

Diseño y evaluación de una estrategia de control del virus de la Fiebre Aftosa basada en CRISPR/Cas13b

Yarte, M(1,2); Esteban, MJ(2); Currá, A(1,2,3); Cacciabue, M(2,3); Kelly, JM(2,3); Fernández y Martín, R(3,4); Taboga, O(1,3); Gismondi MI(1,2,3).

(1) Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO, INTA-CONICET); (2) Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas; (3) CONICET; (4) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía.

Contacto: *gismondi.maria@inta.gob.ar*

El virus de la fiebre aftosa (FMDV) produce infecciones en el ganado, ocasionando grandes pérdidas económicas directas e indirectas. A nivel mundial, las regiones libres de fiebre aftosa logran controlar la enfermedad mediante vacunación y/o por estricto control de las fronteras y el comercio de productos de origen animal. Las vacunas utilizadas, basadas en virus inactivados, presentan algunas desventajas, como por ejemplo la pobre inducción de inmunidad de memoria, el requerimiento de cadena de frío y el riesgo potencial de escape desde las plantas productoras. Además, en caso de que ocurran brotes en países libres de enfermedad sin vacunación, la vacunación de emergencia requiere al menos 5 días para inducir protección. En consecuencia, el desarrollo de métodos alternativos de control de la enfermedad, complementarios a la vacunación, ha sido propuesto como desafío biotecnológico. El objetivo de este trabajo fue diseñar una herramienta de control de FMDV basada en un sistema CRISPR/Cas, en el que pequeños crRNA complementarios a secuencias blanco de FMDV guían la degradación del RNA viral a través de la actividad RNasa de la nucleasa Cas13b. Para ello, se construyeron vectores de expresión de crRNA dirigidos contra secuencias ubicadas en las regiones Pseudonudos, IRES, VP4, 2C y 3D del genoma viral, seleccionadas mediante predicción bioinformática. Estos vectores se cotransfectaron en células BHK-21 junto con i) un plásmido que expresa la nucleasa Cas13b en el citoplasma celular y ii) distintos plásmidos reporteros que expresan la proteína fluorescente EGFP río arriba de porciones del genoma viral que incluyen las secuencias blanco. A fin de evaluar la eficacia de este sistema respecto de un sistema de silenciamiento génico de referencia, se construyeron también vectores de expresión de pequeñas horquillas de RNA (shRNA) dirigidas contra las mismas secuencias blanco de FMDV, que también fueron cotransfectadas en células BHK-21 junto con los plásmidos reporteros. La expresión de EGFP se determinó mediante fluorimetría y microscopía de fluorescencia a las 24 h postransfección. Se observó una disminución de la fluorescencia derivada de EGFP en todas las condiciones evaluadas, excepto para la región blanco 2C. La fluorescencia fue menor en células transfectadas con el sistema CRISPR/Cas13b que con el sistema shRNA en los distintos blancos evaluados. Estos resultados demuestran que la potencialidad del sistema desarrollado para la selección de blancos y la edición efectiva del

genoma viral, que deberá ser validada en experimentos de infección con el virus completo.