

PROGRAMA DE INCENTIVOS PARA LA FORMACIÓN DE DOCENTES-INVESTIGADORES

Nombre del programa de posgrado: Maestría en Ciencias Químico-Biológicas.

Categorización PRONII: Candidato a investigador.

Nombre de la Institución: Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción.

Vinculación a Proyectos I+D: No vinculado.

Nombre del beneficiario: Enmanuel Etelvino Céspedes Chaves.

Vinculación docencia, tutoría o centro de investigación: No vinculado.

Publicaciones realizadas durante el programa: 1 (uno).

Título de tesis: Construcción de fagos filamentosos transportadores de un sistema CRISPR-Cas9 contra el virus del *Herpes simplex* tipo 1.

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud estima que dos terceras partes de la población mundial menor de 50 años está infectada por el virus del *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1). El HSV-1 es capaz de infectar las neuronas de los mamíferos, en la cual ingresa en estado de latencia de por vida o pueden reactivarse ante eventos de estrés, lo que conlleva a la replicación del material genético viral y la consecuente producción de nuevos virus infectivos. Los antivirales actualmente disponibles no son capaces de eliminar los herpesvirus latentes y cepas resistentes a las drogas de primera elección.

Debido a ello es necesario buscar nuevos fármacos o estrategias capaces de eliminar la latencia y la producción de nuevos virus en las células infectadas. Una de las estrategias actualmente utilizadas es la terapia génica, basada en el sistema CRISPR-Cas9. Sin embargo, actualmente los vectores virales y no virales utilizados para la administración de los componentes del sistema presentan ciertos retos. Ante esta situación, los vectores virales como los bacteriófagos filamentosos, ofrecen ventajas: no se integran en el genoma de las células eucariotas, son estables, seguros, se los puede modificar genéticamente, poseen mayor capacidad de empaquetamiento de genoma y son fáciles de producir.

En este trabajo se construyeron bacteriófagos filamentosos recombinantes transportadores de un sistema CRISPR-Cas9 con gRNAs únicos y dobles, capaces de inhibir el ciclo viral del HSV-1. Los fagómidos desarrollados fueron evaluados mediante transfección e infección con HSV-1 de las células HEK293T, observándose que independientemente al número de gRNAs, el sistema CRISPR-Cas9 fue capaz de inhibir la producción de nuevos HSV-1. Los vectores derivados del fago M13 fueron capaces de empaquetar fagómidos de hasta 9290 pares de bases (pb) y un rendimiento de 10^{11} a 10^{13} VGC/mL. Sin embargo, las tasas de transducción presentaron una muy baja eficiencia. Esto pudo deberse a problemas en la entrada y el transporte del fago al núcleo, lo que abre la posibilidad de modificar la superficie del fago para facilitar su entrada. El vector resultante sirve como punto de partida para una plataforma de desarrollo de vectores que a través de la tecnología de *Phage display* pueda facilitar el transporte dentro de la célula o dirigir de manera específica a algún tipo celular.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Construir fagos filamentosos recombinantes transportadores de un sistema CRISPR-Cas9 capaz de inhibir el ciclo viral del *Herpes simplex* tipo 1.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar vectores tipo fagómido que permitan la expresión de Cas9 y gRNAs dirigidos contra el genoma del virus del *Herpes simplex* tipo 1.
2. Producir fagos recombinantes transportadores del sistema CRISPR-Cas9 dirigidos contra el genoma del virus del *Herpes simplex* tipo 1.
3. Analizar la capacidad de los fagos recombinantes de inhibir el ciclo viral del *Herpes simplex* tipo 1.

APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

- Construcción de fagómidos para la expresión del sistema CRISPR-Cas9 contra genes del virus del *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1).
- Desarrollo de un novedoso de vector viral para el suministro del *cassette* de expresión del sistema CRISPR-Cas9 en células mamíferas.
- Desarrollo de una plataforma de PCR en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de copias del gen GFP (Proteína verde fluorescente), en fagómidos y bacteriófagos filamentosos recombinantes.

ACTIVIDADES REALIZADAS

- Se construyeron vectores tipo fagómido que permita la expresión de Cas9 y gRNAs dirigidos a genes del HSV-1, utilizando técnicas de biología molecular e ingeniería genética.
- Se produjeron bacteriófagos filamentosos recombinantes, y se purificaron mediante el método de precipitación con Polietilenglicol y cloruro de sodio, seguido de ultracentrifugación.
- Los bacteriófagos filamentosos fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real, utilizando dos *targets*: ORI M13 y GFP, previamente diseñados en el laboratorio.
- Se realizaron experimentos de transfección y transducción de líneas celulares de mamíferos, con los fagómidos o bacteriófagos.
- Se realizaron experimentos de infección de líneas celulares transfectadas o transducidas anteriormente, con el virus del *Herpes simplex* tipo 1.
- Se analizó el efecto de edición génica, mediante la detección de la glicoproteína D del HSV-1.

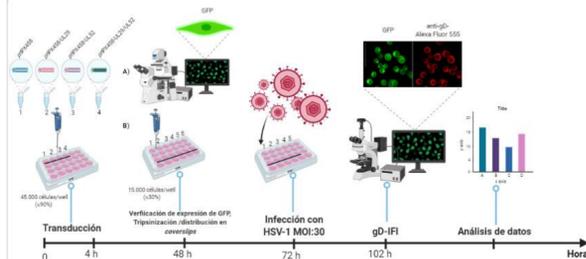


Figura 1. Ensayo de transducción de células HEK293T e infección con HSV-1.

RESULTADOS OBTENIDOS

- El sistema CRISPR-Cas9 fue capaz de inhibir la producción de nuevas partículas del HSV-1, tal como se observó en el ensayo de transfección con los fagómidos construidos y posterior infección con HSV-1.
- Los vectores derivados del fago M13 fueron capaces de empaquetar fagómidos de hasta 9290 pares de bases (pb) y un rendimiento de 10^{11} a 10^{13} VGC/mL.
- Se lograron transducir las células con los bacteriófagos filamentosos recombinantes. Sin embargo, las tasas de transducción presentaron una muy baja eficiencia.

CONCLUSIÓN

- Se logró desarrollar los vectores tipo fagómido para la expresión de Cas9 y gRNAs dirigidos contra el genoma del HSV-1.
- Además, se logró establecer un sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de fagos recombinantes que poseen en su genoma la secuencia codificante de GFP.
- Se analizó la capacidad de los fagos recombinantes de transportar el sistema CRISPR-Cas9 e inhibir el ciclo viral del HSV-1, se ha observado que las células HEK293T fueron transducidas, pero en una baja eficiencia, pese a las estrategias alternativas evaluadas.

VISIÓN Y PLANES FUTUROS

- Se sugiere a futuro implementar la tecnología *Phage display*, para la expresión de péptidos en la superficie de los bacteriófagos, con esto podría mejorar la tasa de transducción celular. Posteriormente evaluar en células neuronales.

“Este programa de posgrado fue cofinanciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT con recursos del FEEI”

