

Inhibición de la replicación del virus de Dengue: evaluación de regiones conservadas como diana de la tecnología CRISPR/Cas13d

Oneto, ME(1,2); Mazur, FG(1); Kachuk, AV(1,2); Miretti, MM(1); Espíndola, SL(1,2).

(1) Laboratorio GIGA, Instituto de Biología Subtropical, CONICET-UNaM; (2) Laboratorio MADAR, UNaM.

Contacto: *equ-e-oneto@hotmail.com*

Objetivo: Desarrollar y analizar el uso de CRISPR/Cas13d como herramienta antiviral contra los cuatro serotipos de DENV, identificando regiones genómicas conservadas que sirvan como target para el sistema enzimático. Metodología: Empleamos diferentes herramientas bioinformáticas para identificar y caracterizar regiones genómicas conservadas de DENV que sirvieran como objetivo para el sistema RfxCas13d. Se seleccionaron subregiones de 3'UTR, 5'UTR y NS5 como dianas debido a su conservación y relevancia funcional en la replicación viral. Se descargaron todos los genomas completos de DENV disponibles en BV-BRC. Éstos fueron alineados y curados manualmente para crear datasets específicos de cada región diana, con los cuales diseñar guías de ARN (gRNA) usando Cas13Design. Las guías generadas se evaluaron por homología y propiedades termodinámicas mediante Blastn y RNAup, seleccionando las más prometedoras. Luego se analizaron secuencias representativas de distintos linajes para examinar la variabilidad estructural de las regiones diana utilizando LocARNA y RNAclust. Esto permitió evaluar la robustez de los gRNA frente a la diversidad genética del virus. Oligonucleótidos codificantes de los gRNA se enviaron a MacroGen Inc. para su síntesis en formato dsDNA, para luego integrarlos al plásmido de expresión pXR003 (Addgene #109053) mediante transformación bacteriana con cepas Stbl3 competentes. Para la expresión de Cas13d emplearemos el plásmido pLentiRNACRISPR_006 (Addgene #138148). Simultáneamente, iniciamos el desarrollo y optimización del protocolo de infección con DENV en cultivo de la línea celular Vero, mediante ensayo de unidades formadoras de placas (UFP). Esto permitirá validar in vitro los gRNA diseñados en la fase inicial ya que, una vez lograda la titulación, se transfectarán las células con el plásmido recombinante utilizando Lipofectamina. Resultados: Generamos un gRNA específico para cada región. Los análisis con RNAup indicaron que las dianas 5'UTR y NS5 son más favorables para la reacción con RfxCas13d que 3'UTR. La evaluación con LocARNA reveló que las dianas 5'UTR y NS5 presentan sitios de menor variabilidad que 3'UTR. Aunque la región 3'UTR presentó mayor heterogeneidad estructural, la diana seleccionada incluyó a todos los serotipos. Se obtuvieron colonias aisladas tras la transformación con el plásmido recombinante. Los ensayos de titulación in vitro se realizaron con medio semisólido de agarosa 0,8% y tinción con cristal violeta, sin buenos resultados. Actualmente estamos realizando el cambio en la tinción de las placas (rojo

neutro) cuyos resultados serán evaluados en las próximas semanas. Conclusión: Las regiones diana seleccionadas mostraron estructuras conservadas entre diversos linajes de DENV, subrayando el potencial de los gRNA diseñados para RfxCas13d. Como limitantes destacamos la poca disponibilidad de genomas completos de DENV para el diseño de la guía. Se espera optimizar la infección con DENV en células en cultivo.