

## **Expresión prolongada de transgenes en mamíferos: desarrollo y obtención de una estrategia basada en baculovirus**

Plastine, MP(1); Amalfi, S(2); Altamirano, AA(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: *plastine.maria@inta.gob.ar*

Los baculovirus se utilizan como herramientas biotecnológicas, principalmente en la producción de proteínas y como control biológico de plagas. Además, presentan un gran potencial como vectores virales para el transporte de genes en mamíferos. Aunque no replican ni se integran, pueden expresar genes bajo promotores activos en mamífero de forma transitoria. Con el objetivo de prolongar la expresión de un transgén vehiculizado por baculovirus, nos propusimos desarrollar un conjunto de vectores baculovirales capaces de llevar los elementos para insertar un gen en la célula blanco. Para ello, elegimos el sistema del transposón *Sleeping Beauty* que integra de manera aleatoria en el genoma celular el casete de genes rodeado por las secuencias terminales ITR. Como la acción requerida de la transposasa SB es inmediata y de corta duración, planteamos dos estrategias: una que la expresa en la célula de mamífero, y otra que lo hace en insecto, para ser transportada de forma pasiva en los baculovirus. Primero, evaluamos protocolos de transducción en células BHK-21 (moi 2000) para optimizar tanto el transporte pasivo de la proteína reportera GFP (baculovirus AcGFP) como el transporte del transgén GFP (baculovirus AcCAGGFP). Utilizamos virus pseudotipados o no con VSV-G, incubación por 4 h a 27°C o espinoculación a 4°C o 27°C. Luego, visualizamos las células al microscopio de fluorescencia a distintos tiempos postransducción y determinamos que el método más eficiente es la espinoculación para ambas estrategias con virus pseudotipados. Por otro lado, diseñamos baculovirus que expresan la SB bajo el promotor CAG (AcCAGSB) o bajo el promotor de poliedrina (AcSB); y un baculovirus que lleva el casete de inserción compuesto por el promotor Ef1?, una versión desestabilizada de GFP (d2GFP), un elemento regulatorio postranscripcional (WPRE) y una secuencia de poliadenilación, rodeado por ITR (AcITRGFP). Se obtuvieron los vectores baculovirales pseudotipados y se transdujeron células BHK-21 con AcITRGFP (moi 200) solo o cotransducido con AcCAGSB o AcSB (moi 200 o 2000). Se realizaron pasajes celulares dos veces por semana y, entre los 15 y 47 días postransducción, se detectó expresión de GFP por microscopía y citometría de flujo solo en las células cotransducidas con AcCAGSB y AcITRGFP, sugiriendo la inserción del casete. Los mayores niveles de expresión se obtuvieron al utilizar una relación 1:10 de AcITRGFP:AcCAGSB, lo que contradice la proporción sugerida previamente en la bibliografía. Adicionalmente, con el virus AcSB se detectó la expresión mediante western blot de SB en células de insecto, pero no su

incorporación en virus purificados, lo que sugiere que el transporte pasivo de SB no es el método adecuado para esta estrategia. En conclusión, logramos obtener un conjunto de vectores baculovirales pseudotipados de expresión prolongada y establecer una relación con mayor eficiencia para la inserción del transgén.