

### **Los baculovirus como vectores de expresión: el impacto de la autofagia y su relación con rutas antioxidantes en la eficiencia de transducción**

Altamirano, AA(1); Amalfi, S(2); Plastine, MP(1); Taboga, O(1); Alfonso, V(1).

(1) Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, IABIMO-INTA/CONICET;  
(2) Universidad Nacional de Hurlingham (UNAHUR), Laboratorio de Virología Molecular, Instituto de Biotecnología.

Contacto: *aynaltamirano@unimoron.edu.ar*

Los baculovirus son virus de insectos incapaces de infectar células de mamífero pero con la facultad de transducir genes en estas células, lo que los convierte en vectores virales de un alto potencial biotecnológico. Resultados previos de nuestro grupo muestran lo determinante que son las vías de respuesta antiviral para la eficiencia de expresión génica por baculovirus en mamífero. En este marco, el objetivo consiste en estudiar si también hay un impacto en vías antioxidantes y autofágicas y si la capacidad para vehiculizar genes de interés se ve afectada por estos procesos. Estas respuestas celulares pueden ser inducidas por virus y en algunos casos son provirales y en otros antivirales. En primer lugar, para evaluar autofagia, transdujimos células de mamífero con baculovirus a una multiplicidad de infección (moi) de 100 y evidenciamos un aumento de la conversión de LC3II, un marcador de autofagia, en relación a la abundancia de b-actina, a las 4 o 7 horas postransducción (hpt) en células NIH/3T3, HeLa y A549. Para determinar si este aumento se debía a una inducción de la autofagia o a una inhibición del flujo autofágico, se evaluó el incremento de LC3II en las mismas células tratadas con el inhibidor NH<sub>4</sub>Cl 20 mM y se determinó que los baculovirus actúan interrumpiendo el flujo de autofagia en estas células. A fin de evaluar el papel del factor antioxidante Nrf2, realizamos ensayos en células A549 que editamos en este gen. Resultados preliminares mostraron que los baculovirus no producen el mismo efecto de acumulación de LC3II en estas células. Por otro lado, evaluamos si la presencia de Nrf2 y la inhibición del flujo autofágico influyen en la eficiencia de transducción por baculovirus. Por un lado, se transdujeron células A549 y A549 Nrf2 <sup>-/-</sup> con un baculovirus reportero en mamíferos (GFP) a moi 200. A las 48 hpt la intensidad de luorescencia media por citometría de flujo en las células editadas fue significativamente mayor que en las células salvajes. Por otra parte, células tratadas con NH<sub>4</sub>Cl y transducidas con un baculovirus reportero fueron evaluadas por microscopía de fluorescencia. El número de células GFP<sup>+</sup> resultó significativamente diferente en aquellas cuyo flujo autofágico fue interrumpido. Por último, determinamos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células transducidas por baculovirus a las 3 hpt, mediante el reactivo CellROX Deep Red por citometría de flujo. Sorprendentemente, al menos en fibroblastos murinos y en las condiciones ensayadas, los baculovirus no generaron ROS. En resumen, hasta aquí los resultados muestran que la

transducción con baculovirus en mamíferos afecta el normal flujo autofágico de las células por un mecanismo independiente de ROS. Nuevos ensayos serán necesarios para confirmar los resultados con metodologías complementarias, profundizar en mecanismos subyacentes y determinar el potencial de los resultados para la optimización de los baculovirus para el transporte génico en mamíferos.