

Generación de un baculovirus destinado a regular negativamente la expresión de la proteína RIPK1 para el tratamiento contra el Glioblastoma Multiforme

Amorós Morales, LC(1); Marchesini, A(1); Gómez Bergna, SM(1); Scalise, ML(1); González, N(2); Candolfi M(2); Romanowski, V(1); Pidre, ML(1).

(1) Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CONICET-UNLP), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina; (2) Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED-CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: amorosleslie@gmail.com

Los baculovirus son virus específicos de artrópodos. El nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) ha sido uno de los más utilizados en biotecnología y en particular como vector para terapia génica, gracias a su capacidad de ingresar a las células de mamíferos y expresar genes heterólogos. El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el tumor primario del sistema nervioso central más común y agresivo en adultos. La muerte celular de carácter inflamatorio juega un rol crítico en el desarrollo de los gliomas, y la proteína RIPK1 es un mediador clave de la muerte celular apoptótica y necrótica, así como de las vías inflamatorias y proliferativas. Por ello, nos propusimos generar un baculovirus recombinante que codifique para un *short hairpin* RNA destinado a regular negativamente la expresión de RIPK1 (Ac shRIPK1) y lo desafiamos en diferentes ensayos preclínicos in vitro empleando modelos experimentales de GBM. El vector de transferencia conteniendo el shRIPK1 y un cassette codificante para la proteína reportera Citrine, se generó utilizando el sistema PluriBAC desarrollado en nuestro laboratorio, basado en la estrategia de clonado por Golden Gate. Las reacciones de Golden Gate fueron incubadas 10 min a 37°C y 15 min a 16°C por 30 ciclos. Los baculovirus recombinantes (recBV) se obtuvieron mediante la cotransfección del vector de transferencia con el báculo bapGOZA en células de insecto Sf9. En cuanto a los ensayos de transducción, los recBV fueron centrifugados durante 1h a 4°C y resuspendidos en PBS para ser utilizados como inóculo para tratar una monocapa de células U251 al 60% de confluencia, con una multiplicidad de 750. 2 h después, se completó el volumen de cada pocillo con medio de cultivo. Para los ensayos de proliferación, se transdujeron células U251 con el virus Ac shRIPK1 o con el virus control que no expresaba el shRNA, pero sí la proteína Citrine. 24 h después, se trataron, o no, con el quimioterápico Cisplatino y 72 h después, las células se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y se midió la absorbancia a 595 nm. Los ensayos de apoptosis tardía se realizaron por exclusión de Ioduro de Propidio en células U251 transducidas con Ac shRIPK1 y con el virus control. Finalmente, se realizó la cuantificación celular mediante citometría de flujo. Se demostró que el baculovirus Ac shRIPK1 obtenido disminuyó significativamente la proliferación de las células humanas de GBM, respecto al control. Además, el

tratamiento con Ac shRIPK1 indujo niveles de apoptosis superiores al 20% en dichas células. Por otro lado, se observó una mejora significativa tanto en la eficiencia de transducción como en la intensidad media de fluorescencia, en las células transducidas con Ac shRIPK1, respecto al control. En conclusión, obtuvimos un recBV con capacidades antiproliferativas y pro-apoptóticas en ensayos preclínicos in vitro. Estos resultados obtenidos sugieren que Ac shRIPK1, podría ser un candidato promisorio para el tratamiento contra el GBM.