

ÁREA TEMÁTICA: Hepatitis.

<https://dx.doi.org/10.14482/sun.01.407.354>

ACV-2025-074

Inhibición de la actividad transcripcional del virus de la hepatitis B mediante tecnología CRISPR/dCas9 dirigida a un blanco de cccDNA recombinante

FABIÁN CORTÉS-MANCERA^{1,2}, PATRYCK JELLEMA¹, MARÍA-CRISTINA NAVAS³,
MARIANNE ROTS¹

¹ Epigenetic Editing Group. Pathology and Medical Biology Department, Faculty of Medicine, University Medical Center, University of Groningen (The Netherlands).

² Grupo de Investigación e Innovación Biomédica, Facultad de Ciencias Exactas y Aplicadas, Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín (Colombia).

³ Grupo de Gastrohepatología. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).

Correspondencia: Fabián Cortés-Mancera. fabiancortes@itm.edu.co

Financiación: Beca doctoral MinCiencias, Colombia (Convocatoria 783) y De Cock-Hadders Foundation, Países Bajos (Grant: 931462).

RESUMEN

Introducción: Una de las estrategias del virus de la hepatitis B (VHB) para establecer infección crónica es la persistencia del intermediario replicativo denominado ADN circular covalentemente cerrado (cccDNA) en los hepatocitos infectados. El cccADN forma un complejo con histonas celulares, por esto se conoce como minicromosoma (mcADN), que se caracteriza por presentar patrones de metilación que regulan el nivel de actividad transcripcional; por lo que corresponde a un blanco terapéutico para el control de la replicación viral y para la eventual cura virológica. Las tecnologías para guiar efectores epigenéticos a secuencias genómicas específicas se ha planteado como una excelente opción.

Métodos: En este trabajo se muestra el uso de la tecnología CRISPR/dCas9 para regular la actividad transcripcional del VHB utilizando como blanco un modelo de cccADN recombinante. Para evaluar el efecto inhibitorio se utilizó un constructo CRE/LoxP recombinasa para generar copias de cccADN (rcccADN) del VHB (pCre/LoxP HBV GFP (S)). Células HepG2 fueron cotransfectadas transitoriamente con plásmidos con el sistema CRISPR/dCas9 fusionado con efectores epigenéticos ADN metiltransferasas, Histona tri-metiltransferasa, un dominio transcripcional pasivo (dCas9-SKD), o el multiefactor CRISPR-Off. Como control se cotransfectó un plásmido dCas9 sin efectores (dCas9-NED). Para posicionar el sistema CRISPR/dCas9 en la secuencia reguladora cercana a los “enhancers” I/II del genoma de VHB, fueron adicionados 8 ARNs guía (sgRNA). Luego de la cotransfección, se extrajo ARN total y se cuantificaron los transcritos virales mediante RT-qPCR.

Resultados: El análisis de los transcritos virales demostró que la cotransfección en combinación con los efectores individuales, o usando CRISPR-Off, evidenció una reducción significativa del nivel de los transcritos virales comparado con el control dCas9-NED.

Conclusiones: Este reporte demuestra la aplicabilidad de la tecnología CRISPR/dCas9 para regular la actividad transcripcional de rcccADN del VHB.

Palabras clave: virus de la hepatitis B, infección crónica, cccADN, minicromosoma (mcADN).