma: A Phase 1, First-in-Human Trial. *Lancet Oncol.* **2023**, *24*, 1042–1052, doi:10.1016/S1470-2045(23)00347-9.

Hipótesis y objetivos



Hipótesis

Los baculovirus son virus específicos de lepidópteros pero que, bajo ciertas condiciones, tienen la capacidad de transducir células de mamífero, es decir, ingresar a las mismas, introducir su material genético y conducir a la expresión de genes heterólogos sin poder completar su ciclo infectivo. Por este motivo los baculovirus han sido ampliamente utilizados como vectores de expresión y, más recientemente, como vectores de terapia génica [1]. **En el presente trabajo de tesis doctoral nos proponemos en una primera instancia mejorar los vectores actualmente disponibles para la generación de baculovirus recombinantes incorporando a los sistemas ya existentes la tecnología de clonado por ensamblado modular Golden Gate. Postulamos que dichas mejoras facilitarán la construcción de vectores de transferencia, permitiendo la generación de baculovirus con una mayor eficiencia y con la capacidad de expresar varios genes terapéuticos a la vez.**

Si bien existe una gran variabilidad entre las células tumorales, hay ciertas características comunes a las células neoplásicas que las diferencian de las células normales, entre las que se destacan: pérdida de sensibilidad frente a señales que detienen el crecimiento, autosuficiencia en señales de proliferación, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis, inestabilidad genómica y promoción de la inflamación. El peso relativo entre las señales tróficas o pro-proliferativas y las diferentes vías de muerte celular toma particular importancia para comprender mejor la fisiología tumoral y el diseño de nuevas terapias [2].

La prolactina (PRL) es una hormona tradicionalmente involucrada en el control endócrino de la reproducción y la lactancia. Si bien la PRL circulante es producida en la adenohipófisis, esta hormona también se produce en distintos tejidos donde tiene efectos autócrinos/parácrinos sobre la homeostasis tisular [3]. La PRL y su receptor (PRLR) también han sido involucrados en el desarrollo de tumores hormono-dependientes, como el cáncer de mama y de próstata, donde favorece la supervivencia de las células tumorales, la quimio-resistencia y la migración celular [4]. La presencia de PRL/PRLR no parece ser exclusiva de los tumores hormono-dependientes, y ambas moléculas han sido detectadas en biopsias de pacientes con GBM en numerosas publicaciones [5–8] y la activación de esta vía favorece la proliferación, la resistencia al efecto citotóxico de drogas quimioterapéuticas y la migración celular en células de GBM.

Por su parte, la muerte celular regulada (o “*programmed cell death*”, PCD) juega un rol fundamental para mantener la homeostasis mediante la remoción de células dañadas y puede constituir también una reacción patológica ante un estímulo dañino. Las vías de PCD han sido ampliamente estudiadas y demostraron ser

cruciales para la prognosis de los pacientes, la progresión del cáncer, la metástasis y la vigilancia inmune en el cáncer. Según la evidencia, distintas formas de PCD podrían generar un cambio en el microambiente tumoral (TIME) a partir de la liberación de PAMPs o DAMPs (pathogen- or damage-associated molecular patterns) que potenciaría la terapia antitumoral [9]. Estudios recientes identificaron un nuevo fenómeno de PCD llamado PANoptosis, controlado por un complejo multimérico denominado PANoptosoma que puede activar en paralelo tres vías de PCD: piroptosis, apoptosis y necroptosis. RIPK1 forma parte del PANoptosoma y es un actor crucial para la activación y el balance entre las tres vías. **En ese sentido hipotetizamos que la regulación negativa de las vías que involucran a PRLR y a RIPK1 modularía las señales tróficas y de muerte celular, modificando la fisiología tumoral y reduciendo su proliferación. Los baculovirus, entonces, representarán una herramienta fundamental para la vehiculización de diferentes genes terapéuticos que contribuyan a ese fin.**

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consiste en desarrollar una plataforma para la generación de baculovirus recombinantes (recBV) que permita la incorporación de múltiples bloques génicos en el genoma baculoviral de manera eficiente empleando la tecnología de ensamblado modular por Golden Gate.

Para evaluar las herramientas generadas tomaremos al Glioblastoma Multiforme como modelo de estudio. Para ello nos proponemos como objetivo adicional la caracterización de posibles blancos terapéuticos contra este tipo de tumor y el desarrollo de baculovirus recombinantes con la capacidad de afectar dichos blancos.

Objetivos específicos

1. Diseñar un sistema de plásmidos modulares con el fin de obtener una plataforma para la generación de vectores baculovirales con la capacidad de expresar múltiples genes de interés.
2. Explorar en mayor profundidad el posible rol desempeñado por la proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1 (RIPK1) y el receptor de la prolactina (PRLR) en la patogénesis de los gliomas difusos mediante análisis transcriptómicos exhaustivos a partir de bases de datos de pacientes que contienen información clínica, transcriptómica y genómica.

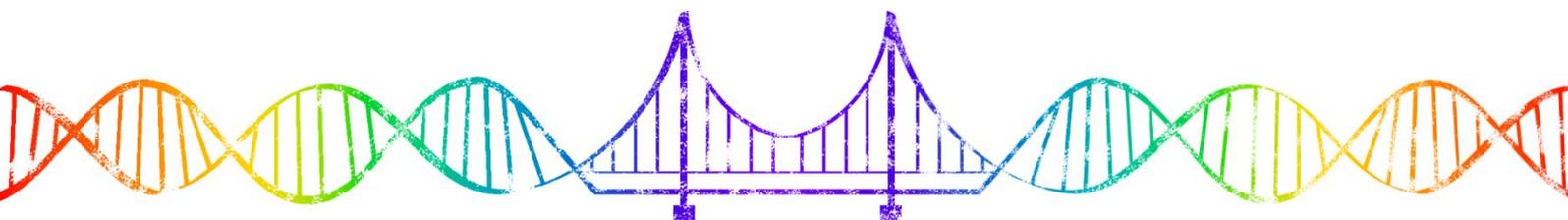
3. Diseñar, obtener y caracterizar baculovirus recombinantes con la capacidad de silenciar o modular el efecto de los blancos terapéuticos RIPK1 y PRLR.
4. Evaluar el rol de ambos blancos terapéuticos en ensayos pre-clínicos *in vitro* utilizando quimioterápicos y drogas específicas.

Referencias

1. Pidre, M.L.; Arrías, P.N.; Amorós Morales, L.C.; Romanowski, V. The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. *Viruses* **2022**, *15*, 80, doi:10.3390/v15010080.
2. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
3. Sethi, B.K.; Chanukya, G.V.; Nagesh, V.S. Prolactin and Cancer: Has the Orphan Finally Found a Home? *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2012**, *16*, S195-198, doi:10.4103/2230-8210.104038.
4. Goffin, V. Prolactin Receptor Targeting in Breast and Prostate Cancers: New Insights into an Old Challenge. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *179*, 111–126, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.009.
5. Mendes, G.A.; Pereira-Lima, J.F.S.; Kohek, M.B.; Trott, G.; Di Domenico, M.; Ferreira, N.P.; Oliveira, M. da C. Prolactin Gene Expression in Primary Central Nervous System Tumors. *J. Negat. Results Biomed.* **2013**, *12*, 4, doi:10.1186/1477-5751-12-4.
6. M. D. Abech, D.; F. S. Pereira-Lima, J.; G. S. Leães, C.; T. Meurer, R.; M. Barbosa-Coutinho, L.; P. Ferreira, N.; C. Oliveira, M. Cell Replication and Angiogenesis in Central Nervous System Tumors and Their Relationship with the Expression of Tissue Prolactin and Hyperprolactinemia. *Open J. Pathol.* **2012**, *02*, 50–57, doi:10.4236/ojpathology.2012.23011.
7. Alkharusi, A.; Yu, S.; Landázuri, N.; Zadjali, F.; Davodi, B.; Nyström, T.; Gräslund, T.; Rahbar, A.; Norstedt, G. Stimulation of Prolactin Receptor Induces STAT-5 Phosphorylation and Cellular Invasion in Glioblastoma Multiforme. *Oncotarget* **2016**, *7*, 79572–79583, doi:10.18632/oncotarget.12840.
8. Ciccarelli, E.; Razzore, P.; Gaia, D.; Todaro, C.; Longo, A.; Forni, M.; Ghè, C.; Camanni, F.; Muccioli, G.; Faccani, G.; et al. Hyperprolactinaemia and Prolactin Binding in Benign Intracranial Tumours. *J. Neurosurg. Sci.* **2001**, *45*, 70–74.
9. Peng, F.; Liao, M.; Qin, R.; Zhu, S.; Peng, C.; Fu, L.; Chen, Y.; Han, B. Regulated Cell Death (RCD) in Cancer: Key Pathways and Targeted Therapies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 286, doi:10.1038/s41392-022-01110-y.

Capítulo 2.

PluriBAC: un sistema modular versátil basado en baculovirus para expresar genes heterólogos en diferentes plataformas biotecnológicas



Capítulo 2. PluriBAC: un sistema modular versátil basado en baculovirus para expresar genes heterólogos en diferentes plataformas biotecnológicas.

Introducción

Como se desarrolló en detalle en la Introducción General, la familia *Baculoviridae* está compuesta por virus específicos de insectos con un genoma a DNA circular doble hebra empaquetado dentro de una nucleocápside en forma de bastón para los que se han descubierto múltiples aplicaciones biotecnológicas.

El sistema de vectores de expresión de baculovirus (BEVS) se desarrolló a principios de la década de 1980. Originalmente, estos patógenos específicos de insectos eran atractivos debido a su utilidad como agentes de control biológico de plagas, sirviendo como una alternativa a los insecticidas químicos en la agroindustria. Sin embargo, con la exitosa producción de IFN- β humano recombinante [1], mediante el empleo de viriones genéticamente modificados derivados de *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) y células de lepidópteros, el BEVS se posicionó como una herramienta altamente versátil y poderosa en biotecnología. Hasta el día de hoy, miles de proteínas se han expresado en este sistema e incluso algunas de ellas se han comercializado [2].

Los baculovirus (BV) también pueden ingresar a células de mamíferos y entregar su DNA al núcleo [3]. La secuencia codificante para el gen de interés puede incluirse en el genoma viral bajo el control de un promotor adecuado reconocido por el organismo blanco [4]. Este proceso es conocido como transducción y puede realizarse en ensayos *in vitro* en cultivos celulares o en ensayos *in vivo* utilizando modelos de experimentación animal. De este modo, la inoculación con el BV recombinante resulta en la expresión de la proteína heteróloga dentro de diferentes tipos celulares [2]. Los BV son más seguros que otros vectores de transducción ya que no se replican en células de vertebrados y no se ha observado la integración de su DNA en el genoma de las células hospedadoras. Además, los humanos no poseen anticuerpos ni células T preexistentes específicas contra los BV, a diferencia de otros vectores de transducción que deben superar el obstáculo de la inmunidad de memoria [5]. Los BV han sido ampliamente modificados mediante ingeniería genética para facilitar la generación de viriones recombinantes. Aunque existen múltiples sistemas comerciales para la generación de BV recombinantes (recBV), la mayoría se basa en alguna de las siguientes dos estrategias: la primera involucra la recombinación homóloga en células de insecto entre un genoma

baculoviral modificado para ser capaz de replicar en *E. coli* (denominado b́acmido) que contiene toda la informaci3n gen3tica para la generaci3n de virus excepto por una delec3n en un gen esencial que le impide generar virus *wild type*, y un plásmido de transferencia con el GOI y la informaci3n necesaria para recombinar con el b́acmido y reconstituir así el gen esencial, permitiendo la replicaci3n del recBV en células de insecto [6,7]. La segunda estrategia involucra una transposici3n sitio específica basada en un vector de transferencia que contiene el GOI bajo el control de un promotor flanqueado por sitios Tn7 que permiten la transposici3n dentro de células *E. coli* DH10Bac, que contienen tanto el b́acmido, como un plásmido *helper* que codifica para la transposasa Tn7. Luego de la transposici3n en las células bacteriana, el b́acmido es purificado y transfectado en células de insecto para la generaci3n de los recBV [8].

El ensamblado por Golden Gate consiste en una estrategia de clonado basada en el uso de las enzimas de restricci3n de tipo IIS y el aprovechamiento de su actividad enzimática que produce un corte en el DNA por fuera de su sitio de reconocimiento. Este enfoque puede ser explotado para obtener secuencias complementarias específicas de 4 pb después de la digesti3n, lo que permite el ensamblado simultáneo de múltiples fragmentos en un vector de destino en un solo paso de restricci3n-ligaci3n [9].

En los últimos años, este método de clonado se ha utilizado para desarrollar diferentes sistemas que permiten la obtenci3n de construcciones multigénicas aplicables en diversos organismos, como plantas [10,11], hongos [12] o levaduras [13,14].

Al momento de dar comienzo a este trabajo de tesis doctoral no existía ningún sistema de producci3n de recBV basado en Golden Gate que permitiese clonar de manera simultánea múltiples genes en el genoma baculoviral, por lo que nos planteamos el desafío de diseñarlo y desarrollarlo. En el año 2021, Neuhold y sus colegas desarrollaron un sistema basado en Golden Gate, denominado GoldenBac, para construir dos conjuntos de vectores que expresan hasta 15 *cassettes* de expresi3n génica en BV [15].

En este capítulo, se describe un sistema versátil y rápido basado en el método de clonado por Golden Gate para expresar genes heterólogos en BV. El sistema PluriBAC se probó en diversas plataformas biotecnológicas con resultados exitosos. Finalmente, presentamos una comparaci3n entre PluriBAC y otros sistemas basados en Golden Gate, centrándonos en los métodos actuales aplicados en BV. El sistema PluriBAC se destaca como el método pionero basado en Golden Gate para generar recBV con la versatilidad requerida para adaptarse a diversas plataformas tecnológicas y distintos campos dentro de la biotecnología.

Objetivo general

Diseño de un sistema de plásmidos modulares con el fin de obtener una plataforma para la generación de vectores baculovirales con la capacidad de expresar múltiples genes de interés.

Objetivos específicos

1. Diseño *in silico* de los vectores correspondientes a los diferentes niveles (sistema PluriBAC) y verificación de los ensamblados utilizando herramientas bioinformáticas.
2. Obtención de baculovirus recombinantes (recBV) reporteros utilizando el sistema PluriBAC.
3. Verificación de la infectividad y la capacidad transductora de los recBV derivados del sistema PluriBAC en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Resultados

Descripción del sistema PluriBAC

Los distintos vectores que constituyen el sistema PluriBAC (figura 2.1) se diseñaron sobre la base de la estrategia de clonado por Golden Gate que permite el ensamblado de múltiples fragmentos en un mismo vector de destino, de manera simultánea. Este sistema aprovecha la propiedad de las enzimas de restricción tipo IIS que digieren el DNA por fuera del sitio de reconocimiento produciendo secuencias extendidas simple cadena y permite construir plásmidos recombinantes sin “cicatrices” provenientes de las etapas previas de clonado. El diseño consiste en tres niveles distintos relacionados con la complejidad y posibilidades de combinación de módulos, es decir, diferentes alternativas de secuencias promotoras, terminadoras y de genes de interés. Además, permite la generación de recBV tanto a partir del nivel 1 como del nivel 2.

1. **Nivel 0.** El nivel 0 consiste en fragmentos de DNA, obtenidos mediante reacciones de PCR, flanqueados por sitios de reconocimiento de la enzima de restricción IIS Esp3I y cohesivos de secuencia específica. Estos cohesivos pueden ser diseñados y elegidos racionalmente de modo tal de dirigir la incorporación de los productos de PCR de forma ordenada en el vector de destino del siguiente nivel luego de ser digeridos con la ER IIS. En líneas generales, para nuestro diseño, las secuencias promotoras se encuentran flanqueadas por los cohesivos “E” y “F” sumado a los sitios de restricción de la enzima Esp3I. A su vez, las secuencias cohesivas “F” y “G” flanquean a los genes de interés junto con los sitios de la enzima. De manera equivalente, las secuencias terminadoras (señales de poliadenilación) contienen a los cohesivos “G” y “H”.

2. **Nivel 1.** Los vectores de destino de nivel 1 contienen el marcador de selección negativa *ccdB*, para minimizar el ruido (número de clones no recombinantes) durante el proceso clonado, flanqueado por los sitios de restricción de la enzima Esp3I y los cohesivos de 4 pb “E” y “H” compatibles con los insertos provenientes del nivel 0. Estos vectores contienen, además, sitios de restricción para la enzima BsaI, necesarios para el salto al nivel 2, y un *cassette* de resistencia para el antibiótico ampicilina. Los plásmidos pGGL1 fueron numerados del I al IV dependiendo del cohesivo que acompañase al sitio de restricción de la enzima BsaI: el vector pGGL1 I posee los cohesivos “A” y “B”, el vector pGGL1 II los cohesivos “B” y “C”, el pGGL1 III los “C” y “D”. Por su parte, el vector pGGL1 IV fue diseñado para contener los sitios de BsaI con las secuencias “C” y “D” para aumentar la versatilidad del sistema permitiendo el paso al nivel 2 con sólo dos módulos.
3. **Nivel 2.** El vector aceptor del nivel 2, denominado pGGL2Bac, posee el marcador de selección *ccdB* flanqueado por sitios de restricción BsaI y los cohesivos “A” y “D” compatibles con los módulos provenientes del nivel 1, además del *cassette* de resistencia a kanamicina. Por otro lado, dicho vector contiene las secuencias requeridas para que ocurra la recombinación homóloga necesaria para la producción de recBV mediante el sistema bapGOZA (figura 2.1).

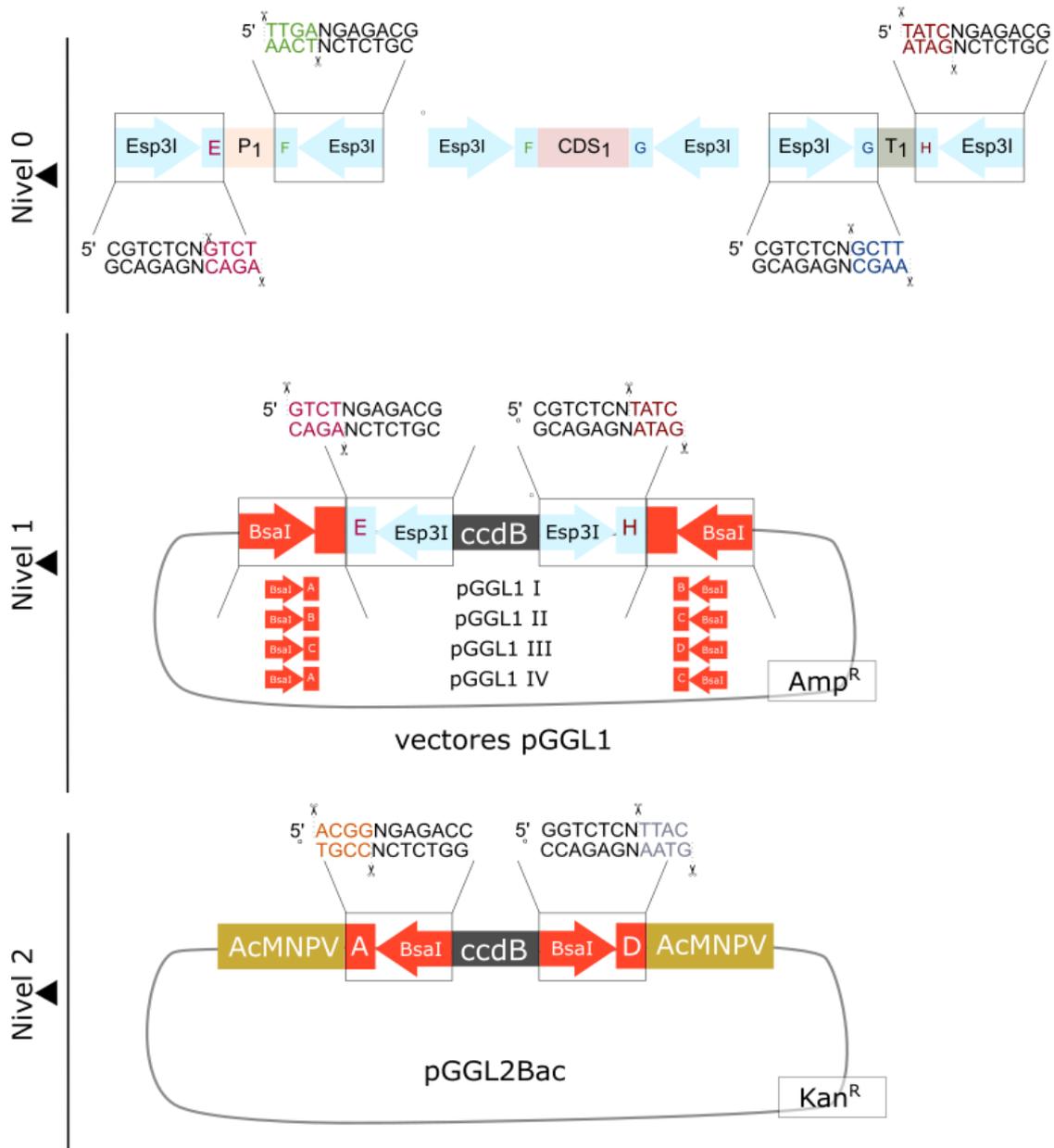


Figura 2.1. Un esquema detallado de los módulos y vectores que se utilizan en los tres niveles del sistema. Los insertos amplificados por PCR que contienen sitios de restricción Esp3I y sobres específicos se ensamblan en vectores aceptores del nivel 1 (pGGL1 I-IV) en una reacción de Golden Gate. Los vectores de nivel 1 resultantes contienen los *cassettes* de expresión flanqueados por sitios de restricción BsaI y cohesivos específicos en una estrategia que permite el ensamblado ordenado de todos los fragmentos en el vectorceptor final del nivel 2 (pGGL2Bac) en una reacción que involucra la enzima de restricción BsaI.

En la práctica, luego de una reacción de Golden Gate utilizando la enzima de restricción Esp3I, los insertos del nivel 0 contendrán cohesivos de simple hebra compatibles con los vectores del nivel 1 (“E” y “H”). Como consecuencia, serán ensamblados de forma ordenada para conformar los *cassettes* de expresión en los vectores de destino del nivel 1. De manera similar, el clivaje de los vectores resultantes del nivel 1 con la enzima BsaI permitirá su ensamblado ordenado en el

vector final pGGL2Bac (con cohesivos “A” y “D”), obteniendo así el vector dador necesario para la generación de recBV mediante la doble recombinación homóloga en células de insecto (figura 2.2).

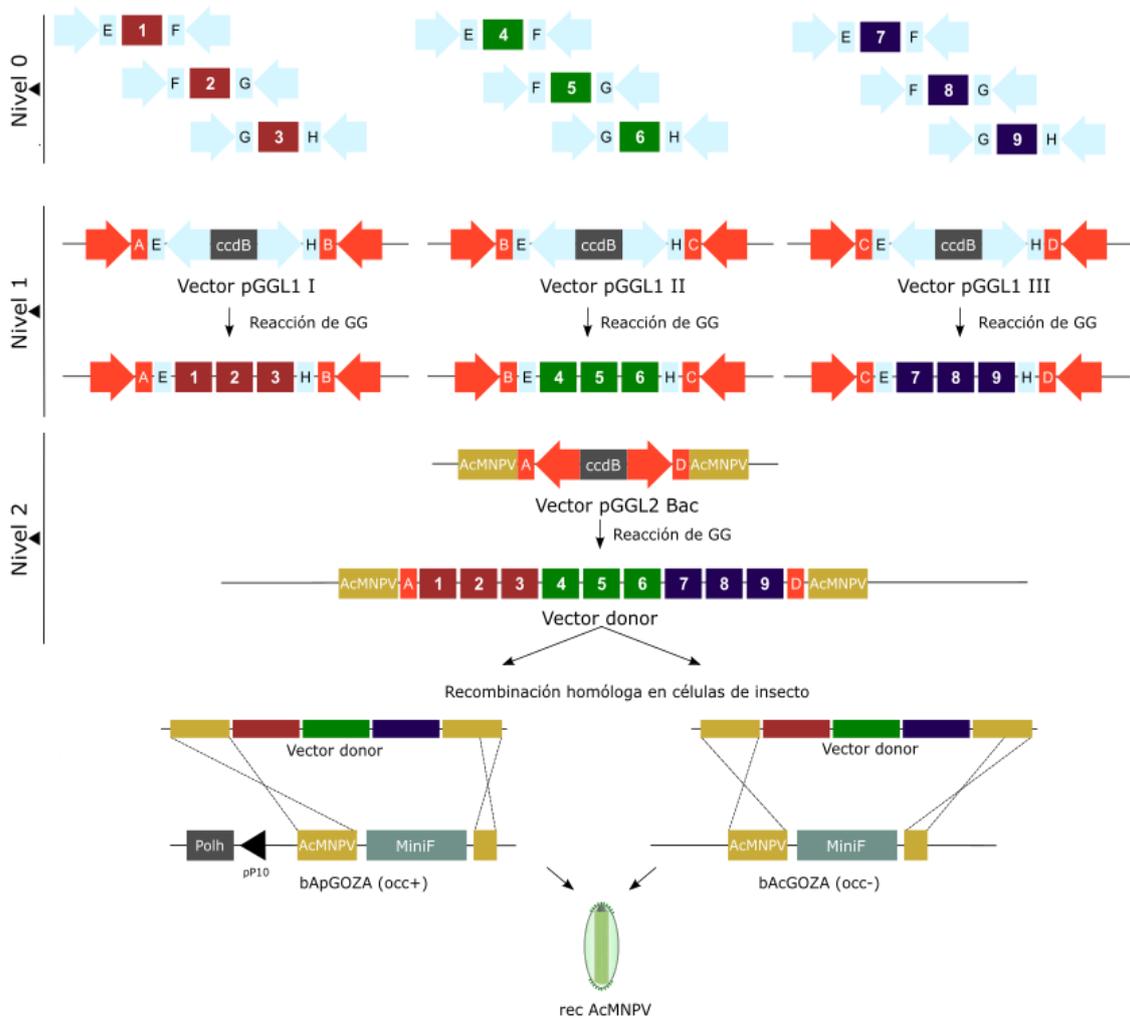


Figura 2.2. Flujo de trabajo hipotético que describe la generación de recAcMNPV mediante recombinación homóloga (HR) entre vectores de transferencia PluriBAC y el báculo *occ+* bApGOZA o el báculo *occ-* bAcGOZA, desde el nivel 0 hasta el nivel 2, pasando por el nivel 1, donde el AcMNPV en el cuadro amarillo representa la secuencia requerida para el rescate de recBV por HR. En este caso se incorporan en el genoma viral tres *cassettes* diferentes (rojo, verde y azul), cada uno de ellos preensamblado a partir de tres módulos independientes en vectores de nivel 1.

Aunque el sistema está planteado para obtener la construcción final haciendo uso de tres niveles, del 0 al 2, la versatilidad de la plataforma permite el clonado directo del nivel 0 al nivel 2 (sin pasar por el nivel 1) y la generación de recBV a partir del nivel 1 si se incluyen en el vector o en los bloques de insertos secuencias específicas que permitan su incorporación al genoma viral. Así, utilizando elementos del sistema Bac-to-Bac es posible obtener recBV sin la necesidad de

llegar al vector de nivel 2. Para ello, se diseñó un vector de nivel 1 que contiene las secuencias necesarias para que ocurra la transposición sitio específica en las bacterias DH10bac y la generación del b́acmido recombinante que luego podŕa ser transfectado en ćelulas de insecto para dar lugar a la producci3n de recAcMNPV (figura 2.3).

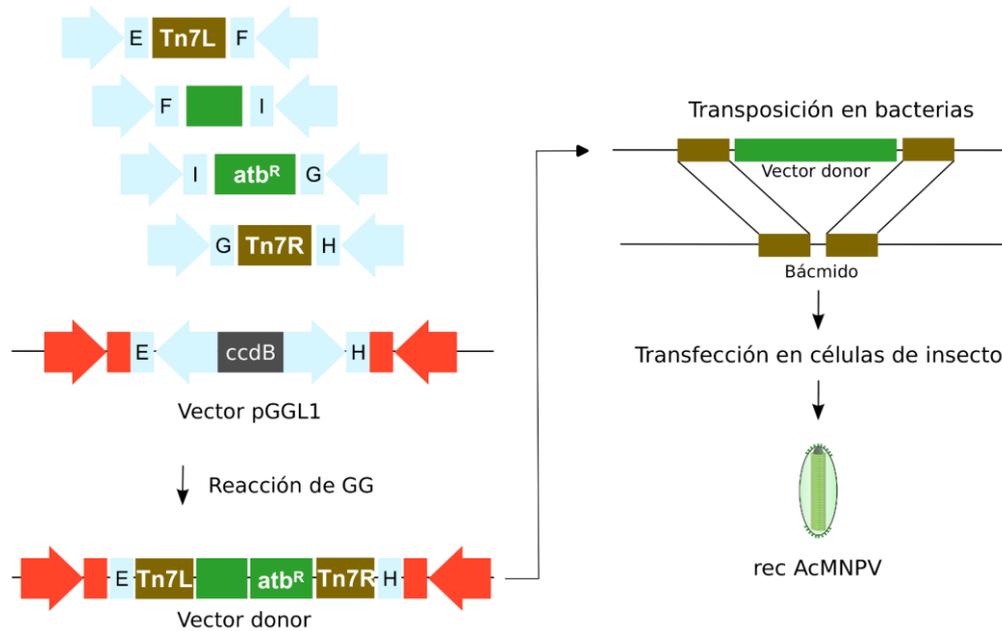


Figura 2.3. Generaci3n de un recBV usando la estrategia Bac-to-Bac, a partir de un vector donador obtenido mediante el sistema PluriBAC.

Finalmente, las diez secuencias cohesivas de 4 pb espećicamente dise~nadas fueron nombradas con las letras de la "A" a la "I". Los rect́angulos de color en los esquemas de las figuras 2.1 y 2.2 representan las secuencias de los cohesivos que se encuentran detalladas en la siguiente tabla:

Cohesivo	Secuencia
A	TGCC
B	AAGG
C	ACTA
D	TTAC
E	CAGA
F	AACT

Cohesivo	Secuencia
A	TGCC
G	CGAA
H	ATAG
I	GCAG
J	CGTC

Tabla 2.1. Listado de las secuencias cohesivas utilizadas en el sistema PluriBAC. En rosa se señalan aquellas secuencias utilizadas en el nivel 2, mientras que en celeste se señalan los cohesivos del nivel 1. Los cohesivos I y J pueden ser utilizados para ambos niveles.

Una vez diseñados los vectores y las secuencias de los cohesivos a utilizar, se realizaron diferentes pruebas *in silico* utilizando la herramienta informática Benchling que permite emular ensamblados de Golden Gate y detecta posibles errores. Habiéndose verificado la funcionalidad del sistema se procedió a sintetizar cada uno de los vectores de nivel 1 y de nivel 2 utilizando como base los plásmidos de clonado pUC57-mini y puC57-Km contratando a la empresa GenScript.

Obtención de AcMNPV recombinantes y verificación de infectividad y capacidad transductora.

Con el fin de desafiar por primera vez al sistema PluriBAC y poner a punto los diferentes parámetros metodológicos inherentes al ensamblado modular, nos propusimos obtener una serie de recBV que expresen genes reporteros. Estos virus reporteros a su vez resultan de utilidad para verificar que los recBV derivados del sistema PluriBAC mantienen su capacidad infectiva y transductora, necesarias para la propagación, así como para las múltiples aplicaciones biotecnológicas propias de los BV.

El AcMNPV derivado del sistema PluriBAC pudo llevar a cabo la infección por vía oral en las larvas.

Para verificar que la capacidad infectiva del recAcMNPV derivado de PluriBAC no se vio afectada, se generó un recBV que codifica para la proteína reportera dTomato bajo el control del promotor IE-1 de CMV y la señal de poliadenilación de SV40. El cassette fue amplificado mediante PCR para luego ser ensamblado en el vector final de nivel 2, pGGL2Bac y generar el vector de transferencia pGGL2Bac-CMV-dTomato-SV40 (figura 2.4).

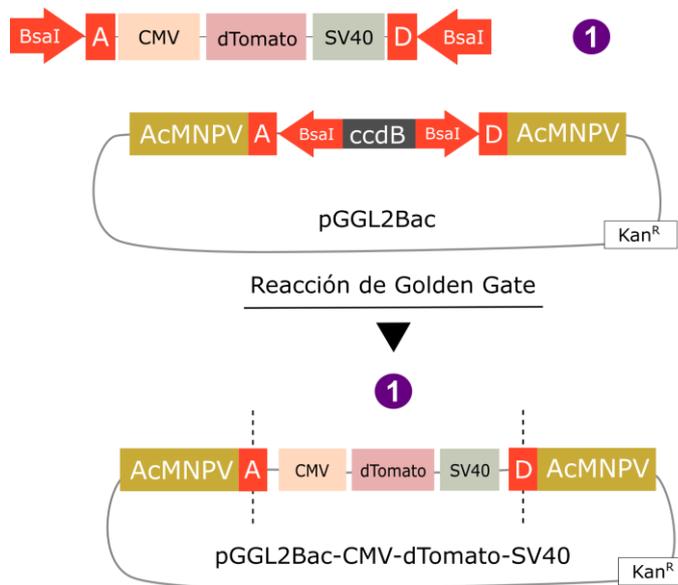


Figura 2.4. Representación de la obtención del vector de transferencia final pGGL2Bac-CMV-dTomato-SV40 para generar el recAcMNPV. CMV representa el promotor del gen inmediato temprano 1 del citomegalovirus (promotor CMV-IE1) y SV40 se refiere a la señal de poliadenilación del virus simio 40 (SV40 polyA).

El *screening* de la inserción del fragmento se realizó mediante PCR (figura 2.5A) y fue posteriormente confirmada por secuenciación de Sanger. El éxito en la generación del recAcMNPV se evidenció mediante microscopía de epifluorescencia en células High Five™ co-transfectadas con el vector de transferencia (figura 2.5B), comprobándose a su vez la infectividad del virus recombinante en cultivo celular.

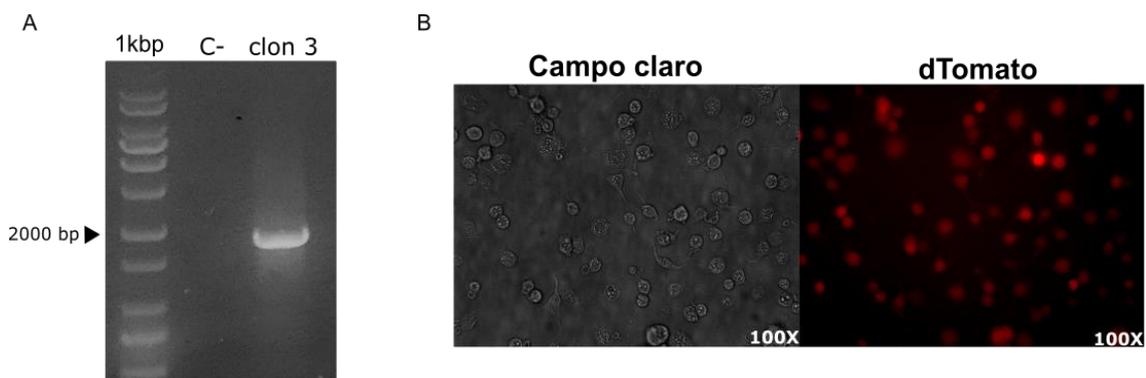


Figura 2.5. (A) *Screening* mediante PCR del inserto CMV+dTomato+SV40 (1650 pb) (B) Células de insecto High Five™ infectadas con el recAcMNPV obtenido, observadas mediante microscopía de epifluorescencia.

Finalmente, nos propusimos infectar larvas de *Spodoptera frugiperda* por vía oral. Para ello, se infectaron células High Five™ con el recAcMNPV y 7 días después de la infección, los cuerpos de oclusión (OB) obtenidos fueron purificados a partir del cultivo celular utilizando el método descrito previamente. Las larvas de tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* fueron infectadas por vía oral con 3×10^8 OB/ml de recAcMNPV que codifica para la proteína reportera dTomato, utilizando una dieta contaminada con los cuerpos de oclusión recombinantes. Cuatro días después, las larvas infectadas y no infectadas fueron observadas mediante microscopía de epifluorescencia. La expresión de dTomato sólo se observó en larvas con signos aparentes de infección por el recBV (figura 2.6).

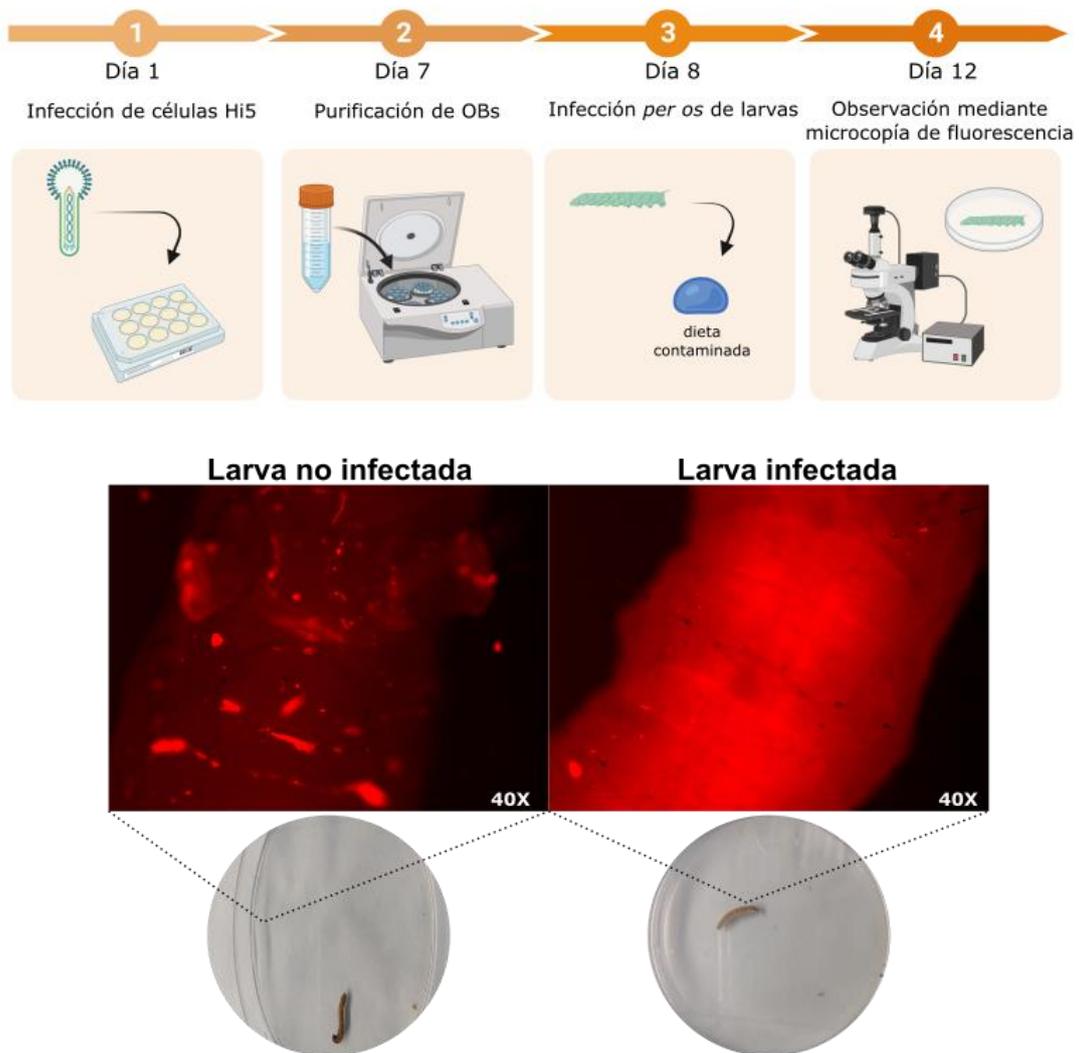


Figura 2.6. Protocolo experimental (creado con BioRender.com) y microscopía de epifluorescencia de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas y no infectadas con el recAcMNPV generado mediante el sistema PluriBAC.

El recAcMNPV derivado de PluriBAC transduce eficientemente células del Sistema Nervioso Central (SNC) tanto in vitro como in vivo.

Para evaluar si los recAcMNPV derivados de PluriBAC conservan su capacidad para transducir células de mamífero, generamos un recBV que codifica para la proteína verde fluorescente citrine bajo el control del promotor IE-1 de CMV y la señal de poliadenilación de SV40.

El cassette fue amplificado mediante PCR utilizando una polimerasa de alta procesividad, y luego fue ensamblado en el vector pGGL2Bac (figura 2.7).

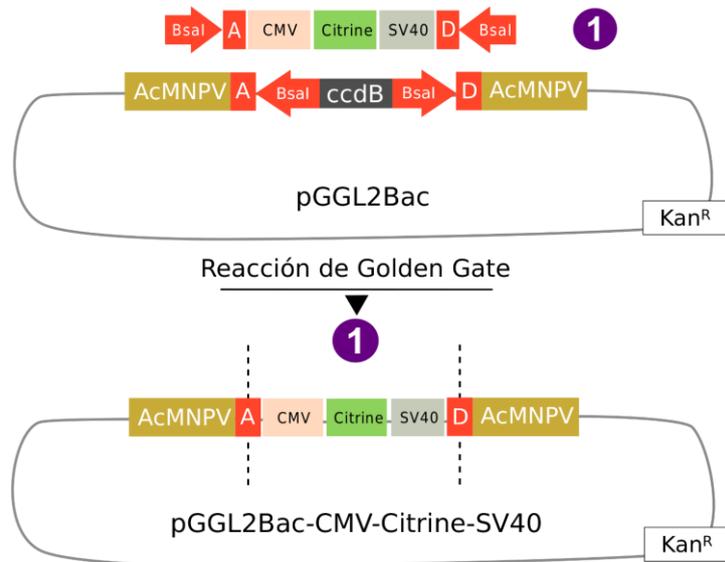


Figura 2.7. Representación de la obtención del vector de transferencia final pGGL2Bac-CMV-citrine-SV40 para generar el recAcMNPV. CMV representa el promotor del gen inmediato temprano 1 del citomegalovirus (promotor CMV-IE1) y SV40 se refiere a la señal de poliadenilación del virus simio 40 (SV40 polyA). AcMNPV hace referencia a la secuencia requerida para la obtención de recBV por HR.

La confirmación de la inserción del fragmento se realizó mediante PCR (figura 2.8A) y secuenciación de Sanger. La figura 2.8B muestra micrografías de células Hi5 cotransfectadas con el báculo bapGOZA y el plásmido de transferencia pGGL2-CMV-citrine-SV40. La fotografía superior muestra la aparición de poliedros, signo característico de infección tardía y la fotografía inferior muestra la expresión del gen reportero citrine.

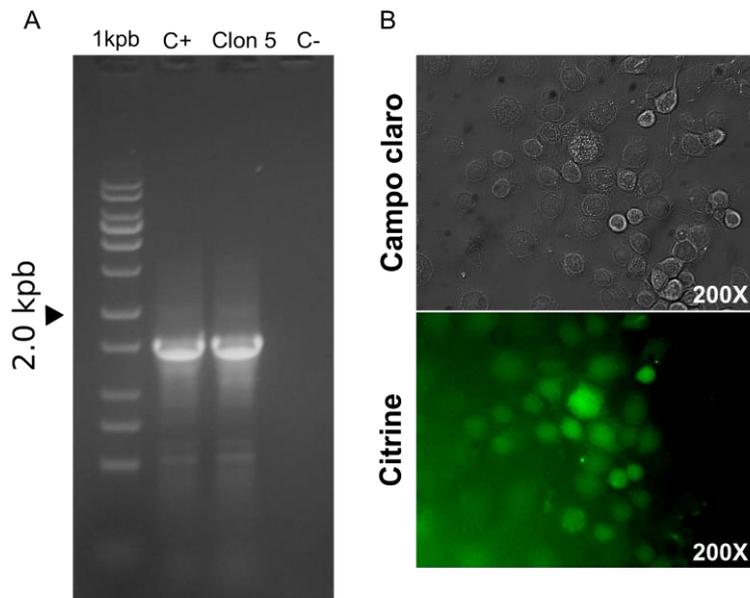


Figura 2.8. (A) *Screening* mediante PCR del inserto CMV-citrine-SV40 (1485 pb) **(B)** Células de insecto High Five™ infectadas con el recAcMNPV obtenido, observadas mediante microscopía de epifluorescencia.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de transducción del recAcMNPV obtenido, realizamos dos abordajes diferentes. En primer lugar, realizamos ensayos *in vitro* utilizando tanto células astrocíticas de ratón como células de GBM derivadas de pacientes. Para ello, partimos de una placa de cultivo con células de cerebro al 60% de confluencia que fueron tratadas con el recBV a una multiplicidad de 750. 48 hs post-transducción las células fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia. Un resumen del protocolo llevado a cabo se esquematiza en la figura 2.9, panel A. Los resultados demostraron que el recAcMNPV derivado de PluriBAC fue capaz de transducir eficientemente ambos tipos celulares a una multiplicidad de 750, evidenciándose al observar una expresión robusta de citrine (figura 2.9B). Cabe destacar que, por razones prácticas, se utiliza la palabra “multiplicidad” aquí para indicar el número de partículas virales infectivas (UFP) por célula, independientemente del hecho de que no se produce un ciclo infeccioso de BV en células de mamíferos.

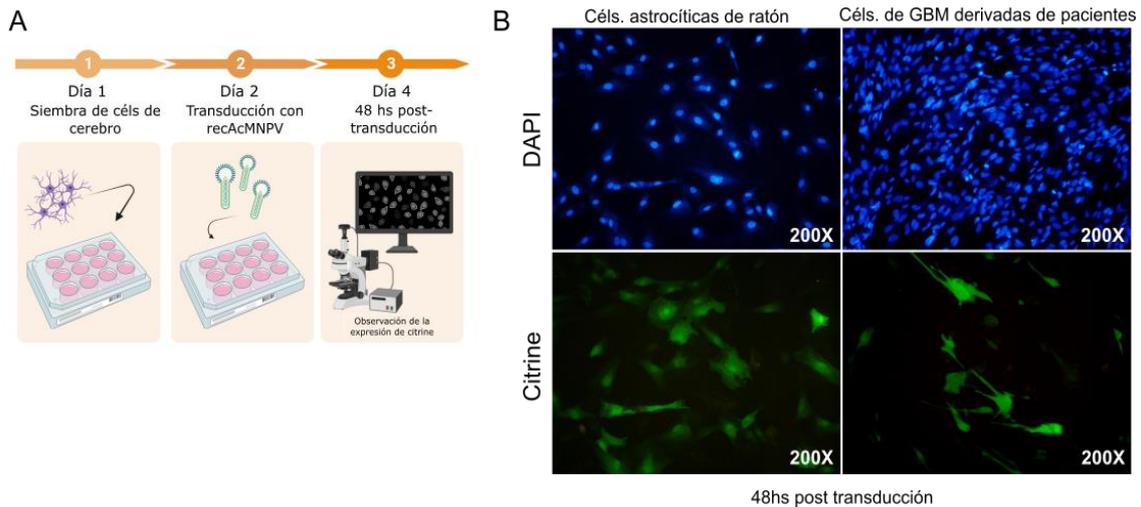


Figura 2.9. (A) Protocolo experimental (creado con BioRender.com) (B) Microscopía de epifluorescencia de astrocitos de ratón y células de GBM derivadas de pacientes transducidas con recBV en una multiplicidad de 750 UFP/célula. La expresión de citrine se observó 48 horas después de la transducción.

En segundo lugar, evaluamos la capacidad del recAcMNPV generado para transducir células del SNC *in vivo*. Para ello, desarrollamos dos enfoques experimentales utilizando modelos animales.

Por un lado, se inyectaron 5×10^8 UFP del recAcMNPV utilizando cirugía estereotáctica en cerebros de ratones *naïve*. Siete días después de la inyección, se observó la expresión del gen reportero en cortes realizados con micrótopo (figura 2.10). La figura 2.10A muestra el esquema de inoculación desarrollado mientras que la figura 2.10B muestra microfotografías de cortes de cerebros 7 días post-inoculación, observándose una efectiva expresión del transgén Citrine en astrocitos normales de ratón.

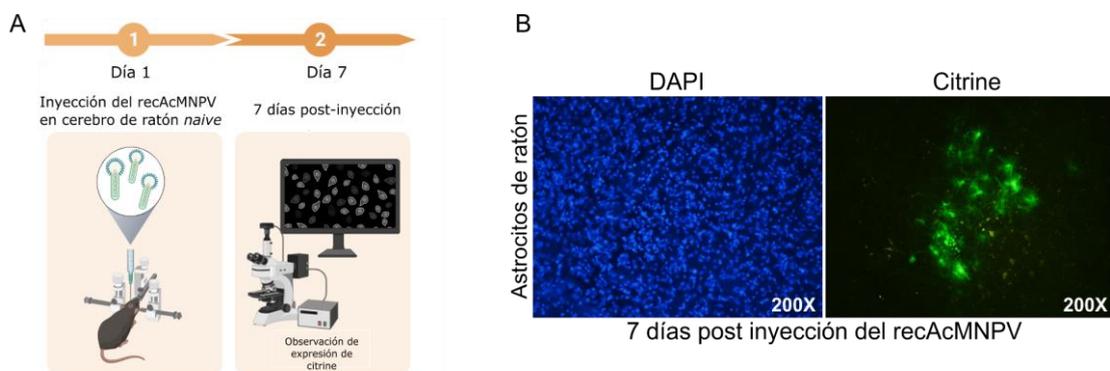


Figura 2.10. (A) Protocolo experimental (creado con BioRender.com) del ensayo *in vivo* (B) Observación de la expresión de citrine en astrocitos normales de ratón. Los ratones C57BU6 fueron inoculados en el estriado derecho con BV (5×10^8 UFP). Después de 7 días, se evaluó la expresión de la proteína reportera citrine (verde) con microscopía de fluorescencia. Se utilizó DAPI para la tinción nuclear.

Finalmente, evaluamos la capacidad de transducción del recAcMNPV obtenido en astrocitos neoplásicos de ratón. Para llevar adelante dicho objetivo, se inocularon ratones con neuroesferas de GBM de ratón utilizando cirugía estereotáctica. Después de 21 días de crecimiento tumoral, tratamos a los ratones con el recAcMNPV, como se describió anteriormente [16]. En la figura 2.11A se muestra de forma detallada el esquema de trabajo empleado en este ensayo *in vivo*. Mediante microscopía de fluorescencia sobre cortes de cerebro pudimos observar que el recAcMNPV derivado de PluriBAC que codifica para la proteína reportera Citrine pudo transducir eficientemente astrocitos neoplásicos de ratón 7 días después de la inyección (figura 2.11B).

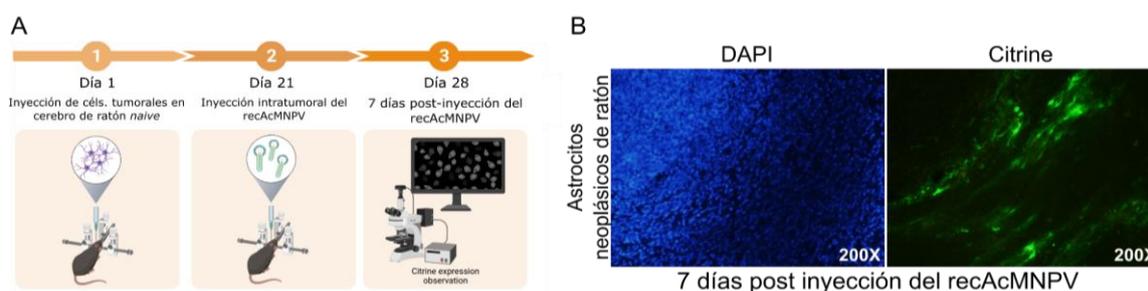


Figura 2.11. (A) Protocolo experimental (creado con BioRender.com) del ensayo *in vivo* **(B)** Observación de la expresión de citrine en astrocitos neoplásicos de ratón. Se inoculó a los ratones C57Bl/6 con neuroesferas de glioma de ratón (NS) en el cerebro; 3 semanas después, los tumores fueron inyectados con el recAcMNPV (5×10^8 UFP) y los ratones fueron sacrificados después de 7 días. La expresión de la proteína reportera citrina (verde) en el tumor se evaluó con microscopía de fluorescencia. Se utilizó DAPI para la tinción nuclear.

Ensamblado de múltiples insertos en el sistema de expresión Bac-to-Bac™

El sistema de generación de recBV Bac-to-Bac™ (Thermofisher) permite a los usuarios construir vectores recAcMNPV mediante transposición en bacterias. Brevemente, la recombinación sitio-específica ocurre entre las secuencias Tn7L y Tn7R de un vector de transferencia y regiones específicas del báculo bMON14272, utilizando una transposasa presente en un plásmido *helper* en la cepa DH10Bac™.

Para poder adaptar nuestro sistema de ensamblado modular al sistema Bac-to-Bac™, construimos un vector pGGL1 flanqueado por las secuencias Tn7R y Tn7L para obtener el recAcMNPV mediante transposición en bacterias. También incluimos un gen de resistencia a la espectinomicina para la selección de recombinantes, una secuencia genérica de relleno o *adapter*, el gen reportero citrine bajo el control del promotor CMV-IE-1 y la señal de poliadenilación de SV40 (figura 2.12).

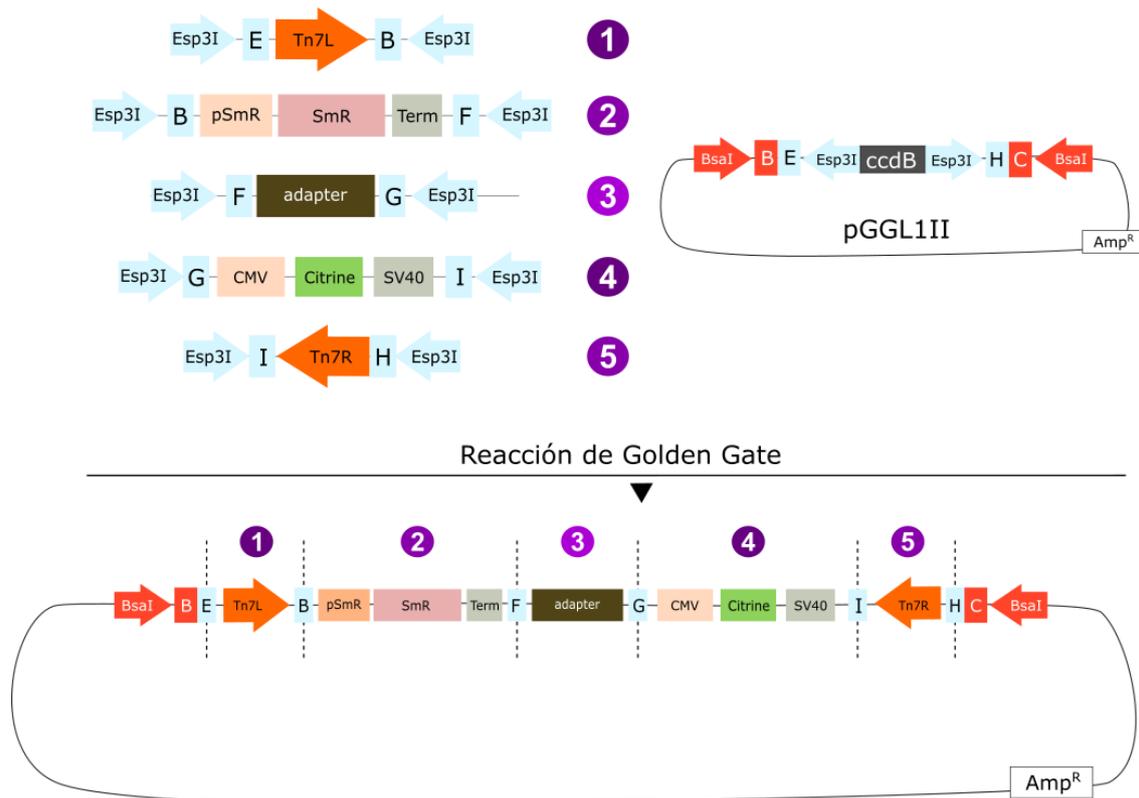


Figura 2.12. El vector de transferencia final obtenido para generar el recAcMNPV con el sistema de expresión Bac-to-Bac™. Tn7L y Tn7R: sitios de transposición, pSpect: promotor de resistencia a espectinomicina, Spect R: resistencia a espectinomicina, pSfU6: promotor del pequeño nucleolar U6 de *Spodoptera frugiperda*, ncRNA: RNA no codificante sintético, CMV: promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus (CMV-IE1), SV40: señal de poliadenilación del virus simio 40.

Los insertos fueron amplificados por PCR utilizando *primers* específicos que contenían sitios de restricción Esp3I y los cohesivos indicados en la figura 2.12. Después del ensamblado de Golden Gate, se transformaron células *E. coli* DH5a electrocompetentes que posteriormente fueron sembradas en medio LB con ampicilina, espectinomicina y tetraciclina. Los insertos fueron *screeneados* por PCR, con excepción del caso de la resistencia a espectinomicina que fue evidenciada con la supervivencia a la presión de selección del antibiótico. La mayoría de los clones seleccionados contenían todos los fragmentos, como se puede apreciar en la figura 2.13. La identidad de los fragmentos fue verificada por secuenciación de Sanger.

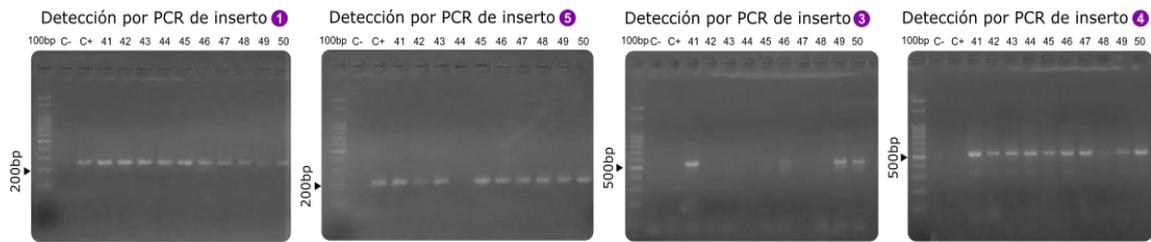


Figura 2.13. Detección por PCR de los múltiples insertos. Inserto 1: Tn7R (260 pb), inserto 3: adapter (520 pb), inserto 4: CMV (507 pb), inserto 5: Tn7L (211 pb). La resistencia a espectinomicina y su promotor fueron *screeneados* utilizando el antibiótico para la selección clonal.

Una vez obtenido el vector de transferencia, las células electrocompetentes de *E. coli* DH10Bac™ fueron transformadas y cultivadas en medio LB con kanamicina, espectinomicina y tetraciclina, y X-gal e IPTG para la selección blanco/azul.

Se seleccionaron colonias blancas y se extrajo el b́acmido recombinante siguiendo las indicaciones del fabricante. La integridad del DNA del b́acmido recombinante fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0.6% teñido con bromuro de etidio. Luego, se transfectaron células de insecto Sf9 con el b́acmido recombinante. La generación de recAcMNPV fue monitoreada por microscopía de epifluorescencia buscando la expresión del gen reportero citrine (figura 2.14).

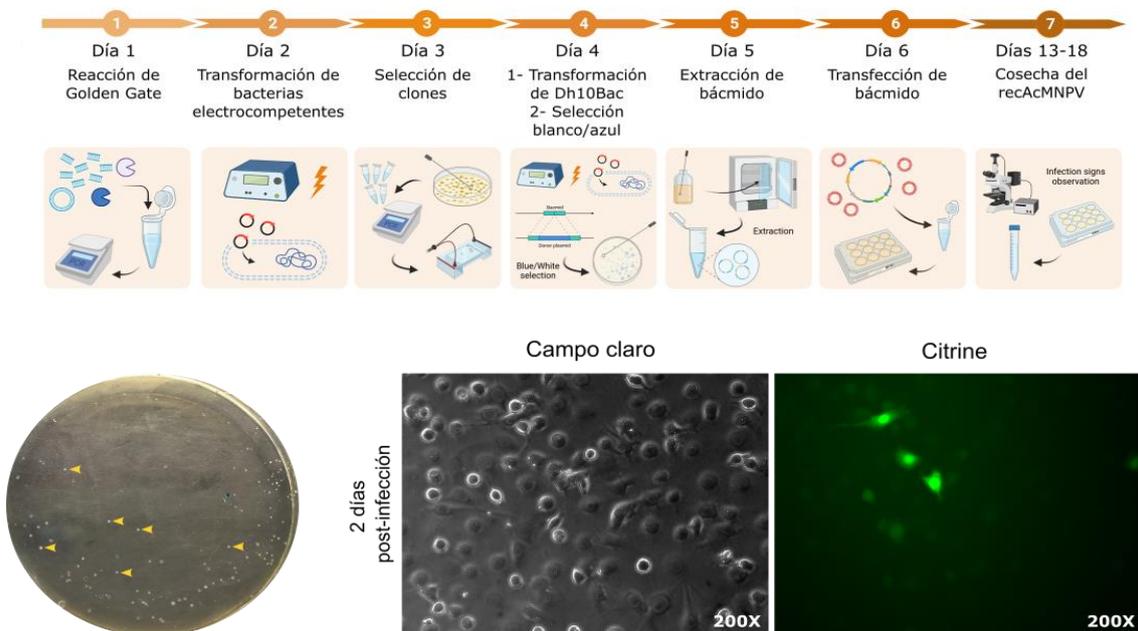


Figura 2.14. Protocolo experimental (creado con BioRender.com) para la generación de recAcMNPV utilizando el sistema Bac-to-Bac™. Selección blanco/azul en células de *E. coli* DH10Bac™ y microscopía de epifluorescencia de células High Five™ infectadas con el recAcMNPV. Las flechas amarillas señalan algunas de las colonias blancas obtenidas.

Diseño y obtención de un baculovirus AcMNPV triple reportero

Paralelamente, nos planteamos el objetivo de obtener un recBV que funcionara como triple reportero, desafiando al sistema PluriBAC mediante el ensamblado de un mayor número de insertos. Dicho baculovirus expresaría el *cassette* para la expresión de la proteína fluorescente mitoTurquoise, para marcar mitocondrias, el *cassette* de la proteína roja dTomato con localización citoplasmática y para la proteína GFP fusionada a la glicoproteína G de VSV, direccionada a la membrana plasmática.

En primer lugar, se diseñaron *primers* específicos que permitieron obtener los bloques flanqueados con los sitios de la enzima BsaI para ser clonados directamente al vector de nivel 2, pGGL2Bac (figura 2.15).

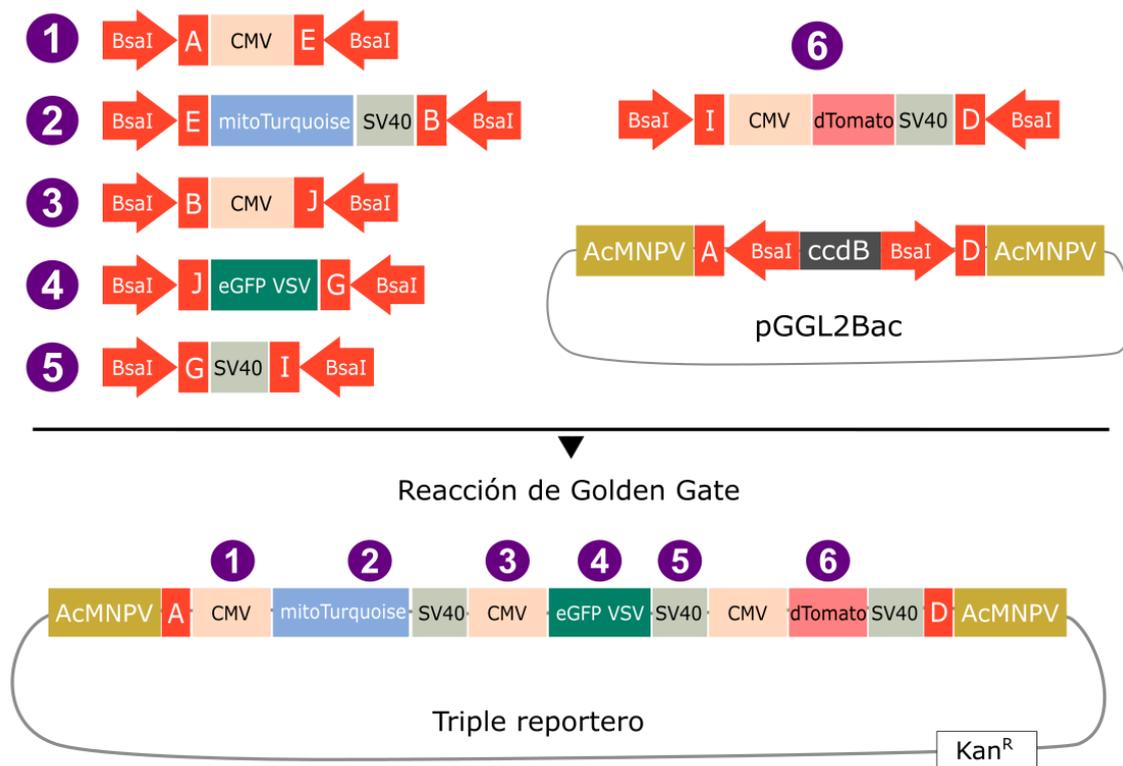


Figura 2.15. Esquema de obtención del vector de transferencia final obtenido para generar el recAcMNPV triple reportero. CMV: promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus (CMV-IE1), SV40: señal de poliadenilación del virus simio 40. AcMNPV: secuencia necesaria para la generación del recBV por HR.

Los seis fragmentos indicados en la figura 2.15 fueron obtenidos por PCR de manera exitosa y se realizó con ellos una mezcla de ensamblado por Golden Gate, del mismo modo que se realizaron los ensamblados anteriores. Sin embargo, observamos una eficiencia notablemente más baja en la obtención de transformantes y, durante el *screening* y la posterior secuenciación, confirmamos que el único clon que parecía ser positivo, en realidad sólo poseía el *cassette* para

la expresión de la proteína mitoTurquoise, es decir, que habían sido “expulsados” los otros dos *cassettes*. A partir de este resultado, que se repitió en otros ensamblados, y el análisis exhaustivo de los cohesivos utilizados para este diseño experimental, concluimos que la expulsión de los demás *cassettes* podría deberse a la similitud entre los cohesivos B y D. Esta similitud de secuencia podría favorecer la inserción de sólo uno de los *cassettes* mediante la ligación del cohesivo B presente en el inserto al cohesivo D del vector pGGL2Bac en lugar de hacerlo con su contraparte en el inserto siguiente. Parte del *screening* llevado a cabo se observa en la figura 2.16.

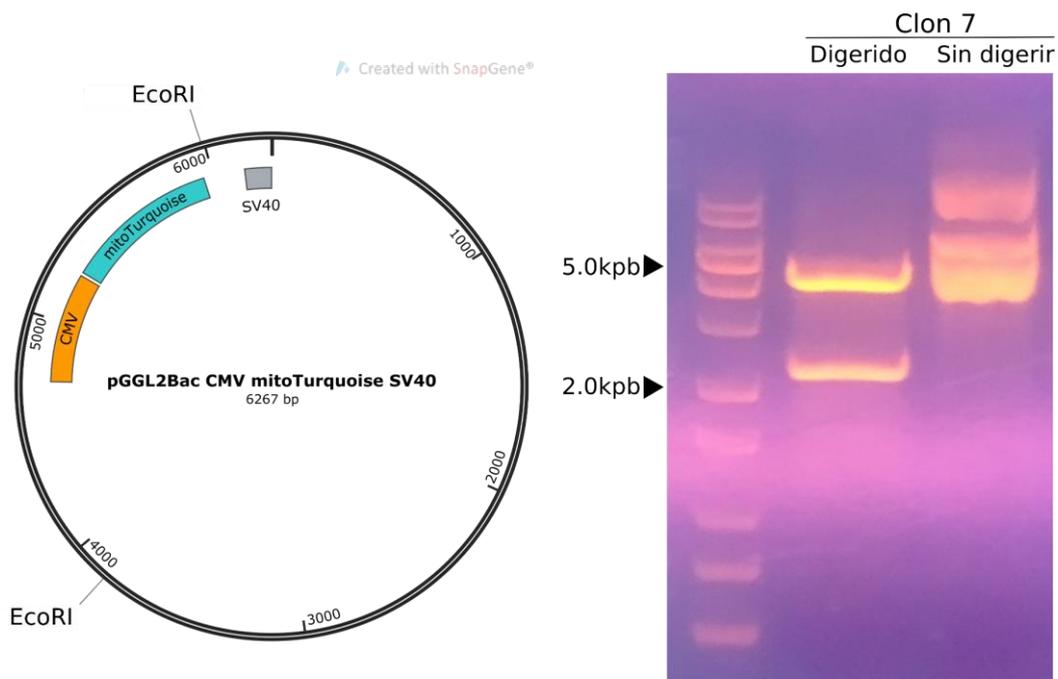


Figura 2.16. (A) Esquema del vector pGGL2Bac CMV mitoTurquoise SV40 con los sitios de restricción de la enzima EcoRI (B) Gel de electroforesis donde se observan los productos del tamaño esperado luego de la digestión del vector obtenido con la ER EcoRI.

Para intentar solucionar este problema, buscamos desfavorecer la inserción del *cassette* de mitoTurquoise por encima del resto. Para ello, en un principio probamos poniendo mayor cantidad de los *cassettes* de GFP y de dTomato en la mezcla de reacción. Sin embargo, no obtuvimos resultados positivos.

En una segunda instancia, nos propusimos realizar un ensamblado secuencial, es decir, incorporando a la mezcla de reacción primero bloques de las proteínas reporteras dTomato y GFP, y 15 ciclos más tarde, los insertos correspondientes a mitoTurquoise. En este caso tampoco obtuvimos resultados positivos.

Discusión

Desde la década de 1980, el sistema de vectores de expresión de baculovirus (BEVS) se ha convertido en una herramienta biotecnológica fundamental para la generación de proteínas recombinantes. La producción de grandes cantidades de proteína es posible gracias a la inserción del gen heterólogo (o serie de genes) bajo el control de un promotor viral muy tardío, generalmente el promotor del gen poliedrina (*polh*). Esto desencadena una expresión elevada del gen de interés en las células de insectos infectadas con el recBV. Un beneficio adicional del BEVS radica en la capacidad de las células de insectos para facilitar la glicosilación y otras modificaciones post-traduccionales en la proteína heteróloga [17]. Actualmente, se utilizan las siguientes dos estrategias principales para la generación de recBV: una implica una transposición específica del sitio en *E. coli*, mientras que la otra se basa en la recombinación homóloga en células de insectos, como se mencionó anteriormente.

En los últimos años ha crecido la necesidad de generar constructos para la expresión de múltiples genes. Sin embargo, los métodos de clonado convencionales usualmente involucran varios pasos y pueden convertirse en un proceso tedioso. Por esta razón, se han estado desarrollando diferentes métodos para facilitar y agilizar este proceso, algunos de ellos involucran el uso de baculovirus. En 2004, Berger y sus colegas crearon el sistema MultiBac para generar un recBV que expresara complejos de proteínas compuestos por muchas subunidades, basándose en la tecnología Cre-loxP [18]. Muchos años después, se utilizó el sistema biGBac, que emplea la estrategia de clonado de Gibson y la inserción de secuencias de enlace específicas, para ensamblar hasta 25 genes en un vector de expresión baculoviral. Luego, se obtuvieron recBV utilizando el método de transposición Tn7 [19].

En busca de una mayor eficiencia y simplicidad en el ensamblado de múltiples genes, la importancia del clonado por Golden Gate ha ido creciendo en los últimos años, y se desarrollaron diferentes sistemas basados en esta tecnología. Por ejemplo, se diseñó un sistema modular, compuesto por tres niveles, para el ensamblado de múltiples unidades de transcripción en vectores receptores optimizados para la transformación de plantas [10]. Recientemente, Occhialini y colegas adaptaron esta estrategia para la ingeniería de cloroplastos en plantas [20]. Por otro lado, se utilizó un sistema basado en Golden Gate para la construcción de vectores de expresión policistronica en hojas de tabaco [11].

En 2021, se diseñó una estrategia basada en el método de clonado por Golden Gate con el objetivo de construir una biblioteca para el estudio de la violaceína, un compuesto terapéutico contra el cáncer, en *Yarrowia lipolytica*, una levadura

oleaginosa [21]. Utilizando un enfoque similar, se creó otro sistema para eliminar e insertar genes en diversos hongos [12].

Recientemente, se diseñó un método novedoso, denominado GoldenBac, basado en el clonado por Golden Gate que consiste en dos niveles secuenciales para el ensamblado de hasta 15 *cassettes* de expresión génica con alta eficiencia. Brevemente, el sistema GoldenBac consta de conjuntos de vectores de entrada, para la inserción de los genes de interés, que contienen un promotor de poliedrina y un terminador flanqueado por sitios de restricción BsaI. Después del clivaje, la liberación de *cassettes* de expresión con cohesivos específicos de 4 pb permite el ensamblaje ordenado de los módulos resultantes en vectores de destino del nivel 2, diseñado para permitir la generación de recBV mediante recombinación homóloga o transposición Tn7 [15].

Aquí presentamos un sistema versátil basado en el clonado por Golden Gate, designado como PluriBAC, eficiente para la generación rápida de recBV para una amplia gama de aplicaciones. Parte de la versatilidad del sistema PluriBAC radica en el hecho de que su diseño permite obtener vectores de transferencia compatibles con ambos sistemas que utilizan bÁcmidos basados en recombinación homóloga (*occ-* bAcGoza y *occ+* bApGoza), así como sistemas basados en transposición en bacterias (Bac-to-Bac™). La flexibilidad de poder elegir entre diferentes bÁcmidos es relevante en relación con la bioseguridad. Si es necesario utilizar algunos recAcMNPV fuera del entorno controlado del laboratorio, los virus *occ-* podrían generarse tanto por recombinación homóloga como por transposición. Similar es el caso de la presencia de resistencia a agentes microbianos en el genoma recAcMNPV. Los genomas recombinantes derivados de los bÁcmidos bAcGoza y bApGoza no contienen resistencia a antibióticos después de la recombinación, a diferencia del sistema Bac-to-Bac. Esto podría ser útil cuando las partículas virales en desarrollo de recAcMNPV se utilizan como vectores terapéuticos. Con esto en mente, se podría elegir el bÁcmido más apropiado en relación con el fenotipo de oclusión y la presencia o ausencia de resistencia a antibióticos según las necesidades y los estándares de bioseguridad requeridos en cada campo o aplicación.

A continuación, generamos un conjunto de recBV diferentes como ejemplos adecuados para ser probados en diversas plataformas biotecnológicas, incluidas células de insectos y mamíferos, así como larvas de insectos y ratones.

Primero, desarrollamos un recAcMNPV que codifica el gen reportero dTomato con el objetivo de explorar su capacidad para infectar larvas de lepidópteros. Realizamos una prueba piloto de infección en larvas del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, que se ha demostrado que son resistentes a la infección con AcMNPV, por lo que requieren altas dosis de este virus para ser infectadas [22].

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) es una plaga agrícola invasora que afecta gravemente a una variedad de cultivos y se distribuye naturalmente en las Américas. Estudios recientes también han descrito la presencia del gusano cogollero del maíz en África y Asia [23,24]. Mientras que los métodos de control tradicionales implican el uso de productos químicos o cultivos que expresan toxinas Bt [25], cada vez hay más casos de resistencia a las toxinas Bt y el impacto ambiental de los pesticidas químicos están impulsando el desarrollo de nuevas estrategias de control [26,27]. Se han realizado muchos esfuerzos para aprender más sobre la interacción entre esta plaga de lepidópteros y sus patógenos naturales con el objetivo final de desarrollar nuevas estrategias de biocontrol [27–30]. En consecuencia, un sistema de generación de recombinantes de AcMNPV versátil, como PluriBAC, es de particular interés para avanzar en el diseño de estas estrategias para probar conceptos de prueba de funcionalidad alternativos en larvas.

Aprovechando la capacidad transductora de los BV [2,4], nos propusimos probar recAcMNPV derivados del sistema PluriBAC en células de mamíferos tanto *in vitro* como *in vivo*, como una segunda plataforma tecnológica experimental. Para lograr este objetivo, diseñamos y construimos dos AcMNPV recombinantes que expresan proteínas reporteras Citrine y dTomato, respectivamente. Basándonos en nuestra experiencia previa en la transducción mediada por baculovirus de células de tumores pituitarios de rata [31], células de cáncer de ovario de rata y humano [32], y células de SNC de rata, ratón y humano [16,33] exploramos la capacidad de transducción de ambos recAcMNPV. Los recBV derivados de PluriBAC transducen eficientemente astrocitos murinos y células de GBM derivadas de pacientes *in vitro*. Además, los recAcMNPV demostraron tener capacidad transductora en astrocitos normales y neoplásicos *in vivo* en cerebro de ratones. El desarrollo de un sistema como PluriBAC, que permite la expresión de múltiples transgenes en diferentes organismos, permite un flujo de trabajo más eficiente para el diseño y producción de inmunógenos y vectores de terapia dirigida tanto para la salud humana como veterinaria.

Uno de los puntos distintivos de nuestro sistema en comparación con sistemas similares [12,15,18] es que ninguno de los vectores de nivel 1 o nivel 2 de PluriBAC contiene secuencias promotoras. Aunque esta ausencia podría parecer un problema, ya que es necesario amplificar por separado el promotor en cada ensamblado génico, en realidad resulta ser una de las fortalezas del sistema PluriBAC. El hecho de que el usuario pueda elegir el promotor para cada ensamblaje en particular permite un diseño de vectores virales personalizados según las necesidades requeridas.

Otra ventaja del sistema PluriBAC radica en su diseño. Como describimos a lo largo de este capítulo, PluriBAC es un sistema de tres niveles que permite el ensamblado

génico utilizando ambas enzimas de restricción tipo IIS, BsaI y Esp3I. Además, la mayoría de los cohesivos disponibles no se encuentran incluidos en los vectores PluriBAC y pueden ser elegidos en el diseño de los *primers* para las PCR de nivel 0. Todas estas características permiten al usuario ingresar al sistema PluriBAC por múltiples caminos y alternar el uso de la enzima de restricción tipo IIS según los requisitos de secuencia de los genes a clonar. Además, como demostramos en la sección “Resultados”, se pueden construir vectores de transferencia compatibles tanto para el sistema Bac-to-Bac™ como para sistemas basados en recombinación homóloga. Por otro lado, en la construcción presentada en la figura 2.12, se incluyeron múltiples productos génicos con funcionalidad biológica en diferentes organismos (resistencia a espectinomicina en bacterias y el gen reportero Citrine en células de insecto y mamífero). Esto sugiere que el sistema PluriBAC podría tener el potencial de ser utilizado en la generación de recAcMNPV que incorporen múltiples productos génicos que, a diferencia del recAcMNPV que generamos aquí, pueden expresarse simultáneamente.

La Tabla 2.2 resume las características más destacadas de PluriBAC. También presenta una comparación con el sistema GoldenBac reportado recientemente. GoldenBac y PluriBAC son los primeros sistemas basados en el ensamblado por Golden Gate diseñados para producir recBV. Mientras que GoldenBac fue desarrollado originalmente para la expresión de proteínas multiméricas en células de insectos, PluriBAC fue diseñado con el objetivo de tener un sistema de expresión génica versátil dirigido a múltiples campos de aplicación tecnológica. Sin embargo, esto no implica que los recBV derivados de cada sistema no puedan adaptarse para su aplicación en otros campos en el futuro. De esta manera, ambos sistemas son complementarios y contribuyen a la amplia caja de herramientas de la ingeniería genética de baculovirus.

Característica del sistema	PluriBAC	GoldenBac
Nro. de niveles	Tres	Dos
Recorrido entre los niveles	Múltiples	Único
	Variable	Lineal
Promotores presentes en los vectores	Ninguno	Poliedrina
Cohesivos diseñados en	<i>Primers</i>	Vectores
ER tipo IIS disponibles para	Dos	Una

usar		
Compatibilidad con sistema de generación de recBV	HR y Bac-to-Bac™	HR y Bac-to-Bac™
Aplicaciones biotecnológicas reportadas hasta el momento	Infección <i>per os</i> en larvas	Expresión de proteínas multiméricas
	Transducción <i>in vitro</i> de células normales y tumorales	
	Transducción <i>in vivo</i> de células normales y tumorales	

Tabla 2.2. Análisis comparativo de las principales características de los sistemas PluriBAC y GoldenBac. HR: recombinación homóloga

Las limitaciones exhibidas por nuestro sistema al ensamblar construcciones con insertos que incluían los cohesivos B y D y la no resolución de las mismas con las estrategias que discutimos en la última sección de este capítulo, nos plantean como perspectiva la necesidad de optimizar aquellos protocolos de ensamblado que incluyan productos de PCR o insertos previamente ensamblados en vectores de nivel 1 que contengan el cohesivo B en caso de que se desee utilizarlos para un ensamblado posterior. En última instancia, en caso de no hallar un protocolo que nos permita sortear esta dificultad, el cohesivo B podría ser reemplazado por otra secuencia que no presente similitud con el cohesivo D, necesario para el ensamblado en el vector pGGL2Bac.

A pesar de las múltiples ventajas del sistema PluriBAC y del ensamblado por Golden Gate en general, queda claro que el número de insertos que se pueden incluir en simultáneo (sin el paso previo por vectores de jerarquización) se ve limitado por el número de cohesivos lo suficientemente distintos que se puedan obtener con secuencias de sólo cuatro nucleótidos. Es por eso, que la etapa más crítica en la utilización de este y otros sistemas es el diseño *in silico* de los vectores y los oligonucleótidos que se vayan a utilizar para la obtención de la construcción final deseada.

Referencias

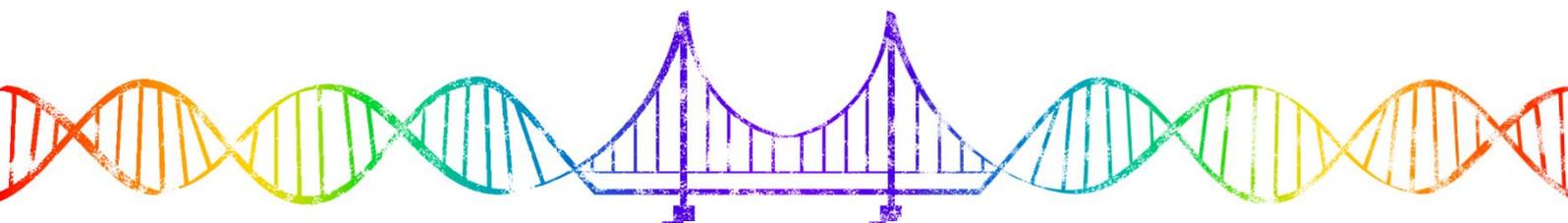
1. Smith, G.E.; Summers, M.D.; Fraser, M.J. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Mol. Cell. Biol.* **1983**, *3*, 2156–2165, doi:10.1128/mcb.3.12.2156-2165.1983.
2. Pidre, M.L.; Arrías, P.N.; Amorós Morales, L.C.; Romanowski, V. The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. *Viruses* **2022**, *15*, 80, doi:10.3390/v15010080.
3. 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. Solutions against Emerging Infectious and Noninfectious Human Diseases through the Application of Baculovirus Technologies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 8195–8226, doi:10.1007/s00253-021-11615-1.
4. Pidre, M.L.; Ferrelli, M.L.; Haase, S.; Romanowski, V. Baculovirus Display: A Novel Tool for Vaccination. In *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*; Romanowski, V., Ed.; InTech, 2013 ISBN 978-953-51-1207-5.
5. Madhan, S.; Prabakaran, M.; Kwang, J. Baculovirus as Vaccine Vectors. *Curr. Gene Ther.* **2010**, *10*, 201–213, doi:10.2174/156652310791321233.
6. Ho Je, Y.; Hee Chang, J.; Young Choi, J.; Yul Roh, J.; Rae Jin, B.; O'Reilly, D.R.; Kwon Kang, S. A Defective Viral Genome Maintained in Escherichia Coli for the Generation of Baculovirus Expression Vectors. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 575–582, doi:10.1023/A:1010301404445.
7. Je, Y.H.; Chang, J.H.; Roh, J.; Jin, B.R. Generation of Baculovirus Expression Vector Using Defective Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome Maintained in Escherichia Coli for Occ+ Virus Production. *Int J Indust Entomol* **2001**, *2*, 155–160.
8. Luckow, V.A.; Lee, S.C.; Barry, G.F.; Olins, P.O. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in Escherichia Coli. *J. Virol.* **1993**, *67*, 4566–4579, doi:10.1128/jvi.67.8.4566-4579.1993.
9. Engler, C.; Marillonnet, S. Combinatorial DNA Assembly Using Golden Gate Cloning. In *Synthetic Biology*; Polizzi, K.M., Kontoravdi, C., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1073, pp. 141–156 ISBN 978-1-62703-624-5.
10. Engler, C.; Youles, M.; Gruetzner, R.; Ehnert, T.-M.; Werner, S.; Jones, J.D.G.; Patron, N.J.; Marillonnet, S. A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 839–843, doi:10.1021/sb4001504.
11. Lee, J.H.; Won, H.J.; Oh, E.-S.; Oh, M.-H.; Jung, J.H. Golden Gate Cloning-Compatible DNA Replicon/2A-Mediated Polycistronic Vectors for Plants. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 559365, doi:10.3389/fpls.2020.559365.
12. Dahlmann, T.A.; Terfehr, D.; Becker, K.; Teichert, I. Golden Gate Vectors for Efficient Gene Fusion and Gene Deletion in Diverse Filamentous Fungi. *Curr.*

- Genet.* **2021**, 67, 317–330, doi:10.1007/s00294-020-01143-2.
13. Larroude, M.; Nicaud, J.-M.; Rossignol, T. Golden Gate Multigene Assembly Method for *Yarrowia Lipolytica*. In *Yeast Metabolic Engineering*; Mapelli, V., Bettiga, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2022; Vol. 2513, pp. 205–220 ISBN 978-1-07-162398-5.
 14. Prielhofer, R.; Barrero, J.J.; Steuer, S.; Gassler, T.; Zahrl, R.; Baumann, K.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Gasser, B.; Marx, H. GoldenPiCS: A Golden Gate-Derived Modular Cloning System for Applied Synthetic Biology in the Yeast *Pichia Pastoris*. *BMC Syst. Biol.* **2017**, 11, 123, doi:10.1186/s12918-017-0492-3.
 15. Neuhold, J.; Radakovics, K.; Lehner, A.; Weissmann, F.; Garcia, M.Q.; Romero, M.C.; Berrow, N.S.; Stolt-Bergner, P. GoldenBac: A Simple, Highly Efficient, and Widely Applicable System for Construction of Multi-Gene Expression Vectors for Use with the Baculovirus Expression Vector System. *BMC Biotechnol.* **2020**, 20, 26, doi:10.1186/s12896-020-00616-z.
 16. Garcia Fallit, M.; Pidre, M.L.; Asad, A.S.; Peña Agudelo, J.A.; Vera, M.B.; Nicola Candia, A.J.; Sagripanti, S.B.; Pérez Kuper, M.; Amorós Morales, L.C.; Marchesini, A.; et al. Evaluation of Baculoviruses as Gene Therapy Vectors for Brain Cancer. *Viruses* **2023**, 15, 608, doi:10.3390/v15030608.
 17. Chambers, A.C.; Aksular, M.; Graves, L.P.; Irons, S.L.; Possee, R.D.; King, L.A. Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2018**, 91, doi:10.1002/cpps.47.
 18. Berger, I.; Fitzgerald, D.J.; Richmond, T.J. Baculovirus Expression System for Heterologous Multiprotein Complexes. *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 1583–1587, doi:10.1038/nbt1036.
 19. Weissmann, F.; Petzold, G.; VanderLinden, R.; Huis In 't Veld, P.J.; Brown, N.G.; Lampert, F.; Westermann, S.; Stark, H.; Schulman, B.A.; Peters, J.-M. biGBac Enables Rapid Gene Assembly for the Expression of Large Multisubunit Protein Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, doi:10.1073/pnas.1604935113.
 20. Occhialini, A.; Piatek, A.A.; Pfoth, A.C.; Frazier, T.P.; Stewart, C.N.; Lenaghan, S.C. MoChlo: A Versatile, Modular Cloning Toolbox for Chloroplast Biotechnology. *Plant Physiol.* **2019**, 179, 943–957, doi:10.1104/pp.18.01220.
 21. Tong, Y.; Zhou, J.; Zhang, L.; Xu, P. A Golden-Gate Based Cloning Toolkit to Build Violacein Pathway Libraries in *Yarrowia Lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* **2021**, 10, 115–124, doi:10.1021/acssynbio.0c00469.
 22. Pantha, P.; Chalivendra, S.; Oh, D.-H.; Elder, B.D.; Dassanayake, M. A Tale of Two Transcriptomic Responses in Agricultural Pests via Host Defenses and Viral Replication. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 3568, doi:10.3390/ijms22073568.
 23. Stokstad, E. New Crop Pest Takes Africa at Lightning Speed. *Science* **2017**, 356, 473–474, doi:10.1126/science.356.6337.473.
 24. Silver, A. Caterpillar's Devastating March across China Spurs Hunt for Native Predator. *Nature* **2019**, 570, 286–287, doi:10.1038/d41586-019-01867-3.
 25. Bernardi, D.; Salmeron, E.; Horikoshi, R.J.; Bernardi, O.; Dourado, P.M.;

- Carvalho, R.A.; Martinelli, S.; Head, G.P.; Omoto, C. Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera Frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0140130, doi:10.1371/journal.pone.0140130.
26. Harrison, R.D.; Thierfelder, C.; Baudron, F.; Chinwada, P.; Midega, C.; Schaffner, U.; Van Den Berg, J. Agro-Ecological Options for Fall Armyworm (*Spodoptera Frugiperda* JE Smith) Management: Providing Low-Cost, Smallholder Friendly Solutions to an Invasive Pest. *J. Environ. Manage.* **2019**, *243*, 318–330, doi:10.1016/j.jenvman.2019.05.011.
27. Masson, T.; Fabre, M.L.; Pidre, M.L.; Niz, J.M.; Berretta, M.F.; Romanowski, V.; Ferrelli, M.L. Genomic Diversity in a Population of *Spodoptera Frugiperda* Nucleopolyhedrovirus. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *90*, 104749, doi:10.1016/j.meegid.2021.104749.
28. Pidre, M.L.; Sabalette, K.B.; Romanowski, V.; Ferrelli, M.L. Identification of an Argentinean Isolate of *Spodoptera Frugiperda* Granulovirus. *Rev. Argent. Microbiol.* **2019**, *51*, 381–385, doi:10.1016/j.ram.2018.10.003.
29. Niz, J.M.; Salvador, R.; Ferrelli, M.L.; De Cap, A.S.; Romanowski, V.; Berretta, M.F. Genetic Variants in Argentinean Isolates of *Spodoptera Frugiperda* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* **2020**, *56*, 401–405, doi:10.1007/s11262-020-01741-9.
30. Ferrelli, M.L.; Pidre, M.L.; Ghiringhelli, P.D.; Torres, S.; Fabre, M.L.; Masson, T.; Cédola, M.T.; Sciocco-Cap, A.; Romanowski, V. Genomic Analysis of an Argentinean Isolate of *Spodoptera Frugiperda* Granulovirus Reveals That Various Baculoviruses Code for Lef-7 Proteins with Three F-Box Domains. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0202598, doi:10.1371/journal.pone.0202598.
31. Gottardo, M.F.; Pidre, M.L.; Zuccato, C.; Asad, A.S.; Imsen, M.; Jaita, G.; Candolfi, M.; Romanowski, V.; Seilicovich, A. Baculovirus-Based Gene Silencing of Humanin for the Treatment of Pituitary Tumors. *Apoptosis* **2018**, *23*, 143–151, doi:10.1007/s10495-018-1444-0.
32. Marvaldi, C.; Martin, D.; Conte, J.G.; Gottardo, M.F.; Pidre, M.L.; Imsen, M.; Irizarri, M.; Manuel, S.L.; Duncan, F.E.; Romanowski, V.; et al. Mitochondrial Humanin Peptide Acts as a Cytoprotective Factor in Granulosa Cell Survival. *Reproduction* **2021**, *161*, 581–591, doi:10.1530/REP-20-0197.
33. Peña Agudelo, J.A.; Pidre, M.L.; Garcia Fallit, M.; Pérez Küper, M.; Zuccato, C.; Nicola Candia, A.J.; Marchesini, A.; Vera, M.B.; De Simone, E.; Giampaoli, C.; et al. Mitochondrial Peptide Humanin Facilitates Chemoresistance in Glioblastoma Cells. *Cancers* **2023**, *15*, 4061, doi: 10.3390/cancers15164061.

Capítulo 3.

Rol de RIPK1 y PRLR en la patología de los gliomas difusos



Capítulo 3. Rol de RIPK1 y PRLR en la patología de los gliomas difusos.

Introducción

Los gliomas difusos (DG o “*diffuse gliomas*”) son los tumores cerebrales malignos más frecuentes en adultos [1,2]. Estos tumores se originan a partir de las células de la glía y son altamente infiltrativos y heterogéneos. Basado en el análisis histopatológico, estos gliomas difusos fueron históricamente diagnosticados como astrocitomas difusos (con el glioblastoma como el representante más frecuente y maligno), como oligodendrogliomas o como tumores con un fenotipo astrocítico y oligodendroglial combinado (oligoastrocitomas) [3].

A pesar de los tratamientos aplicados en la actualidad, como la neurocirugía, radioterapia y quimioterapia, la tasa de supervivencia de los pacientes con Glioblastoma Multiforme (GBM) no suele superar los 12 meses debido a la naturaleza altamente invasiva de los tumores y a la resistencia intrínseca a las terapias. Por esta razón, resaltamos la importancia de identificar nuevos blancos moleculares para desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad [4].

Tradicionalmente, la clasificación de los gliomas difusos ha sido basada en las características histopatológicas [5]. Sin embargo, en el 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó por primera vez el concepto de alteraciones genéticas y epigenéticas para definir varios grupos de gliomas [3,6–8]. Entre todas las alteraciones genéticas caracterizadas, la mutación somática en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 y 2 se ha convertido en el principal marcador para la clasificación molecular y la prognosis de gliomas difusos en adultos. IDH, una enzima involucrada en el metabolismo celular y la respuesta al estrés oxidativo [9], cataliza la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato. Una mutación en el residuo R132 del sitio activo modifica la actividad catalítica de la enzima, convirtiendo el α -cetoglutarato en D-2-hidroxiglutarato (D-2-HG) [10–12]. La acumulación de D-2-HG conduce a la reprogramación epigenética asociada a hipermetilación de las células tumorales [11,12] (figura 3.1). Aunque la mutación en la IDH (IDHm) está asociada a una peor prognosis en algunos cánceres como la leucemia [13], se ha observado lo contrario en el caso de los gliomas difusos [14,15]. La mutación en IDH1 y en IDH2 es un marcador positivo en la prognosis de pacientes con glioma y se asocia con una tasa de supervivencia más alta en comparación con pacientes con IDH de tipo *wild type* (IDHwt) [4,14,15].

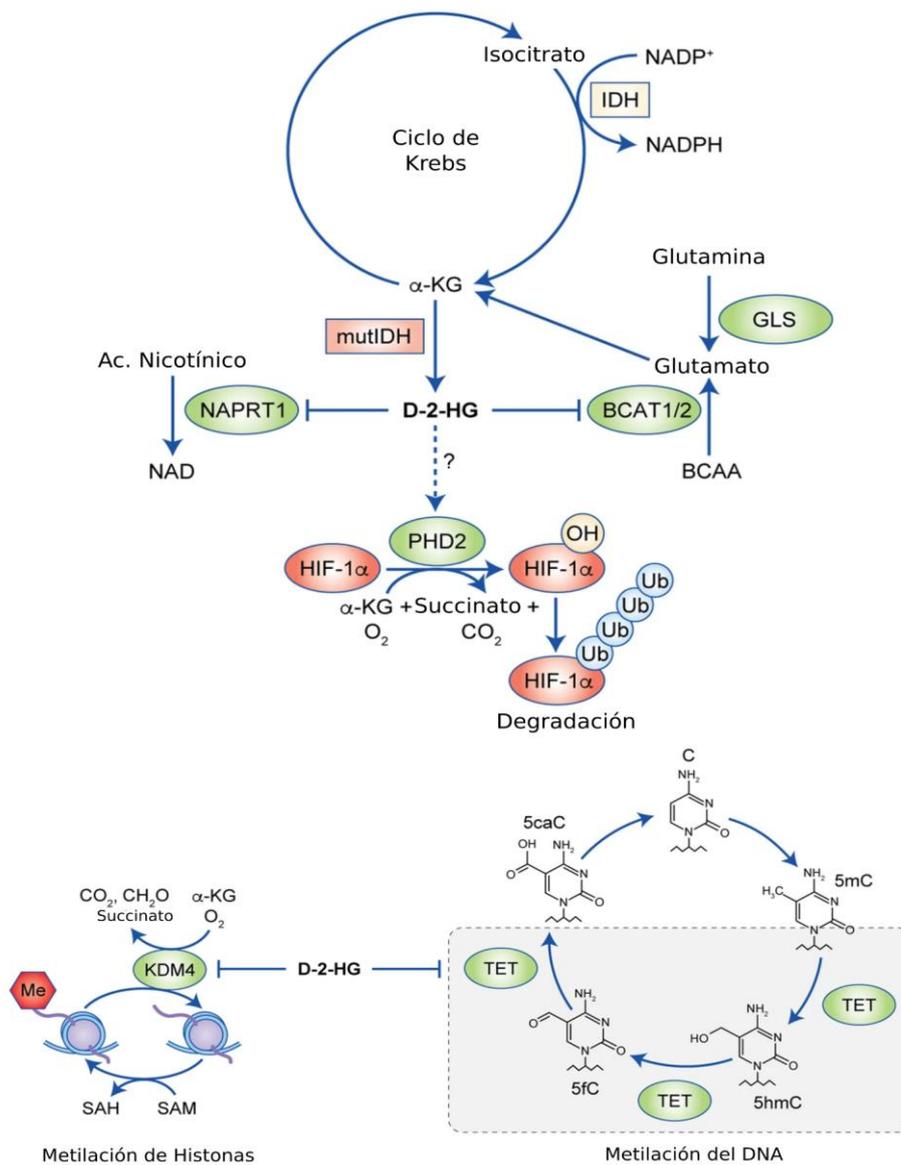


Figura 3.1. Representación esquemática de las alteraciones celulares producidas por la enzima Isocitrato deshidrogenasa mutada (IDHm). La aparición de la enzima mutante IDHm da como resultado una reprogramación metabólica sustancial, agotando el ciclo de Krebs para la producción de D-2-HG. Metabolitos como la glutamina, el glutamato y los aminoácidos de cadena ramificada sirven como fuentes compensatorias para alimentar el metabolismo celular. D-2-HG a su vez afecta la biosíntesis de glutamato y NAD. Si bien se ha observado una relación con la vía de detección de hipoxia, el rol de D-2-HG sigue sin estar del todo claro. El metabolito D-2-HG funciona también como inhibidor competitivo de KDM4 o TET y, por lo tanto, bloquea el proceso de desmetilación en histonas y nucleótidos, respectivamente. Figura adaptada de Han *et al.* [16].

Vías de muerte celular programada y cáncer

Numerosos estudios han demostrado consistentemente que controlar la proliferación celular y eliminar células innecesarias o potencialmente dañinas es esencial para mantener la homeostasis para el crecimiento y desarrollo de

organismos multicelulares *in vivo* [17]. La muerte celular programada (PCD) es un mecanismo eficaz para regular estos procesos [18]. La PCD abarca tanto la apoptosis clásica dentro del contexto de la homeostasis tisular y del desarrollo, como también las formas alternativas que surgen en respuesta a perturbaciones del microambiente exógenas o endógenas, como la apoptosis, piroptosis, necroptosis, ferroptosis, autofagia y otras [19]. El estudio de las vías de PCD más clásicas y bien definidas, piroptosis, apoptosis y necroptosis (figura 3.2) y la interacción entre ellas, ha llevado al establecimiento y desarrollo del concepto de "PANoptosis".

Vale la pena señalar que la PANoptosis tiene características clave de las vías anteriores, pero no puede explicarse por ninguna de ellas por sí sola. Más bien, están interconectados y mantienen el equilibrio dinámico al compartir un complejo proteico de muerte, a saber, el "PANoptosoma", que se cree que es una plataforma que puede activar múltiples modos de muerte celular [20]. Como tal, se produce una importante interferencia en la ejecución y regulación de las numerosas vías en la PANoptosis. Estudios recientes se han centrado en los complejos mecanismos moleculares subyacentes a la PANoptosis y sus implicancias en las enfermedades humanas, particularmente el cáncer [3,21].

La progresión del cáncer se ha relacionado con mecanismos que permiten a las células cancerosas evitar la PANoptosis. Por lo tanto, comprender la conexión entre la PANoptosis y el cáncer puede proporcionar conocimientos más profundos sobre la aparición y el tratamiento del cáncer, y puede ser fundamental para explorar nuevas estrategias terapéuticas al interferir con el mecanismo de escape de la PANoptosis en las células cancerosas. Además, dentro del microambiente tumoral (TME, del inglés *tumor microenvironment*) la PANoptosis puede combatir la progresión tumoral mediante regulación local de las respuestas inmunitarias [22].

Ya sea por su aporte a la PANoptosis o por su rol individual, las vías de PCD clásicas, apoptosis, necroptosis y piroptosis juegan un rol fundamental en la homeostasis tumoral [23]. Mientras que la apoptosis ha sido considerada como un importante mecanismo de defensa antitumoral, el rol de la necroptosis y la piroptosis en el contexto del cáncer no está del todo claro. La piroptosis y la necroptosis se encuentran muy relacionadas con las enfermedades del sistema nervioso, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y tumores. Existen evidencias crecientes que sugieren que tanto la necroptosis como la piroptosis podrían jugar un papel importante en la patogénesis tumoral, lo que las vuelve en blancos interesantes para el diseño racional de estrategias terapéuticas antitumorales [24].

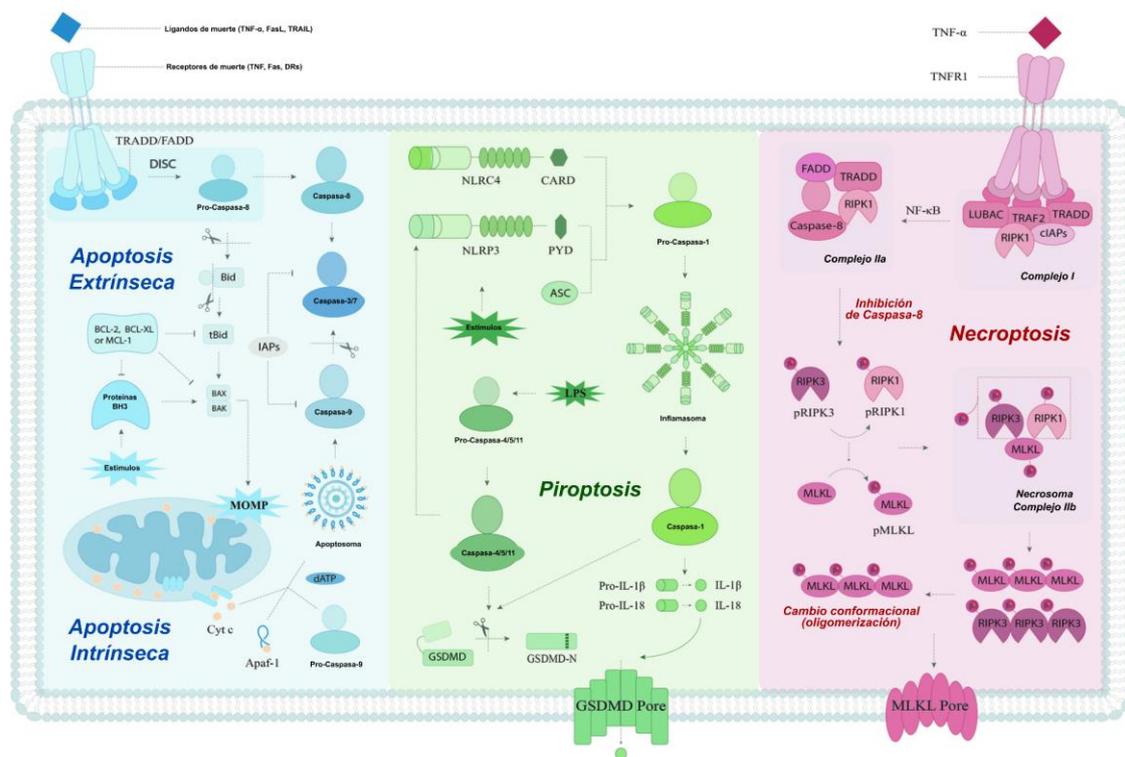


Figura 3.2. Representación esquemática de la maquinaria molecular de las vías clásicas de muerte celular programada (PCD): apoptosis, piroptosis y necroptosis. Figura adaptada de Gao *et al.* [22].

RIPK1 y muerte celular programada

La proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1 (RIPK1) es una proteína de 76 kDa y es considerada como un regulador maestro de la decisión celular entre la señalización pro-supervivencia NF- κ B y la muerte celular en respuesta a un amplio conjunto de estímulos inflamatorios [25–27].

RIPK1 contiene un dominio quinasa N-terminal, un dominio intermedio con un motivo de interacción homotípico RIP (RHIM) y un dominio de muerte C-terminal (DD, del inglés *death domain*) (figura 3.3). El dominio RHIM es necesario para unirse con RIPK3 y mediar la necroptosis, además media la unión con otras proteínas que contienen motivos RHIM. El DD no solo es crucial para mediar la heterodimerización de RIPK1 con otras proteínas que contienen DD, sino que también es necesario para la homodimerización y la propia activación de RIPK1 durante la transición del complejo I al complejo II (figura 3.2). En lo que respecta a la actividad quinasa, RIPK1 presenta varios sitios de fosforilación. La autofosforilación en la Ser166 es un biomarcador de la activación de RIPK1. Como se muestra también en la figura 3.2, RIPK1 es ampliamente modulado por ubiquitinación con hasta 34 sitios, especialmente en el dominio quinasa y el dominio de muerte.

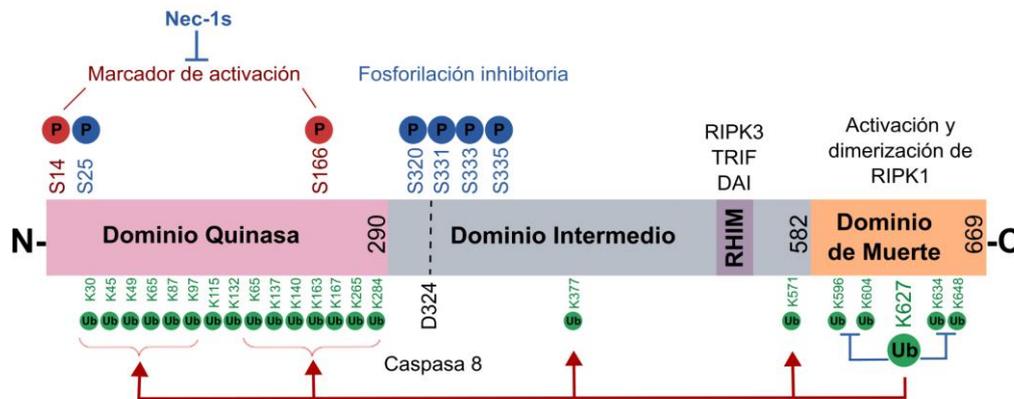


Figura 3.3. Esquema de los dominios funcionales de la proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1 (RIPK1). Figura adaptada de Li *et al.* [28].

Entre las diferentes vías de muerte celular programada en las que se encuentra involucrada RIPK1, la necroptosis cobra mayor relevancia ya que la misma es principalmente mediada por un complejo efector integrado por RIPK1 junto a las proteínas RIPK3 y MLKL e inhibida por necrostatina-1 (Nec-1s) [29]. Además de su participación en la infección viral, se ha sugerido que la necroptosis juega un rol crítico en la regulación de la biología del cáncer, incluyendo la oncogénesis, metástasis e inmunidad [30,31]. Se han observado efectos ambiguos de la necroptosis en el cáncer. Mientras que la apoptosis es en su mayoría inmunosilente, la necroptosis provoca una fuerte respuesta inflamatoria que puede alterar drásticamente el entorno tisular local e impactar en la patogénesis de las enfermedades del sistema nervioso central [25].

Por otro lado, se ha sugerido que diferentes mediadores clave de la vía necroptótica, solos o en combinación, promueven la metástasis y la progresión tumoral en cáncer de cabeza y cuello y en glioblastoma, respectivamente [32–34]. Sin embargo, la necroptosis también sirve como un mecanismo alternativo que protege contra el desarrollo tumoral cuando la apoptosis está comprometida [35,36]. Dada la función ambigua de la necroptosis en la biología del cáncer, ha surgido como un potencial blanco para el tratamiento del cáncer, y un número creciente de compuestos inductores o inhibidores de la necroptosis se encuentran actualmente en desarrollo, e incluso en fase clínica [37,38].

Prolactina y cáncer

Por su parte, la prolactina (PRL) es una hormona peptídica secretada principalmente por la hipófisis anterior. Algunas fuentes extra-pituitarias de PRL son la glándula mamaria, la próstata, el cerebro, las células inmunes y la piel, donde esta hormona actúa de manera autócrina y parácrina como reguladora fisiológica del desarrollo y la homeostasis de los tejidos [39,40]. Si bien la PRL ha

sido asociada tradicionalmente a la regulación de la lactancia y la fertilidad, en los últimos años se ha acumulado abundante evidencia que indica que esta hormona y su receptor (PRLR) están involucrados en el desarrollo de varios tipos de tumores hormono-dependientes, como el cáncer de mama y el de próstata. La expresión de PRL y su receptor PRLR ha sido asociada a un mayor riesgo de desarrollar estos tipos de cáncer y a generar resistencia a los tratamientos estándares [39,40]. También se observó que la PRL promueve la proliferación de células tumorales, la angiogénesis y la quimio-resistencia en este tipo de tumores [41–45]. Por lo tanto, el bloqueo del PRLR ha sido propuesto como estrategia terapéutica para el tratamiento de tumores hormono-dependientes [40]. Dado que la expresión extrapituitaria de PRL no depende de la regulación de dopamina, la utilización de agonistas dopaminérgicos no es útil para inhibir la acción de PRL en estos tumores. Por este motivo, se propone actualmente que la utilización de antagonistas o anticuerpos neutralizantes y/o moléculas pequeñas inhibitoras para PRLR podrían ser útiles para tratar tumores de mama y de próstata resistentes a la quimioterapia [39,40]. En humanos, varias isoformas post-transcripcionales del PRLR, como la isoforma larga, la intermedia o la corta, resultan del *splicing* alternativo y varían en el largo del dominio intracelular [46]. Dado que estas isoformas utilizan distintas vías de señalización, la expresión relativa de los receptores en tejidos normales en comparación con los patológicos podría explicar, en parte, la versatilidad de las acciones de la PRL que fue descripta en diversos tejidos normales y tumorales [40].

La expresión de PRL y PRLR ha sido detectada en biopsias de GBM por varios autores [47–50]. También fueron detectados altos niveles de PRL circulante en alrededor del 30% de los pacientes de GBM en un estudio clínico relativamente pequeño [48]. En los gliomas de grado II y III (GII-III) se observó que la expresión del gen de PRL es menor que en los GBM [51]. Además, ha sido reportado que la expresión local de PRL y los altos niveles de PRL circulante correlacionan con el índice de proliferación y la densidad vascular del GBM [48]. Ha sido sugerido que la PRL modularía la expresión de moléculas de adhesión (26) y facilitaría la migración de células de GBM [49]. Asimismo, ha sido demostrado que la activación del PRLR estimula la proliferación de líneas celulares de GBM *in vitro* [52]. Sin embargo, aún no se comprende en profundidad cuál es el papel de PRL/PRLR en la progresión de esta enfermedad. Todavía no ha sido dilucidado si la PRL circulante, la producida localmente y/o la activación constitutiva del PRLR afectan a la progresión tumoral.

Bases de datos de pacientes

The Cancer Genome Atlas (TCGA), es un programa histórico de genómica del cáncer que caracterizó molecularmente más de 20.000 tumores primarios que abarcan 33 tipos de cáncer diferentes. Este esfuerzo conjunto entre el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y el Instituto Nacional de Investigación del Genoma

Humano (NHGRI) de los Estados Unidos comenzó en 2006 y reunió a investigadores de diversas disciplinas y múltiples instituciones.

Durante los siguientes doce años, el TCGA generó más de 2,5 petabytes (1 petabyte equivale a 1000 TB) de datos genómicos, epigenómicos, transcriptómicos y proteómicos a partir tanto de tejidos tumorales como de tejidos normales.

Estos datos, que se encuentran disponibles públicamente para que los utilice cualquier miembro de la comunidad científica, permiten realizar profundos análisis *in silico* de expresión diferencial, sobrevida, correlación con parámetros clínicos diversos como el tratamiento con quimio y/o radioterapia, entre otros.

Si bien el abordaje de los datos puede realizarse a través de diferentes códigos y algoritmos bioinformáticos, se han desarrollado diferentes plataformas que permiten el acceso y análisis de los datos de manera más amigable para el usuario. Una de las plataformas más completas existentes es la plataforma Xena desarrollada por la Universidad de Santa Cruz [53].

Objetivo general

Explorar en mayor profundidad el posible rol desempeñado por RIPK1 y PRLR en la patogénesis de los gliomas difusos mediante análisis transcriptómicos exhaustivos a partir de bases de datos de pacientes que contienen información clínica, transcriptómica y genómica.

Objetivos específicos

1. Estudiar la relación entre los niveles de expresión de los posibles blancos terapéuticos propuestos (RIPK1 y PRLR) y diferentes indicadores de sobrevida y pronóstico.
2. Estudiar la correlación entre los niveles de expresión de RIPK1 y PRLR y diferentes marcadores clínicos relevantes como ser el tratamiento previo con alguna terapia convencional.
3. Evaluar la correlación entre los niveles de expresión de RIPK1 y PRLR y distintos genes efectores o reguladores de vías relevantes para la fisiología, progresión y patología tumoral.

Resultados

Para el desarrollo de los análisis transcriptómicos, utilizamos una base de datos de biopsias de pacientes con gliomas difusos del TCGA LGGGBM. Luego del curado de las muestras, se utilizó un total de 670 biopsias provenientes de pacientes diferentes. Los atributos clínicos generales de los pacientes se encuentran resumidos en la tabla 3.1.

Atributo clínico		Base de datos:TCGA LGGGBM
Total de pacientes		670
RIPK1	Alta expresión	335
	Baja expresión	335
PRLR	Alta expresión	335
	Baja expresión	335
Estado mutacional de IDH	IDHwt	257
	IDHm	404
	No definido	9
Edad al inicio del diagnóstico	<50	383
	>50	275
	No definido	2
Clasificación histológica	Oligoastrocitoma	130
	Oligodendroglioma	191
	Astrocitoma	324
	GBM	153
Radioterapia	Sí	408
	No	200
	Discrepancia	1
	No definido	61

Tabla 3.1. Cohorte de pacientes. En la tabla se muestran los principales atributos clínicos correspondientes a la base de datos TCGA LGGGBM utilizada en este capítulo. El número en cada

celda indica la cantidad de pacientes con los atributos clínicos especificados en la primera columna.

Expresión de RIPK1 y supervivencia

A continuación, dada la relevancia del estado mutacional de la enzima IDH y de las diferencias en el comportamiento de los gliomas según su estado, las muestras se estratificaron según si presentaban la IDH mutada o *wild type*. Luego, dentro de cada uno de esos grupos, las muestras fueron nuevamente divididas según la expresión mediana de RIPK1. Así, se analizaron 404 muestras de pacientes con IDH1m y no se observaron diferencias significativas respecto a la probabilidad de supervivencia bajo condiciones de baja o alta expresión de RIPK1. Sin embargo, en aquellas muestras con IDH1wt, la probabilidad de supervivencia fue menor en el grupo que presentaba alta expresión de RIPK1 (figura 3.4).

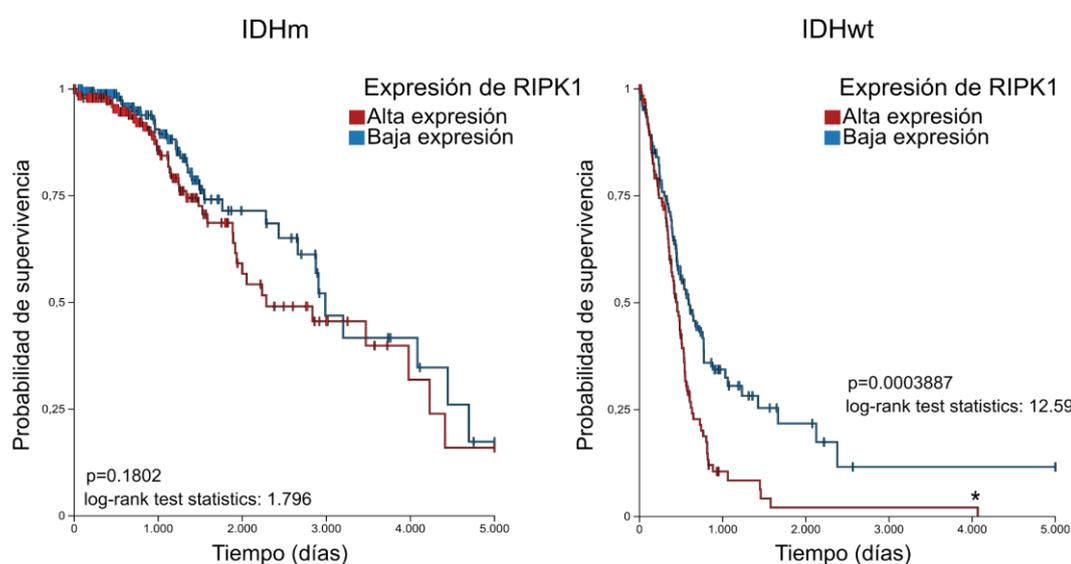


Figura 3.4. Gráficos de supervivencia. Las muestras de DG fueron filtradas de TCGA, y se evaluó la expresión de RIPK1. En el análisis, las muestras se dividieron en dos grupos según la mediana de expresión: alta expresión de RIPK1 y baja expresión de RIPK1 y se trazó la supervivencia para cada grupo. Izquierda: muestras con IDHm, derecha: muestras de pacientes con IDHwt. Prueba de log-rank *P < 0.05.

La expresión de RIPK1 se evaluó en muestras derivadas de pacientes con diferentes subtipos de glioma utilizando la plataforma UCSCXena. Los resultados mostraron niveles más altos de RIPK1 en muestras derivadas de pacientes con GBM y astrocitoma del SNC de grado 2–3 en comparación con muestras de glioma de bajo grado, como oligodendroglioma y oligoastrocitoma (figura 3.5.A).

Luego, evaluamos la expresión de RIPK1 y el estado mutacional de IDH, observándose una expresión de RIPK1 significativamente mayor en muestras IDHwt en comparación con muestras IDHm (figura 3.5.B).

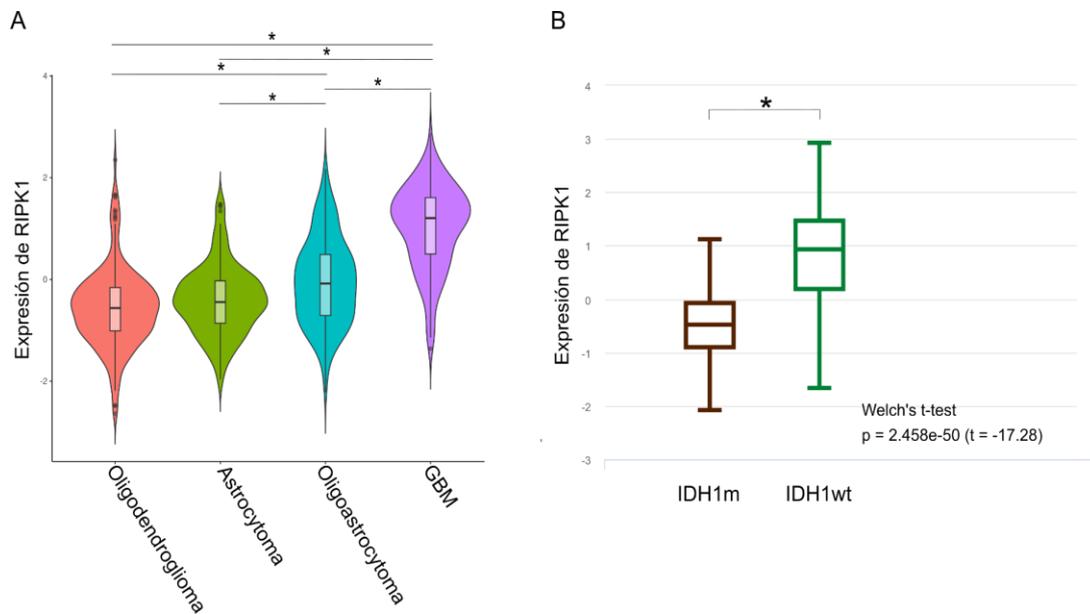


Figura 3.5. (A) Expresión diferencial de RIPK1 entre los subtipos de tumor DG. Prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn con el valor de P corregido por el método de Bonferroni. * $P < 0.05$. **(B)** Expresión diferencial de RIPK1 en gliomas IDHm e IDHwt. Prueba t de Welch. * $P < 0.05$.

Por otro lado, para evaluar si existe algún tipo de correlación entre la radioterapia y los niveles de expresión de RIPK1, las muestras se dividieron entre los pacientes que habían recibido radioterapia y aquellos que no la habían recibido, y se estudió la expresión de RIPK1 en ambos casos. Se observó una mayor expresión de RIPK1 en muestras derivadas de pacientes tratados con radioterapia en comparación con muestras de pacientes no tratados tanto en gliomas IDHm como IDHwt (figura 3.6).

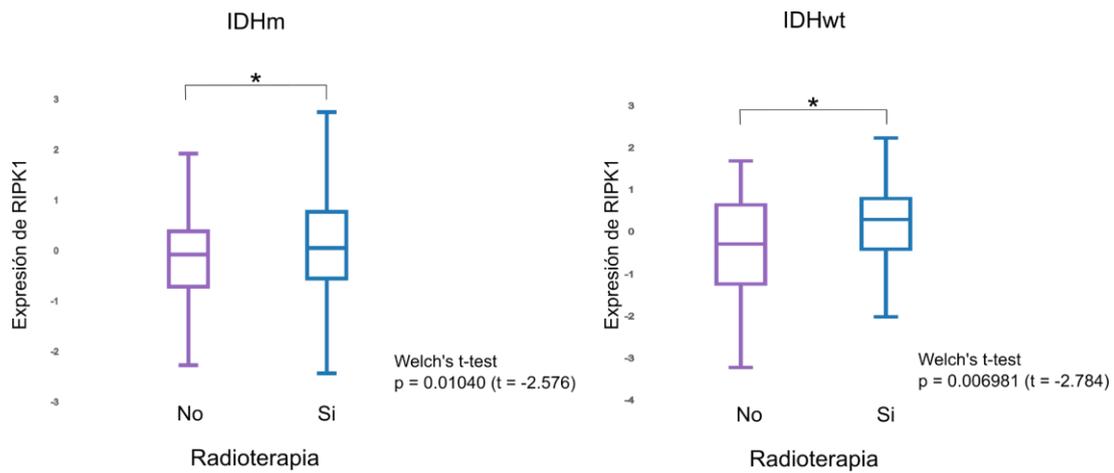


Figura 3.6. Expresión diferencial de RIPK1 entre las muestras de pacientes que recibieron radioterapia y aquellas que no la recibieron. Las muestras fueron clasificadas en IDHm (izquierda) y en IDHwt (derecha). Prueba t de Welch. *P < 0.05.

RIPK1 y vías relevantes para la fisiología tumoral

Después de clasificar las muestras de la base de datos TCGA-LGGGBM según la expresión mediana de RIPK1, se realizó un Análisis de Expresión Génica Diferencial seguido de un *Gene Ontology* para identificar los términos biológicos que están sobre-representados tanto en los genes *up-regulados* y *down-regulados* identificados al comparar los grupos de muestras con alta y baja expresión de RIPK1. Además, las muestras fueron previamente divididas en IDHm e IDHwt.

En primer lugar, en la figura 3.7 se muestran los resultados relacionados con la categoría: procesos biológicos, entre los que destacan la activación de neutrófilos y demás vías pro-inflamatorias como conjuntos de genes regulados positivamente.

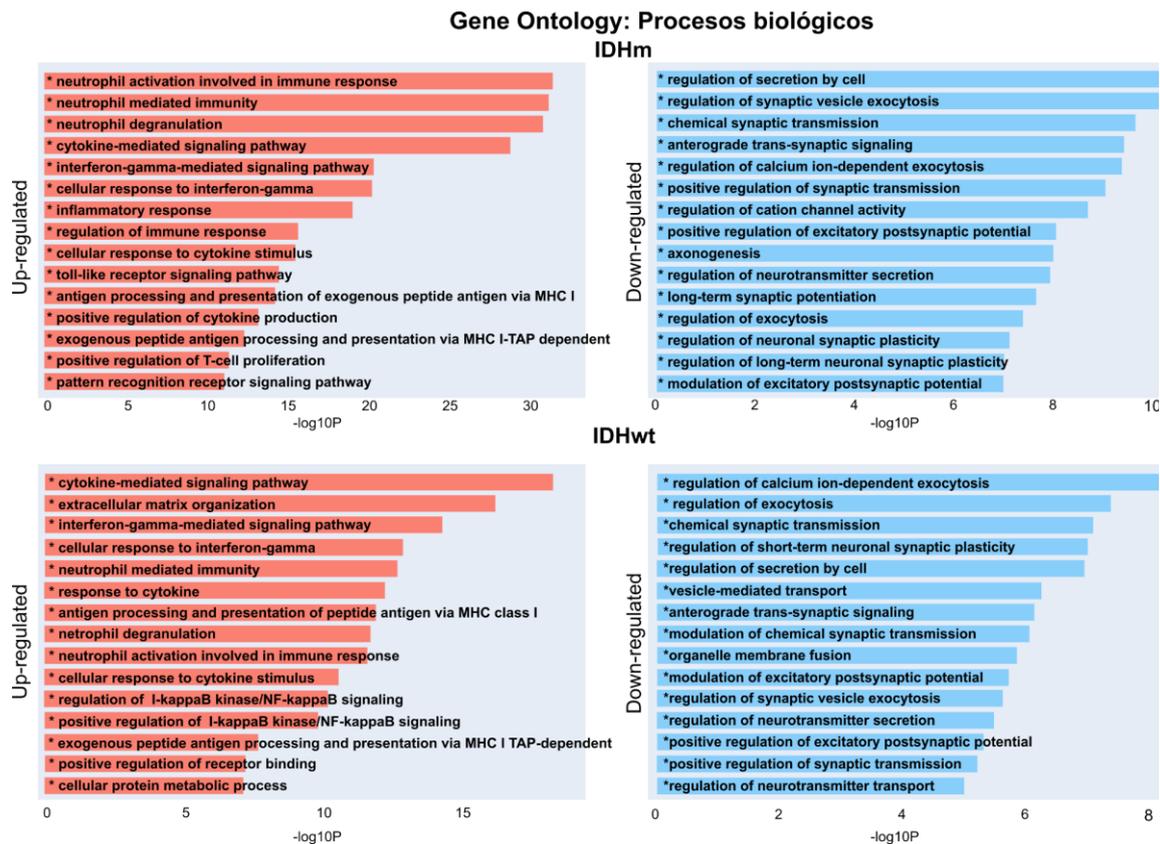


Figura 3.7. Análisis de expresión diferencial y de ontología de genes: Procesos biológicos. Los gráficos muestran las vías canónicas significativamente sobre-representadas (enriquecidas) por los DEGs con el número de genes para las principales categorías de una de las tres ontologías: GO: procesos biológicos. DEA de genes de baja expresión versus alta expresión de RIPK1: Las vías canónicas estadísticamente significativas en los DEGs se enumeran según su valor de P corregido por FDR ($-\log_{10}P$; barras de colores) y la proporción de los genes enumerados encontrados en cada vía sobre el número total de genes en esa vía. La información se obtuvo de la base de datos Pan-Cancer-Xena de *The Cancer Genome Atlas*. DEA, análisis de expresión diferencial; DEG, gen diferencialmente expresado; FDR, tasa de falsos descubrimientos.

En una segunda instancia, se evaluaron los resultados de la categoría: función molecular y se graficaron los resultados obtenidos en la figura 3.8. Nuevamente, predominan funciones moleculares vinculadas a la inflamación (*up-reguladas*) y a la adhesión y diferenciación celular (*down-reguladas*).

Gene Ontology: Funciones moleculares

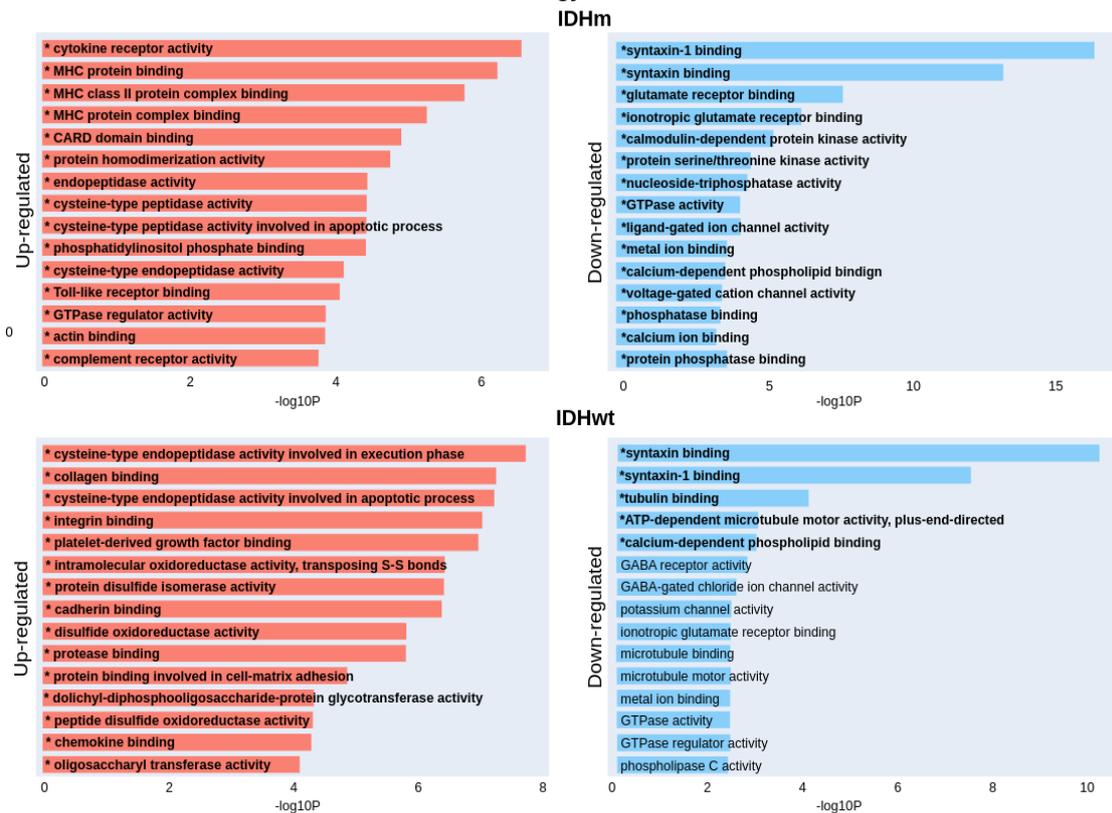


Figura 3.8. Análisis de expresión diferencial y de ontología de genes: Funciones moleculares. Los gráficos muestran las vías canónicas significativamente sobre-representadas (enriquecidas) por los DEGs con el número de genes para las principales categorías de una de las tres ontologías: GO: funciones moleculares. DEA de genes de baja expresión versus alta expresión de RIPK1: Las vías canónicas estadísticamente significativas en los DEGs se enumeran según su valor de P corregido por FDR ($-\log_{10}P$; barras de colores) y la proporción de los genes enumerados encontrados en cada vía sobre el número total de genes en esa vía. La información se obtuvo de la base de datos Pan-Cancer-Xena de *The Cancer Genome Atlas*. DEA, análisis de expresión diferencial; DEG, gen diferencialmente expresado; FDR, tasa de falsos descubrimientos.

Este primer análisis mostró que en aquellas muestras con alta expresión de RIPK1, las vías relacionadas con la desdiferenciación celular, la inflamación y la muerte celular están sobreexpresadas. A partir de los resultados obtenidos, se decidió realizar un análisis más exhaustivo para estudiar la expresión de RIPK1 y su correlación con distintas vías de muerte como la apoptosis, necroptosis y piroptosis.

Apoptosis

Inicialmente, se analizó la expresión diferencial de genes relacionados con la apoptosis en ambos grupos, con alta y baja expresión de RIPK1, luego de la estratificación de las muestras según el estado de mutación de IDH1. A continuación, se estudió la correlación entre la expresión de RIPK1 y los genes relacionados con la apoptosis. Se observó que BAX, CASP3, CASP8 y NF κ B1 tienen

niveles significativamente más altos en el grupo con alta expresión de RIPK1 en comparación con aquellos con niveles más bajos de RIPK1 tanto en gliomas con IDHwt como en gliomas con IDHm. Mientras que, en el caso de las muestras con IDH mutada, se observó un nivel más alto de TP53 en el grupo con alta expresión de RIPK1 en comparación con el grupo con baja expresión de RIPK1. En las muestras con IDH wild type, ocurrió lo mismo con BCL2 (figura 3.9). La figura 3.9B muestra un ensayo de correlación de Pearson entre los niveles de expresión de RIPK1 y los diferentes genes involucrados en la apoptosis, para muestras IDHwt e IDHm.

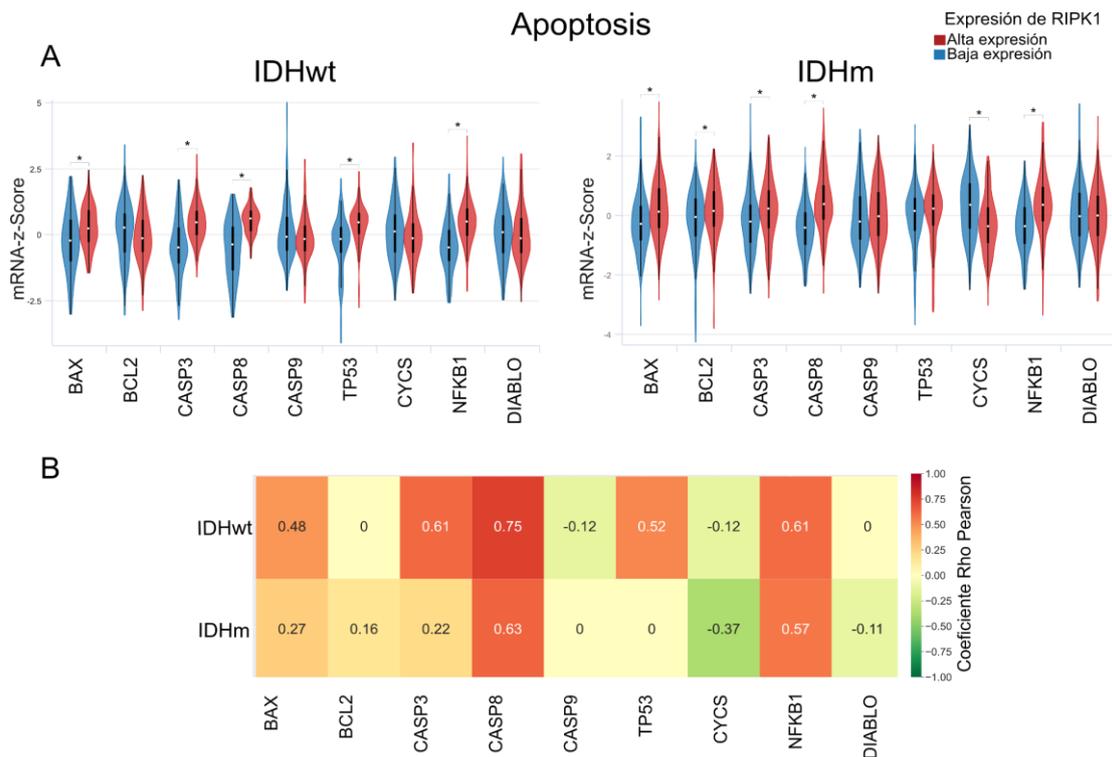


Figura 3.9. Análisis transcriptómico de la vía de muerte celular: apoptosis. **(A)** Violin plot de la expresión (z-score) de proteínas involucradas en la vía de la apoptosis bajo condiciones de alta y baja expresión de RIPK1. Las muestras se clasificaron en tumores IDHm e IDHwt y luego se graficaron. Prueba t de Welch *p < 0.01. **(B)** Correlación entre la expresión de RIPK1 y las proteínas involucradas en la respectiva vía separadas en tumores IDHm e IDHwt. Los números en las celdas indican el índice de correlación de Pearson en comparaciones estadísticamente significativas.

Necroptosis

Se analizaron los genes relacionados con la necroptosis bajo condiciones de baja y alta expresión de RIPK1. Los resultados mostraron niveles más altos de RIPK3, MLKL y CASP8 en aquellas muestras con alta expresión de RIPK1 tanto en el caso de muestras con IDHm como con IDHwt, y lo mismo se observó para BIRC2 y BIRC3 en las muestras wtIDH (figura 3.10A). Al realizar un ensayo de correlación de Pearson, se observó una mayor correlación entre la expresión de RIPK1 y los

diferentes marcadores de necroptosis en las muestras IDHwt en comparación con las muestras IDHm (figura 3.10B).

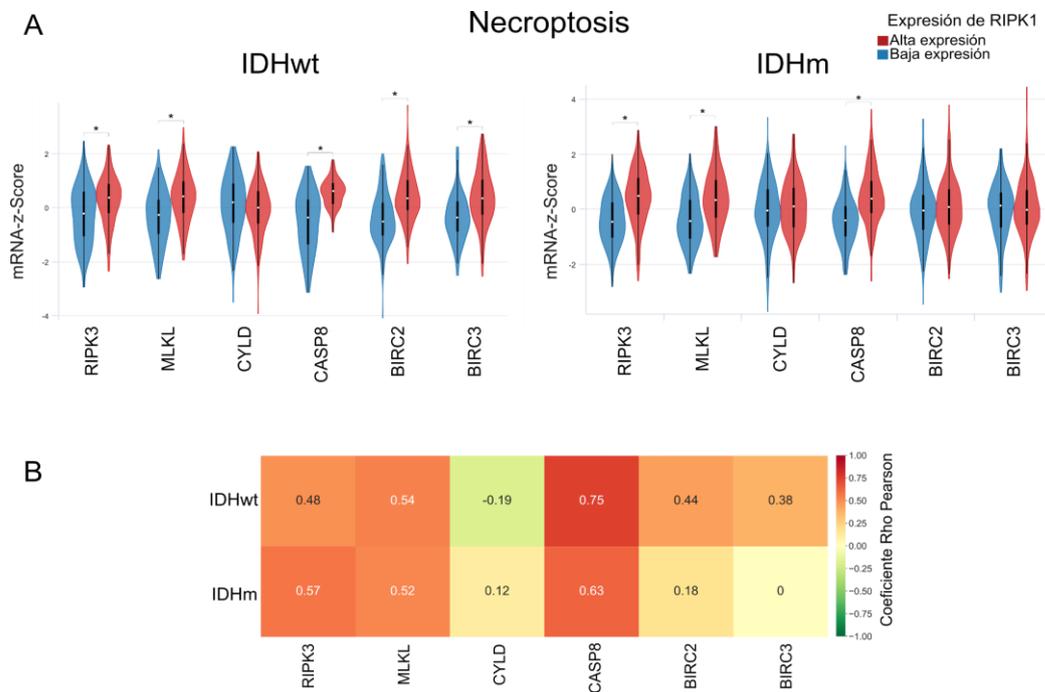


Figura 3.10. Análisis transcriptómico de la vía de muerte celular: necroptosis. **(A)** *Violin plot* de la expresión (z-score) de proteínas involucradas en la vía de la necroptosis bajo condiciones de alta y baja expresión de RIPK1. Las muestras se clasificaron en tumores IDHm e IDHwt y luego se graficaron. Prueba t de Welch, * $p < 0.01$. Derecha: Correlación entre la expresión de RIPK1 y las proteínas involucradas en la respectiva vía separadas en tumores mIDH y wtIDH. Los números en las celdas indican el índice de correlación de Pearson en comparaciones estadísticamente significativas.

Piroptosis

Se realizó un análisis similar para estudiar la expresión de genes asociados con la piroptosis. En este caso, se evaluaron los niveles de expresión de BAX, CASP1, CASP3, CASP4, CASP8, GSDMD, GZMA, IL6 e IL1 β , y se observó una mayor expresión de todos los genes mencionados anteriormente en las muestras con alta expresión de RIPK1 en comparación con aquellas con baja expresión de RIPK1 tanto en muestras wtIDH como mIDH (figura 3.11A). Sin embargo, una vez más, se observó una mayor correlación entre la expresión de RIPK1 y los diferentes marcadores de piroptosis en las muestras wtIDH (figura 3.11B).

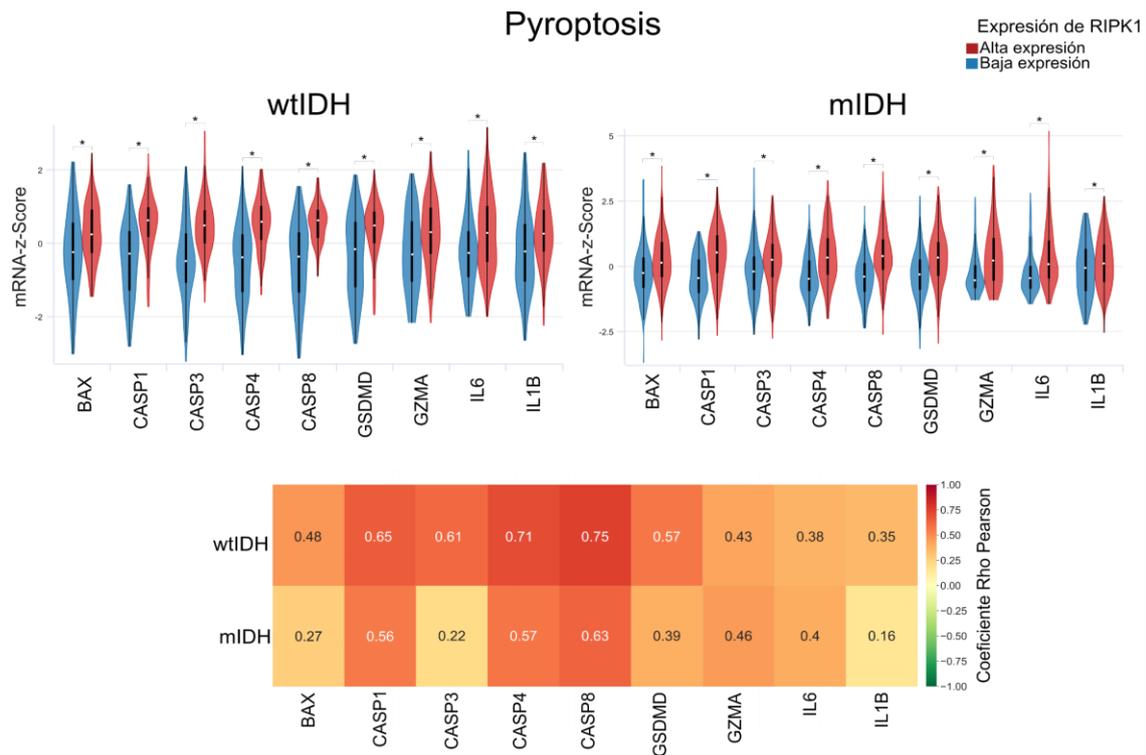


Figura 3.11. Análisis transcriptómico de la vía de muerte celular: piroptosis. **(A)** Violin plot de la expresión (z-score) de proteínas involucradas en la vía de la piroptosis bajo condiciones de alta y baja expresión de RIPK1. Las muestras se clasificaron en tumores IDHm e IDHwt y luego se graficaron. Prueba t de Welch, *p < 0.01. Derecha: Correlación entre la expresión de RIPK1 y las proteínas involucradas en la respectiva vía separadas en tumores mIDH y wtIDH. Los números en las celdas indican el índice de correlación de Pearson en comparaciones estadísticamente significativas.

Proliferación

La proliferación celular es un proceso vital para la progresión tumoral. Por esta razón, se repitió el análisis transcriptómico evaluando genes vinculados a este proceso en condiciones de baja y alta expresión de RIPK1. Además, se estudió la correlación entre esos genes y la expresión de RIPK1 dividiendo nuevamente las muestras según el estado mutacional de IDH1. Los resultados mostraron una mayor expresión de MAPK8, MAP2K1, APC, KRAS, HRAS y una menor expresión de JUN, STAT3, NFKB1 y CTNNB1 en el grupo de baja expresión de RIPK1 en muestras tanto mIDH como wtIDH, mientras que se observaron niveles más altos de GSK3B y RAF1 en el grupo de baja expresión de RIPK1 en muestras con IDHm. Lo mismo ocurrió con MAPK3, PTPN11 y AXIN2 para las muestras wtIDH1 (figura 3.12). Estos resultados por sí solos no permiten asociar a RIPK1 a un estado pro-proliferativo ni a uno anti-proliferativo.

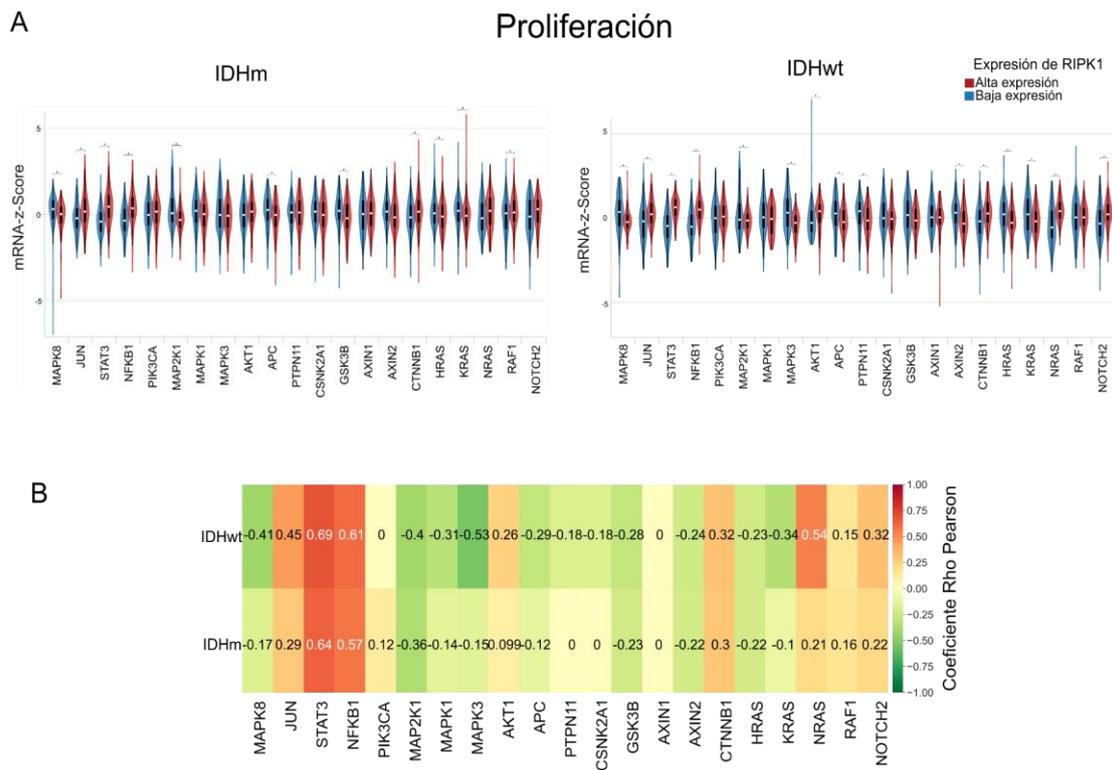


Figura 3.12. Análisis transcriptómico (TCGA) de proliferación. **(A)** *Violin plot* de la expresión (z-score) de proteínas involucradas en la respectiva vía bajo condiciones de alta y baja expresión de RIPK1. Las muestras se clasificaron en tumores IDHm e IDHwt y luego fueron graficadas. Prueba t de Welch *p < 0.01. **(B)** Correlación entre la expresión de RIPK1 y las proteínas involucradas en proliferación separadas en tumores IDHm e IDHwt. Los números en las celdas indican el índice de correlación de Pearson en comparaciones estadísticamente significativas.

Transición epitelio-mesenquimal

En el contexto de las neoplasias, la transición epitelio-mesenquimal (EMT, del inglés “*epithelial-mesenchymal transition*”) se asocia con la iniciación e invasión tumoral [54]. El estudio de la correlación entre la expresión de RIPK1 y la expresión de genes relacionados con la EMT se llevó a cabo de manera análoga a los estudios presentados anteriormente, en muestras con IDHm o IDHwt. Se observó que las muestras con alta expresión de RIPK1 presentaban niveles significativamente más altos de la mayoría de los genes evaluados tanto en muestras IDHwt como en muestras IDHm (figura 3.13).

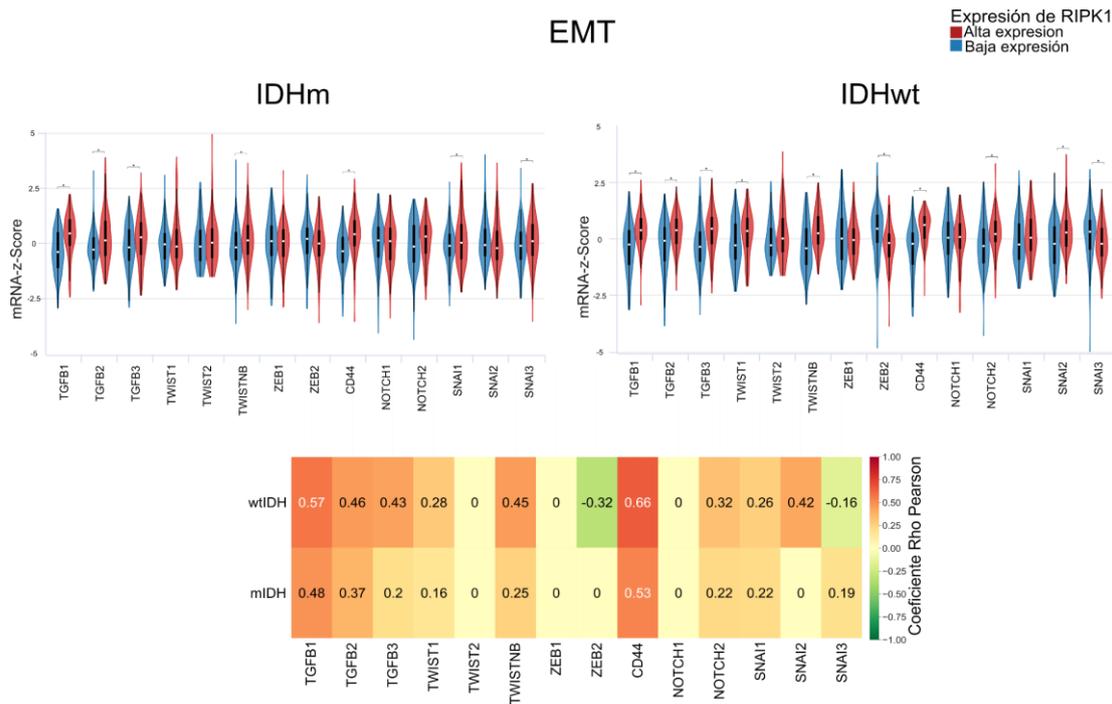


Figura 3.13. Análisis transcriptómico (TCGA) de la transición epitelio-mesenquimal (EMT). Arriba: *Violin plot* de la expresión (z-score) de genes involucrados en la respectiva vía bajo condiciones de alta y baja expresión de RIPK1. Las muestras se clasificaron en tumores IDHm e IDHwt y luego fueron graficadas. Prueba t de Welch * $p < 0.01$. Abajo: Correlación entre la expresión de RIPK1 y las proteínas involucradas en EMT separadas en tumores IDHm e IDHwt. Los números en las celdas indican el índice de correlación de Pearson en comparaciones estadísticamente significativas.

Expresión de RIPK1 e infiltración de células inmunes

Considerando que RIPK1 desempeña un papel central en la regulación de la muerte celular programada (PCD) y que observamos una correlación directa entre su expresión y la de los diferentes genes involucrados en la necroptosis y la piroptosis (formas de muerte celular que desencadenan inflamación), realizamos un meta-análisis utilizando firmas génicas inmunológicas previamente validadas de células inmunes infiltrantes en tumores [55,56]. Encontramos que la expresión de firmas génicas que caracterizan diferentes poblaciones linfocíticas, por ejemplo, células *T helpers*, citotóxicas, de memoria y reguladoras, estaban reguladas positivamente en gliomas IDHm con alta expresión de RIPK1. Del mismo modo, las firmas génicas de células presentadoras de antígenos, es decir, células dendríticas (DC) y macrófagos, también se encontraban reguladas positivamente. Se observó el mismo efecto con respecto a los neutrófilos y las células NK (figura 3.14).

IDHm

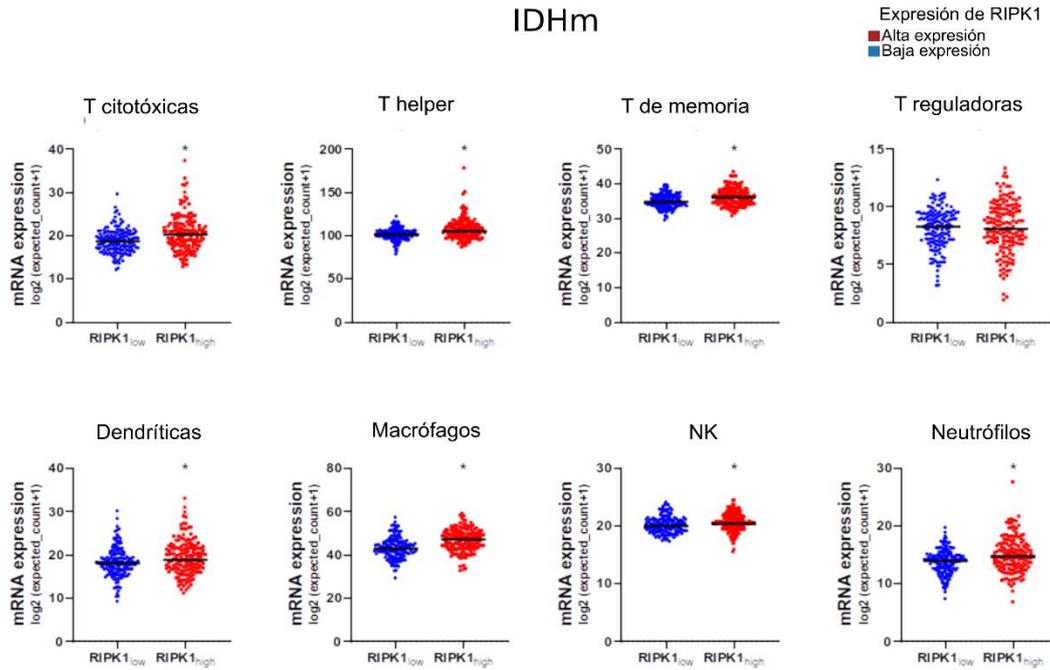


Figura 3.14. Meta-análisis de firmas génicas inmunes en biopsias de gliomas con IDHm. Evaluamos las firmas génicas que caracterizan las poblaciones de células inmunes en datos transcriptómicos de biopsias de gliomas. Los pacientes fueron clasificados según los niveles de expresión del RNAm de RIPK1 en dos grupos: RIPK1 bajo (azul) y RIPK1 alto (rojo). *, $p < 0.05$; prueba de Mann-Whitney.

En el caso de muestras IDHwt, observamos que la expresión de firmas genéticas de macrófagos y neutrófilos era mayor en muestras con niveles altos de expresión de RIPK1. En cuanto a la expresión de firmas genéticas de diferentes poblaciones linfocíticas, solo observamos un aumento en las células T de memoria. Sin embargo, observamos una disminución significativa en la expresión de firmas genéticas de células Treg en gliomas IDHwt con niveles altos de expresión de RIPK1 (figura 3.15).

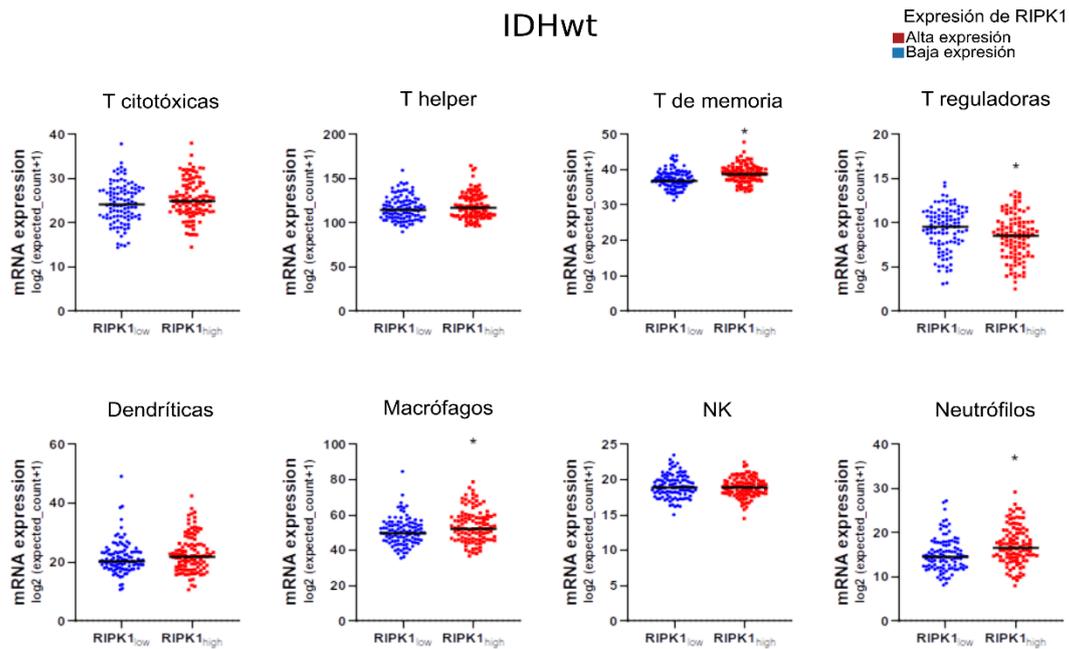


Figura 3.15. Meta-análisis de firmas génicas inmunes en biopsias de gliomas con IDHwt. Evaluamos las firmas génicas que caracterizan las poblaciones de células inmunes en datos transcriptómicos de biopsias de gliomas. Los pacientes fueron clasificados según los niveles de expresión del RNAm de RIPK1 en dos grupos: RIPK1 bajo (azul) y RIPK1 alto (rojo). * $p < 0.05$; prueba de Mann-Whitney.

Expresión de PRLR y supervivencia

En el marco de una colaboración con el grupo de Marianela Candolfi del Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED-UBA-CONICET) que busca caracterizar el rol del receptor de la PRL en GBM y desarrollar herramientas terapéuticas, nos propusimos complementar los estudios realizados por Asad y colaboradores [57] empleando la misma base de datos de pacientes que utilizamos para los estudios anteriores. Así, de manera análoga a lo que se realizó para el caso de RIPK1, las muestras se filtraron según el estado mutacional de IDH, mutada o *wild type*, antes de ser divididas según la expresión de PRLR. En nuestra base de datos, no se observaron diferencias significativas respecto a la probabilidad de supervivencia bajo condiciones de baja o alta expresión de PRLR tanto en las muestras con IDHm o IDHwt (figura 3.16).

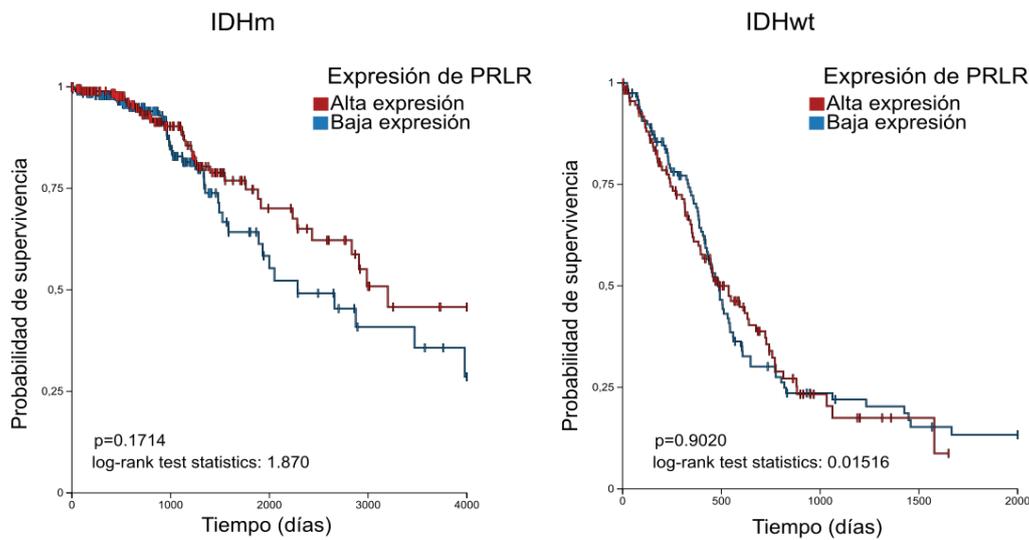


Figura 3.16. Gráficos de supervivencia. Las muestras de DG fueron filtradas de TCGA, y se evaluó la expresión de PRLR. En el análisis, las muestras se dividieron en dos grupos según la mediana de expresión: alta expresión de PRLR y baja expresión de PRLR y se trazó la supervivencia para cada grupo. Izquierda: muestras con IDHm, derecha: muestras de pacientes con IDHwt. Prueba de log-rank * $p < 0.05$.

Por otro lado, se evaluó la correlación entre la expresión de PRLR y el estado mutacional de IDH1. Los resultados demostraron un aumento significativo en la expresión de PRLR en muestras IDHwt respecto a las muestras IDHm (figura 3.17, A). Luego, se estudió la expresión de PRLR en muestras derivadas de pacientes con diferentes tipos histológicos de glioma. En este caso no se observaron diferencias significativas entre los subtipos histológicos respecto a la expresión de PRLR (figura 3.17.B).

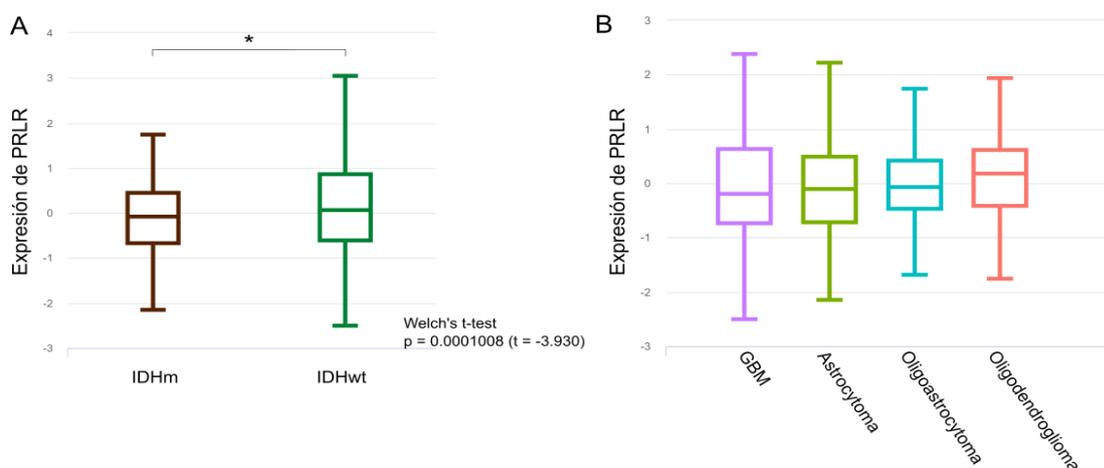


Figura 3.17. (A) Expresión diferencial de PRLR en gliomas IDHm e IDHwt. Prueba t de Welch. * $p < 0.05$. **(B)** Expresión diferencial de PRLR entre los subtipos de tumor DG. One-way Anova * $p < 0.05$.

Expresión de PRLR y proliferación

Para evaluar si existía o no correlación entre los niveles de expresión de PRLR y los genes involucrados en la proliferación, repetimos el análisis transcriptómico pero esta vez en condiciones de baja y alta expresión de PRLR. En el grupo de muestras IDHm, se observó una mayor expresión de 8 de los 21 genes estudiados (MAPK8, PIK3CA, MAP2K1, MAPK1, MAPK3, APC, GSK3B y KRAS) en el grupo de alta expresión de PRLR, mientras que 5 de estos genes (JUN, AKT1, AXIN1, NRAS y RAF1) estaban menos expresados en ese mismo grupo, el resto de los genes no presentó diferencias significativas entre los dos grupos. En el caso de las muestras IDHwt, 6 de los genes estudiados (MAPK8, MAP2K1, MAPK3, APC, AXIN2 y KRAS) presentaron mayor expresión en el grupo de alta expresión de PRLR mientras que se observaron niveles más bajos de AKT1, AXIN1, HRAS, NRAS y RAF1 en ese mismo grupo. El resto de los genes no presentó diferencias significativas entre los grupos de alta y baja expresión de PRLR. (figura 3.18).

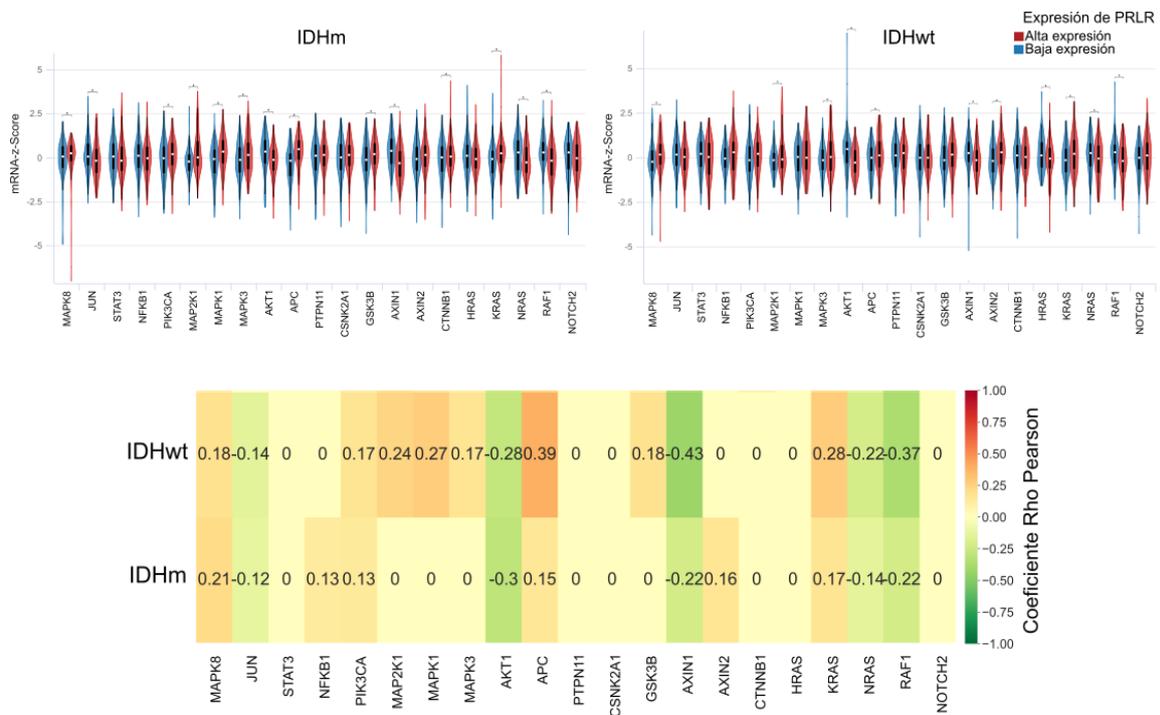


Figura 3.18. Análisis transcriptómico (TCGA) de proliferación. **(A)** Violin plot de la expresión (z-score) de genes involucrados en la respectiva vía bajo condiciones de alta y baja expresión de PRLR. Las muestras se clasificaron en tumores IDHm (izquierda) e IDHwt (derecha) y luego fueron graficadas. Prueba t de Welch * $p < 0.01$. **(B)** Correlación entre la expresión de PRLR y las proteínas involucradas en proliferación separadas en tumores IDHm e IDHwt. Los números en las celdas indican el índice de correlación de Pearson en comparaciones estadísticamente significativas.

Discusión

Los gliomas difusos son una colección heterogénea de tumores cerebrales. Son el tipo más común y mortal de tumores cerebrales malignos primarios [1,2]. En la actualidad, los gliomas en adultos suelen dividirse en dos grupos principales según el estado mutacional de los genes de la enzima isocitrato deshidrogenasa, IDH1 o IDH2. Los gliomas que poseen la IDH mutada suelen presentarse como tumores de grados histológicos más bajos y suelen relacionarse con un pronóstico más favorable [58], pero a menudo evolucionan hacia grados superiores. En contraste, los gliomas con IDH tipo *wild type* suelen presentarse como glioblastomas (GBM), los gliomas de grado IV más comunes y clínicamente más agresivos según la Organización Mundial de la Salud (OMS), con una supervivencia media de sólo 12 a 15 meses [59]. Los gliomas difusos están entre los cánceres más difíciles de tratar, con estrategias terapéuticas limitadas a alguna combinación que incluye la remoción quirúrgica, radioterapia o quimioterapia tradicional con pocas terapias dirigidas de limitada efectividad [60].

Aunque los gliomas están entre los tipos de tumores más caracterizados genéticamente gracias a los esfuerzos de consorcios de investigación multicéntricos como *The Genome Cancer Atlas* (TCGA), la última adición al repertorio de tratamientos fue el fármaco Temozolomida hace 23 años y que no ha logrado impactar significativamente en la supervivencia media de los pacientes [59]. En este contexto, los estudios transcriptómicos dirigidos a comprender la patogénesis de los gliomas adquieren una relevancia particular.

Aquí, realizamos un estudio exhaustivo transcriptómico utilizando bases de datos de pacientes (TCGA-LGGGBM [61]) con el objetivo de caracterizar, en primer lugar, el papel de la proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1 (RIPK1) en la patología de los DG. En una segunda instancia realizamos un análisis transcriptómico similar a partir de la misma base de datos para profundizar en el estudio del receptor de PRL. Ambos blancos de estudio se encuentran estrechamente relacionados con vías de señalización involucradas en la homeostasis tumoral como ser la muerte celular programada (PCD) y vías asociadas a la supervivencia y proliferación celular, respectivamente.

En cuanto a RIPK1, nuestros resultados mostraron que su expresión se correlaciona con un mal pronóstico en gliomas IDHwt pero no en gliomas IDHm, afectando la probabilidad de supervivencia. Estas diferencias entre los gliomas IDHwt y IDHm podrían deberse a diferentes mecanismos involucrados en la reprogramación celular reportada para tumores IDHm, así como en los perfiles diferenciales de infiltración inmunológica [4]. Estos resultados son consistentes con datos previamente reportados, ya que RIPK1 es un regulador principal de la necroptosis y

los genes asociados a la vía de la necroptosis son marcadores pronósticos desfavorables en el glioblastoma multiforme [62,63].

Además, observamos diferencias significativas al analizar los niveles de expresión de RIPK1 en relación con la clasificación histológica de los DG y su estado de mutación de IDH1. Esta información sugiere que en tumores más agresivos hay una mayor expresión de RIPK1. Además, observamos niveles más altos de expresión de RIPK1 en aquellos pacientes tratados previamente con radioterapia, sugiriendo que RIPK1 podría estar involucrado en algún mecanismo desencadenado en respuesta al tratamiento, como la inflamación inducida por la radioterapia [64]. De hecho, se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno conducen a la fosforilación de RIPK1 y al reclutamiento consecuente de RIPK3 al necrosoma [65]. Al mismo tiempo, MPhil *et al.* [66] informaron que el tratamiento con radioterapia induce una mayor activación de la piroptosis y, consecuentemente, más inflamación, lo cual es consistente con nuestros hallazgos.

Considerando que nuestros resultados muestran una fuerte correlación positiva entre RIPK1 y los genes involucrados en vías de muerte celular, especialmente piroptosis y necroptosis, junto con los obtenidos en relación con el pronóstico, podríamos inferir que la desregulación de algunas de estas vías podría contribuir a las menores probabilidades de supervivencia observadas en aquellos pacientes con alta expresión de RIPK1. Esto es consistente con los resultados previamente reportados por Lin *et al.* [67] y Chen *et al.* [63], en los que demuestran que una mayor activación de las vías de muerte celular inflamatoria se correlaciona con un peor pronóstico clínico.

Por otro lado, Melo-Lima y colaboradores [68] utilizaron inhibidores de la necroptosis como la necrostatina-1s (Nec-1s), un inhibidor de la actividad quinasa de RIPK1, para realizar ensayos preclínicos *in vitro*. El tratamiento con Edelfosina, que induce la muerte celular inflamatoria combinada con el inhibidor de RIPK1, produjo una reorientación de las vías de muerte, induciendo niveles más altos de apoptosis en células U118-MG.

En relación con la respuesta inmune, los resultados disponibles en la literatura son controvertidos, aunque muestran una clara diferencia en los perfiles observados para las muestras IDHwt e IDHm [69,70]. Con respecto a nuestros resultados, observamos que una mayor expresión de RIPK1 se correlaciona con una mayor infiltración inmune en ambos tipos de tumores, IDHm e IDHwt. Entre las muestras IDHm, el grupo con alta expresión de RIPK1 correlacionó con una mayor expresión de las firmas genéticas de células T *helper* y citotóxicas, células dendríticas, macrófagos, células NK y neutrófilos. Por otro lado, las muestras IDHwt con alta expresión de RIPK1 mostraron una mayor expresión de las firmas de macrófagos, neutrófilos y células T de memoria, mientras que las firmas genéticas de células Treg

y NK fueron significativamente más bajas que en los tumores con baja expresión de RIPK1. La acumulación de macrófagos y neutrófilos caracteriza la inflamación crónica no resuelta involucrada en el efecto protumoral del microambiente tumoral en glioma [71], y, por lo tanto, es coherente encontrar estas firmas génicas aumentadas en tumores con un pronóstico menos favorable como los gliomas IDHwt [72,73]. Estos resultados podrían explicar la correlación observada entre la expresión de RIPK1 y los subtipos de glioma más agresivos.

Es bien sabido que RIPK1 está involucrado en la respuesta inflamatoria y en la necroptosis [27,62,74]. Además, nuestro análisis demostró una mayor correlación con genes involucrados en la piroptosis. Varios estudios han demostrado que la piroptosis puede facilitar la infiltración de células inmunes en el microambiente tumoral [67,75]. En esta dirección, RIPK1 podría desempeñar un papel en el mantenimiento de la inflamación a través de la regulación de vías de muerte proinflamatorias y colaborar con la patogénesis del glioma.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el papel de PRL y su receptor en el desarrollo de tumores hormono-dependientes han sido ampliamente documentados [2,3]. Estas moléculas también han sido detectadas en biopsias de GBM [4–7]. Sin embargo, el papel de la vía de PRL en la progresión del GBM es aún poco conocido.

En sintonía con el análisis previo realizado por Asad y colaboradores [57], nuestro análisis *in silico* demostró que hay una mayor expresión del receptor de PRL en muestras con IDHwt en comparación con muestras IDHm, aunque no observamos diferencias significativas entre los distintos grados histológicos, ni en la supervivencia de los pacientes incluidos en nuestra base de datos. Una posible razón de estas diferencias encontradas podría deberse en primer lugar a que se trata de cohorte de pacientes distintas y a que, a diferencia del estudio realizado por Asad y colaboradores, no realizamos una estratificación según el sexo biológico de los pacientes.

En ese mismo trabajo, los autores [57] demostraron que la activación o sobreexpresión del receptor de prolactina (PRLR), mediante la transfección plasmídica en células de GBM, aumentaba la proliferación, viabilidad, clonogenicidad y quimio-resistencia *in vitro*.

En conjunto, nuestros resultados obtenidos a partir de este análisis transcriptómico exhaustivo sugieren que tanto RIPK1 como PRLR podrían desempeñar un papel importante en la progresión y en la patogénesis del glioma difuso. Si bien es necesario profundizar en el estudio de cada una de estas proteínas realizando ensayos experimentales que permitan validar nuestros hallazgos mediante análisis *in silico*, estos resultados sugieren que tanto RIPK1

como PRLR podrían ser propuestos como posibles blancos moleculares para el desarrollo de terapias específicas.

Referencias

1. Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Truitt, G.; Boscia, A.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology* **2018**, *20*, iv1–iv86, doi:10.1093/neuonc/noy131.
2. Ostrom, Q.T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. Corrigendum to: CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncology* **2022**, *24*, 1214–1214, doi:10.1093/neuonc/noaa269.
3. Wesseling, P.; Capper, D. WHO 2016 Classification of Gliomas. *Neuropathology Appl Neurobio* **2018**, *44*, 139–150, doi:10.1111/nan.12432.
4. Gonzalez, N.; Asad, A.S.; Gómez Escalante, J.; Peña Agudelo, J.A.; Nicola Candia, A.J.; García Fallit, M.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. Potential of IDH Mutations as Immunotherapeutic Targets in Gliomas: A Review and Meta-Analysis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2021**, *25*, 1045–1060, doi:10.1080/14728222.2021.2017422.
5. Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* **2007**, *114*, 97–109, doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
6. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol* **2016**, *131*, 803–820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
7. Reifenberger, G.; Wirsching, H.-G.; Knobbe-Thomsen, C.B.; Weller, M. Advances in the Molecular Genetics of Gliomas — Implications for Classification and Therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**, *14*, 434–452, doi:10.1038/nrclinonc.2016.204.
8. Masui, K.; Mischel, P.S.; Reifenberger, G. Molecular Classification of Gliomas. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2016; Vol. 134, pp. 97–120 ISBN 978-0-12-802997-8.
9. Koh, H.-J.; Lee, S.-M.; Son, B.-G.; Lee, S.-H.; Ryoo, Z.Y.; Chang, K.-T.; Park, J.-W.; Park, D.-C.; Song, B.J.; Veech, R.L.; et al. Cytosolic NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Plays a Key Role in Lipid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 39968–39974, doi:10.1074/jbc.M402260200.
10. Dang, L.; White, D.W.; Gross, S.; Bennett, B.D.; Bittinger, M.A.; Driggers, E.M.; Fantin, V.R.; Jang, H.G.; Jin, S.; Keenan, M.C.; et al. Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate. *Nature* **2009**, *462*, 739–744, doi:10.1038/nature08617.

11. Chowdhury, R.; Yeoh, K.K.; Tian, Y.; Hillringhaus, L.; Bagg, E.A.; Rose, N.R.; Leung, I.K.H.; Li, X.S.; Woon, E.C.Y.; Yang, M.; et al. The Oncometabolite 2-hydroxyglutarate Inhibits Histone Lysine Demethylases. *EMBO Reports* **2011**, *12*, 463–469, doi:10.1038/embor.2011.43.
12. Xu, W.; Yang, H.; Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Kim, S.-H.; Ito, S.; Yang, C.; Wang, P.; Xiao, M.-T.; et al. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 17–30, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014.
13. Paschka, P.; Schlenk, R.F.; Gaidzik, V.I.; Habdank, M.; Krönke, J.; Bullinger, L.; Späth, D.; Kayser, S.; Zucknick, M.; Götze, K.; et al. *IDH1* and *IDH2* Mutations Are Frequent Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia and Confer Adverse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia With *NPM1* Mutation Without *FLT3* Internal Tandem Duplication. *JCO* **2010**, *28*, 3636–3643, doi:10.1200/JCO.2010.28.3762.
14. Parsons, D.W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J.C.-H.; Leary, R.J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.-M.; Gallia, G.L.; et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **2008**, *321*, 1807–1812, doi:10.1126/science.1164382.
15. Noshmehr, H.; Weisenberger, D.J.; Diefes, K.; Phillips, H.S.; Pujara, K.; Berman, B.P.; Pan, F.; Pelloski, C.E.; Sulman, E.P.; Bhat, K.P.; et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype That Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 510–522, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017.
16. Han, S.; Liu, Y.; Cai, S.J.; Qian, M.; Ding, J.; Larion, M.; Gilbert, M.R.; Yang, C. IDH Mutation in Glioma: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 1580–1589, doi:10.1038/s41416-020-0814-x.
17. Bedoui, S.; Herold, M.J.; Strasser, A. Emerging Connectivity of Programmed Cell Death Pathways and Its Physiological Implications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 678–695, doi:10.1038/s41580-020-0270-8.
18. Green, D.R.; Oguin, T.H.; Martinez, J. The Clearance of Dying Cells: Table for Two. *Cell Death Differ* **2016**, *23*, 915–926, doi:10.1038/cdd.2015.172.
19. Li, M.; Wang, Z.-W.; Fang, L.-J.; Cheng, S.-Q.; Wang, X.; Liu, N.-F. Programmed Cell Death in Atherosclerosis and Vascular Calcification. *Cell Death Dis* **2022**, *13*, 467, doi:10.1038/s41419-022-04923-5.
20. Samir, P.; Malireddi, R.K.S.; Kanneganti, T.-D. The PANoptosome: A Deadly Protein Complex Driving Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 238, doi:10.3389/fcimb.2020.00238.
21. Malireddi, R.K.S.; Tweedell, R.E.; Kanneganti, T.-D. PANoptosis Components, Regulation, and Implications. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 11163–11164, doi:10.18632/aging.103528.
22. Gao, J.; Xiong, A.; Liu, J.; Li, X.; Wang, J.; Zhang, L.; Liu, Y.; Xiong, Y.; Li, G.; He, X. PANoptosis: Bridging Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis in Cancer Progression and Treatment. *Cancer Gene Ther* **2024**, doi:10.1038/s41417-024-00765-9.

23. Tong, X.; Tang, R.; Xiao, M.; Xu, J.; Wang, W.; Zhang, B.; Liu, J.; Yu, X.; Shi, S. Targeting Cell Death Pathways for Cancer Therapy: Recent Developments in Necroptosis, Pyroptosis, Ferroptosis, and Cuproptosis Research. *J Hematol Oncol* **2022**, *15*, 174, doi:10.1186/s13045-022-01392-3.
24. Yu, P.; Zhang, X.; Liu, N.; Tang, L.; Peng, C.; Chen, X. Pyroptosis: Mechanisms and Diseases. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 128, doi:10.1038/s41392-021-00507-5.
25. Yuan, J.; Amin, P.; Ofengeim, D. Necroptosis and RIPK1-Mediated Neuroinflammation in CNS Diseases. *Nat Rev Neurosci* **2019**, *20*, 19–33, doi:10.1038/s41583-018-0093-1.
26. Ofengeim, D.; Yuan, J. Regulation of RIP1 Kinase Signalling at the Crossroads of Inflammation and Cell Death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, *14*, 727–736, doi:10.1038/nrm3683.
27. Mifflin, L.; Ofengeim, D.; Yuan, J. Receptor-Interacting Protein Kinase 1 (RIPK1) as a Therapeutic Target. *Nat Rev Drug Discov* **2020**, *19*, 553–571, doi:10.1038/s41573-020-0071-y.
28. Li, W.; Yuan, J. Targeting RIPK1 Kinase for Modulating Inflammation in Human Diseases. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1159743, doi:10.3389/fimmu.2023.1159743.
29. Degtarev, A.; Hitomi, J.; Germscheid, M.; Ch'en, I.L.; Korkina, O.; Teng, X.; Abbott, D.; Cuny, G.D.; Yuan, C.; Wagner, G.; et al. Identification of RIP1 Kinase as a Specific Cellular Target of Necrostatins. *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 313–321, doi:10.1038/nchembio.83.
30. Seehawer, M.; Heinzmann, F.; D'Artista, L.; Harbig, J.; Roux, P.-F.; Hoenicke, L.; Dang, H.; Klotz, S.; Robinson, L.; Doré, G.; et al. Necroptosis Microenvironment Directs Lineage Commitment in Liver Cancer. *Nature* **2018**, *562*, 69–75, doi:10.1038/s41586-018-0519-y.
31. Stoll, G.; Ma, Y.; Yang, H.; Kepp, O.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Pro-Necrotic Molecules Impact Local Immunosurveillance in Human Breast Cancer. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1299302, doi:10.1080/2162402X.2017.1299302.
32. Strilic, B.; Yang, L.; Albarrán-Juárez, J.; Wachsmuth, L.; Han, K.; Müller, U.C.; Pasparakis, M.; Offermanns, S. Tumour-Cell-Induced Endothelial Cell Necroptosis via Death Receptor 6 Promotes Metastasis. *Nature* **2016**, *536*, 215–218, doi:10.1038/nature19076.
33. McCormick, K.D.; Ghosh, A.; Trivedi, S.; Wang, L.; Coyne, C.B.; Ferris, R.L.; Sarkar, S.N. Innate Immune Signaling through Differential RIPK1 Expression Promote Tumor Progression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Carcinogenesis* **2016**, *37*, 522–529, doi:10.1093/carcin/bgw032.
34. Park, S.; Hatanpaa, K.J.; Xie, Y.; Mickey, B.E.; Madden, C.J.; Raisanen, J.M.; Ramnarain, D.B.; Xiao, G.; Saha, D.; Boothman, D.A.; et al. The Receptor Interacting Protein 1 Inhibits P53 Induction through NF-kappaB Activation and Confers a Worse Prognosis in Glioblastoma. *Cancer Res* **2009**, *69*, 2809–2816, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4079.

35. Höckendorf, U.; Yabal, M.; Herold, T.; Munkhbaatar, E.; Rott, S.; Jilg, S.; Kauschinger, J.; Magnani, G.; Reisinger, F.; Heuser, M.; et al. RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 75–91, doi:10.1016/j.ccell.2016.06.002.
36. Feng, X.; Song, Q.; Yu, A.; Tang, H.; Peng, Z.; Wang, X. Receptor-Interacting Protein Kinase 3 Is a Predictor of Survival and Plays a Tumor Suppressive Role in Colorectal Cancer. *Neoplasma* **2015**, *62*, 592–601, doi:10.4149/neo_2015_071.
37. Fulda, S. Therapeutic Exploitation of Necroptosis for Cancer Therapy. *Semin Cell Dev Biol* **2014**, *35*, 51–56, doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.002.
38. Gong, Y.; Fan, Z.; Luo, G.; Yang, C.; Huang, Q.; Fan, K.; Cheng, H.; Jin, K.; Ni, Q.; Yu, X.; et al. The Role of Necroptosis in Cancer Biology and Therapy. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 100, doi:10.1186/s12943-019-1029-8.
39. Sethi, B.K.; Chanukya, G.V.; Nagesh, V.S. Prolactin and Cancer: Has the Orphan Finally Found a Home? *Indian J Endocrinol Metab* **2012**, *16*, S195-198, doi:10.4103/2230-8210.104038.
40. Goffin, V. Prolactin Receptor Targeting in Breast and Prostate Cancers: New Insights into an Old Challenge. *Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *179*, 111–126, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.009.
41. Struman, I.; Bentzien, F.; Lee, H.; Mainfroid, V.; D'Angelo, G.; Goffin, V.; Weiner, R.I.; Martial, J.A. Opposing Actions of Intact and N-Terminal Fragments of the Human Prolactin/Growth Hormone Family Members on Angiogenesis: An Efficient Mechanism for the Regulation of Angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96*, 1246–1251.
42. Goldhar, A.S.; Vonderhaar, B.K.; Trott, J.F.; Hovey, R.C. Prolactin-Induced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor via Egr-1. *Mol Cell Endocrinol* **2005**, *232*, 9–19, doi:10.1016/j.mce.2005.01.005.
43. Reuwer, A.; Nowak-Sliwinska, P.; Mans, L.; Loos, C.; von der Thüsen, J.; Th, M.; Twickler, M.; Spek, C.; Goffin, V.; Griffioen, A.; et al. Functional Consequences of Prolactin Signalling in Endothelial Cells: A Potential Link with Angiogenesis in Pathophysiology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2011**, *16*.
44. Howell, S.J.; Anderson, E.; Hunter, T.; Farnie, G.; Clarke, R.B. Prolactin Receptor Antagonism Reduces the Clonogenic Capacity of Breast Cancer Cells and Potentiates Doxorubicin and Paclitaxel Cytotoxicity. *Breast Cancer Res* **2008**, *10*, R68, doi:10.1186/bcr2129.
45. LaPensee, E.W.; Schwemberger, S.J.; LaPensee, C.R.; Bahassi, E.M.; Afton, S.E.; Ben-Jonathan, N. Prolactin Confers Resistance against Cisplatin in Breast Cancer Cells by Activating Glutathione-S-Transferase. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1298–1304, doi:10.1093/carcin/bgp120.
46. Clevenger, C.V.; Gadd, S.L.; Zheng, J. New Mechanisms for PRLr Action in Breast Cancer. *Trends Endocrinol Metab* **2009**, *20*, 223–229, doi:10.1016/j.tem.2009.03.001.

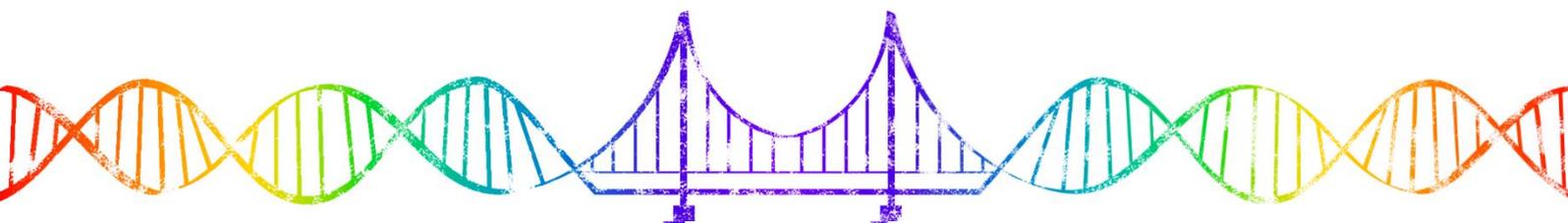
47. Mendes, G.A.; Pereira-Lima, J.F.S.; Kohek, M.B.; Trott, G.; Di Domenico, M.; Ferreira, N.P.; Oliveira, M.D.C. Prolactin Gene Expression in Primary Central Nervous System Tumors. *J Negat Results BioMed* **2013**, *12*, 4, doi:10.1186/1477-5751-12-4.
48. Abech, D.M.D.; Pereira-Lima, J.F.S.; Leães, C.G.S.; Meurer, R.T.; Barbosa-Coutinho, L.M.; Ferreira, N.P.; Oliveira, M.C. Cell Replication and Angiogenesis in Central Nervous System Tumors and Their Relationship with the Expression of Tissue Prolactin and Hyperprolactinemia. *Open Journal of Pathology* **2012**, *2*, 50–57, doi:10.4236/ojpathology.2012.23011.
49. Alkharusi, A.; Yu, S.; Landázuri, N.; Zadjali, F.; Davodi, B.; Nyström, T.; Gräslund, T.; Rahbar, A.; Norstedt, G. Stimulation of Prolactin Receptor Induces STAT-5 Phosphorylation and Cellular Invasion in Glioblastoma Multiforme. *Oncotarget* **2016**, *7*, 79572–79583, doi:10.18632/oncotarget.12840.
50. Ciccarelli, E.; Razzore, P.; Gaia, D.; Todaro, C.; Longo, A.; Forni, M.; Ghè, C.; Camanni, F.; Muccioli, G.; Faccani, G.; et al. Hyperprolactinaemia and Prolactin Binding in Benign Intracranial Tumours. *J Neurosurg Sci* **2001**, *45*, 70–74.
51. Sreekanthreddy, P.; Srinivasan, H.; Kumar, D.M.; Nijaguna, M.B.; Sridevi, S.; Vrinda, M.; Arivazhagan, A.; Balasubramaniam, A.; Hegde, A.S.; Chandramouli, B.A.; et al. Identification of Potential Serum Biomarkers of Glioblastoma: Serum Osteopontin Levels Correlate with Poor Prognosis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2010**, *19*, 1409–1422, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1077.
52. Oliveira-Ferrer, L.; Wellbrock, J.; Bartsch, U.; Penas, E.M.M.; Hauschild, J.; Klokow, M.; Bokemeyer, C.; Fiedler, W.; Schuch, G. Combination Therapy Targeting Integrins Reduces Glioblastoma Tumor Growth through Antiangiogenic and Direct Antitumor Activity and Leads to Activation of the Pro-Proliferative Prolactin Pathway. *Mol Cancer* **2013**, *12*, 144, doi:10.1186/1476-4598-12-144.
53. Goldman, M.J.; Craft, B.; Hastie, M.; Repečka, K.; McDade, F.; Kamath, A.; Banerjee, A.; Luo, Y.; Rogers, D.; Brooks, A.N.; et al. Visualizing and Interpreting Cancer Genomics Data via the Xena Platform. *Nat Biotechnol* **2020**, *38*, 675–678, doi:10.1038/s41587-020-0546-8.
54. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology* **2019**, *29*, 212–226, doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001.
55. Melaiu, O.; Chierici, M.; Lucarini, V.; Jurman, G.; Conti, L.A.; De Vito, R.; Boldrini, R.; Cifaldi, L.; Castellano, A.; Furlanello, C.; et al. Cellular and Gene Signatures of Tumor-Infiltrating Dendritic Cells and Natural-Killer Cells Predict Prognosis of Neuroblastoma. *Nat Commun* **2020**, *11*, 5992, doi:10.1038/s41467-020-19781-y.
56. Bindea, G.; Mlecnik, B.; Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Waldner, M.; Obenauf, A.C.; Angell, H.; Fredriksen, T.; Lafontaine, L.; Berger, A.; et al. Spatiotemporal

- Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* **2013**, *39*, 782–795, doi:10.1016/j.immuni.2013.10.003.
57. Asad, A.S.; Nicola Candia, A.J.; Gonzalez, N.; Zuccato, C.F.; Abt, A.; Orrillo, S.J.; Lastra, Y.; De Simone, E.; Boutillon, F.; Goffin, V.; et al. Prolactin and Its Receptor as Therapeutic Targets in Glioblastoma Multiforme. *Sci Rep* **2019**, *9*, 19578, doi:10.1038/s41598-019-55860-x.
 58. Franceschi, E.; Tosoni, A.; Bartolini, S.; Minichillo, S.; Mura, A.; Asioli, S.; Bartolini, D.; Gardiman, M.; Gessi, M.; Ghimenton, C.; et al. Histopathological Grading Affects Survival in Patients with IDH-Mutant Grade II and Grade III Diffuse Gliomas. *Eur J Cancer* **2020**, *137*, 10–17, doi:10.1016/j.ejca.2020.06.018.
 59. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 987–996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
 60. Weller, M.; Wick, W.; Aldape, K.; Brada, M.; Berger, M.; Pfister, S.M.; Nishikawa, R.; Rosenthal, M.; Wen, P.Y.; Stupp, R.; et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15017, doi:10.1038/nrdp.2015.17.
 61. Ceccarelli, M.; Barthel, F.P.; Malta, T.M.; Sabedot, T.S.; Salama, S.R.; Murray, B.A.; Morozova, O.; Newton, Y.; Radenbaugh, A.; Pagnotta, S.M.; et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **2016**, *164*, 550–563, doi:10.1016/j.cell.2015.12.028.
 62. Dong, Y.; Sun, Y.; Huang, Y.; Dwarakanath, B.; Kong, L.; Lu, J.J. Upregulated Necroptosis-Pathway-Associated Genes Are Unfavorable Prognostic Markers in Low-Grade Glioma and Glioblastoma Multiforme. *Transl. Cancer Res* **2019**, *8*, 821–827, doi:10.21037/tcr.2019.05.01.
 63. Zhou, Z.; Xu, J.; Huang, N.; Tang, J.; Ma, P.; Cheng, Y. Clinical and Biological Significance of a Necroptosis-Related Gene Signature in Glioma. *Front Oncol* **2022**, *12*, 855434, doi:10.3389/fonc.2022.855434.
 64. Tabatabaei, P.; Visse, E.; Bergström, P.; Brännström, T.; Siesjö, P.; Bergenheim, A.T. Radiotherapy Induces an Immediate Inflammatory Reaction in Malignant Glioma: A Clinical Microdialysis Study. *J Neurooncol* **2017**, *131*, 83–92, doi:10.1007/s11060-016-2271-1.
 65. Zhang, Y.; Su, S.S.; Zhao, S.; Yang, Z.; Zhong, C.-Q.; Chen, X.; Cai, Q.; Yang, Z.-H.; Huang, D.; Wu, R.; et al. RIP1 Autophosphorylation Is Promoted by Mitochondrial ROS and Is Essential for RIP3 Recruitment into Necrosome. *Nat Commun* **2017**, *8*, 14329, doi:10.1038/ncomms14329.
 66. Cao, W.; Chen, G.; Wu, L.; Yu, K.N.; Sun, M.; Yang, M.; Jiang, Y.; Jiang, Y.; Xu, Y.; Peng, S.; et al. Ionizing Radiation Triggers the Antitumor Immunity by Inducing Gasdermin E-Mediated Pyroptosis in Tumor Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2023**, *115*, 440–452, doi:10.1016/j.ijrobp.2022.07.1841.

67. Lin, J.; Lai, X.; Liu, X.; Yan, H.; Wu, C. Pyroptosis in Glioblastoma: A Crucial Regulator of the Tumour Immune Microenvironment and a Predictor of Prognosis. *J Cell Mol Med* **2022**, *26*, 1579–1593, doi:10.1111/jcmm.17200.
68. Melo-Lima, S.; Celeste Lopes, M.; Mollinedo, F. Necroptosis Is Associated with Low Procaspase-8 and Active RIPK1 and -3 in Human Glioma Cells. *Oncoscience* **2014**, *1*, 649–664, doi:10.18632/oncoscience.89.
69. Luoto, S.; Hermelo, I.; Vuorinen, E.M.; Hannus, P.; Kesseli, J.; Nykter, M.; Granberg, K.J. Computational Characterization of Suppressive Immune Microenvironments in Glioblastoma. *Cancer Res* **2018**, *78*, 5574–5585, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3714.
70. Sørensen, M.D.; Dahlrot, R.H.; Boldt, H.B.; Hansen, S.; Kristensen, B.W. Tumour-Associated Microglia/Macrophages Predict Poor Prognosis in High-Grade Gliomas and Correlate with an Aggressive Tumour Subtype. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2018**, *44*, 185–206, doi:10.1111/nan.12428.
71. Chimal-Ramírez, G.K.; Espinoza-Sánchez, N.A.; Fuentes-Pananá, E.M. Protumor Activities of the Immune Response: Insights in the Mechanisms of Immunological Shift, Oncotraining, and Oncopromotion. *J Oncol* **2013**, *2013*, 835956, doi:10.1155/2013/835956.
72. Cheng, W.; Ren, X.; Zhang, C.; Cai, J.; Liu, Y.; Han, S.; Wu, A. Bioinformatic Profiling Identifies an Immune-Related Risk Signature for Glioblastoma. *Neurology* **2016**, *86*, 2226–2234, doi:10.1212/WNL.0000000000002770.
73. Marinari, E.; Allard, M.; Gustave, R.; Widmer, V.; Philippin, G.; Merkler, D.; Tsantoulis, P.; Dutoit, V.; Dietrich, P.-Y. Inflammation and Lymphocyte Infiltration Are Associated with Shorter Survival in Patients with High-Grade Glioma. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1779990, doi:10.1080/2162402X.2020.1779990.
74. Jouan-Lanhouet, S.; Riquet, F.; Duprez, L.; Vanden Berghe, T.; Takahashi, N.; Vandenabeele, P. Necroptosis, in Vivo Detection in Experimental Disease Models. *Semin Cell Dev Biol* **2014**, *35*, 2–13, doi:10.1016/j.semcd.2014.08.010.
75. Zheng, J.; Zhou, Z.; Qiu, Y.; Wang, M.; Yu, H.; Wu, Z.; Wang, X.; Jiang, X. A Pyroptosis-Related Gene Prognostic Index Correlated with Survival and Immune Microenvironment in Glioma. *JIR* **2022**, *Volume 15*, 17–32, doi:10.2147/JIR.S341774.

Capítulo 4.

Generación de recBV con
aplicación terapéutica contra GBM
y validación pre-clínica *in vitro*



Capítulo 4. Generación de recBV con aplicación terapéutica contra GBM y validación pre-clínica *in vitro*.

Introducción

Terapia combinada contra el cáncer

Los cánceres son enfermedades complejas que involucran múltiples vías y su progresión está marcada por la acumulación de numerosas mutaciones sucesivas en una línea de células. Además, dado que las mutaciones favorables para la supervivencia de las células tumorales son seleccionadas a medida que progresa la terapia, el tratamiento de tumores a menudo presenta desafíos como la resistencia intrínseca y adquirida a los agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, la inhibición de una vía a través del uso de un solo medicamento puede ser insuficiente para lograr la regresión del tumor. En la quimioterapia combinada, se utiliza el efecto sinérgico de dos (o más) agentes que apuntan a diferentes vías de señalización relevantes para el desarrollo de la enfermedad, incluyendo genes o puntos de control del ciclo celular, genes involucrados en la apoptosis u otros tipos de muerte celular programada, etc. La combinación de quimioterapéuticos permite a los oncólogos, a su vez, utilizar los medicamentos a dosis más bajas, reduciendo los efectos citotóxicos pero aumentando la eficacia, y por lo tanto, presenta un enfoque prometedor para la investigación del cáncer y su tratamiento [1].

Como se mencionó anteriormente, el glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor del sistema nervioso central más letal debido a su naturaleza infiltrativa difusa. Esta característica que conduce a una resección quirúrgica incompleta se combina con su capacidad para desarrollar fácilmente resistencia a los medicamentos. Algunas de las limitaciones en el tratamiento del GBM incluyen el crecimiento invasivo del tumor en un órgano esencial, lo que limita la utilidad de la terapia local, así como la protección de las células tumorales por la barrera hematoencefálica, su resistencia intrínseca a la inducción de la muerte celular y la falta de dependencia de vías oncogénicas únicas y dirigibles, lo que impone grandes desafíos para la terapia sistémica [2].

La temozolomida (TMZ), un agente alquilante de la familia de las imidazotetrazinas es el agente quimioterapéutico de primera línea más popular en el tratamiento del GBM. El estándar de atención incluye el uso de TMZ sumado a la radioterapia, luego de la remoción quirúrgica [3]. Sin embargo, la efectividad de este régimen de tratamiento sigue siendo baja. Se ha descrito que este quimioterápico de administración oral es capaz de generar daños en el DNA, como DSB (*“Double Strand Break”*), conduciendo a la activación de la apoptosis intrínseca mediante la

activación de las caspasas 9 y 3 (figura 4.1). Si bien en algunos tipos celulares se ha reportado la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el mecanismo preponderante en esos casos sigue siendo ese tipo de muerte celular.

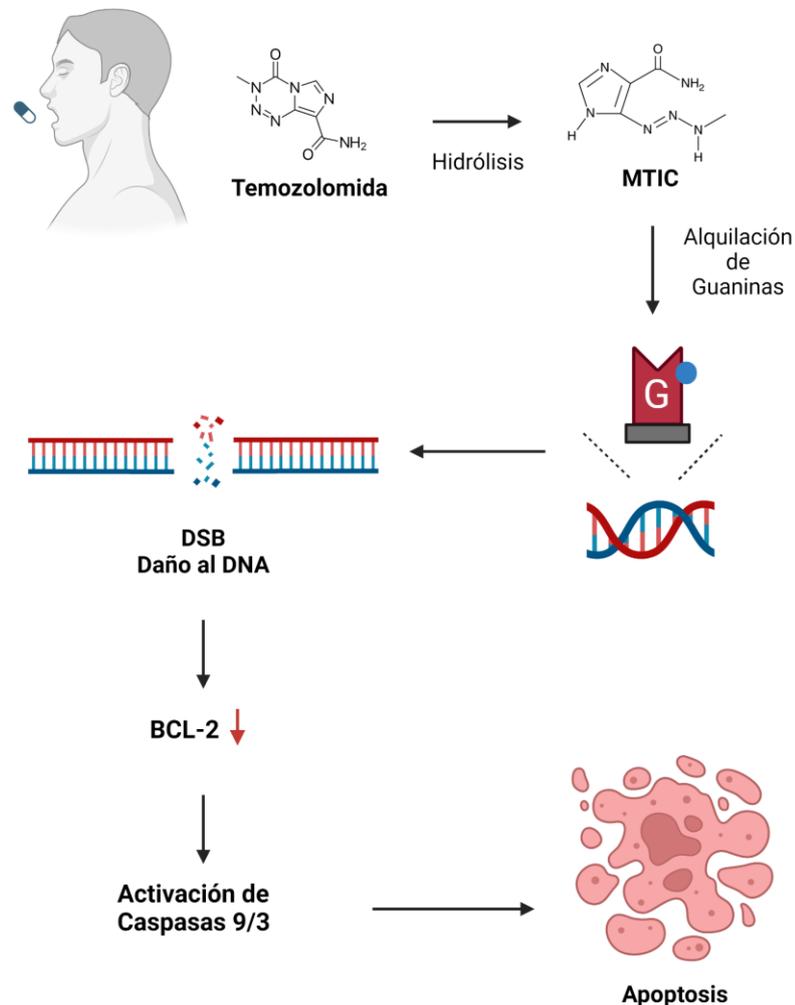


Figura 4.1. Mecanismo de acción de la Temozolomida (TMZ) y otros agentes alquilantes. Figura realizada con Biorender.com.

El cisplatino (CDDP), por su parte, es un medicamento anticancerígeno comúnmente utilizado en la práctica clínica y aprobado para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluido el GBM. Se ha demostrado, que cuando se combina con TMZ, el CDDP ofrece potencial para la quimioterapia combinada contra el GBM. Dado que los mecanismos patogénicos del GBM son complejos e involucran múltiples vías moleculares, la terapia combinada con dos o más estrategias que suprimen la proliferación de células tumorales al dirigirse a múltiples vías patogénicas es una estrategia atractiva para abordar el desafío de la resistencia a los medicamentos [4]. En cuanto a su mecanismo de acción, el cisplatino también genera daños en el DNA, principalmente a través del estancamiento de la DNApol durante la replicación y la inhibición de los mecanismos de reparación (figura 4.2A).

Sin embargo, se ha reportado que este quimioterápico produce altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) induciendo vías de muerte celular programada con carácter más inflamatorio como la necroptosis o la necrosis misma (figura 4.2B).

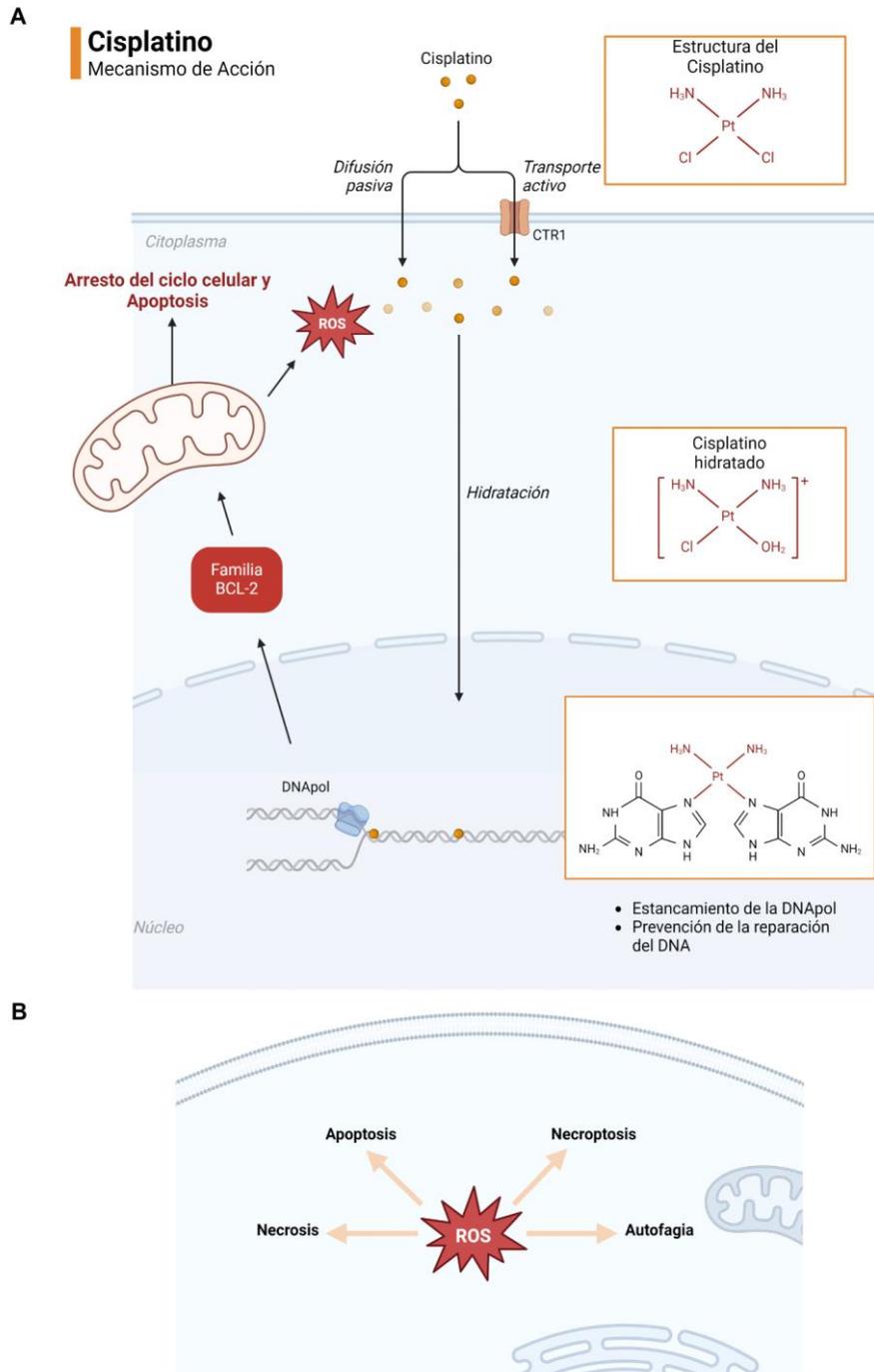


Figura 4.2. Mecanismo de acción del cisplatino (CDDP). Figura realizada con Biorender.com

Sin embargo, el pronóstico de los pacientes con GBM prácticamente no ha cambiado incluso cuando se suministraron diferentes fármacos de forma combinada.

La terapia génica surge como una buena alternativa ya que permite que los transgenes terapéuticos se expresen localmente en el área adyacente a la masa tumoral principal después de la remoción por cirugía [5] a partir de la administración local de vectores de terapia génica. Entre los vectores más utilizados se encuentran los vectores adenovirales (AdV) y los retrovirales. Los AdV se han evaluado ampliamente en ensayos clínicos con pacientes con GBM, y han mostrado buena eficiencia de transducción y perfil toxicológico [6,7]. En ese sentido, esquemas terapéuticos que contemplen la combinación de la terapia génica con las terapias convencionales toman particular interés (figura 4.3). En última instancia, haciendo uso de la versatilidad intrínseca de la terapia génica, se podrían diseñar vectores con la capacidad de atacar aquellas células tumorales resistentes a las terapias convencionales disminuyendo o evitando incluso la recurrencia del tumor.

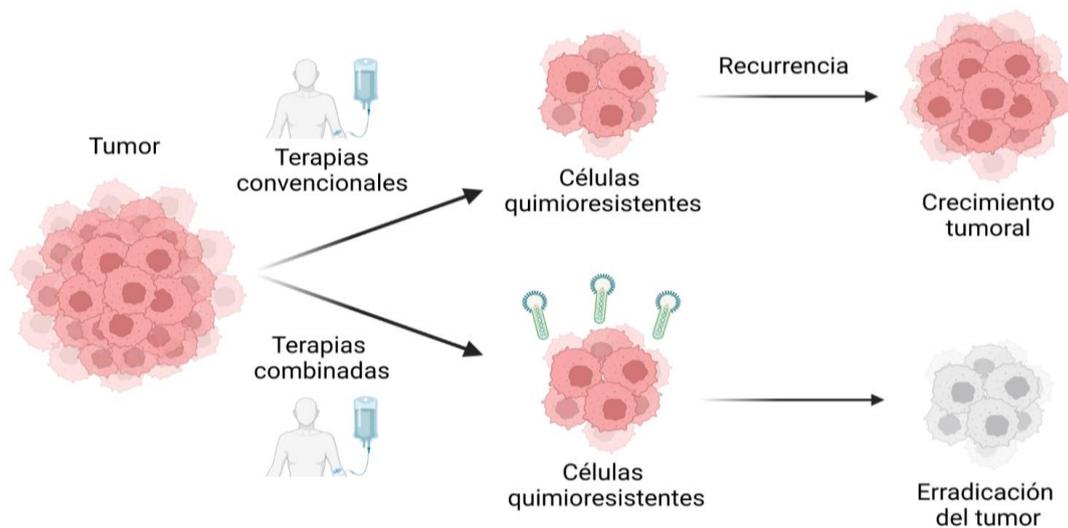


Figura 4.3. Representación esquemática del potencial de la combinación de la terapia génica con las terapias convencionales para evitar el surgimiento de resistencia y la recurrencia tumoral.

RIPK1: regulador de la supervivencia celular, la inflamación y la muerte

Como se mencionó anteriormente, la proteína serina/treonina quinasa asociada a receptor 1 (RIPK1) es considerada como un regulador maestro de la decisión celular entre la señalización pro-supervivencia NF- κ B y la muerte celular en respuesta a un amplio conjunto de estímulos inflamatorios [8–10].

En particular, se encuentra ampliamente descrito que RIPK1 puede mediar las diferentes vías de inflamación, proliferación (complejo I), necroptosis (complejo IIb)

y apoptosis (complejo IIa) frente a diferentes estímulos como por ejemplo TNF- α (figura 4.4).

En algunos tipos de cáncer, como el cáncer de ovario [11], se ha observado que RIPK1 tiene un rol pro-proliferativo estimulando la progresión tumoral. Sin embargo, al tratar estos tumores con cisplatino, RIPK1 media la muerte celular programada inducida por ese quimioterápico.

Aunque en GBM el rol de RIPK1 se encuentra caracterizado de forma parcial, se ha observado que RIPK1 es un marcador asociado a mal pronóstico, así como el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) [12,13]. En ese sentido, también se ha observado que el TNF- α secretado por macrófagos asociados a gliomas promueve la activación endotelial y la progresión tumoral. Además, la activación de la vía mediada por TNF- α promueve el surgimiento de resistencia contra la terapia antiangiogénica [14].

La regulación de la actividad y de los niveles de ubiquitinación y/o fosforilación de RIPK1 parece ser crucial para la decisión celular entre la supervivencia o la muerte. Contar con herramientas moleculares que permitan regular la actividad, o directamente, los niveles de expresión de RIPK1 parece ser un punto importante para el diseño y desarrollo de nuevas terapias.

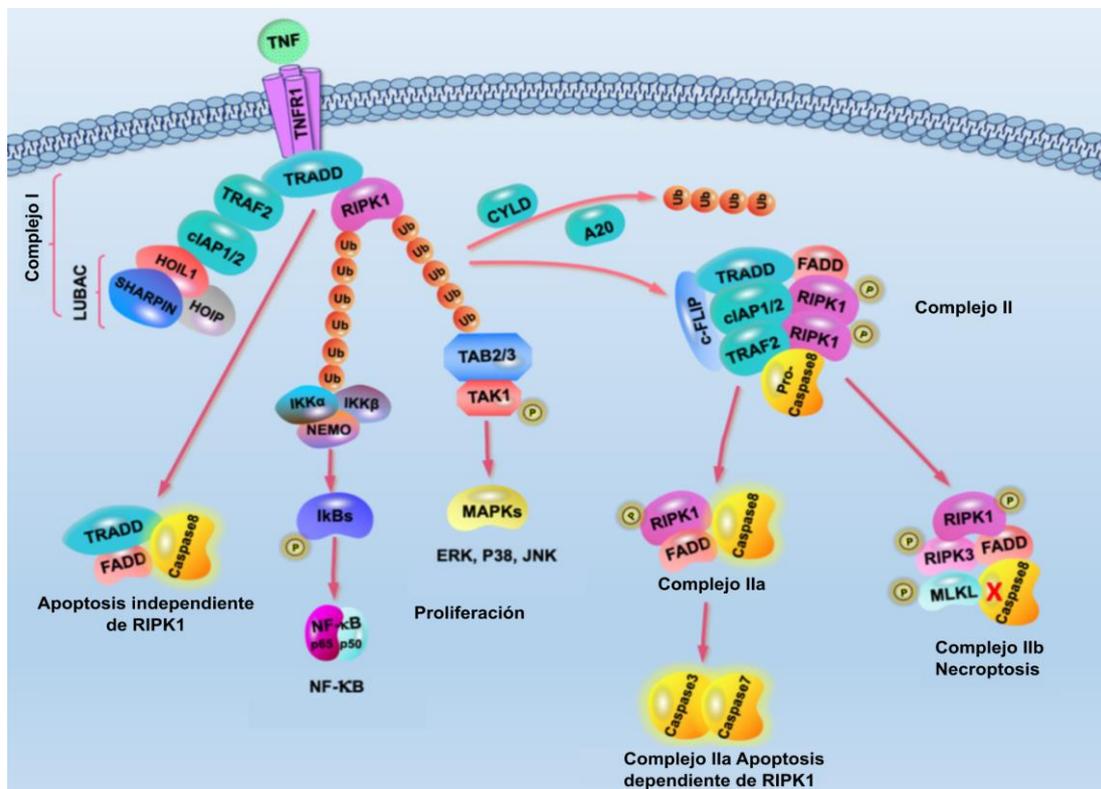


Figura 4.4. Representación esquemática de las vías inducidas por RIPK1 mediadas por TNF. RIPK1 induce las vías de inflamación y proliferación, mediadas por NF- κ B, necroptosis y apoptosis. Imagen adaptada de Wang et. al. [15].

Inhibidores de RIPK1

Diversas enfermedades como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas y algunos cánceres se han relacionado con las vías mediadas por RIPK1, llamando la atención de diferentes investigadores. La posibilidad de inhibir la actividad de RIPK1 ha cobrado particular relevancia, surgiendo primeramente la Necrostatina-1, un inhibidor natural de la necroptosis, como un potencial agente terapéutico para tal fin [16]. Asimismo, han surgido otros inhibidores de RIPK1 basados en pequeñas moléculas, que presentan alta precisión y una buena penetrabilidad. Entre ellos, el inhibidor GSK2982772, desarrollado por GlaxoSmithKline (GSK), se convirtió en el primer inhibidor de RIPK1 aprobado para investigación clínica en el mundo en 2014 [17]. El inhibidor GSK2982772 se une a un bolsillo alostérico del dominio quinasa de RIPK1, impidiendo la dimerización de la proteína y es un potente inhibidor de la muerte celular mediada por RIPK1 y la producción de las citoquinas asociadas en modelos preclínicos [18].

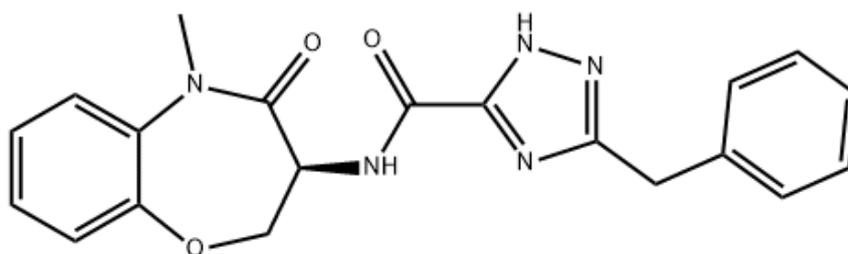


Figura 4.5. Estructura química del inhibidor GSK2982772, desarrollado por GlaxoSmithKline.

Short hairpin RNA (shRNA) para el silenciamiento de genes

El silenciamiento mediado por RNA de interferencia (RNAi) es una herramienta valiosa que permite regular negativamente y de forma selectiva la expresión de proteínas y péptidos [19]. El mecanismo de acción de los RNAi consiste principalmente en una función de silenciamiento post-transcripcional altamente conservada mediada por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). El silenciamiento de un gen determinado puede obtenerse de dos formas: (i) utilizando directamente moléculas de dsRNA que por algún método son introducidas en el interior de las células (siRNA) o bien (ii) utilizando moléculas de DNA que codifiquen para una molécula pequeña de RNA con estructura secundaria de horquilla, *short hairpin* RNA (shRNA), y de este modo la especie de RNA capaz de mediar el silenciamiento se expresa directamente en el interior de la célula.

Sin embargo, el campo del shRNA todavía enfrenta muchos desafíos. La insatisfactoria eficacia de *knockdown* y el aumento de los efectos *off-target* continúan obstaculizando sus aplicaciones, a menudo debido a fallas en el diseño.

Por lo tanto, para llevar adelante la expresión de un shRNA es necesario diseñar de forma meticulosa el shRNA y el vector que será utilizado para vehiculizarlo [20,21]. En primer lugar, es necesario elegir un promotor adecuado que controle la transcripción. El promotor más utilizado es el promotor U6 que es reconocido por la RNA polimerasa III. Dicha RNA polimerasa es la encargada de sintetizar moléculas de RNA pequeños en la célula y diversos trabajos han demostrado que es muy eficiente en la transcripción de shRNA. Un shRNA típico se encuentra conformado por una región de doble cadena de entre 19 y 25 bp complementarios con la secuencia *target*, conectados entre sí por un loop simple cadena de entre 5 y 10 bases. Finalmente, la construcción del vector debe incorporar una secuencia terminadora de la transcripción que sea reconocida por la RNA polimerasa III. Una vez expresado el shRNA, la molécula de dsRNA resultante sigue el camino de maduración característico de los miRNA y de este modo es capaz de llevar adelante su función regulatoria (figura 4.6).

En paralelo con el descubrimiento de los RNAi, los microRNA (miRNAs) fueron identificados como una clase abundante de pequeñas moléculas de RNA no codificante (de alrededor de 22 nt) que son altamente conservadas entre especies y que pueden regular negativamente la expresión de genes. Los miRNA son transcritos desde el genoma en transcritos primarios (pri-miRNA) y procesados en precursores (pre-miRNA) y miRNA maduros por dos nucleasas de la familia RNasa-III, Drosha y Dicer, respectivamente. Basado en el grado de complementariedad entre el miRNA y su mRNA *target*, el miRNAs puede inducir el clivaje directo del mRNA o iniciar un proceso mucho más largo caracterizado por una represión traslacional y una posterior represión a través de la degradación del mRNA.

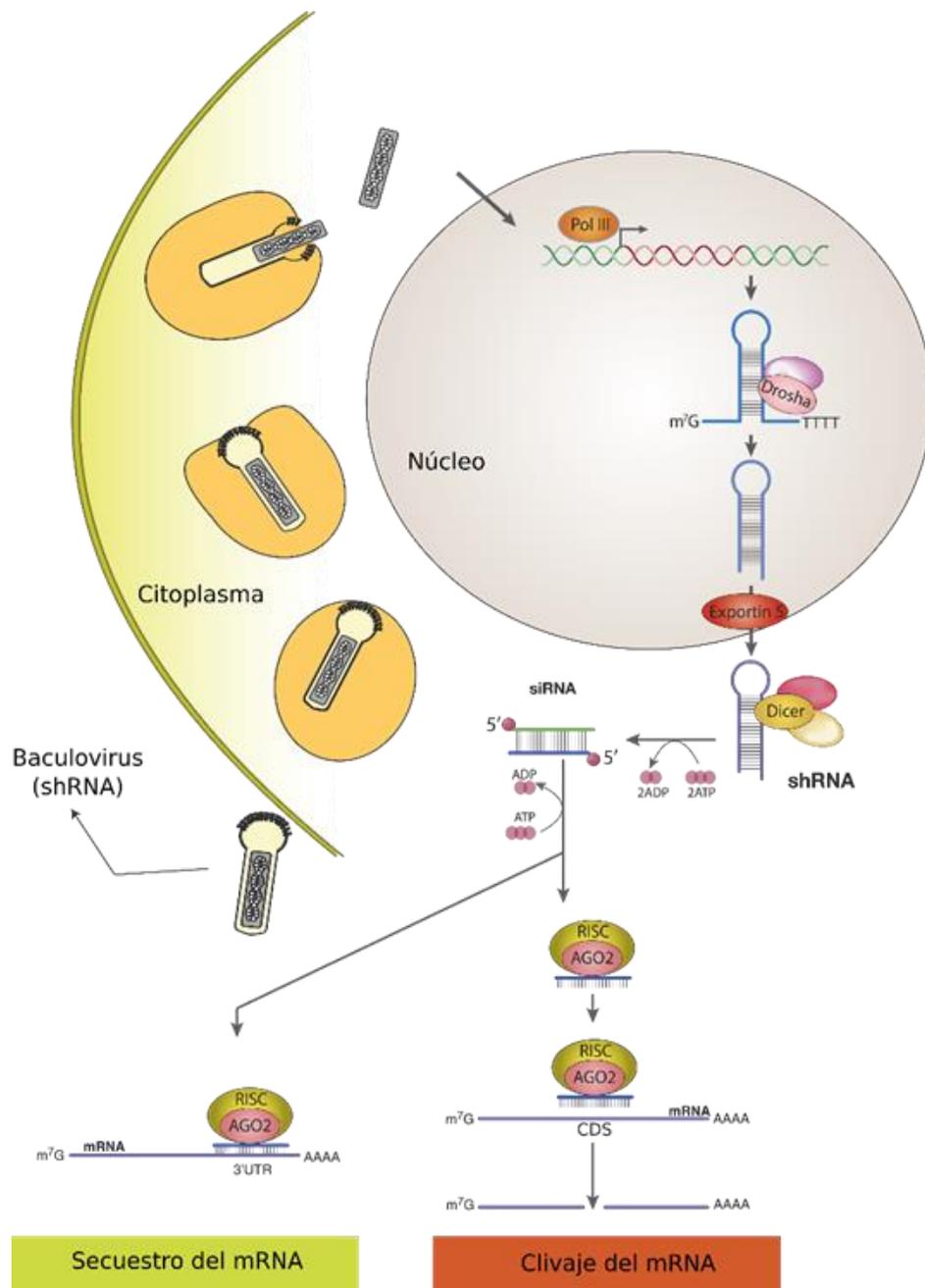


Figura 4.6. Esquema explicando la maduración y función de un shRNA vehiculizado por un baculovirus. Brevemente, el virión brotante baculoviral ingresa a la célula por endocitosis, la nucleocápside es liberada al citoplasma y el DNA llega al núcleo. La RNA polimerasa III reconoce el promotor U6 que controla la expresión del shRNA y comienza la transcripción. El resultado de la transcripción es procesado secuencialmente por las proteínas Drosha (en el núcleo) y Dicer (ya en el citoplasma). Finalmente, una de las hebras del RNA doble cadena resultante es cargado por el complejo formado por RISC y AGO2 para ejercer su función regulatoria.

El rol de la vía del receptor de prolactina en GBM

La prolactina (PRL) es una hormona tradicionalmente asociada con la fertilidad y la lactancia que se ha demostrado que está involucrada en el desarrollo del cáncer dependiente de hormonas. La expresión de PRL y su receptor (PRLR) se relaciona con vías proliferativas y con la respuesta inmune (figura 4.7) y correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar tumores de mama y próstata, así como con la resistencia a la quimioterapia. Por lo tanto, se ha propuesto el bloqueo de PRLR como una estrategia terapéutica para el tratamiento de este tipo de tumores.

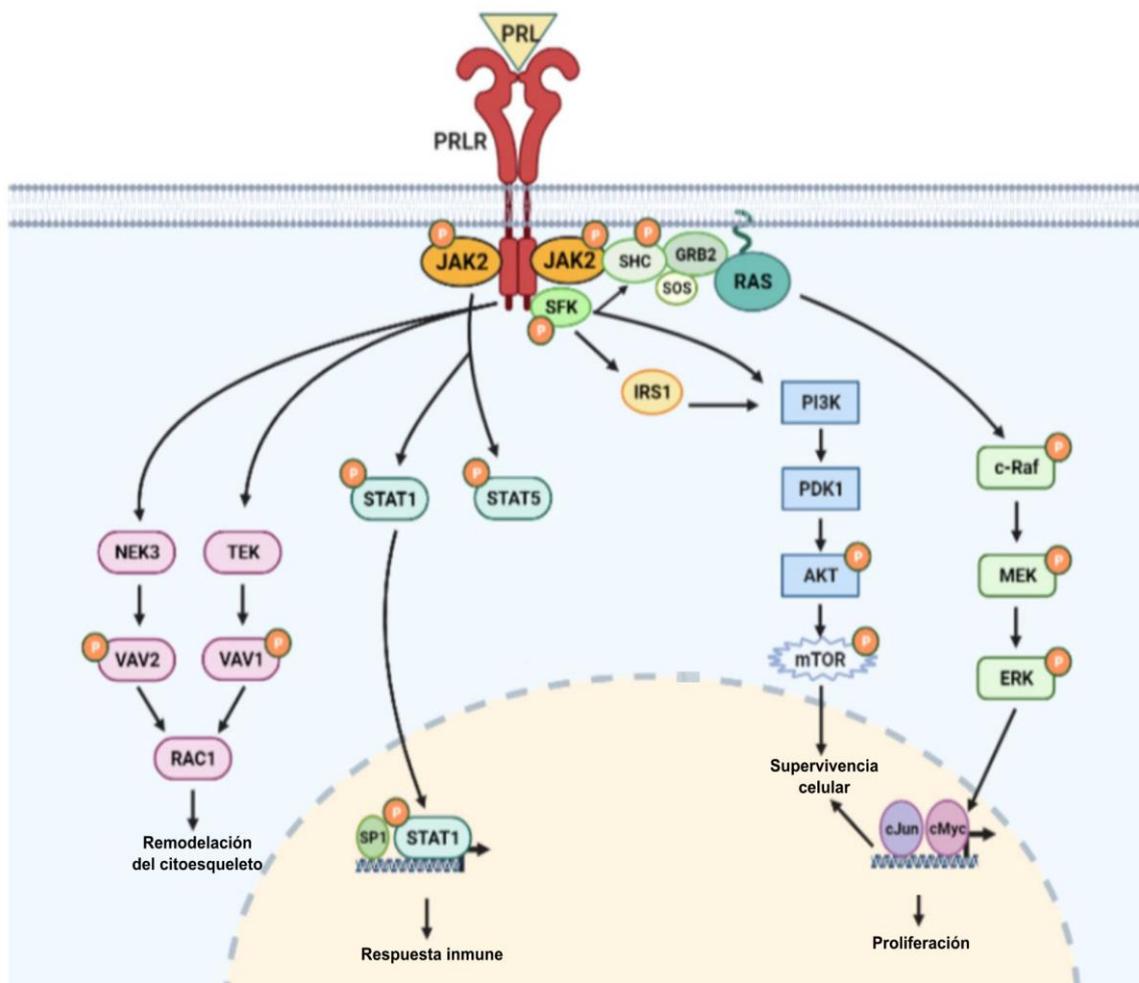


Figura 4.7. Vías de señalización activadas por la prolactina (PRL) y su par receptor PRLR. Figura adaptada a partir de Kavarthapu *et al.* [22].

Aunque en la última década se demostró que las biopsias de GBM expresan PRL y PRLR en varios estudios [23–25], recientemente se ha comprendido mejor el papel de esta hormona y su receptor. Se han descrito siete isoformas de PRLR en humanos, donde la isoforma principal es el PRLR largo, y existen varias isoformas cortas de PRLR. Se ha informado que los homodímeros de PRLR y los heterodímeros entre las isoformas larga y corta, asociados a través del dominio transmembrana, se expresan constitutivamente en la superficie celular en humanos. La sobreexpresión de PRL y las isoformas de PRLR aumentan la quimiorresistencia de las células de GBM, mientras que el bloqueo de PRLR las sensibiliza a los fármacos quimioterapéuticos [26]. Este mecanismo protector de la activación de PRLR en las células de GBM también ha sido estudiado en tumores dependientes de hormonas [27,28]. Estos resultados indican que tanto PRL como PRLR tienen valor como blancos terapéuticos y/o biomarcadores pronósticos en GBM [29]. Además, Asad y colaboradores demostraron que la expresión transitoria mediada por plásmidos del antagonista de PRLR $\Delta 1-9-G129R-hPRL$ desarrollado previamente por Bernichtein *et al.* [30] en células de GBM cultivadas *in vitro*, conduce a una menor viabilidad celular y a una mayor quimiorresistencia al cisplatino. Contar con un vector viral que sea capaz de vehiculizar el antagonista $\Delta 1-9-G129R-hPRL$ resulta de particular interés para incrementar, no sólo la eficiencia de la terapia en modelos *in vitro*, sino también para permitir la realización de ensayos en modelos *in vivo*.

Objetivos generales

- Estudiar el efecto de la combinación del inhibidor de RIPK1 y distintos quimioterápicos sobre la proliferación celular *in vitro*.
- Generar dos recAcMNPV contra los posibles blancos terapéuticos: RIPK1 y PRLR

Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de la inhibición de RIPK1 sobre la proliferación de células humanas de glioblastoma
- Evaluar el efecto de la combinación del inhibidor de RIPK1 con el quimioterápico cisplatino sobre la proliferación celular
- Evaluar el efecto de la combinación del inhibidor de RIPK1 con el quimioterápico TMZ sobre la proliferación celular
- Generar un recAcMNPV con un shRNA para regular negativamente la expresión de RIPK1
- Generar un recAcMNPV que codifique un antagonista para bloquear la vía de PRLR

Resultados

El inhibidor de RIPK1 no afectó la proliferación de células de glioblastoma

Con el objetivo de seguir estudiando el rol de RIPK1 en la patogénesis de los gliomas difusos, se realizaron distintos ensayos *in vitro* con la línea celular humana de glioblastoma, U251 y el inhibidor comercial altamente selectivo de RIPK1, GSK2982772 (MCE).

En una primera instancia, sembramos una placa de cultivo de 96 pocillos con 2000 células por pocillo. 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas con distintas concentraciones del inhibidor de RIPK1: dos concentraciones por debajo del IC50 (16nM), la correspondiente al IC50 y una concentración por encima de la misma. Cada condición se realizó por sextuplicado y, a su vez, el ensayo se repitió cinco veces. 72 hs después del tratamiento, la placa fue fijada, teñida con cristal violeta y se midió absorbancia a 595 nm. En cuanto a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas respecto a la proliferación celular en ninguna de las concentraciones ensayadas, en comparación con el control sin inhibidor de RIPK1 (figura 4.8).

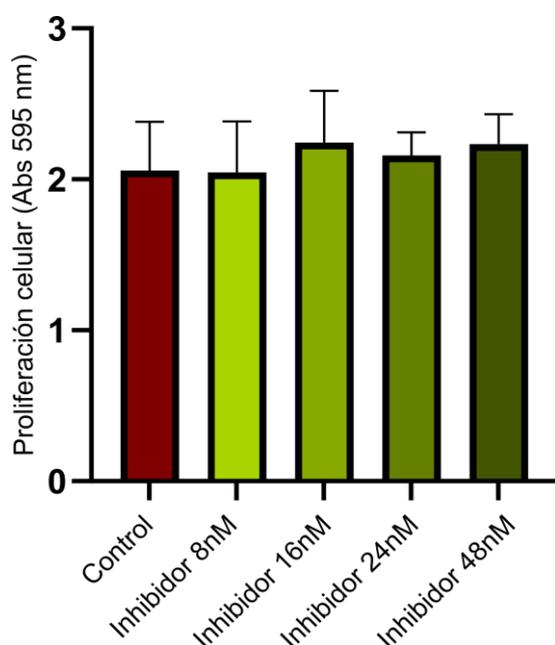


Figura 4.8. Ensayo de proliferación celular. Se utilizaron células humanas de glioblastoma, U251 y distintas concentraciones del inhibidor comercial de RIPK1. El control corresponde a células no tratadas con el inhibidor. ANOVA seguido de prueba de Dunnet, $p^* < 0.05$.

Efecto del inhibidor de RIPK1 sobre la quimiorresistencia

Nos propusimos estudiar el efecto de la suma de quimioterápicos e inhibidor de RIPK1 sobre la proliferación celular. Para ello, utilizamos dos de los quimioterápicos más administrados en el tratamiento del cáncer en general, y del GBM en particular, cisplatino (cis-diaminodicloroplatino(II) o CDDP) y temozolomida (TMZ). En el caso

del CDDP, usamos la concentración correspondiente al IC50 para las 48 hs, mientras que, para el caso de la temozolomida, utilizamos la concentración clínica relevante. Partiendo de una placa de 96 pocillos con células U251, se procedió al tratamiento con las distintas concentraciones del inhibidor de RIPK1 y con el quimioterápico correspondiente (5 μ M para cisplatino y 15 μ M para Temozolomida). 72 horas después, las células fueron fijadas, teñidas con cristal violeta y la proliferación celular fue calculada a partir de la medida de absorbancia a 595 nm. En cuanto al tratamiento de inhibidor junto con TMZ, observamos mayor proliferación celular respecto al control tratado solamente con temozolomida, en todas las concentraciones de inhibidor ensayadas (figura 4.2A). Contrariamente, en el caso de CDDP observamos una menor proliferación celular en el tratamiento combinado de inhibidor más CDDP, respecto al tratamiento con CDDP solamente (figura 4.9B).

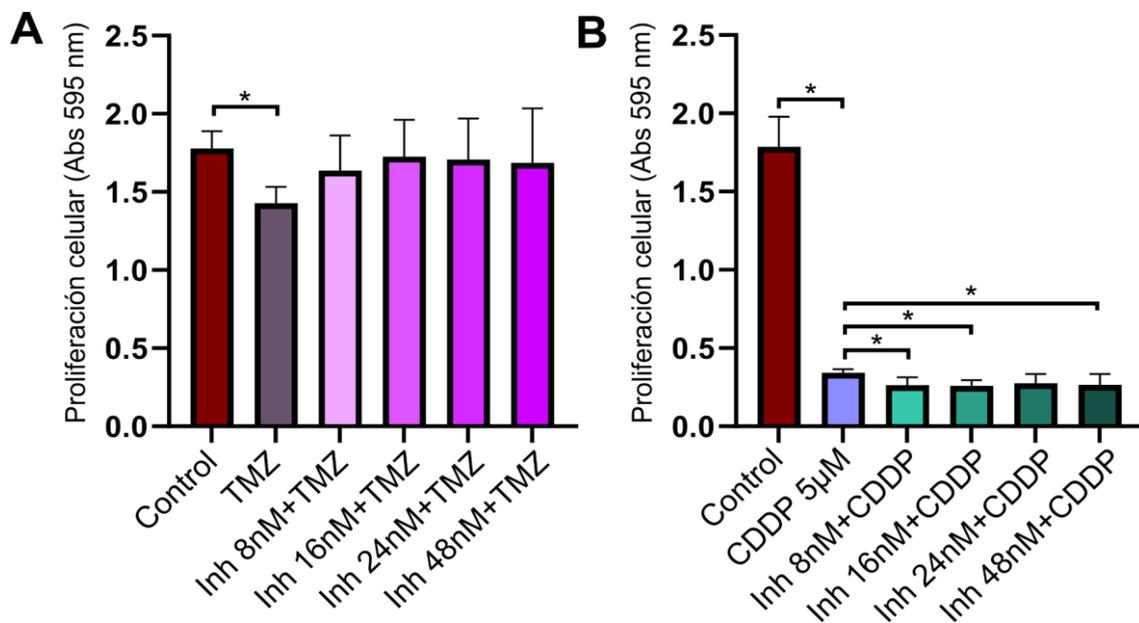


Figura 4.9. Ensayo de proliferación celular con células humanas de glioblastoma, U251. Se incubaron las células con distintas concentraciones del inhibidor comercial de RIPK1 junto con la concentración clínica relevante del quimioterápico **(A)** TMZ y **(B)** cisplatino. El control corresponde a células que no fueron tratadas con el inhibidor o con quimioterápicos. TMZ: células tratadas solamente con temozolomida; CDDP corresponde al tratamiento sólo con el quimioterápico cisplatino. ANOVA seguido de prueba de Dunnet, $p^* < 0.05$.

Para continuar con el análisis, decidimos estudiar el efecto de la inhibición de RIPK1 sobre la sensibilidad al CDDP. Para eso realizamos un ensayo de proliferación celular semejante al anterior, pero anteponiendo un paso de 24 h de sensibilización con el inhibidor de RIPK1 previo al tratamiento con el quimioterápico cisplatino. Para profundizar el análisis, además de utilizar la concentración de CDDP evaluada anteriormente, nos propusimos disminuir la concentración de cisplatino y evaluar el impacto sobre la proliferación de las células de glioblastoma en condiciones de

menor concentración de droga. Para ello, las células se incubaron 24 horas con las distintas concentraciones del inhibidor y luego se agregó cisplatino en una concentración de 1 μM (figura 4.10A) o de 5 μM (figura 4.10B). 72 horas después de la siembra, las células se fijaron, se tiñeron y nuevamente la absorbancia se midió a 595 nm. La figura 4.10 A muestra que para la concentración de CDDP de 1 μM , la sensibilización previa con inhibidor de RIPK1 impactó significativamente sobre la capacidad proliferativa.

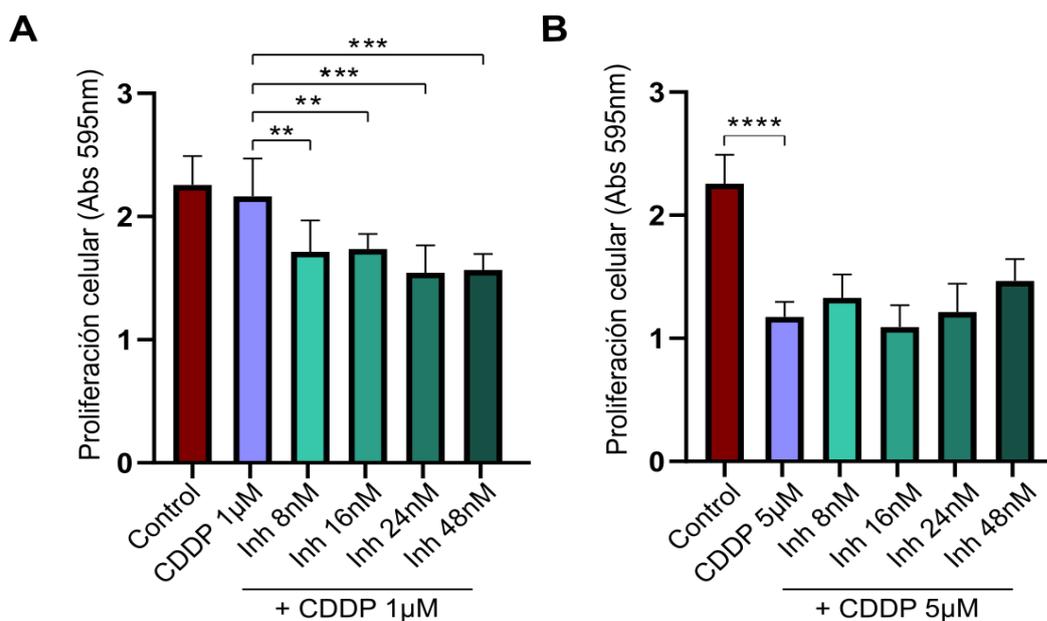


Figura 4.10. Ensayo de proliferación celular con la línea celular U251. Se incubaron las células con distintas concentraciones del inhibidor comercial de RIPK1. 24 horas después, se trataron las células con el quimioterápico CDDP en una concentración de 1 μM (A) o en una concentración de 5 μM (B). El control corresponde a células no tratadas con el inhibidor ni con el quimioterápico. ANOVA seguido de prueba de Dunnet, $p^* < 0.05$, $p^{****} < 0.001$.

Con el objetivo de indagar en el efecto de RIPK1 sobre la muerte celular y si dicho efecto se veía intensificado en presencia del quimioterápico CDDP, realizamos un ensayo de TUNEL (*Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*) para detectar la presencia de fragmentación del DNA en las células apoptóticas. Para llevar a cabo el ensayo, una monocapa de células U251 fue tratada durante 24 h con una concentración de 16 nM del inhibidor de RIPK1 (correspondiente al IC50) y luego se añadió, en caso de que correspondiera, 1 μM de CDDP. 72 h después de la siembra, las células fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con la mezcla conteniendo la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Finalmente, se procedió a la tinción de los núcleos con DAPI y a la observación de las células mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ y se calculó el porcentaje de células apoptóticas en las distintas

condiciones. Como puede observarse en la figura 4.11, se obtuvieron mayores niveles de inducción de apoptosis en el tratamiento que combinó el inhibidor de RIPK1 y el CDDP, mostrando diferencias significativas con todos los demás tratamientos.

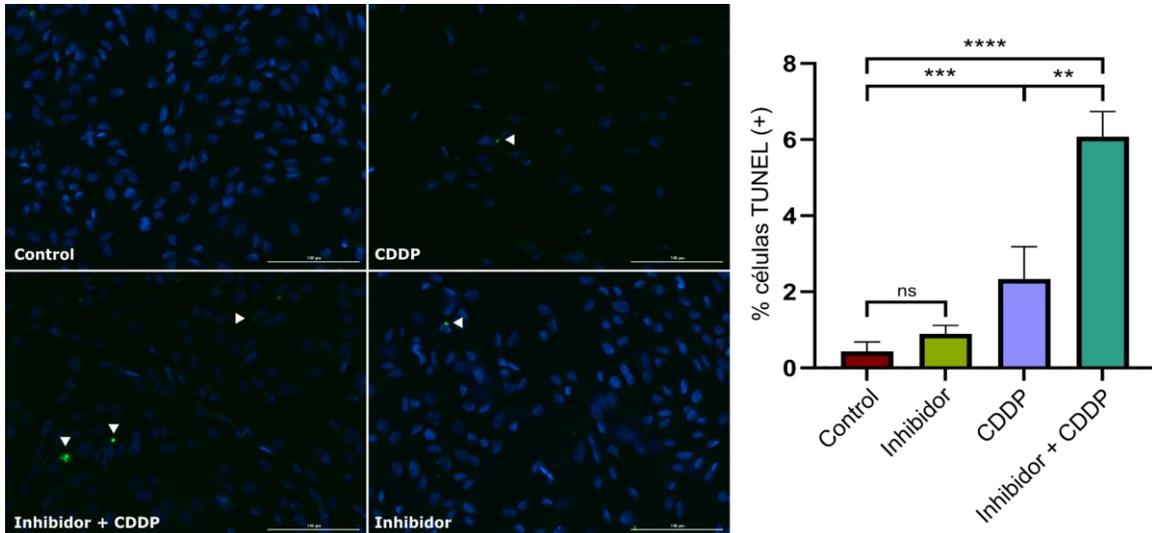


Figura 4.11. Análisis del porcentaje de células apoptóticas mediante el ensayo de TUNEL. Izquierda: en azul se observan los núcleos celulares mientras que con flechas blancas se señala la tinción verde, resultado de la ruptura del DNA característico de las células apoptóticas. Derecha: porcentaje de células TUNEL+, donde “Control” corresponde a células U251 sin tratamiento, “Inhibidor”, a células tratadas sólo con el inhibidor de RIPK1, “CDDP” a células tratadas con 1 μ M de cisplatino e “Inhibidor + CDDP” a aquellas células sensibilizadas durante 24 h con el inhibidor y luego tratadas con 1 μ M de CDDP por 48h. ANOVA seguido de prueba de Dunnet, $p^* < 0.05$ y $p^{****} < 0.001$

Generación de un recAcMNPV con capacidad silenciadora de RIPK1

A partir de los resultados obtenidos, nos propusimos generar un baculovirus recombinante, utilizando el sistema PluriBAC, que codificara para un *short hairpin* RNA (shRNA) destinado a regular negativamente la expresión de la proteína RIPK1. Para cumplir con este objetivo, se diseñó la secuencia del shRNA siguiendo las recomendaciones del manuscrito “*Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs*” [31] (figura 4.12B) y la síntesis del mismo fue realizada por la empresa Genscript, dentro del vector pUC57. Una vez recibido el vector, generamos el vector de nivel 1 que contuviera el shRNA bajo el control del promotor pU6, mediante el sistema PluriBAC (figura 4.12 A).

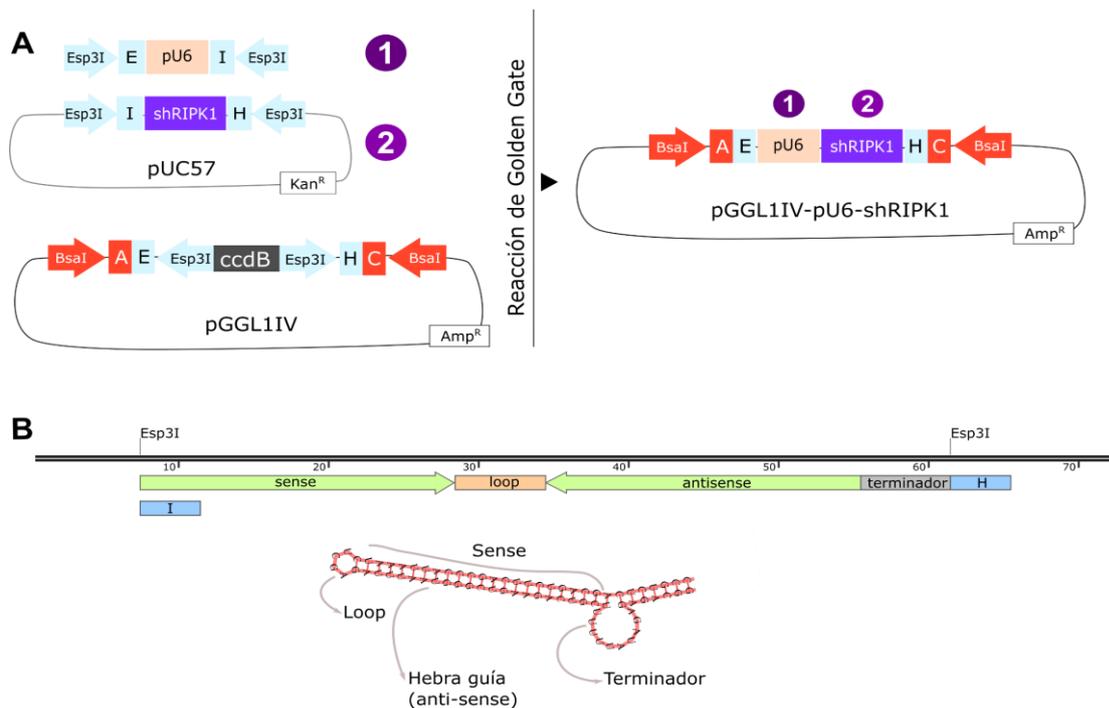


Figura 4.12. (A) Representación de la obtención del vector de nivel 1 pGGL1IV-pU6-shRIPK1, donde pU6 representa el promotor específico de la polimerasa III y shRIPK1 al *short hairpin* RNA destinado a regular negativamente a RIPK1. **(B)** Esquema de la secuencia que codifica para el shRIPK1 y su estructura secundaria predicha obtenida mediante “*The Vienna RNA Websuite*” [32].

Luego de realizado el ensamblado, y la posterior transformación en células electrocompetentes, como se detalló en el capítulo 1, el *screening* se realizó mediante colony PCR utilizando *primers* específicos contra el promotor U6. En la figura 4.13, panel A, se puede observar el resultado de una colony PCR que indicaría la presencia del promotor pU6 en todos los clones estudiados. Luego, se procedió a realizar minipreps y una posterior digestión con la enzima de restricción *XhoI* de los clones correspondientes. Es importante destacar que el sitio de restricción de la enzima *XhoI* se encontraba dentro de la secuencia del shRNA, por lo tanto, sólo en aquellos clones que tuvieran la secuencia correcta, la digestión generaría la linearización del vector. Como puede observarse en la figura 4.13 B, para los 4 clones estudiados se detectó una sola banda en el gel de agarosa evidenciando la linearización mencionada anteriormente.

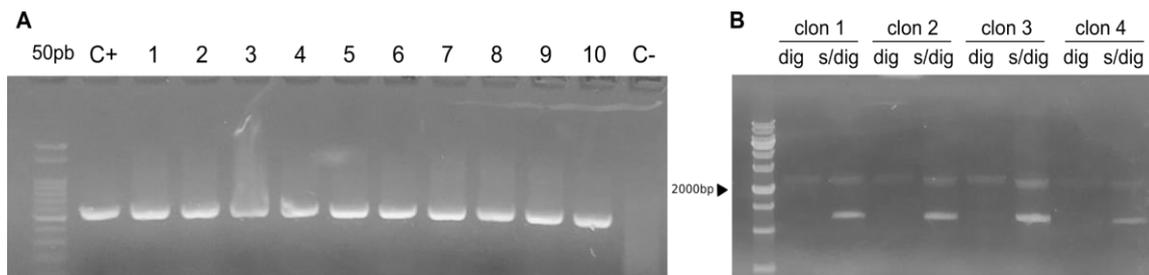


Figura 4.13. (A) Gel de agarosa 2%. Colony PCR de los clones obtenidos a partir del ensamblado correspondiente al vector de nivel 1 pGGL1-pU6-shRIPK1. Se observa la banda de 270 bp esperada para todos los clones estudiados. C+: control positivo. C-: control negativo. **(B)** Gel de agarosa 0,8%. Digestión realizada con la enzima XhoI, de los clones 1,2, 3 y 4 obtenidos a partir del ensamblado correspondiente al vector de nivel 1 pGGL1-pU6-shRIPK1. Donde “dig” corresponde al vector digerido y “s/dig” al vector sin digerir.

Una vez obtenido el vector pGGL1IV-pU6-shRIPK1, procedimos a la generación del vector de transferencia de nivel 2 que contuviera el shRIPK1 bajo el control del promotor de U6 y el cassette de expresión de la proteína reportera citrine utilizando el sistema PluriBAC (figura 4.14).

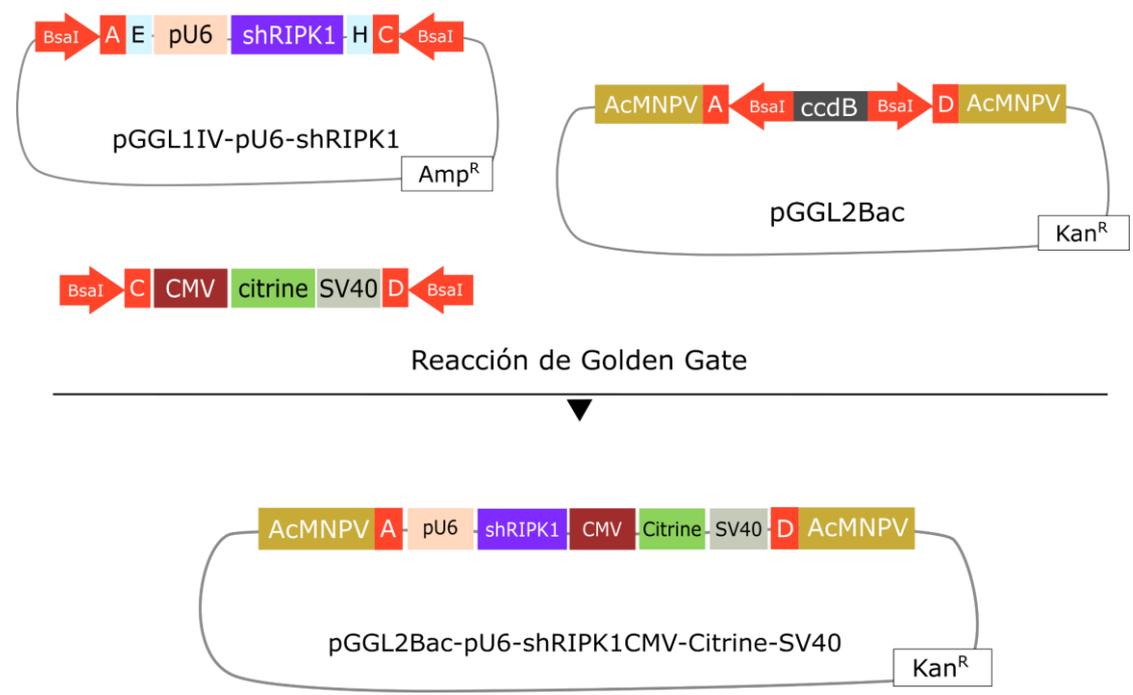


Figura 4.14. Representación de la obtención del vector de transferencia final pGGL2Bac-pU6-shRIPK1-CMV-citrine-SV40 para generar el recAcMNPV. Donde pU6 representa el promotor específico de la polimerasa III, shRIPK1 al short hairpin RNA destinado a regular negativamente a RIPK1, CMV al promotor del gen inmediato temprano 1 del citomegalovirus (promotor CMV-IE1) y SV40 se refiere a la señal de poliadenilación del virus simio 40 (SV40 polyA).

La confirmación de la inserción del fragmento se realizó mediante PCR (figura 4.15, A) y posterior secuenciación por Sanger. Luego, se procedió a la generación del recAcMNPV a partir del vector de transferencia utilizando el sistema *bapGOZA*. La exitosa generación del baculovirus recombinante se evidenció mediante microscopía de epifluorescencia en células de insecto Sf9 co-transfectadas con el bácido y el vector de transferencia obtenido, observándose aparición de fluorescencia y de signos de infección (figura 4.15, B).

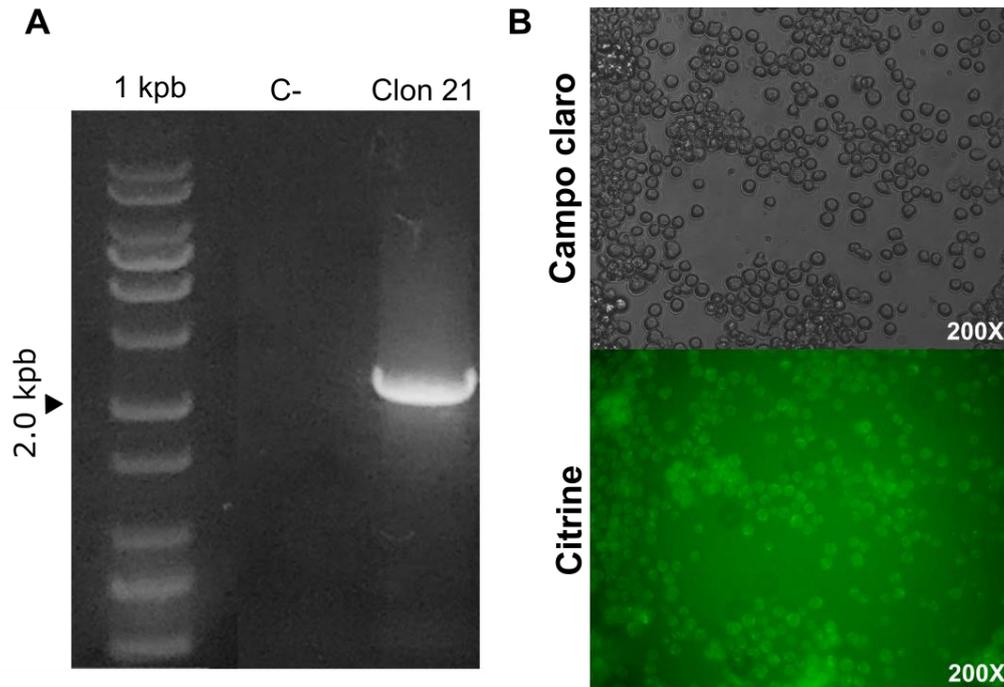


Figura 4.15. (A) *Screening* mediante PCR del inserto pU6-shRIPK1-CMV-citrine-SV40. Se observa el fragmento de unos 2000 pb esperado **(B)** Células de insecto Sf9 infectadas con el recAcMNPV obtenido, observadas mediante microscopía de epifluorescencia.

El shRIPK1 incrementa la eficiencia de transducción baculoviral y los niveles de expresión de transgenes en células de GBM.

Debido a que existe evidencia de que el *knockdown* de RIPK1 aumenta los niveles de expresión de proteínas heterólogas en células transducidas por baculovirus [33], nos propusimos estudiar si sucedía ese mismo efecto en células de GBM transducidas. Para ello, evaluamos la eficiencia de transducción del baculovirus recombinante obtenido, al que denominamos Ac shRIPK1. Vale aclarar que, aunque el baculovirus Ac shRIPK1 contiene el *cassette* de la proteína reportera citrine, además del shRNA, no fue incorporado en el nombre para evitar confusiones con el baculovirus recombinante Ac citrine, que sólo contiene al *cassette* de la proteína citrine. Para llevar a cabo los ensayos de transducción, los recAcMNPV fueron centrifugados durante 1h a 4°C y resuspendidos en PBS 1X hasta llegar en ambos

casos a un número de partículas virales que se correspondiera con una multiplicidad de 750. Luego, se retiró el medio de cultivo de una placa de 48 pocillos con una monocapa de células U251 al 60% de confluencia y se adicionaron 100 μ l del inóculo correspondiente. Las células se incubaron con el inóculo a temperatura ambiente y en agitación. 2 horas después, se completó el volumen de cada pocillo con medio de cultivo. 48 h después de iniciada la transducción, se observaron las células mediante microscopía de fluorescencia (fig. 4.16, A) y se procedió a determinar la fluorescencia media y a calcular el porcentaje de transducción para ambos baculovirus recombinantes mediante un ensayo de citometría de flujo. Como muestra la figura 4.16B el porcentaje de células citrine + es significativamente mayor en el caso de las células tratadas con el baculovirus Ac shRIPK1 llegando a valores superiores al 55%. Del mismo modo, la fluorescencia media alcanzada por las células transducidas con Ac shRIPK1 fue significativamente superior a la alcanzada por las células transducidas por el baculovirus control Ac citrine. Por último, y a modo de ejemplo, se presentan dos de los histogramas obtenidos a partir de los ensayos de citometría (fig. 4.16, C).

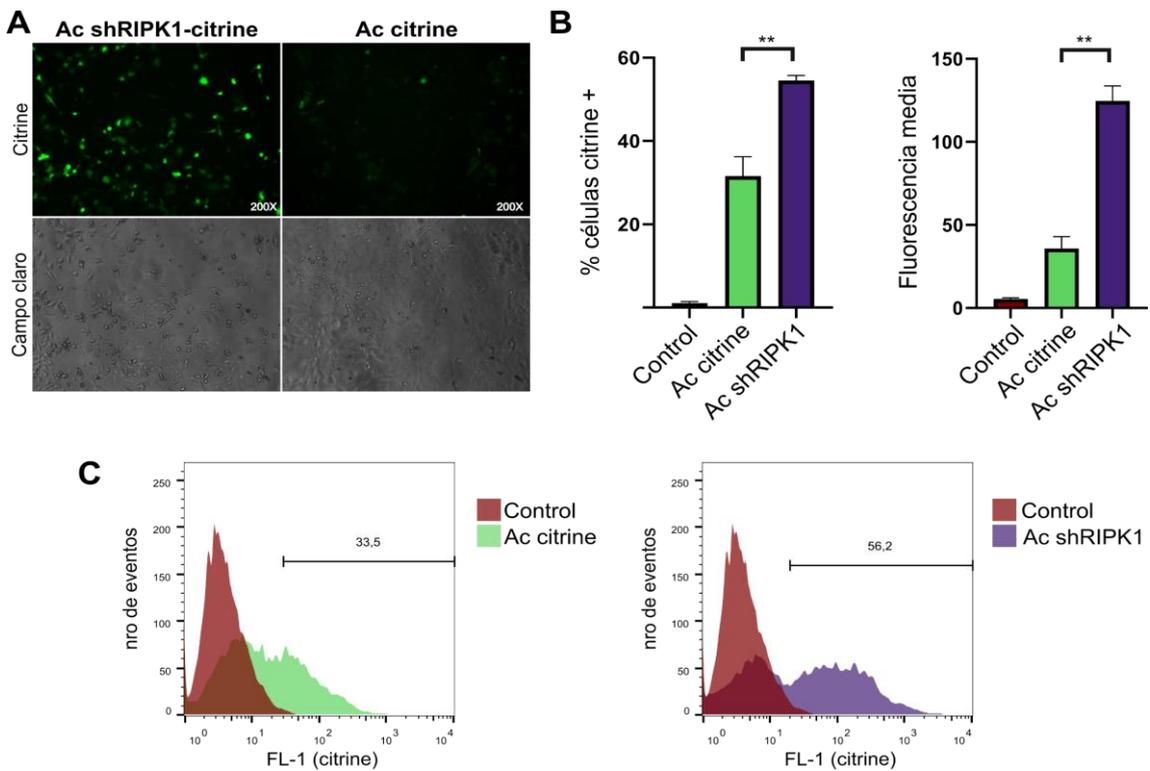


Figura 4.16. Ensayo de transducción en células U251 transducidas con los baculovirus obtenidos mediante el sistema PluriBAC. **(A)** Células U251 transducidas con Ac citrine o con Ac shRIPK1, a las 48 hpt. **(B)** Cálculo del porcentaje de células citrine + y de la fluorescencia media en células transducidas con los dos recAcMNPV. t-test, $p^* < 0.05$. **(C)** Izquierda: se observa uno de los histogramas obtenido para el caso del virus Ac citrine. Derecha: uno de los histogramas obtenido para el virus Ac shRIPK1. “Control” corresponde a células U251 sin transducir.

El recAcMNPV Ac shRIPK1 reduce la proliferación celular e induce la apoptosis en células de GBM transducidas

Paralelamente, se evaluó el efecto del baculovirus recombinante Ac shRIPK1 sobre la proliferación celular. Para ello, se transdujeron las células de glioma con los baculovirus Ac citrine y Ac shRIPK1 repitiendo la metodología detallada en el ensayo anterior. 24 h después de la transducción, se agregó CDDP en una concentración de 1 μ M a los pocillos correspondientes. Finalmente, la proliferación celular se evaluó como se detalló anteriormente, 72 h después de la siembra. A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que el baculovirus Ac shRIPK1 disminuyó significativamente la proliferación de las células de GBM (figura 4.17).

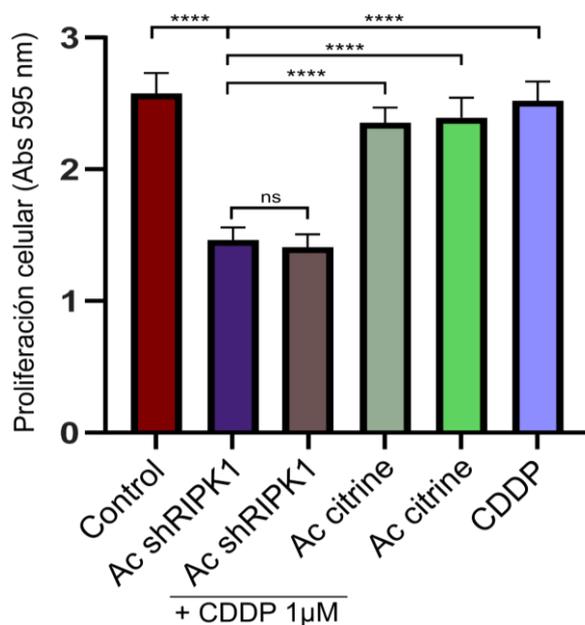


Figura 4.17. Ensayo de proliferación celular con la línea celular U251. Se transdujeron las células con los baculovirus recombinantes Ac shRIPK1 o Ac citrine. 24 horas después, se procedió al tratamiento con 1 μ M de CDDP en los grupos correspondientes. El grupo control corresponde a células no transducidas, mientras que el grupo CDDP, a células tratadas sólo con cisplatino. ANOVA seguido de prueba de Dunnet, $p^{****} < 0.001$.

Con el objetivo de evaluar el potencial efecto de Ac shRIPK1 sobre la muerte celular, realizamos un ensayo de viabilidad celular por exclusión de Ioduro de Propidio (IP) en células U251 transducidas con Ac shRIPK1 y con Ac citrine. Aquellas células con la membrana plasmática comprometida fueron teñidas con el colorante, que posee la capacidad de intercalarse en el DNA. Finalmente, se realizó la cuantificación celular mediante citometría de flujo para las 3 condiciones ensayadas. La figura 4.18 muestra los resultados obtenidos, en los que puede observarse un incremento significativo del % de células IP+ en aquellas tratadas con el virus Ac shRIPK1 en comparación con aquellas tratadas con el virus control Ac citrine.

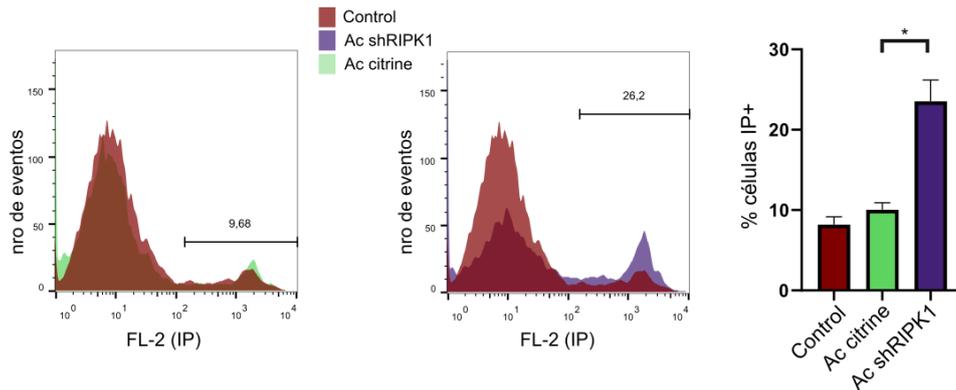


Figura 4.18. Estudio del efecto de Ac shRIPK1 sobre la muerte celular mediante tinción con Ioduro de Propidio y posterior cuantificación por citometría de flujo en células U251 transducidas con el baculovirus recombinante. t-test $p^* < 0.05$

Generación del recAcMNPV que codifica un antagonista de prolactina (aPRL), utilizando el sistema PluriBAC

Por otro lado, con el objetivo de estudiar el efecto de la inhibición de la vía de PRL, nos propusimos construir un vector baculoviral que codificara para el antagonista de PRLR $\Delta 1-9$ -G129R-hPRL (aPRL), mediante el sistema PluriBAC. Para ello, sintetizamos el *cassette* de expresión del antagonista de PRLR, basándonos en la secuencia caracterizada por Bernichtein *et al.* [30], en el vector pMG mediante el servicio de la empresa Macrogen. Este *cassette* fue luego clonado en el vector final de nivel 2 pGGL2Bac para poder generar el recAcMNPV mediante el sistema GOZA. (figura 4.19)

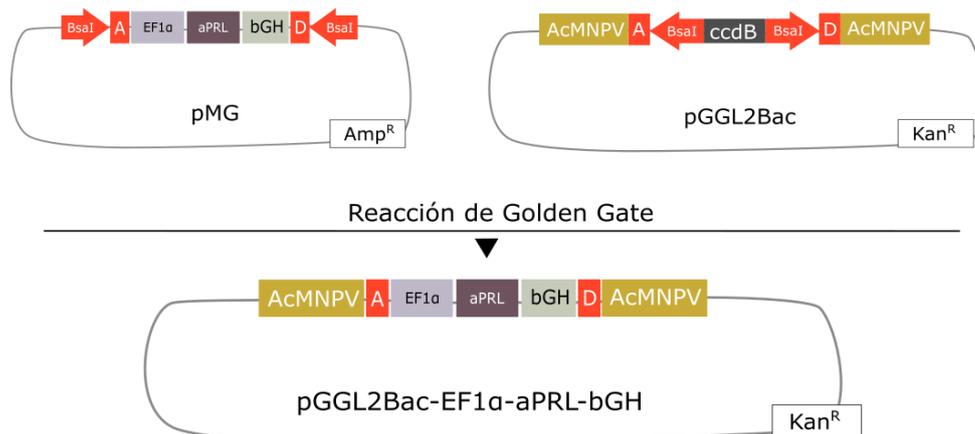


Figura 4.19. Representación de la obtención del vector de transferencia final pGGL2Bac-EF1 α -aPRL-bGH para generar el recAcMNPV. EF1 α es el promotor del factor de elongación de la traducción eucariota 1 α , aPRL se refiere a un antagonista del receptor de prolactina y bGH se refiere a la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH-polyA).

Siguiendo el mismo procedimiento que el realizado para la obtención del resto de los recAcMNPV, la confirmación de la inserción del fragmento deseado se realizó mediante PCR (figura 4.20A) y luego se confirmó mediante secuenciación por Sanger. Finalmente, la correcta obtención del baculovirus recombinante se evidenció por la aparición de signos de infección (presencia de poliedros) en células de insectos co-transfectadas. (figura 4.20B)

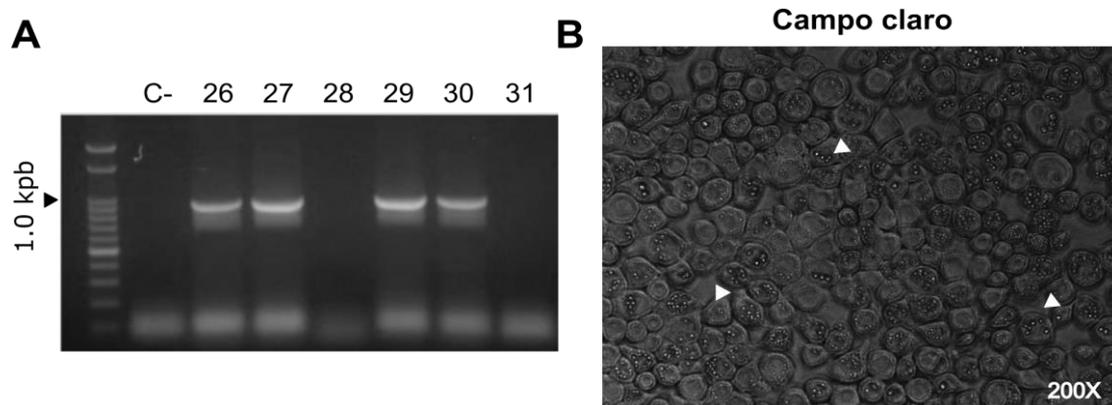


Figura 4.20. (A) Screening mediante PCR del inserto EF1 α -aPRL. Se observa la banda esperada, de aproximadamente 1000 pb, para cuatro de los clones estudiados. **(B)** Células de insecto Sf9 infectadas con el recAcMNPV obtenido, con flechas blancas se señalan algunas de las células con poliedros.

El recAcMNPV Ac aPRL afecta la viabilidad de las células de GBM

Una vez obtenido el baculovirus recombinante Ac aPRL, nos propusimos analizar el efecto del mismo sobre la viabilidad celular. Para cumplir con este objetivo, llevamos a cabo el ensayo colorimétrico MTT para medir la actividad metabólica en células murinas de glioma, GL26, y en la línea celular humana U251 transducidas previamente con Ac aPRL con una multiplicidad de 750. 24 h después de la transducción, la monocapa celular fue tratada, o no, con CDDP en una concentración de 1 μ M. Finalmente, la viabilidad celular se determinó mediante colorimetría 72 h después de la siembra.

Según los resultados obtenidos, podemos observar que el baculovirus recombinante Ac aPRL disminuye la viabilidad en células de glioblastoma murinas (figura 4.21A) y que, además, ese efecto parece potenciarse en presencia del quimioterápico CDDP. En cuanto a los ensayos realizados con células humanas (figura 4.21B), no observamos diferencias significativas en la viabilidad cuando utilizamos el baculovirus Ac aPRL respecto al control. Sin embargo, observamos que disminuía la viabilidad cuando el recBV se combinaba con el quimioterápico CDDP.

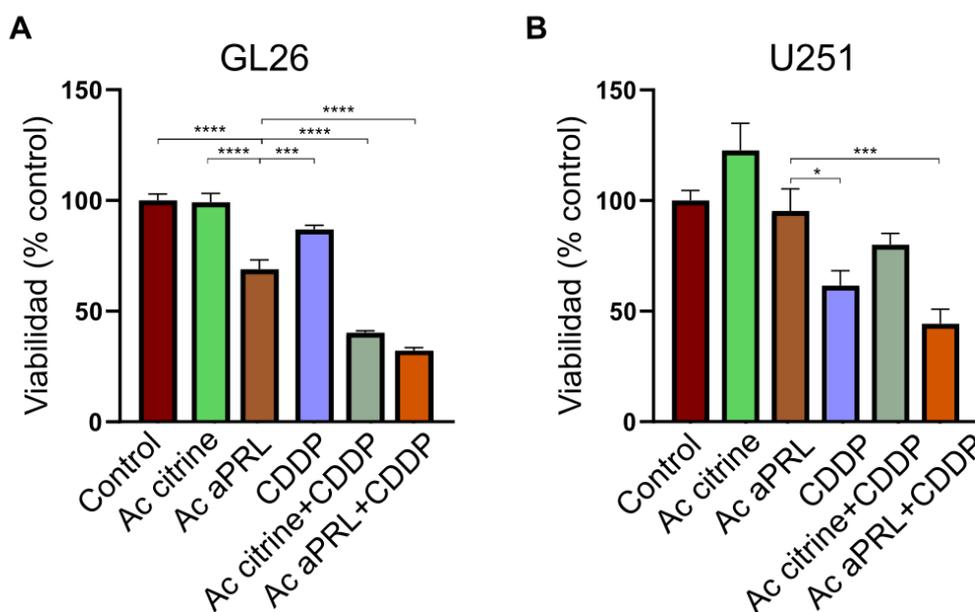


Figura 4.21. Ensayo de viabilidad realizado en células murinas de glioblastoma, GL26 **(A)** o en la línea celular humana, U251 **(B)**. Brevemente, se trataron las células con el baculovirus recombinante Ac aPRL o Ac citrine con una MOT de 750 durante 24 h. Luego, las células fueron incubadas, en los grupos correspondientes, con 1 μ M de CDDP. La viabilidad celular se determinó mediante el reactivo de MTT. ANOVA seguido de prueba de Dunnet, $p^* < 0.05$, $p^{****} < 0.001$

Discusión

La invasividad y la alta resistencia a los tratamientos del glioblastoma multiforme (GBM) producen una baja supervivencia en los pacientes afectados. Desafortunadamente, en las últimas décadas, ninguna estrategia terapéutica nueva ha demostrado una prolongación significativa de la supervivencia de los pacientes con GBM más allá de la proporcionada por la quimioterapia y radioterapia estándar. El GBM se caracteriza por su inmunidad tumoral altamente supresiva, lo que representa un obstáculo crítico para la inmunoterapia. Varios mecanismos modulan las vías moleculares y las funciones celulares de la inmunidad tumoral y contribuyen a la inmunosupresión asociada al tumor producida por el GBM. Las células tumorales del GBM producen potentes moléculas inmunosupresoras, incluyendo el factor de crecimiento transformante- β , la interleucina-10 y la indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO) [34,35]. Además, el GBM puede expresar ligandos de puntos de control inmunitario que inhiben marcadamente las respuestas efectoras inmunitarias [36,37]. Asimismo, se ha reportado la gran acumulación de células supresoras reguladoras T (Tregs), macrófagos asociados al tumor (TAMs) con características similares a los M2 y células supresoras mieloides derivadas (MDSCs) en el microambiente tumoral, lo cual se correlaciona con una mala supervivencia global en pacientes con GBM [38]. Por esta razón, se están buscando nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, siendo la

terapia combinada una de ellas. Sin embargo, se observó que la inflamación es un mecanismo patogénico relevante en la fisiología tumoral de los DG. En el trabajo publicado por González et. al. [39] se observa un mayor nivel de infiltración inmunológica en el caso de IDHwt respecto a IDHm. Más precisamente, encuentran reguladas positivamente las firmas génicas asociadas a neutrófilos y macrófagos en los gliomas IDHwt, lo que resulta coherente para gliomas de tan mal pronóstico, dado que la acumulación de estas células es característica de la inflamación crónica no resuelta involucrada en el efecto pro-tumoral del microambiente tumoral. Sin embargo, el rol que juegan esas células infiltrativas en el TIME (“*Tumor Immune Microenvironment*”) es controversial y no se encuentra completamente caracterizado, en parte debido a que cada subtipo tumoral exhibe un comportamiento particular que depende del TIME. Se ha determinado, por ejemplo, que los macrófagos infiltrados secretan TNF- α estimulando la vía inflamatoria vinculada a TNF y que los factores derivados de TNF, como TRAF1 y TRAF2, son indicadores de mala prognosis, dado que se observó que inhiben la apoptosis y promueven la supervivencia de células de GBM [12]. Asimismo, se ha observado que la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos del microambiente tumoral del GBM juega un papel tanto en la activación endotelial como en la resistencia a tratamientos antiangiogénicos [14].

En este marco, resulta relevante ahondar en el estudio sobre la vía de TNF y, en particular, con RIPK1, un regulador maestro entre las señales de supervivencia y de muerte celular inflamatoria.

En los análisis *in silico* presentados en el capítulo 3 de esta tesis pudimos concluir que RIPK1 desempeña un rol importante en la progresión de los DG y que las vías vinculadas a la inflamación parecen ser de relevancia.

Nuestros resultados obtenidos a partir de ensayos *in vitro* realizados durante este capítulo, demostraron que la combinación del inhibidor comercial de RIPK1, GSK2982772, con cisplatino, uno de los quimioterápicos utilizados en la clínica contra el GBM, disminuyó significativamente la proliferación de células humanas de glioblastoma, cuando las drogas fueron agregadas en simultáneo, en comparación a la monoterapia con cisplatino. Interesantemente, observamos que ese efecto en la proliferación era mayor aun cuando las células eran sensibilizadas con el inhibidor 24 h previo a la adición del cisplatino. Contrariamente, observamos que la terapia combinada con TMZ (el más utilizado actualmente en la clínica) junto con el inhibidor de RIPK1, tuvo un efecto contrario al deseado aumentando levemente la proliferación celular. Esta diferencia observada entre los quimioterápicos podría deberse a los distintos mecanismos de acción: mientras que TMZ activa principalmente la vía de la apoptosis intrínseca, el mecanismo de acción de CDDP involucra la generación de ROS, lo que activa vías de muerte celular de carácter más inflamatorio. El inhibidor comercial de RIPK1 es capaz de

inhibir la vía necroptótica mediante la unión al dominio quinasa de la proteína, pero no la vía pro-proliferativa dependiente de RIPK1 [40]. En ese sentido, hipotetizamos que, en el tratamiento combinado con TMZ se produce el bloqueo de la formación del complejo II por parte del inhibidor, y eso podría provocar una mayor disponibilidad de la proteína RIPK1 para la formación del complejo I y estimular levemente la proliferación celular. En cambio, en el tratamiento con cisplatino, debido a la formación de ROS, es probable que se estimule la formación del complejo II por la deubiquitinación de RIPK1, pero al inhibir su actividad quinasa en presencia del inhibidor, prevalezca la apoptosis independiente de RIPK1. Esta hipótesis podría parcialmente fundamentarse en nuestros ensayos de medición de apoptosis tardía, en los que observamos una significativamente mayor proporción de células apoptóticas en el tratamiento combinado CDDP + GSK2982772. Melo-Lima y colaboradores observaron un efecto similar al aplicar tratamientos combinados del quimioterápico edelfosina y la proteína inhibidora de la necroptosis Necrostatina-1 sobre células de glioma U-118, concluyendo que inhibición de la necroptosis podría redirigir el destino celular hacia la apoptosis frente al estímulo del quimioterápico, impidiendo, por ejemplo, la inducción de la autofagia como mecanismo de recuperación [41]. Sin embargo, son necesarios más experimentos para poder validar o refutar esta hipótesis.

La capacidad de los baculovirus para transducir células de mamífero y su capacidad para permitir la introducción de grandes cantidades de DNA heterólogo en sus genomas representan notables ventajas. En sumatoria con los beneficios de bioseguridad de los baculovirus en comparación con otros vectores virales, estas características hacen que los vectores basados en baculovirus sean cada vez más utilizados para terapia génica. Por ello, nos propusimos avanzar en la generación de un recAcMNPV que expresara un shRIPK1 destinado a regular negativamente la actividad de RIPK1. A partir de los resultados preliminares obtenidos, pudimos observar que el virus Ac shRIPK1 disminuyó significativamente la proliferación de células de GBM humanas, en un esquema monoterapéutico, sin la combinación con ningún quimioterápico, a diferencia de lo observado con el inhibidor comercial. Además, el tratamiento con Ac shRIPK1 indujo niveles de apoptosis superiores al 20% en dichas células. Las diferencias observadas entre el inhibidor de RIPK1 y el Ac shRIPK1 respecto a la proliferación celular, podrían deberse a las distintas maneras en que ejercen su acción. El inhibidor de RIPK1 se une al sitio alostérico del bolsillo del dominio quinasa de la enzima, impidiendo así su fosforilación, la formación del complejo II y afectando principalmente la necroptosis. Sin embargo, no se ve afectada la vía que conduce a la proliferación y por eso no se verían diferencias en la proliferación celular a menos que se combine con CDDP. El baculovirus recombinante, en cambio, ejerce su acción a nivel postranscripcional, disminuyendo los niveles generales de RIPK1 afectando no sólo la vía que induce muerte celular inflamatoria, sino también evitando la formación del complejo I y la

señalización de supervivencia, dejando libre sólo la vía apoptótica independiente de RIPK1. Es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que ocurren al silenciar RIPK1 y caracterizar más profundamente el tipo de muerte celular que el baculovirus induce.

En cuanto al rol de la prolactina en GBM, estudios previos habían demostrado que la vía de PRLR podría estar involucrada en la progresión tumoral, dado que la sobreexpresión de la misma conducía a una mayor proliferación, viabilidad, clonogenicidad y quimiorresistencia en ensayos *in vitro* [26,29]. Al mismo tiempo, Asad y colaboradores demostraron en ese mismo trabajo que la expresión transitoria del antagonista $\Delta 1-9$ -G129R-hPRL era capaz de sensibilizar a las células frente a la quimioterapia. Las limitaciones propias de los vectores plasmídicos utilizados en esos ensayos impidieron la validación del antagonista de PRL en modelos de GBM *in vivo*.

Así, en el marco de una colaboración científica con la Dra. Marianela Candolfi, generamos un baculovirus recombinante que codifica para el antagonista de PRL ($\Delta 1-9$ -G129R-hPRL) mediante el sistema PluriBAC. La correcta obtención del mismo se evidenció mediante la observación microscópica de poliedros en células de insectos infectadas. Finalmente, el baculovirus recombinante Ac aPRL demostró disminuir la viabilidad de células de GBM murinas y, en combinación con CDDP, también afectó la viabilidad de células humanas.

La obtención de estos vectores de terapia génica nos permitirá avanzar en la caracterización de estos blancos terapéuticos en modelos murinos, aunque previamente será necesario evaluar la toxicidad que los vectores podrían presentar frente a tejidos y células normales como los astrocitos.

Finalmente, tal como observaron Wang y colaboradores [33], en nuestros ensayos el silenciamiento de RIPK1 tuvo un efecto positivo sobre la expresión del transgén citrine. Esto plantea un escenario prometedor para la combinación del shRIPK1 con la expresión de genes que afecten otros blancos terapéuticos en un mismo baculovirus.

Estos resultados nos alientan a continuar en el estudio de una potencial terapia contra el GBM, basada en el silenciamiento de RIPK1 y la expresión del antagonista aPRL mediante el uso de un único baculovirus recombinante que afecte a ambos blancos, en esquemas mono-terapéuticos o en combinación con quimioterapia.

Referencias

1. Xu, X.; Ho, W.; Zhang, X.; Bertrand, N.; Farokhzad, O. Cancer Nanomedicine: From Targeted Delivery to Combination Therapy. *Trends in Molecular Medicine* **2015**, *21*, 223–232, doi:10.1016/j.molmed.2015.01.001.
2. Lim, M.; Xia, Y.; Bettegowda, C.; Weller, M. Current State of Immunotherapy for Glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, 422–442, doi:10.1038/s41571-018-0003-5.
3. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.M.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idbaih, A.; Ahluwalia, M.S.; Fink, K.; et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *318*, 2306, doi:10.1001/jama.2017.18718.
4. FABLE ZUSTOVICH; GIUSEPPE LOMBARDI; ALESSANDRO DELLA PUPPA; ANTONINO ROTILIO; RENATO SCIENZA; DAVIDE PASTORELLI A Phase II Study of Cisplatin and Temozolomide in Heavily Pre-Treated Patients with Temozolomide-Refractory High-Grade Malignant Glioma. *Anticancer Res* **2009**, *29*, 4275.
5. Chiocca, E.A.; Aguilar, L.K.; Bell, S.D.; Kaur, B.; Hardcastle, J.; Cavaliere, R.; McGregor, J.; Lo, S.; Ray-Chaudhuri, A.; Chakravarti, A.; et al. Phase IB Study of Gene-Mediated Cytotoxic Immunotherapy Adjuvant to Up-Front Surgery and Intensive Timing Radiation for Malignant Glioma. *JCO* **2011**, *29*, 3611–3619, doi:10.1200/JCO.2011.35.5222.
6. Castro, M.G.; Candolfi, M.; Wilson, T.J.; Calinescu, A.; Paran, C.; Kamran, N.; Koschmann, C.; Moreno-Ayala, M.A.; Assi, H.; Lowenstein, P.R. Adenoviral Vector-Mediated Gene Therapy for Gliomas: Coming of Age. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2014**, *14*, 1241–1257, doi:10.1517/14712598.2014.915307.
7. Todo, T.; Ito, H.; Ino, Y.; Ohtsu, H.; Ota, Y.; Shibahara, J.; Tanaka, M. Intratumoral Oncolytic Herpes Virus G47 Δ for Residual or Recurrent Glioblastoma: A Phase 2 Trial. *Nat Med* **2022**, *28*, 1630–1639, doi:10.1038/s41591-022-01897-x.
8. Yuan, J.; Amin, P.; Ofengeim, D. Necroptosis and RIPK1-Mediated Neuroinflammation in CNS Diseases. *Nat Rev Neurosci* **2019**, *20*, 19–33, doi:10.1038/s41583-018-0093-1.
9. Ofengeim, D.; Yuan, J. Regulation of RIP1 Kinase Signalling at the Crossroads of Inflammation and Cell Death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, *14*, 727–736, doi:10.1038/nrm3683.
10. Mifflin, L.; Ofengeim, D.; Yuan, J. Receptor-Interacting Protein Kinase 1 (RIPK1) as a Therapeutic Target. *Nat Rev Drug Discov* **2020**, *19*, 553–571, doi:10.1038/s41573-020-0071-y.
11. Zheng, X.; Yang, J.; Wang, Y.; Li, Q.; Song, Y.; Su, M.; Li, J.; Zhang, L.; Li, Z.; Zhou, B.; et al. RIP1 Promotes Proliferation through G2/M Checkpoint Progression and Mediates Cisplatin-Induced Apoptosis and Necroptosis in Human Ovarian Cancer Cells. *Acta Pharmacol Sin* **2020**, *41*, 1223–1233, doi:10.1038/s41401-

019-0340-7.

12. Zhang, W.; Sun, Y.; Liu, L.; Li, Z. Prognostic Significance of TNFR-Associated Factor 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2) in Glioblastoma. *Med Sci Monit* **2017**, *23*, 4506–4512, doi:10.12659/MSM.903397.
13. Xie, H.; Yuan, C.; Li, J.; Li, Z.; Lu, W. Potential Molecular Mechanism of TNF Superfamily-Related Genes in Glioblastoma Multiforme Based on Transcriptome and Epigenome. *Front. Neurol.* **2021**, *12*, 576382, doi:10.3389/fneur.2021.576382.
14. Wei, Q.; Singh, O.; Ekinci, C.; Gill, J.; Li, M.; Mamatjan, Y.; Karimi, S.; Bunda, S.; Mansouri, S.; Aldape, K.; et al. TNF α Secreted by Glioma Associated Macrophages Promotes Endothelial Activation and Resistance against Anti-Angiogenic Therapy. *acta neuropathol commun* **2021**, *9*, 67, doi:10.1186/s40478-021-01163-0.
15. Wang, Q.; Fan, D.; Xia, Y.; Ye, Q.; Xi, X.; Zhang, G.; Xiao, C. The Latest Information on the RIPK1 Post-Translational Modifications and Functions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2021**, *142*, 112082, doi:10.1016/j.biopha.2021.112082.
16. Cao, L.; Mu, W. Necrostatin-1 and Necroptosis Inhibition: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Pharmacological Research* **2021**, *163*, 105297, doi:10.1016/j.phrs.2020.105297.
17. Shi, K.; Zhang, J.; Zhou, E.; Wang, J.; Wang, Y. Small-Molecule Receptor-Interacting Protein 1 (RIP1) Inhibitors as Therapeutic Agents for Multifaceted Diseases: Current Medicinal Chemistry Insights and Emerging Opportunities. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 14971–14999, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01518.
18. Weisel, K.; Scott, N.E.; Tompson, D.J.; Votta, B.J.; Madhavan, S.; Povey, K.; Wolstenholme, A.; Simeoni, M.; Rudo, T.; Richards-Peterson, L.; et al. Randomized Clinical Study of Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of RIPK1 Inhibitor GSK2982772 in Healthy Volunteers. *Pharmacol Res Perspect* **2017**, *5*, e00365, doi:10.1002/prp2.365.
19. Barata, P.; Sood, A.K.; Hong, D.S. RNA-Targeted Therapeutics in Cancer Clinical Trials: Current Status and Future Directions. *Cancer treatment reviews* **2016**, *50*, 35–47, doi:10.1016/j.ctrv.2016.08.004.
20. Bofill-De Ros, X.; Gu, S. *Guidelines for the Optimal Design of miRNA-Based shRNAs*; Academic Press Inc., 2016; Vol. 103;.
21. Liu, Y.P.; Karg, M.; Herrera-Carrillo, E.; Berkhout, B. Towards Antiviral shRNAs Based on the AgoshRNA Design. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0128618, doi:10.1371/journal.pone.0128618.
22. Kavarthapu, R.; Dufau, M.L. Prolactin Receptor Gene Transcriptional Control, Regulatory Modalities Relevant to Breast Cancer Resistance and Invasiveness. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 949396, doi:10.3389/fendo.2022.949396.
23. Mendes, G.A.; Pereira-Lima, J.F.S.; Kohek, M.B.; Trott, G.; Di Domenico, M.; Ferreira, N.P.; Oliveira, M.D.C. Prolactin Gene Expression in Primary Central Nervous System Tumors. *J Negat Results BioMed* **2013**, *12*, 4, doi:10.1186/1477-

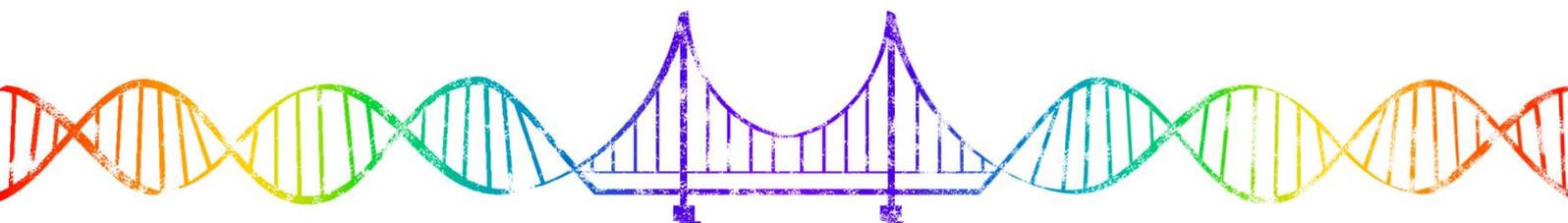
5751-12-4.

24. Alkharusi, A.; Yu, S.; Landázuri, N.; Zadjali, F.; Davodi, B.; Nyström, T.; Gräslund, T.; Rahbar, A.; Norstedt, G. Stimulation of Prolactin Receptor Induces STAT-5 Phosphorylation and Cellular Invasion in Glioblastoma Multiforme. *Oncotarget* **2016**, *7*, 79572–79583, doi:10.18632/oncotarget.12840.
25. Sreekanthreddy, P.; Srinivasan, H.; Kumar, D.M.; Nijaguna, M.B.; Sridevi, S.; Vrinda, M.; Arivazhagan, A.; Balasubramaniam, A.; Hegde, A.S.; Chandramouli, B.A.; et al. Identification of Potential Serum Biomarkers of Glioblastoma: Serum Osteopontin Levels Correlate with Poor Prognosis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2010**, *19*, 1409–1422, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1077.
26. Asad, A.S.; Nicola Candia, A.J.; Gonzalez, N.; Zuccato, C.F.; Abt, A.; Orrillo, S.J.; Lastra, Y.; De Simone, E.; Boutillon, F.; Goffin, V.; et al. Prolactin and Its Receptor as Therapeutic Targets in Glioblastoma Multiforme. *Sci Rep* **2019**, *9*, 19578, doi:10.1038/s41598-019-55860-x.
27. Goffin, V. Prolactin Receptor Targeting in Breast and Prostate Cancers: New Insights into an Old Challenge. *Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *179*, 111–126, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.009.
28. LaPensee, E.W.; Schwemberger, S.J.; LaPensee, C.R.; Bahassi, E.M.; Afton, S.E.; Ben-Jonathan, N. Prolactin Confers Resistance against Cisplatin in Breast Cancer Cells by Activating Glutathione-S-Transferase. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1298–1304, doi:10.1093/carcin/bgp120.
29. Asad, A.S.; Nicola Candia, A.J.; Gonzalez, N.; Zuccato, C.F.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. The Role of the Prolactin Receptor Pathway in the Pathogenesis of Glioblastoma: What Do We Know so Far? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2020**, *24*, 1121–1133, doi:10.1080/14728222.2020.1821187.
30. Bernichtein, S.; Kayser, C.; Dillner, K.; Moulin, S.; Kopchick, J.J.; Martial, J.A.; Norstedt, G.; Isaksson, O.; Kelly, P.A.; Goffin, V. Development of Pure Prolactin Receptor Antagonists. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 35988–35999, doi:10.1074/jbc.M305687200.
31. Bofill-De Ros, X.; Gu, S. Guidelines for the Optimal Design of miRNA-Based shRNAs. *Methods* **2016**, *103*, 157–166, doi:10.1016/j.ymeth.2016.04.003.
32. Gruber, A.R.; Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; Neubock, R.; Hofacker, I.L. The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, W70–W74, doi:10.1093/nar/gkn188.
33. Wang, C.-H.; Naik, N.G.; Liao, L.-L.; Wei, S.-C.; Chao, Y.-C. Global Screening of Antiviral Genes That Suppress Baculovirus Transgene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **2017**, *6*, 194–206, doi:10.1016/j.omtm.2017.07.002.
34. Tran, T.-T.; Uhl, M.; Ma, J.Y.; Janssen, L.; Sriram, V.; Aulwurm, S.; Kerr, I.; Lam, A.; Webb, H.K.; Kapoun, A.M.; et al. Inhibiting TGF-Beta Signaling Restores Immune Surveillance in the SMA-560 Glioma Model. *Neuro Oncol* **2007**, *9*, 259–270, doi:10.1215/15228517-2007-010.

35. Preusser, M.; Lim, M.; Hafler, D.A.; Reardon, D.A.; Sampson, J.H. Prospects of Immune Checkpoint Modulators in the Treatment of Glioblastoma. *Nat Rev Neurol* **2015**, *11*, 504–514, doi:10.1038/nrneurol.2015.139.
36. Hodges, T.R.; Ott, M.; Xiu, J.; Gatalica, Z.; Swensen, J.; Zhou, S.; Huse, J.T.; de Groot, J.; Li, S.; Overwijk, W.W.; et al. Mutational Burden, Immune Checkpoint Expression, and Mismatch Repair in Glioma: Implications for Immune Checkpoint Immunotherapy. *Neuro Oncol* **2017**, *19*, 1047–1057, doi:10.1093/neuonc/nox026.
37. Garber, S.T.; Hashimoto, Y.; Weathers, S.-P.; Xiu, J.; Gatalica, Z.; Verhaak, R.G.W.; Zhou, S.; Fuller, G.N.; Khasraw, M.; De Groot, J.; et al. Immune Checkpoint Blockade as a Potential Therapeutic Target: Surveying CNS Malignancies. *NEUONC* **2016**, *18*, 1357–1366, doi:10.1093/neuonc/nov132.
38. Yue, Q.; Zhang, X.; Ye, H.-X.; Wang, Y.; Du, Z.-G.; Yao, Y.; Mao, Y. The Prognostic Value of Foxp3+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Glioblastoma. *J Neurooncol* **2014**, *116*, 251–259, doi:10.1007/s11060-013-1314-0.
39. Gonzalez, N.; Asad, A.S.; Gómez Escalante, J.; Peña Agudelo, J.A.; Nicola Candia, A.J.; García Fallit, M.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. Potential of IDH Mutations as Immunotherapeutic Targets in Gliomas: A Review and Meta-Analysis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2021**, *25*, 1045–1060, doi:10.1080/14728222.2021.2017422.
40. Harris, P.A.; Berger, S.B.; Jeong, J.U.; Nagilla, R.; Bandyopadhyay, D.; Campobasso, N.; Capriotti, C.A.; Cox, J.A.; Dare, L.; Dong, X.; et al. Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1247–1261, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01751.
41. Melo-Lima, S.; Lopes, M.C.; Mollinedo, F. Necroptosis Is Associated with Low Procaspase-8 and Active RIPK1 and -3 in Human Glioma Cells. *Oncoscience* **2014**, *1*, 649–664, doi:10.18632/oncoscience.89.

Capítulo 5.

Conclusiones generales y
perspectivas



Capítulo 5. Conclusiones generales y perspectivas

Conclusiones generales

Optimización de la producción de recBV: sistema PluriBAC

Los baculovirus, especialmente AcMNPV, han sido ampliamente estudiados y aplicados en diversos usos biotecnológicos durante años. Los diferentes esfuerzos por desarrollar nuevas tecnologías basadas en baculovirus han generado diferentes productos y pruebas de concepto en muchos campos que incluyen no sólo la agricultura sino también la salud animal y humana [1–3].

La ingeniería genética de AcMNPV para generar viriones modificados se ha utilizado ampliamente para la investigación básica y aplicada. Estas modificaciones se basaron inicialmente en la recombinación homóloga en cultivos de células de insectos, pero más tarde, tras la generación de bácmidos de AcMNPV, fue posible la modificación genómica en bacterias. Además, se han desarrollado estrategias novedosas para la modificación del genoma de AcMNPV, incluida la construcción de genomas sintéticos [4,5] o procedimientos de edición de genes mediados por tecnología CRISPR/Cas [6,7].

Debido a la versatilidad de los baculovirus, no sólo pueden usarse como biopesticidas sino también como vectores para la expresión de proteínas recombinantes y nanoestructuras como como VLP (*virus-like particles*), para la generación de plataformas de exposición superficial de proteínas y como vectores de *delivery* de genes para transducir células de mamíferos [3]. Los primeros productos comerciales derivados del uso de baculovirus para la salud humana, que llegaron al mercado fueron Cervarix® (una vacuna VLP humana contra el HPV (virus del papiloma humano); GlaxoSmithKline, 2007); Provenge® (una proteína recombinante para el cáncer de próstata; Dendreon, 2010); Flublok® (una vacuna de subunidades humanas contra la influenza; Corporación de Ciencias de las Proteínas, 2013); y Glybera® (producto de terapia genética humana para el tratamiento de la deficiencia de lipoproteína lipasa basado en recAAV producido por vectores derivados de baculovirus) [3,8].

Más recientemente Novavax desarrolló una vacuna para prevenir la COVID-19, comercializada también bajo los nombres Nuvaxovid y Covovax, siendo la primera vacuna COVID-19 producida por BEVS en obtener la aprobación de la FDA [9].

En los últimos años, se han disparado los estudios básicos y aplicados sobre los baculovirus produciendo conocimientos más fundamentales y permitiendo el surgimiento de mejores estrategias para su modificación y aplicación. La gran versatilidad de los baculovirus y su indiscutible utilidad, los convierten en una potente herramienta para la salud humana y animal, y los múltiples campos de

aplicación desde la industria agrícola hasta la farmacéutica confirman su enorme potencial tecnológico.

Como se ha discutido anteriormente en este trabajo, últimamente ha crecido la necesidad de generar construcciones que expresen múltiples genes. Una de las estrategias más relevantes desarrolladas para afrontar esta demanda de forma sencilla y rápida consiste en el sistema de clonado por Golden Gate, que utiliza enzimas de restricción de tipo IIS que cortan por fuera del sitio de reconocimiento, para permitir el ensamblado secuencial de diferentes insertos en un vector de destino, logrando así la conformación de múltiples *cassettes* de expresión. Esta estrategia de clonado ha sido utilizada para generar construcciones de expresión multigénicas en plantas [10–12], levaduras [13] y hongos [14].

El presente trabajo doctoral apuntó a la generación de una plataforma basada en la estrategia de clonado por Golden Gate, para la generación de baculovirus recombinantes mediante diferentes estrategias (recombinación homóloga en células de insecto o transposición sitio específica en bacterias).

El diseño del sistema de clonado que desarrollamos durante el presente trabajo de tesis doctoral, denominado PluriBAC, consiste en distintos niveles relacionados con la complejidad y posibilidades de combinación de módulos, es decir, diferentes alternativas de secuencias promotoras, terminadoras y de genes de interés. El sistema PluriBAC fue, en principio, desafiado mediante la generación de dos baculovirus recombinantes utilizando el sistema GOZA: dos de ellos codifican para las proteínas reporteras, dTomato y citrine, Ac-dTomato y Ac-citrine respectivamente y fueron utilizados para infectar larvas de *Spodoptera frugiperda* y para transducir células del sistema nervioso central tanto *in vitro* como *in vivo*. De esta manera, se evidenció que los recBV obtenidos mantenían su capacidad infectiva y transductora. Además, para comprobar la capacidad del sistema desarrollado de generar un recBV mediante el sistema Bac-to-Bac, se diseñó un vector conteniendo los sitios necesarios para que ocurriera la transposición sitio específica en bacterias. La correcta generación del recBV se evidenció mediante microscopía de fluorescencia en células de insectos infectadas [15].

Durante los años en los que desarrollamos el sistema PluriBAC, en forma independiente se publicó otro sistema que permite la generación de recBV utilizando ensamblado modular por Golden Gate como estrategia de clonado denominado GoldenBac [16]. Este novedoso sistema permite el ensamblado de hasta 15 *cassettes* de expresión génica con una alta eficiencia. Para ello, cuenta con dos niveles secuenciales y dos series de vectores, que contienen un promotor de poliedrina y un terminador, permitiendo la inserción del gen de interés luego del clivaje con la enzima Bsal.

A diferencia de otros sistemas similares [14,16,17], los vectores que conforman nuestro sistema PluriBAC, tanto de nivel 1 como de nivel 2, no contienen secuencias promotoras. A pesar de que este hecho conlleva la necesidad de amplificar por separado al promotor que formará parte de cada *cassette* de expresión, permite la enorme ventaja de poder diseñar los vectores según las necesidades del usuario, aumentando la versatilidad del sistema. Por otro lado, la posibilidad de clonar con dos enzimas de restricción de tipo IIS, a diferencia del sistema GoldenBac diseñado para utilizar sólo la enzima Bsal, amplía el rango de insertos que se pueden utilizar sin necesidad de ser curados previamente.

Sin embargo, el sistema PluriBAC, al igual que otros sistemas basados en la tecnología de Golden Gate, presenta una limitación inherente a la cantidad de extremos cohesivos que pueden diseñarse de modo tal que sean lo suficientemente distintos como para permitir el ingreso ordenado de los módulos. Esta limitación debe tenerse en cuenta al momento del diseño racional de cada clonado y de esa forma tomar la decisión de realizar un único ensamblado con múltiples insertos en el vector de destino (nivel 2), o bien, múltiples ensamblados en vectores de jerarquización (nivel 1) que luego darán lugar al vector final deseado.

El sistema PluriBAC mostró un rendimiento excelente en el clonado de múltiples secuencias heterólogas en el genoma de AcMNPV. Dependiendo de la naturaleza de estas secuencias heterólogas, los vectores derivados de PluriBAC podrían conducir a la generación de recAcMNPV mediante recombinación homóloga en células de insectos o transposición desarrollada en bacterias. Los baculovirus recombinantes generados con el sistema PluriBAC se utilizaron con éxito para infectar larvas de moscas, transducir células de mamíferos *in vitro* y cerebros de ratones sanos y enfermos *in vivo*. Esta capacidad intrínseca de combinar libremente múltiples secuencias diferentes con actividad biológica en organismos diversos convierte a PluriBAC en una caja de herramientas muy útil para la biotecnología baculoviral.

Vías de señalización y moléculas blanco para la terapia génica de GBM

Como campo de aplicación con el que desafiar nuestro nuevo sistema de producción de baculovirus recombinantes elegimos la terapia génica antitumoral y como modelo de estudio los gliomas difusos y en particular al Glioblastoma Multiforme (GBM) debido a la ausencia de tratamientos efectivos y la baja tasa de supervivencia de los pacientes afectados con este tipo de tumor [18].

En primer lugar, enfocamos nuestros esfuerzos en la búsqueda y selección de posibles nuevos blancos terapéuticos a partir de búsqueda bibliográfica y análisis de datos clínicos, genómicos y transcriptómicos obtenidos a partir de bases de datos de biopsias de pacientes disponibles en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). En particular, nos centramos en el estudio de las distintas vías de muerte y

proliferación ya que constituyen puntos relevantes en la transformación celular y la fisiología y patología tumoral [19].

En ese sentido, realizamos análisis bioinformáticos exhaustivos a partir de bases de datos de pacientes con glioma, evaluando la expresión tanto de RIPK1 como de PRLR y su correlación con diferentes atributos clínicos como la supervivencia y el pronóstico, además de estudiar la correlación de cada uno con distintos marcadores relevantes para la progresión de la enfermedad.

Aunque en la última década se ha demostrado que las biopsias de GBM expresan PRL y PRLR en varios estudios, sólo recientemente se ha comprendido mejor el papel de esta hormona y su receptor. En el arduo trabajo de buscar nuevas estrategias terapéuticas contra GBM, tanto PRL como PRLR han emergido como potenciales blancos terapéuticos contra estos gliomas, ya que se ha demostrado que estarían fuertemente asociadas con la supervivencia, migración y quimiosensibilidad de células de GBM, y, por lo tanto, con el pronóstico de los pacientes [20]. A partir de nuestros análisis *in silico* podemos concluir que PRLR correlaciona con los tipos de glioma más agresivos y podría estar involucrado en las vías implicadas en la proliferación celular y la supervivencia.

RIPK1, por su parte, es un mediador clave de la muerte celular apoptótica y necrótica, así como de las vías inflamatorias y proliferativas. Recientemente, ha surgido como un prometedor blanco terapéutico para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes e inflamatorias en humanos. En este sentido, la evidencia genética humana ha vinculado la disfunción de RIPK1 con la patogénesis de la ELA (esclerosis lateral amiotrófica), así como con otras enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas [21]. Además, según mostraron nuestros resultados, la expresión de RIPK1 estaría asociada a una peor prognosis en GBM [22]. En particular, observamos que los niveles de expresión de RIPK1 se encuentran fuertemente asociados con fenotipos tumorales más agresivos. En el plano molecular, observamos una correlación con las vías de muerte pro-inflamatorias y con perfiles de infiltración de células inmunes en el microambiente tumoral relacionados con la inflamación crónica característica de GBM. El aumento en las firmas genéticas correspondientes a macrófagos en aquellos tumores IDHwt con altos niveles de expresión de RIPK1 podría explicar la correlación observada entre esta proteína y las vías inducidas por TNF- α en las biopsias analizadas [23].

Estos resultados nos permiten concluir que tanto RIPK1 como PRLR desempeñan un rol relevante en la patología de los gliomas difusos y en particular del GBM.

A continuación, habiendo desarrollado el sistema PluriBAC para la eficiente generación de recBV y habiendo seleccionado a PRLR y RIPK1 como genes de relevancia en la patología de GBM, con el objetivo último de validar pre-

clínicamente ambos genes como posibles blancos terapéuticos, se realizaron ensayos en modelos experimentales de GBM *in vitro*.

En primer lugar, con el fin de caracterizar el rol de RIPK1 en GBM, evaluamos el efecto de un inhibidor comercial de RIPK1, combinado o no con los quimioterápicos cisplatino y temozolomida, sobre la proliferación celular y la apoptosis. Los tratamientos combinados con inhibidor de RIPK1 y cisplatino en una dosis clínicamente relevante de 1 μ M, así como los ensayos de sensibilización previa con inhibidor, demostraron ser eficientes en reducir la quimiorresistencia incrementando la apoptosis y reduciendo la proliferación celular.

A continuación, nos propusimos utilizar el sistema PluriBAC para generar un recAcMNPV que expresara un antagonista de la vía de prolactina y un reAcMNPV capaz de vehiculizar un shRNA que disminuyera la expresión de RIPK1. Finalmente evaluamos el efecto de ambos baculovirus sobre la proliferación, apoptosis y viabilidad celular observando efectos antitumorales para ambos baculovirus recombinantes.

Es importante destacar que el baculovirus Ac shRIPK1 presentó efectos pro-apoptóticos y anti-proliferativos superiores a los exhibidos por el inhibidor comercial, lo que nos permite concluir que, al menos en la línea celular ensayada, el silenciamiento de RIPK1 sería una estrategia más eficiente que la inhibición de su función quinasa. Estas diferencias podrían deberse al rol dual que desempeña RIPK1 en la decisión celular entre la supervivencia y la muerte. El silenciamiento de su expresión no solo afectaría a la necroptosis y la inflamación asociada, sino también al rol pro-proliferativo de esta proteína.

Adicionalmente, tal como había sido reportado para otros tipos celulares [24], observamos que, en células de GBM, el shRIPK1 fue capaz de incrementar la eficiencia de transducción de los baculovirus y los niveles de expresión de los transgenes. Teniendo en cuenta todos estos resultados podemos concluir que el *cassette* de expresión del shRIPK1 no solo tiene potencial terapéutico en sí mismo, sino que también podría convertirse en un complemento potenciador de la expresión de otros transgenes con potencial terapéutico como el antagonista de PRL que evaluamos también en este trabajo de tesis doctoral.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que tanto RIPK1 como PRLR podrían desempeñar un papel importante en la progresión y patogénesis del glioma y que los baculovirus Ac aPRL y Ac shRIPK1 son potenciales agentes terapéuticos que podrían resultar de suma utilidad para el diseño de nuevos esquemas terapéuticos combinados. Con relación a RIPK1 podemos concluir, además, que el silenciamiento de su expresión posee un efecto antitumoral mayor al exhibido por el inhibidor comercial destacando la necesidad de tener en cuenta los niveles de

expresión de RIPK1 para la toma de decisiones al elegir el tratamiento apropiado para cada paciente o para diseñar nuevas alternativas terapéuticas.

En resumen, en el transcurso de este trabajo de tesis, hemos desarrollado un sistema versátil denominado PluriBAC, basado en el clonado por Golden Gate para la generación de baculovirus recombinantes. Por otro lado, a partir de distintos análisis *in silico* e *in vitro*, propusimos a RIPK1 y a PRLR como posibles blancos terapéuticos contra el GBM. La sumatoria de los resultados obtenidos sugieren que los recAvMNPV obtenidos mediante el sistema PluriBAC, destinados a regular negativamente a RIPK1 y a PRLR, podrían ser candidatos promisorios para el tratamiento contra el Glioblastoma Multiforme.

Perspectivas

A partir del conjunto de resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, surgen diferentes perspectivas que plantean nuevos objetivos a abordar a corto y mediano plazo para poder profundizar aún más en el conocimiento molecular de las vías de señalización que hemos abordado, así como continuar avanzando en la caracterización y validación experimental de los vectores terapéuticos que desarrollamos:

- Profundizar en la caracterización de los dos recAcMNPV terapéuticos obtenidos mediante el sistema PluriBAC
 - Confirmar el efecto del shRNA específico de RIPK1 codificado por el baculovirus Ac-pU6-shRIPK1-CMV-citrine-SV40
 - Confirmar el efecto del antagonista del receptor de PRL codificado por el baculovirus Ac-Ef1 α -aPRL-bGH sobre la vía de PRL
 - Caracterizar molecularmente la vía de muerte inducida por ambos baculovirus.
- Realizar ensayos preclínicos *in vitro* para evaluar la citotoxicidad de los recAcMNPV sobre células normales del SNC, tales como astrocitos.
- Realizar ensayos preclínicos *in vivo* para evaluar la progresión tumoral y la sobrevida en terapias combinadas contra el GBM
- Evaluar las vías de muerte y proliferación intratumoral en cortes de cerebros, obtenidos a partir de los ensayos *in vivo*.
- Generar un baculovirus que combine ambos genes terapéuticos (aPRL y shRIPK1) mediante el sistema PluriBAC y evaluar su desempeño como vector de terapia génica antitumoral.

Referencias

1. Hu, Y.-C.; Yao, K.; Wu, T.-Y. Baculovirus as an Expression and/or Delivery Vehicle for Vaccine Antigens. *Expert Review of Vaccines* 2008, 7, 363–371, doi:10.1586/14760584.7.3.363.
2. Wang, J.; Zhu, L.; Chen, X.; Huang, R.; Wang, S.; Dong, P. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Functionalized by Hybrid Baculovirus-Adeno-

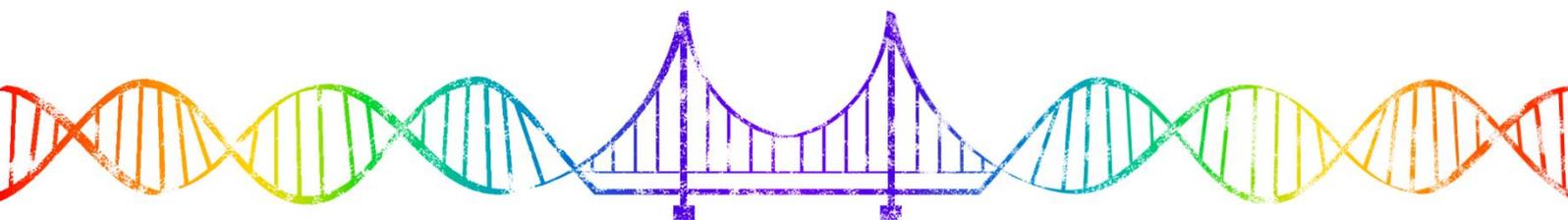
- Associated Viral Vectors for Targeting Hypopharyngeal Carcinoma. *Stem Cells Dev* **2019**, *28*, 543–553, doi:10.1089/scd.2018.0252.
3. Mietzsch, M.; Casteleyn, V.; Weger, S.; Zolotukhin, S.; Heilbronn, R. OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsulation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther* **2015**, *26*, 688–697, doi:10.1089/hum.2015.050.
 4. Dunkle, L.M.; Izikson, R.; Patriarca, P.A.; Goldenthal, K.L.; Muse, D.; Cox, M.M.J. Randomized Comparison of Immunogenicity and Safety of Quadrivalent Recombinant Versus Inactivated Influenza Vaccine in Healthy Adults 18–49 Years of Age. *The Journal of Infectious Diseases* **2017**, *216*, 1219–1226, doi:10.1093/infdis/jix478.
 5. Guebre-Xabier, M.; Patel, N.; Tian, J.-H.; Zhou, B.; Maciejewski, S.; Lam, K.; Portnoff, A.D.; Massare, M.J.; Frieman, M.B.; Piedra, P.A.; et al. NVX-CoV2373 Vaccine Protects Cynomolgus Macaque Upper and Lower Airways against SARS-CoV-2 Challenge. *Vaccine* **2020**, *38*, 7892–7896, doi:10.1016/j.vaccine.2020.10.064.
 6. Keeler, A.M.; ElMallah, M.K.; Flotte, T.R. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. *Clin Transl Sci* **2017**, *10*, 242–248, doi:10.1111/cts.12466.
 7. Urabe, M.; Ding, C.; Kotin, R.M. Insect Cells as a Factory to Produce Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors. *Human Gene Therapy* **2002**, *13*, 1935–1943, doi:10.1089/10430340260355347.
 8. Yang, J.; Wang, W.; Chen, Z.; Lu, S.; Yang, F.; Bi, Z.; Bao, L.; Mo, F.; Li, X.; Huang, Y.; et al. A Vaccine Targeting the RBD of the S Protein of SARS-CoV-2 Induces Protective Immunity. *Nature* **2020**, *586*, 572–577, doi:10.1038/s41586-020-2599-8.
 9. Pavot, V.; Berry, C.; Kishko, M.; Anosova, N.G.; Huang, D.; Tibbitts, T.; Raillard, A.; Gautheron, S.; Gutzeit, C.; Koutsoukos, M.; et al. Protein-Based SARS-CoV-2 Spike Vaccine Booster Increases Cross-Neutralization against SARS-CoV-2 Variants of Concern in Non-Human Primates. *Nat Commun* **2022**, *13*, 1699, doi:10.1038/s41467-022-29219-2.
 10. Engler, C.; Youles, M.; Gruetzner, R.; Ehnert, T.-M.; Werner, S.; Jones, J.D.G.; Patron, N.J.; Marillonnet, S. A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 839–843, doi:10.1021/sb4001504.
 11. Occhialini, A.; Piatek, A.A.; Pfothenhauer, A.C.; Frazier, T.P.; Stewart, C.N.; Lenaghan, S.C. MoChlo: A Versatile, Modular Cloning Toolbox for Chloroplast Biotechnology. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 943–957, doi:10.1104/pp.18.01220.
 12. Lee, J.H.; Won, H.J.; Oh, E.-S.; Oh, M.-H.; Jung, J.H. Golden Gate Cloning-

- Compatible DNA Replicon/2A-Mediated Polycistronic Vectors for Plants. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 559365, doi:10.3389/fpls.2020.559365.
13. Tong, Y.; Zhou, J.; Zhang, L.; Xu, P. A Golden-Gate Based Cloning Toolkit to Build Violacein Pathway Libraries in *Yarrowia Lipolytica*. *ACS Synth Biol* **2021**, *10*, 115–124, doi:10.1021/acssynbio.0c00469.
 14. Dahlmann, T.A.; Terfehr, D.; Becker, K.; Teichert, I. Golden Gate Vectors for Efficient Gene Fusion and Gene Deletion in Diverse Filamentous Fungi. *Curr Genet* **2021**, *67*, 317–330, doi:10.1007/s00294-020-01143-2.
 15. Amorós Morales, L.C.; Marchesini, A.; Gómez Bergna, S.M.; García Fallit, M.; Tongiani, S.E.; Vásquez, L.; Ferrelli, M.L.; Videla-Richardson, G.A.; Candolfi, M.; Romanowski, V.; et al. PluriBAC: A Versatile Baculovirus-Based Modular System to Express Heterologous Genes in Different Biotechnological Platforms. *Viruses* **2023**, *15*, 1984, doi:10.3390/v15101984.
 16. Neuhold, J.; Radakovics, K.; Lehner, A.; Weissmann, F.; Garcia, M.Q.; Romero, M.C.; Berrow, N.S.; Stolt-Bergner, P. GoldenBac: A Simple, Highly Efficient, and Widely Applicable System for Construction of Multi-Gene Expression Vectors for Use with the Baculovirus Expression Vector System. *BMC Biotechnol* **2020**, *20*, 26, doi:10.1186/s12896-020-00616-z.
 17. Berger, I.; Fitzgerald, D.J.; Richmond, T.J. Baculovirus Expression System for Heterologous Multiprotein Complexes. *Nat Biotechnol* **2004**, *22*, 1583–1587, doi:10.1038/nbt1036.
 18. Gonzalez, N.; Asad, A.S.; Gómez Escalante, J.; Peña Agudelo, J.A.; Nicola Candia, A.J.; García Fallit, M.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. Potential of IDH Mutations as Immunotherapeutic Targets in Gliomas: A Review and Meta-Analysis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2021**, *25*, 1045–1060, doi:10.1080/14728222.2021.2017422.
 19. Tong, X.; Tang, R.; Xiao, M.; Xu, J.; Wang, W.; Zhang, B.; Liu, J.; Yu, X.; Shi, S. Targeting Cell Death Pathways for Cancer Therapy: Recent Developments in Necroptosis, Pyroptosis, Ferroptosis, and Cuproptosis Research. *J Hematol Oncol* **2022**, *15*, 174, doi:10.1186/s13045-022-01392-3.
 20. Asad, A.S.; Nicola Candia, A.J.; Gonzalez, N.; Zuccato, C.F.; Seilicovich, A.; Candolfi, M. The Role of the Prolactin Receptor Pathway in the Pathogenesis of Glioblastoma: What Do We Know so Far? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2020**, *24*, 1121–1133, doi:10.1080/14728222.2020.1821187.
 21. Mifflin, L.; Ofengeim, D.; Yuan, J. Receptor-Interacting Protein Kinase 1 (RIPK1) as a Therapeutic Target. *Nat Rev Drug Discov* **2020**, *19*, 553–571, doi:10.1038/s41573-020-0071-y.

22. Leslie C. Amorós Morales; Santiago M. Gómez Bergna; Abril Marchesini; Ma. Luján Scalise; Nazareno González; Marianela Candolfi; Víctor Romanowski; Matias L. Pidre Role of RIPK1 in Diffuse Gliomas Pathology. **2023**, doi:<https://doi.org/10.1101/2023.11.11.566709>.
23. Wei, Q.; Singh, O.; Ekinici, C.; Gill, J.; Li, M.; Mamatjan, Y.; Karimi, S.; Bunda, S.; Mansouri, S.; Aldape, K.; et al. TNF α Secreted by Glioma Associated Macrophages Promotes Endothelial Activation and Resistance against Anti-Angiogenic Therapy. *acta neuropathol commun* **2021**, 9, 67, doi:10.1186/s40478-021-01163-0.
24. Wang, C.-H.; Naik, N.G.; Liao, L.-L.; Wei, S.-C.; Chao, Y.-C. Global Screening of Antiviral Genes That Suppress Baculovirus Transgene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **2017**, 6, 194–206, doi:10.1016/j.omtm.2017.07.002.

Capítulo 6.

Materiales y métodos



Capítulo 6. Materiales y métodos

Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (La Jolla, USA), Promega (Madison, USA), New England Biolabs (Beverly, USA) y Gibco BRL- Life Technologies (Grand Island, USA). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Thermo-Fischer / Life Sciences / Invitrogen (Grand Island, USA) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (EE.UU.). Las fotografías se obtuvieron con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak digital science) o capturador de imágenes Epichemi3 Darkroom (UVP Bioimaging Systems). Para la toma de imágenes se utilizó un escáner VistaScan 240. La cuantificación de muestras se realizó por medidas de absorbancia; con el programa LabWorks™ 4.6 (Image Acquisition and Analysis Software) o con Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. Algunos plásmidos fueron recibidos de Clontech Laboratories / Takara Bio; otros fueron gentilmente cedidos por colegas. En particular, se agradece la gentileza del Dr. Jeon-Ho Je (Seul, Corea del Sur) por compartir con nosotros el bAcGOZA y el plásmido pBacPAK9.

Soluciones

Todas las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración con filtro de diámetro de poro de 22 µm. El agua utilizada en las soluciones fue bidestilada, filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave.

Soluciones para la extracción de plásmidos

Alcoholes: etanol 96% y 70%.

Solución I: glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH=8) EDTA 1 mM

Solución II: NaOH 0,2 N; SDS 1%

Solución III: acetato de potasio (KAcO) 5M, pH=4,8 (5M acetato)

Buffer TE: Tris•HCl 10 mM (pH=8) EDTA 1 mM

Acetato de sodio (NaAcO) 3 M: se pesaron 246,1 gramos de NaAcO y se disolvieron en agua bidestilada. Se llevó a pH 5,2 con ácido acético glacial y se añadió agua hasta llegar a un volumen final de 1 L.

Cloroformo : alcohol isoamílico (24:1): 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico.

Fenol: fenol equilibrado con fase acuosa a pH 8

Soluciones de antibióticos

Los antibióticos se disolvieron en agua bidestilada estéril a una concentración final de 100 mg/ml y se esterilizaron por filtración.

Soluciones para la resolución de ácidos nucleicos mediante electroforesis

Buffer de corrida TAE (Tris-HCl, ácido acético, EDTA) 50 X: 242 Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial y 100 mM EDTA 0,5 M pH=8,0. Completado a 1 L con agua.

TAE 1X: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

Solución Stock Bromuro de etidio: 10 mg/ml BrEt, conservado en oscuridad.

Geles de agarosa: agarosa 0,3% - 2% en buffer TAE 1X.

Solución de siembra: TAE 1X, glicerol 30% y colorantes xilen cianol FF y azul de bromofenol.

Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Gel separador: 18, 12, ó 10%, dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida : bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en buffer de separación 1 X (Tris•HCl 0,375 M, pH 8,8; SDS 0,1%). Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente. Agregar luego de desaerear la solución de acrilamida:bis inmediatamente antes de la verter la solución entre las placas de vidrio ensambladas del equipo (en nuestro caso: MiniPortean II, BioRad)

Gel concentrador: 5%. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en buffer concentrador 1 X (Tris•HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 0,1%). Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Buffer de corrida 1 X: Tris base 25 mM; glicina 250 mM, pH 8,3; SDS 0,1%

Solución para siembra de muestras 4 X: Tris-HCl 200 mM, pH 6,8; glicerol 40,0%; SDS 8,0%; β-mercaptoetanol 8,0%; azul de bromofenol 0,4%

Solución de tinción: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% p/v; metanol 45% v/v; ácido acético 10% v/v; Se lleva a 100 ml con H₂O.

Solución de decoloración: etanol 30% v/v; ácido acético 10% v/v.

Soluciones utilizadas en reacciones enzimáticas:

Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el DNA a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el buffer de digestión, la cantidad de enzima y el tiempo y temperatura de incubación recomendados por el proveedor. Los volúmenes de digestión variaron con la masa de DNA digerido de 5 µl a 100 µl.

Medios para cultivo de bacterias

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1 litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Para preparar medios sólidos se agrega 15 g de agar por cada litro de medio líquido.

Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas la cepa de Escherichia coli DH5α™ y TOP10, que posee los siguientes genotipos:

DH5α™: F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1 tonA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

TOP10: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL(StrR) nupG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

DB3.1: gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 glnV44 (=supE44) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtl1. Gentilmente cedida por el laboratorio de virología y biotecnología vegetal del IBBM.

Medios para cultivo de bacterias:

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1 litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Para preparar medios sólidos se agrega 15 g de agar por cada litro de medio líquido.

Electroforesis en geles de agarosa

Se pesó agarosa en un frasco de vidrio, se añadió buffer TAE (con bromuro de etidio 0,5 µg/ml) y se calentó en horno microondas hasta disolución de la agarosa en el buffer. Una vez que la agarosa se enfrió, pero aún se encontraba en estado líquido, se vertió un volumen conveniente sobre un molde acrílico con un peine para generar

las calles de siembra de muestra. Una vez gelificada la agarosa, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con buffer TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de muestra y se depositaron dentro de las calles del gel. Los DNA se resolvieron aplicando un voltaje entre 80-120 V en caso que los tamaños de los fragmentos fueran pequeños o de 50-70 V para fragmentos grandes y en geles de menor concentración (0,3- 0,6%). Las electroforesis se realizaron en aparatos BIO-RAD. Los DNA se visualizaron por transiluminación con luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, EE.UU. o Stratagen, EE.UU.) y las imágenes se capturaron con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science).

Purificación de fragmentos de DNA por adsorción a polvo de sílice

Los fragmentos de DNA o de productos de amplificación, se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (Geneclean Bio 101 Inc.). Se extrajo la porción del gel conteniendo la banda de interés y se incubó en 3 volúmenes de NaI saturado durante 5 min a 60°C. Posteriormente, se resuspendió con 20 µl de polvo de sílice (previamente resuspendido) y se incubó con agitación durante 5 min. La solución fue centrifugada durante 10 segundos a 14-18.000 X g. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado con 200 µl de solución New Wash (NaCl, etanol y agua), este paso se repitió 2 veces. Este precipitado fue secado durante 5 min a temperatura ambiente y luego resuspendido en una cantidad conveniente de agua bidestilada. Se centrifugó 30 seg a 14-18.000 X g y el sobrenadante con el DNA de interés se transfirió a otro tubo que fue conservado a -20 °C hasta su uso. El protocolo anterior fue adaptado para la purificación de minipreps. En este caso, se agregaron 3 volúmenes de NaI a la solución III de miniprep y 20 µl de polvo de sílice, siendo el resto de los pasos iguales.

Preparación de bacterias E. coli electrocompetentes

Se cultivaron bacterias E. coli DH5a hasta saturación. Ese cultivo se diluyó 1/20 en medio LB sin NaCl (1.000 ml) y se cultivó a 37 °C con agitación de 180-220 rpm hasta alcanzar 0,5 a 0,6 unidades de densidad óptica a 600 nm. En este punto, el cultivo se enfrió en agua hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 2800xg durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 500 ml de glicerol 10% (v/v) preparado en agua bidestilada estéril. El proceso de resuspensión y centrifugación se repitió dos veces, disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados, reuniendo los sobrenadantes resuspendidos de dos recipientes en uno. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10%, se separaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80 °C hasta el momento de su uso.

Transformación de *E. coli* por electroporación

La transformación de bacterias electrocompetentes se realizó en un electroporador Gene Pulser TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se mezclaron 50 µl de bacterias electrocompetentes con 2 µl reacción de ligación. Esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm de distancia entre los electrodos y la mezcla se sometió a un pulso de 2,2 kV. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 µF y 200 ohm (Ω), respectivamente. Inmediatamente luego del pulso eléctrico, se añadió 1 ml de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h a 37 °C con agitación. Se sembraron 200 y 300 µl de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (ampicilina 100 µg/ml). Las placas se incubaron 18-24 h a 37°C.

Colony PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de las diferentes transformaciones y se estriaron en una placa de agar LB con el antibiótico. El remanente de bacterias en el palillo fue depositado en un tubo eppendorf con agua estéril, reuniendo hasta 10 colonias en cada tubo. Los tubos eppendorf fueron incubados en un baño de agua a 100°C durante quince minutos, para provocar la lisis celular y liberación del DNA plasmídico. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 5 min. Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descritas anteriormente, utilizando 1 µl del sobrenadante como molde en 10 µl de volumen final y empleando los *primers* correspondientes. Los pools que presentaron una señal positiva por PCR fueron analizados en una colony PCR individual, con una colonia por tubo, a partir de las estrías del proceso anterior.

Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979).

Se cultivaron bacterias *E. coli* (DH-5 α o TOP10) en medio LB a 37°C con agitación (200 rpm) hasta saturación con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 1,5 ml de estos cultivos a 14000-18000 x g durante 30 segundos en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió cinco veces rellenando el mismo Eppendorf. Se añadieron 200 µl de Solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con vórtex. Luego se agregaron 400 µl de Solución II. Después se invirtió suavemente el tubo 5 a 10 veces o hasta observar la clarificación de la suspensión y se incubó en agua-hielo durante 5 min. Luego se neutralizó el pH con 300 µl de Solución III (a 4 °C) y se incubó durante 2-5 min en agua-hielo. El tubo Eppendorf se centrifugó 5 minutos a 14.000-18.000 x g a 4°C y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) evitando tomar el precipitado de DNA

cromosómico, restos celulares y proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNA celulares de esta solución se degradaron por incubación con RNAsa A (20 µg/ml) durante 30 min a 37°C. El DNA plasmídico se aisló de las proteínas por dos extracciones sucesivas con fenol y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se concentró por precipitación etanólica (2-2,5 volúmenes) o con isopropanol (1 volumen). La preparación plasmídica se purificó luego con polvo de sílice.

Extracción de bÁcmido

Se cultivaron bacterias E. coli (DH-5α conteniendo el bÁcmido bApGoza o DH10-BAC conteniendo el bÁcmido recombinante generado mediante el sistema Bac-to-Bac) en medio LB con Kanamicina a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta saturación. Se centrifugó 1,5 ml de estos cultivos a 14000 rpm durante 1 minuto en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces. Cada pellet se resuspendió en 300 µl de la solución I, y se agregó RNasa A (20 µg/ml). Luego, se agregó 300 µl de la solución II, mezclando suavemente, y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregó lentamente 300 µl de la solución III, mezclando suavemente a medida que se incorpora la solución, esto permite la re-naturalización del DNA viral, se incubó en hielo por 10 min. A continuación, se centrifugó por 10 min a 14000 rpm. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo con 800 µl de Isopropanol absoluto. Esta mezcla se incubó en hielo por 10 min. Al finalizar la incubación, se centrifugó 15 min a 14000 rpm a temperatura ambiente, y se removió el sobrenadante. A cada pellet se le agregó 500 µl de etanol 70%, se invirtió varias veces para lavar y se centrifugó 5 min a 14000 rpm, esto se repitió 2 veces. Se secó el pellet por no más de 10 min a temperatura ambiente. Por último, se disolvió el pellet en 40 µl de agua tibia, y se dejó resuspendiendo a 65°C en baño seco durante 30 min.

Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA fueron llevadas a cabo en los cicladores térmicos Eppendorf (Mastercycler Gradient) y Thermo (PCR Sprint). Las reacciones en las que se iba a utilizar el producto de amplificación para clonación se utilizó la DNA polimerasa Taq (Embiotec) si el producto era menor a 1000 pb. En las reacciones de caracterización se usó la misma polimerasa. La mezcla de reacción fue diseñada de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes de la enzima, variando únicamente la concentración de MgCl₂. Para la clonación de productos de más de 1000 pb se utilizó la enzima Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc.), siguiendo las recomendaciones del fabricante y variando la concentración de MgCl₂ y enhancer.

Oligonucleótidos

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')
Bac1_GG	CAGCCATTGTAATGAGTCGCAC
Bac2_GG	CAACGCACAGAATCTAGCGC
RvpGGL1	TCTTTCCGATGGTCTCACC
FwpGGL1	CATGAGCGGATACATATTTGAATG
Fw EEsp3I CMV	GTCACGTCTCACAGACGTTACATAACTTACG
Rv SV40HEsp3I	GTCACGTCTCGCTATaactgtttattgcagc
FwEsp3GSV40cor	GTCACGTCTCACGAAaactgtttattgcagc
RvSV40HEsp3cor	GTCACGTCTCGCTATaagatacattgatgag
Fw Esp3I E CMV	GTCACGTCTCGCAGACGTTACATAACTTACG
Fw CMV Esp3I B	GTCACGTCTCGAAGGCGTTACATAACTTAC
Fw CMV BsaI B	GTCAGGTCTCGAAGGCGTTACATAACTTACGG
Rv CMV E BsaI	ATGCGGTCTCGTCTGagctctgcttatatagacc
RvBGHpA-G-Esp3I	cgtaCGTCTCGTTCGCCATAGAGCCCACCGCATC
FwpCMV-F-Esp3I	cgtaCGTCTCTAACTCGTTACATAACTTACGGTAAATG
Fw-pU6-D-Esp3I	CGTACGTCTCATTACGAGGGCCTATTTCCCATG
Rv-shRIPK1-A-Esp3I	TCGGCGTCTCCGGCACTTCCGATGGTCTCATAGTC
Fw a-PRL-J-Esp3I	cgtaCGTCTCA CGTCATGAACATCAAAGGATCGCCATG
F pGGL2shRIP1dT	CTTGTGGAAAGGACGGTTTAGT
R pGGL2shRIP1dT	GGGCCATTACCGTAAGTTATGTAACG

Células de insecto

Las líneas celulares de insecto Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 (High Five™ cells; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y Sf9 (derivadas de Spodoptera

frugiperda) fueron mantenidas en medio de Grace's (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 27°C en frascos para cultivo.

Células de mamíferos

Cultivos primarios de astrocitos murinos obtenidos a partir de la corteza cerebral fueron cultivados en placas de Petri previamente recubiertas con gelatina, conteniendo medio DMEM con alta concentración de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina-estreptomicina. Las células fueron cosechadas utilizando tripsina-EDTA (0,05%) y contadas con Trypan-Blue.

Las células G09 son células de glioblastoma (GBM) derivadas de pacientes obtenidas previamente de biopsias de glioma [1]. El uso de estos cultivos para la investigación biomédica fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Biomédica de la Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas en la Infancia (FLENI, Buenos Aires, Argentina). Estas células se cultivaron en placas de Petri recubiertas con Geltrex con medio neurobasal sin suero suplementado con glucosa, piruvato de sodio, PBS-BSA 7.5 mg/mL, 1× B27, 1× N2, 20 ng/mL de bFGF y EGF, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de aminoácidos no esenciales y 50 U/mL de penicilina/estreptomicina. Las células se recolectaron con accutase y se contaron con azul de tripán.

Las células humanas U251 y las células murinas GL26 (líneas celulares de GBM) se cultivaron en medio de cultivo D-MEM suplementado con aminoácidos MEM (10 µl/ml), L-glutamina (2 mM) y con SFB al 10 y 5 %, respectivamente.

Congelamiento

Para el congelamiento se partió de monocapas de células confluentes de frascos T25. En el caso de células de insecto, se extrae el medio de cultivo y se agregan 5 ml de medio Grace's conteniendo 10% SFB y 10% DMSO. Se suspendieron las células mecánicamente y se alicuotaron en criotubos de polipropileno de 2 ml. Luego se procedió a un congelamiento graduado hasta -80°C, colocando los criotubos en contacto con una suspensión de etanol o glicerol. Respecto a las células de mamíferos, se utiliza tripsina para levantar las células previo a alicuotarlas en los criotubos.

Ensamblado por Golden Gate

Las reacciones de Golden Gate fueron preparadas mezclando 0,5 µl (30U) de la enzima tipo IIS (BsaI o Esp3I), 1 µl (5U) de ligasa T4, 2 µl de buffer 10X de ligasa con 100 ng del vector de destino y 200 ng de cada inserto en un volumen final de 20 µl. Las mezclas de reacción fueron incubadas por 10 min a 37°C y 15 min a 16°C por 30 ciclos y se sometieron a un paso final de 5 min a 60°C.

Luego, 3 μ l de la mezcla de reacción fue transformada en bacterias E.Coli electrocompetentes TOP10 y, luego de 1h de incubación a 37°C, las células fueron plaqueadas en agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El screening para validar los insertos fue realizado mediante colony PCR, digestión con enzimas de restricción tradicionales o ambos. En todos los casos, las secuencias fueron confirmadas mediante secuenciación por Sanger.

Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular

Para el mantenimiento de virus en cultivo celular, se siguieron los protocolos sugerido en los libros de referencia “Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual [2] y “Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols” [3].

Generación de recAcMNPV

Los vectores recombinantes pGGL2Bac fueron co-tranfectados en células High Five™ junto con el báculo bApGOZA occ+ usando el reactivo lipídico de transfección Cellfectin IITM (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron mantenidas en medio Grace suplementado con 10% de SFB a 27°C en frascos de cultivo hasta la aparición de signos de infección.

Para el caso del sistema de expresión Bac-to-Bac®, los vectores recombinantes pGGL1 conteniendo las secuencias Tn7R y Tn7L fueron usados para transformar células electrocompetentes E.Coli DH10 Bac™. Las células transformadas fueron plaqueadas en medio LB conteniendo Kanamicina (50 μ g/ml), Tetraciclina (10 μ g/ml) y cualquier otro antibiótico que haya sido requerido para la selección. Para llevar a cabo la selección blanco/azul de aquellas colonias donde ocurrió la transposición, se utilizó IPTG (40 μ g/ml) y X-gal (200 μ g/ml). El báculo recombinante fue extraído de las colonias blancas, siguiendo las instrucciones del fabricante, y fue luego utilizado para transfectar células High Five™ con el reactivo Cellfectin II™ (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron mantenidas en medio Grace suplementado con 10% de SFB a 27°C hasta la aparición de signos de infección.

Transfecciones

Como reactivo de transfección se utilizó Cellfectin o Cellfectin II (Invitrogen™). Se utilizó el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, para la transfección de una placa de 6 wells se realizó una mezcla de DNA a transfectar con 200 μ l de medio sin suero y otra mezcla de 5 μ l de Cellfectin y 200 μ l de medio sin suero. Las mezclas de DNA y Cellfectin se realizaron por goteo suave y se esperó 15 minutos (Cellfectin II) o 30 minutos (Cellfectin) para permitir la formación de complejos DNA-reactivo de transfección. Se retiró el sobrenadante de la placa de cultivo a transfectar y se

lavó 3 veces con medio sin suero. Finalmente, se goteó suavemente la mezcla de transfección sobre la placa. Luego se agregaron 400 µl adicionales de medio sin suero para completar el volumen mínimo de medio requerido por la placa para la supervivencia de las células. Al día siguiente se extrajo el medio de transfección y se agregaron 2 ml de medio completo.

Titulación de BV

Los BVs fueron titulados utilizando monocapas de células High Five™ con la técnica de titulación por plaqueo, obteniendo unidades formadoras de placa (UFP). Brevemente, se sembraron las células en placas de 12 wells y se incubaron a 27°C hasta alcanzar un 70% de confluencia. A continuación, se infectaron los wells con distintas diluciones seriadas del baculovirus a titular, incubando las células con 200 µl del inóculo viral por 1 hora. Luego, se retiró el inóculo y se agregó medio de cultivo completo con metilcelulosa para permitir la formación de placas de infección. Las placas multiwell fueron monitoreadas hasta la formación de placas de infección ya sea por la aparición de fluorescencia o de poliedros como signo de infección. El número de placas fue observado en un Microscopio de Epifluorescencia y los títulos obtenidos tanto por conteo de placas fluorescentes como de placas polh+ fueron coincidentes.

Infección *per os* utilizando RecAcMNPV

Extracción de cuerpos de oclusión de recAcMNPV

La extracción de los cuerpos de oclusión (OBs) fue realizada a partir de células High Five infectadas. Brevemente, las células infectadas fueron resuspendidas y centrifugadas a 5000x g por 15 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-Hcl pH 7,4, 10 mM EDTA, 0.25% SDS) al pellet seguido de una incubación a 37°C por 30 min. La suspensión fue centrifugada a 350 x g por 15 min para poder eliminar restos celulares. El sobrenadante conteniendo los OBs fue transferido a otro tubo y centrifugado a 17000x g por 15 min, El pellet fue resuspendido en PBS y la presencia de OBs fue verificada con un microscopio óptico. La cuantificación de los OBs se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

Infección de larvas de *Spodoptera Frugiperda*

Larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron infectadas *per os* con el baculovirus recombinante que expresa la proteína reportera dTomato. Para ello, los insectos fueron alimentados con una dieta artificial contaminada con una suspensión de 3×10^8 OBs/ml (3×10^6 OBs en total por porción de dieta de acuerdo con las dosis reportadas previamente por Pantha *et al.* [4] o con una dieta libre de virus, para el grupo control). Las larvas fueron mantenidas separadas en frascos individuales,

incubadas a 27°C y con un ciclo de 16:8 hs de luz:oscuridad y monitoreadas diariamente hasta la aparición de signos de infección. Las larvas infectadas y las no infectadas fueron observadas con un microscopio de fluorescencia a los 4 dpi.

Transducción *in vitro* mediada por baculovirus

Para llevar a cabo los ensayos de transducción en las células astrocíticas murinas y las células G09 derivadas de pacientes con glioblastoma (GBM), se tomó una alícuota de los viriones brotantes del baculovirus de interés, previamente clarificados, y se centrifugó durante 60 minutos a 21000 x g a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 200 µl de PBS 1X, en medio DMEM o neurobasal, según corresponda, para alcanzar una multiplicidad de transducción de 750. Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos y, después de 24 h, se incubaron con el recAcMNPV (750 UFP/célula) durante 2 h en medio DMEM o Neurobasal, respectivamente. Finalmente, se añadió 0.25 mL de medio DMEM o Neurobasal suplementado.

Suspensiones de viriones recombinantes se prepararon de igual manera y se utilizaron para transducir las líneas celulares U251 y GL26 cultivadas en placas de 48 wells. Las células se incubaron en presencia de viriones recombinantes por 2 horas con agitación suave. Pasado este tiempo se completó cada well con 0.5 ml de medio D-MEM con 10% de SFB y se incubaron a 37°C, monitoreándolas cada 24 horas.

Animales

Los ratones C57Bl/6 macho adultos (de 6 a 8 semanas de edad) se obtuvieron del centro de animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de luz (ciclos de 12 h de luz/oscuridad) y a una temperatura de 20-25 °C. Se les proporcionó alimento estándar y agua ad libitum, y se cuidó su entorno para minimizar el estrés. Toda experimentación con animales se realizó bajo la guía de los NIH y fue aprobada por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Res. (CD) No. 697/19.

Transducción *in vivo* mediada por baculovirus

Para caracterizar la capacidad de transducción de los vectores *in vivo*, se inyectaron ratones en el cerebro mediante cirugía estereotáctica, con recAcMNPV que codifica Citrina (5×10^8 UFP/5 µL). Después de 7 días, los ratones recibieron una sobredosis de ketamina/xilazina y fueron perfundidos con solución de Tyrode heparinizada y paraformaldehído al 4% (PFA al 4%). Los cerebros fueron removidos y fijados con PFA al 4% durante 48 horas adicionales, resuspendidos en sacarosa al 20% fría durante 16 horas, y finalmente congelados en un baño de acetona-isopentano a -

80 °C. Se obtuvieron secciones de 50 µm en criostato, y la eficiencia de transducción fue posteriormente analizada observando la expresión del gen reportero Citrina.

Para evaluar la capacidad de BV para transducir células de glioma *in vivo*, se inocularon intracranealmente neuroesferas de GBM de ratón en el estriado derecho de ratones *naive* (n = 3). Tres semanas después, se inyectó el recAcMNPV intratumoralmente (5×10^8 UFP en 5 µL), y siete días más tarde los ratones fueron perfundidos con solución de Tyrode heparinizada y PFA al 4%. Los cerebros fueron procesados, como se describió anteriormente, para evaluar la eficiencia de transducción observando la expresión de la proteína reportera citrine.

Muestras de pacientes con glioma

Se analizaron bases de datos públicos con información clínica, genómica y transcriptómica de muestras de pacientes. Para todos los análisis, se utilizaron la base de datos TCGA-LGGGBM y la plataforma UCSCXena. Se filtraron las muestras correspondientes a DG, se clasificaron según el estado de IDH y se evaluó la expresión de RIPK1 y otros genes. Los atributos de los pacientes se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Expresión de RIPK1 y atributos clínicos

RIPK1 se utilizó como *query* y las muestras se dividieron en dos grupos según la mediana de expresión: alta expresión de RIPK1 (>9.094) y baja expresión de RIPK1 (≤ 9.094). Se evaluó la correlación entre los niveles de expresión de RIPK1 y varios atributos clínicos de interés.

Gráficos de supervivencia

Se filtraron muestras correspondientes a diferentes tipos de glioma y se evaluó la expresión de RIPK1. En el análisis, las muestras se dividieron en dos grupos según la mediana de expresión: alta expresión de RIPK1 (>9.094) y baja expresión de RIPK1 (≤ 9.094), y se trazaron gráficos de supervivencia para cada grupo.

Análisis transcriptómico

Se utilizó la plataforma UCSCXena [5] y la base de datos TCGA-LGGGBM para evaluar la expresión de RIPK1 [6]. Se utilizó la expresión de RNAm en Z-score relativo a todas las muestras (*microarray* de registro), realizado en la plataforma Illumina HT-12 v3 (Illumina_Human_WG-v3). Para el análisis de correlación de diferentes vías, se utilizaron la base de datos TCGA y la plataforma UCSCXena.

Análisis de *Gene Ontology* y vías relevantes

Se realizaron análisis de expresión génica diferencial y *Gene Ontology*. El set de datos utilizado contenía datos de transcriptoma completamente secuenciados de 702 muestras de tumor primario de pacientes con glioma.

Para realizar el análisis de expresión génica diferencial, las muestras se separaron en dos grupos: valores de expresión de RIPK1 mayores que la mediana y valores de expresión de RIPK1 menores o iguales que la mediana. Se realizó un análisis de expresión génica diferencial con subsiguiente análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* y vías utilizando la extensión disponible en la plataforma Xena con parámetros predeterminados comparando ambos grupos.

Meta-análisis de firmas génicas inmunes en biopsias de glioma mIDH y wtIDH

Se analizaron un total de 521 pacientes con gliomas de la cohorte TCGA-LGGGBM en este estudio. Se dividieron a los pacientes en dos grupos según el estado mutacional de IDH: pacientes con IDHm e IDHwt. Las muestras se clasificaron en dos grupos según los niveles de expresión de RNAm de RIPK1 en RIPK1bajo y RIPK1alto utilizando las medianas de expresión como punto de corte. Los valores de expresión normalizados se transformaron a log2. Los genes se agruparon en 8 firmas de tipos de células inmunes (CD8 citotóxicos, células T helper, células dendríticas, NK, macrófagos, neutrófilos, células T de memoria y T regulatorias), derivadas de Gonzalez *et al.* Se obtuvieron los ESTIMATE score de cBio Cancer Genomics Portal [7,8]. Las firmas génicas para cada tipo de célula inmune se obtuvieron a partir de datos previamente publicados [9,10].

Análisis estadístico asociado a los análisis *in silico*

A continuación, se resumen las diferentes pruebas estadísticas utilizadas para los distintos análisis transcriptómicos realizados a partir de la base de datos TCGA-LGGGBM. En cada caso se indica además el número de pacientes analizado luego de realizar la estratificación en subgrupos.

Para la expresión de RIPK1 en muestras de TCGA-LGGGBM vs. subtipos diferentes de DG: n = 1106; prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn con el valor de P corregido por el método de Bonferroni. Expresión de RIPK1 en muestras de TCGA_LGG_GBM vs. tratamiento de radioterapia: n = 701; Welch's t-test. Gráficos de supervivencia: n = 702; prueba de logRank. Expresión de RIPK1 vs. proteínas de diferentes vías: n = 702 (n = 351 Alta expresión de RIPK1; n = 351 Baja expresión de RIPK1); Welch's t-test. Análisis de correlación: coeficiente de correlación de Pearson. Meta-análisis de firmas génicas inmunes en mIDH (n=311) y wtIDH

(n=210): prueba de Mann-Whitney. Se consideró significancia estadística cuando el valor de p no superó 0.05 en todos los casos.

Diseño de shRNA

Para diseñar el shRNA que regula negativamente a la proteína RIPK1, se tuvo en cuenta la secuencia específica de un siRNA publicado en la página de SigmaAldrich [11], que fue validado en células humanas A549, demostrando un *knockdown* del 80%. Dicha secuencia se encuentra dirigida a la región 3'UTR del mRNA blanco. En base a los requisitos detallados en la guía “*Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs*” [12], algunas de las consideraciones que se tuvieron en cuenta se detallan a continuación: los cohesivos fueron diseñados de manera específica para que la primera base de la hebra *sense* fuera una G, que además funcionaría como el sitio +1 de transcripción, asegurando que el primer nucleótido del shRNA alineara perfectamente con el sitio de inicio de la transcripción. Por otro lado, se utilizó una U como el primer nucleótido de la hebra guía, para favorecer su incorporación en la proteína Argonauta.

La secuencia completa del shRIPK1 diseñado es la siguiente: CGTCTCAGCAGTCTTCAGCCCATTAATCTCGAGATTTAATGGGCTGAAGACTGCTTTTT TATAGAGAGACG donde la secuencia resaltada en gris corresponde al loop que conecta ambas hebras de la horquilla.

Finalmente, la secuencia elegida para el shRNA fue analizada con el software RNAfold webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), para predecir la estructura secundaria y la energía libre mínima asociada.

Ensayos de proliferación celular

Ensayos utilizando inhibidor comercial de RIPK1

Las células U251 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2500 células por pocillo y se incubaron durante 24 h. Después de 24 h, se agregaron a los pocillos las diferentes concentraciones de inhibidor comercial de RIPK1 GSK2982772 y de quimioterápico (TMZ o CDDP) en medio completo, según el tratamiento estipulado. Después de la incubación durante 72 h, se eliminó el medio y las placas se lavaron con PBS 1X. Luego, las células adheridas se fijaron en metanol durante 15 minutos y se tiñeron con una solución de violeta cristal al 0,5% durante otros 15 min. Para eliminar el exceso de colorante, las células se lavaron con agua. El colorante retenido en las células teñidas se disolvió en una solución de metanol al 10 % y ácido acético al 5 % (v/v). La absorbancia a 595 nm se midió en un lector de placas de 96 pocillos (ASYS Hitech GmbH, Austria). Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados con el software Graphpad Prism8. Los

resultados mostrados corresponden al promedio de tres experimentos separados, incluidas seis réplicas experimentales para cada condición.

Ensayos utilizando baculovirus recombinantes

Para los ensayos de proliferación empleando baculovirus se procedió de manera análoga a los ensayos de proliferación descritos anteriormente, pero utilizando placas de 48 pocillos como soporte para permitir la correcta adsorción de los baculovirus durante el protocolo de transducción.

Ensayos de apoptosis tardía mediante determinación microscópica de la fragmentación del DNA (TUNEL)

Se colocaron insertos circulares estériles de vidrio dentro de cada pocillo en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Se sembraron células U251 y 24 hs después recibieron tratamiento con PBS, CDDP, inhibidor comercial de RIPK1 o combinaciones. A las 48 horas del último tratamiento se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X. Cada inserto se fijó con PFA 4% durante 20 minutos a 4°C, seguido de dos lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. Para la permeabilización se incubó durante 5 minutos con Triton X-100 0,2%. Nuevamente se lavó 2 veces con PBS 1X durante 5 minutos. Se les agregó 100µl de buffer E, y se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Luego, se incubaron con 50 µl de la mix de reacción que contiene la enzima TdT, en una cámara húmeda durante 60 minutos a 37 °C, cuidando que desde este paso en adelante los insertos no se expusieran a la luz. Posteriormente se incubó durante 15 minutos con 2X SSC, para detener la reacción. Seguidamente, se lavó 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos. A continuación, se realizó una tinción nuclear con DAPI. Finalmente, los preparados fueron montados con líquido de montaje en portaobjetos para ser observados con posterioridad en el microscopio de fluorescencia Cytation 5 (Universidad Nacional de Quilmes). Se fotografiaron campos al azar hasta alcanzar un total de 800 células por grupo experimental y se contaron las células totales y aquellas con señal TUNEL+. Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados con el software Graphpad Prism8.

Medición de la eficiencia de transducción y fluorescencia media por citometría de flujo

Se sembraron 30.000 células U251 en placa de 48 wells. Al día siguiente se transdujeron 3 wells con el baculovirus Ac-Citrine y 3 wells con el baculovirus Ac-shRIPK1. Se dejaron 3 wells sin transducir para utilizar como control de autofluorescencia. Se recolectaron las células U251 por tripsinización y posterior inactivación con MEM+SFB y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 µl de PBS 1X.

La fluorescencia se midió con un citómetro de flujo FACSCalibur (Hospital de clínicas, Universidad de Buenos Aires). Se utilizaron los valores de fluorescencia de las células no transducidas como valor de referencia para definir la línea de corte para las células transducidas. Empleando el software FlowJo v.10 se cuantificó el porcentaje de células Citrine+ y la fluorescencia media para cada réplica. Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados con el software Graphpad Prism8.

Ensayos de apoptosis tardía mediante tinción con Ioduro de propidio (IP)

Se sembraron un total de 30.000 células por well en placas de 48 wells. Al día siguiente se transdujeron 3 wells con el baculovirus Ac-Citrine y 3 wells con el baculovirus Ac-shRIPK1. Se dejaron 3 wells sin transducir para utilizar como control de autofluorescencia. Se utilizaron tubos independientes para la preparación de cada muestra colectando sobrenadantes y células previamente levantadas con tripsina-EDTA al 0,025%. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante. Para la preparación de la solución madre de yoduro de propidio (IP), se disolvió 1 mg de IP en 1 ml de agua destilada. Luego, se preparó la solución de trabajo utilizando 1 ml de la solución madre en 100 ml de PBS. Las células se resuspendieron con 200 μ L de la solución de trabajo y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo. Para el control de compensación se utilizaron células sin IP. Se identificaron las células muertas mediante citometría de flujo midiendo la excitación a 535 nm. Empleando el software FlowJo v.10 se cuantificó el porcentaje de células IP+ para cada réplica. Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados con el software Graphpad Prism8.

Ensayos de viabilidad celular (MTT)

Para los ensayos de viabilidad celular se sembraron 20.000 células U251 o GL26 en placas de 48 wells. Al día siguiente se transdujeron con el baculovirus correspondiente. La viabilidad celular se evaluó utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 48 hs después de la transducción con BV. La absorbancia se determinó utilizando un espectrofotómetro de placa de 96 pocillos a 595 nm (Bio-Rad, Hercules, CA, Modelo 550).

Análisis estadístico asociado a los ensayos *in vitro*

Todos los ensayos se repitieron al menos dos veces. Para los ensayos de proliferación y viabilidad celular se realizaron al menos 6 réplicas técnicas para cada grupo experimental. Los ensayos de apoptosis contemplaron 3 réplicas. Los resultados obtenidos fueron graficados y analizados con el software Graphpad

Prism8. Para las comparaciones múltiples en ensayos con más de dos grupos experimentales se realizó un análisis de ANOVA seguido de test de Dunnett, mientras que para las comparaciones entre dos grupos en ensayos que sólo contenían dos grupos experimentales se realizó t-test. En todos los casos se representó el p valor según: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

Referencias

1. Videla Richardson, G.A.; Garcia, C.P.; Roisman, A.; Slavutsky, I.; Fernandez Espinosa, D.D.; Romorini, L.; Miriuka, S.G.; Arakaki, N.; Martinetto, H.; Scassa, M.E.; et al. Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence: Lineage Choice of Glioma Stem Cells. *Brain Pathology* **2016**, *26*, 43–61, doi:10.1111/bpa.12263.
2. O'Reilly, D.R.; Miller, L.; Luckow, V.A. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*; Oxford University Press: New York, 1994; ISBN 978-0-19-509131-1.
3. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*; Murhammer, D.W., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2016; Vol. 1350; ISBN 978-1-4939-3042-5.
4. Pantha, P.; Chalivendra, S.; Oh, D.-H.; Elder, B.D.; Dassanayake, M. A Tale of Two Transcriptomic Responses in Agricultural Pests via Host Defenses and Viral Replication. *IJMS* **2021**, *22*, 3568, doi:10.3390/ijms22073568.
5. Goldman, M.J.; Craft, B.; Hastie, M.; Repečka, K.; McDade, F.; Kamath, A.; Banerjee, A.; Luo, Y.; Rogers, D.; Brooks, A.N.; et al. Visualizing and Interpreting Cancer Genomics Data via the Xena Platform. *Nat Biotechnol* **2020**, *38*, 675–678, doi:10.1038/s41587-020-0546-8.
6. Ceccarelli, M.; Barthel, F.P.; Malta, T.M.; Sabedot, T.S.; Salama, S.R.; Murray, B.A.; Morozova, O.; Newton, Y.; Radenbaugh, A.; Pagnotta, S.M.; et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **2016**, *164*, 550–563, doi:10.1016/j.cell.2015.12.028.
7. Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Larsson, E.; et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, doi:10.1126/scisignal.2004088.
8. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery* **2012**, *2*, 401–404, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
9. Melaiu, O.; Chierici, M.; Lucarini, V.; Jurman, G.; Conti, L.A.; De Vito, R.; Boldrini, R.; Cifaldi, L.; Castellano, A.; Furlanello, C.; et al. Cellular and Gene Signatures of Tumor-Infiltrating Dendritic Cells and Natural-Killer Cells Predict Prognosis of Neuroblastoma. *Nat Commun* **2020**, *11*, 5992, doi:10.1038/s41467-020-19781-y.

10. Bindea, G.; Mlecnik, B.; Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Waldner, M.; Obenauf, A.C.; Angell, H.; Fredriksen, T.; Lafontaine, L.; Berger, A.; et al. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* **2013**, *39*, 782–795, doi:10.1016/j.immuni.2013.10.003.
11. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/semi-configure/shrna?activeLink=selectClones>, accedido el 2024-06-13.
12. Bofill-De Ros, X.; Gu, S. Guidelines for the Optimal Design of miRNA-Based shRNAs. *Methods* **2016**, *103*, 157–166, doi:10.1016/j.ymeth.2016.04.003.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por posibilitarme realizar el doctorado dentro del ámbito de la institución. Educación y ciencia pública, SIEMPRE.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) por brindarme la infraestructura y el ámbito necesarios para el desarrollo del presente trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED-CONICET-UBA) por el trabajo en colaboración.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el otorgamiento de la financiación necesaria para el desarrollo de este trabajo.

A Víctor. Por confiar en mí y haberme otorgado la beca para llevar a cabo este trabajo. Por la dirección de esta tesis y por toda la ayuda al corregirla.

A Flor, a Maru y a todo su lab, por sus aportes en el área del cáncer, por estar siempre disponibles para responder dudas o dar una mano con los ensayos.

A Mati, gracias por las risas, los viajes, por esos mates horrendos con Canarias pero en mate de plástico. Por confiar en mí y haberme adoptado, por haberme ayudado a crecer profesional y personalmente. Si hoy disfruto de esta etapa y de esta tesis es en gran parte gracias a vos, y obvio que vamos por más. Te quiero un montón.

A Leti, gracias por preocuparte por el lab y por nosotros, por tu aporte a la consolidación de este grupo de trabajo tan lindo, por las risas y por tu apoyo. Te quiero LS!

A mis compas de VA, Pablito, Sil, Mati, Leti, Abrilita, Santi, Lu y Lucas, porque nada hubiera sido igual sin ustedes, sin nuestras charlas, sin nuestros mates, no se olviden nunca: “once VA, always VA”. Gracias infinitas!

A mis compas del instituto, por preocuparse, por preguntarme “cómo va esa tesis?” en los pasillos, por dejar que ponga música para toda la oficina, por hacer más divertido el día a día en el instituto.

A Sil y a Lari por la ayuda día a día en el lab, pero sobre todo por nuestras charlas, serias y no tan serias. Gracias!

A las ex VA, Lau y a Pau, por haberme ayudado en mis inicios, por haberme enseñado tantas cosas, ojalá sean felices en el lugar del mundo donde decidan estar.

A Santi y Abrilita, por festejar cada logro mío como si fuera propio (que obviamente en parte lo es), por ser oídos, sostén, alegría. Por su capacidad para sacarme una sonrisa todos los días. Los adoro, gracias por tanto!

A las chirusas, Florcita y Lu. Por las infinitas risas, los abrazos, las palabras de aliento, porque sin importar qué pase, sabemos que vamos a estar ahí, para una lloradita, una birrita y a seguir. Las quiero mis chirus.

A Eze, porque siempre tenés las palabras justas, por aguantarme desde hace más de 14 años, por entender todas mis referencias a Los Simpsons. Vamos que falta poco! Te quiero nerd.

A Maca, Aipi, Anita, Vir y Ro. Parece ayer cuando cursábamos juntas segundo año! Gracias por tantos años de amistad y por estar cerca, a pesar de la distancia. Las quiero!

A mi mamá, a mi papá, a mi hermana y al Tata por esperarme cada domingo con una comida y unos mates. Por aportar estabilidad en momentos de tanta incertidumbre. Los quiero mucho!

A mis sobris, Ambi y Luciano, por llenarme de amor cada vez que me ven, no se dan una idea lo que significan para mí, los amo.

A mi abu, ojalá estés orgullosa, te extraño siempre.

A Noemí, Fernando, Malén y Maite, por esperarnos con los brazos abiertos, por ser tan atentos, porque siempre es lindo compartir el tiempo con ustedes.

A Manu, porque no existe mejor compañero, no imagino algo mejor que unos matecitos con vos y los animales en el solcito. Gracias por apoyarme en todo lo que hago, por ser amor en tiempos violentos. Te amo infinito.

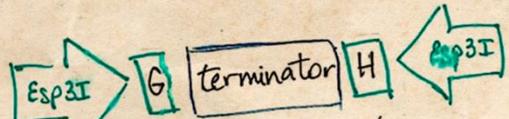
A mi familia del alma: Sofi y Agus, porque pasan los años y siguen ahí, firmes. No me voy a cansar nunca de decirles que algo debo haber hecho bien para que se quedaran en mi vida. A Bauti y Tobi, por hacerme reír con sus ocurrencias, por ser como son, dos personitas hermosas. Los adoro.

A mis cholis, Guille y Gaby, porque en poco tiempo se convirtieron en dos de las personas más importantes para mí. Gracias por su interés genuino en mi trabajo aunque sean de otro palo. Gracias por su apoyo incondicional, por las birritas y las papitas que acompañan nuestras charlas eternas. Las quiero mucho!

A toda la gente linda que me regaló el vóley, tanto de Alumni, como de Hernández.

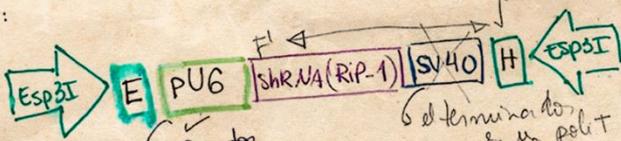
No hubiera llegado hasta acá si no tuviera una banda amiga que me aguanta el corazón...

Nivel 0:



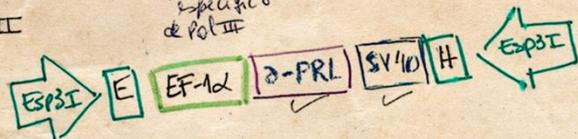
Digestión con *Esp3I* y ligación

Bloque I:

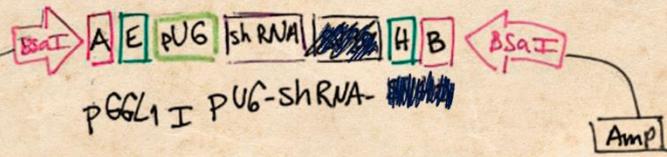
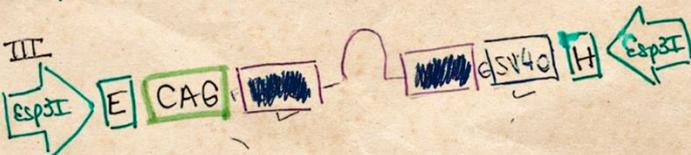


promotor específico de Pol III
el terminador de un pol I

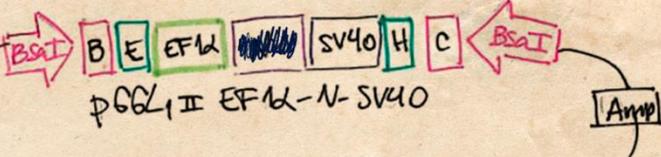
Bloque II



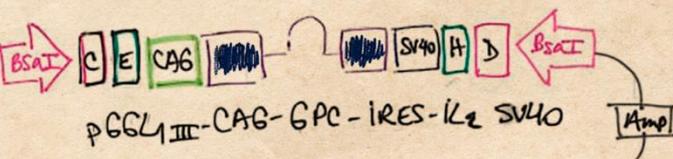
Bloque III



pGGL1 I PUG-shRNA

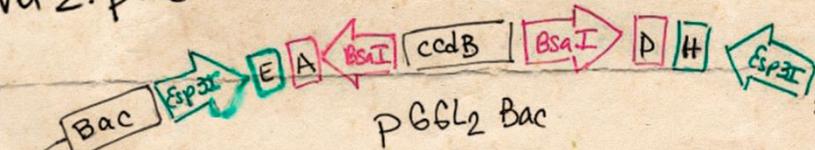


pGGL1 II EF1α-N-SV40



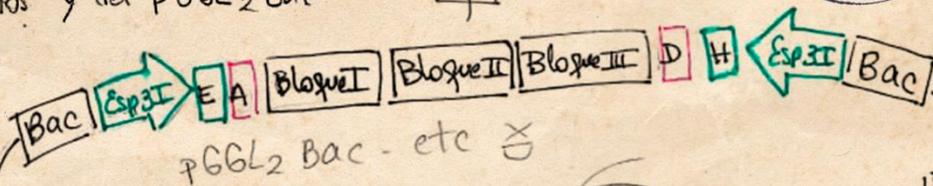
pGGL1 III-CAG-GPC-iRES-Ik2-SV40

Nivel 2: pUC57 (kan^R)



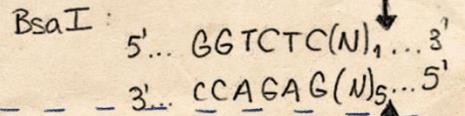
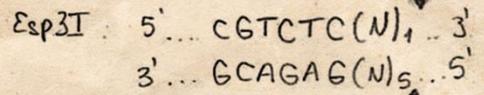
pGGL2 Bac

Digestión de los pGGL1 I-IV + insertos y del pGGL2 Bac con *BsaI* y ligación:

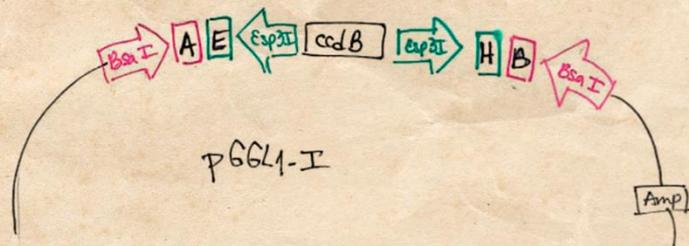


pGGL2 Bac - etc

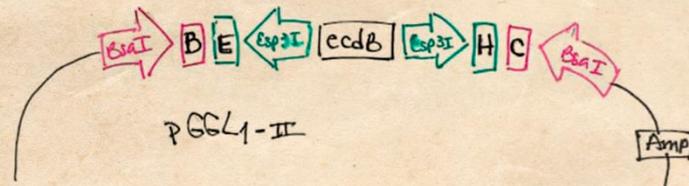
Enzimas tipo II S utilizadas:



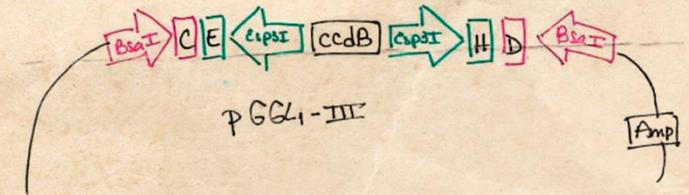
Nivel 1: pUC57 mini (Amp^R)



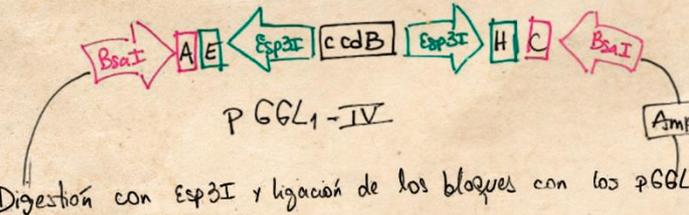
pGGL1-I



pGGL1-II

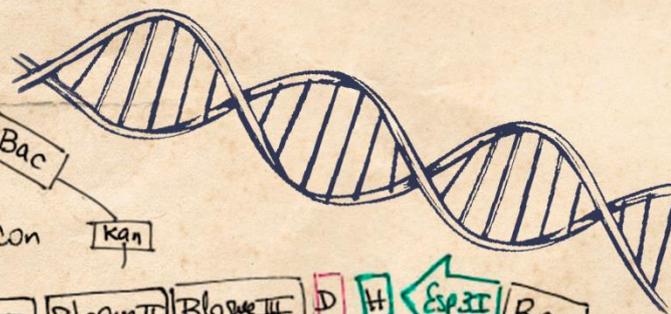


pGGL1-III



pGGL1-IV

Digestión con *Esp3I* y ligación de los bloques con los pGGL1



Kan