



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Desarrollo de un biosensor genético basado en el sistema
CRISPR-Cas12a para la detección de *Trypanosoma cruzi***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestra en Ciencias

Presenta

IDALIA PATRICIA GARCÍA MORALES

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando Hernández García
[Instituto de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad de México, Marzo, 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

GARCÍA MORALES IDALIA PATRICIA
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **10 de diciembre de 2024**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Desarrollo de un biosensor genético basado en el sistema CRISPR-Cas12a para la detección de Trypanosoma cruzi**", dirigida por el/la Dr(a). **HERNÁNDEZ GARCÍA ARMANDO**. Acuerdo: se sustituye al Dr. Luis Vaca Domínguez por el Dr. SOSA PEINADO ALEJANDRO.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

GALVEZ MARISCAL MARÍA AMANDA	PMDCBQ PRESIDENTE
GONZALEZ ANDRADE MARTIN	PMDCBQ SECRETARIO
CEVALLOS GAOS ANA MARÍA	PMDCBQ VOCAL
FRAGOSO GONZÁLEZ GLADIS DEL CARMEN	PMDCBQ VOCAL
SOSA PEINADO ALEJANDRO	PMDCBQ VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de diciembre de 2024



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Desarrollo de un biosensor genético basado en sistema CRISPR-Cas12a para la detección de *Trypanosoma cruzi*, que presenté para obtener el grado de maestra es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Idalia Patricia García Morales'.

Idalia Patricia García Morales
No. de cuenta 417078540

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Este proyecto fue financiado por DGAPA-PAPIIT (IV200820) y por la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) - Secretaría de Relaciones Exteriores de México (Proyectos COVID-19).

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca que me permitió dedicarme a este proyecto (número: 189038978932). Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo económico.

A mi tutor, el Dr. Armando Hernández García, por su apoyo, guía y paciencia durante el desarrollo de este proyecto. A las Doctoras miembros de mi comité tutor, la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez y Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, por sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.

A los miembros de mi jurado: Dra. María Amanda Gálvez Mariscal, Dr. Martín González Andrade, Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dra. Gladis del Carmen Fragoso González y Dr. Alejandro Sosa Peinado, por sus comentarios y recomendaciones, las cuales enriquecieron este proyecto.

A la Dra. Bertha Josefina Espinoza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y a la Dra. Ingeborg Becker Fauser de la Facultad de Medicina, UNAM, por la donación de las muestras biológicas, las cuales fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación. También quiero extender mi agradecimiento a los técnicos de sus laboratorios, quienes me brindaron su apoyo, conocimientos y disposición en todo momento.

A todos los integrantes del laboratorio BioNano, en especial a Melissa por su apoyo en este proyecto, igualmente a Jesús, Gustavo, Mario, Karen, Ximena y Eddie, por su paciencia, consejos y por compartir sus conocimientos conmigo. Su compañía hizo de este proceso algo más llevadero y memorable. Les deseo lo mejor.

A mi familia, Marina, Héctor, Paulina y Bonnie, y mi amiga Elani, por su apoyo constante y por ser mi motivación para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Este logro es también suyo.

Finalmente, quiero agradecer a mí misma, por seguir adelante a pesar de la adversidad que representa la academia científica, especialmente para las mujeres, y por no rendirme a pesar de los desafíos personales.

Resumen

Este proyecto propone la evaluación e implementación de una innovadora técnica molecular basada en el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmica. La metodología busca ofrecer una alternativa precisa y accesible para la detección del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual es endémica en varios países de América, incluido México. Actualmente, la detección de *T. cruzi* se realiza mediante pruebas parasitológicas y pruebas serológicas. Aunque estas pruebas son accesibles para la mayoría de los laboratorios, su efectividad varía según la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente, y en algunos casos pueden ser difíciles de interpretar. Por ello este estudio busca desarrollar un diagnóstico molecular que ofrezca una alta sensibilidad para detectar secuencias específicas del parásito, utilizando equipos y reactivos relativamente accesibles.

Para abordar esta necesidad, se propone el uso del sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), metodología encargada de amplificar inicialmente las secuencias genéticas de interés del parásito, como el ADN satélite (satDNA) y el ADN de minicírculos del cinetoplasto (kDNA). Posteriormente, el ADN amplificado es reconocido por la ribonucleoproteína (RNP), compuesto por la proteína Cas12a y un ARN guía (gRNA). La RNP reconoce una secuencia llamada Motivo Adyacente de Protoespaciador (PAM) presente en el ADN blanco, y el gRNA se une a la secuencia de manera complementaria. El sitio catalítico de Cas12a se activa e hidroliza la doble cadena del ADN (corte *cis*), posteriormente corta de manera no específica cualquier ADN de cadena sencilla disponible en la solución (corte *trans*). Esto permite el uso de sondas de ADN marcadas con un fluoróforo y un *quencher* que al ser hidrolizadas emiten fluorescencia, funcionando como reporteras de la presencia de la secuencia de ADN detectada. Esta técnica destaca por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez en los resultados.

Se realizaron pruebas de concepto para detectar específicamente las secuencias satDNA y kDNA de *T. cruzi*, utilizando ADN genómico extraído de cultivos de epimastigotes de la cepa Ninoa. Se seleccionaron los sets de primers y gRNAs más eficaces para el método molecular. El límite de detección (LoD) de satDNA fue inferior a una concentración zeptomolar (10^{-21} M), equivalente a aproximadamente 0.1 fg/ μ L o 0.1 parásitos/mL, similar a los niveles de sensibilidad reportados por la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Además, el sistema es específico para la detección de diferentes cepas de *T. cruzi* y no detecta parásitos relacionados filogenéticamente, como *Leishmania*. De igual manera la técnica se evaluó en muestras biológicas de sangre de ratón infectados con tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro. Finalmente, se adaptó a tiras de flujo lateral para facilitar su uso en los laboratorios clínicos, logrando resultados rápidos, accesibles y con gran potencial para su implementación en el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas.

Tabla de contenido

Resumen.....	3
Lista de Abreviaturas	6
Introducción.....	7
Antecedentes.....	8
Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	8
Detección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Secuencias empleadas para la detección molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Detección de satDNA y kDNA con PCR	13
Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).....	14
Aplicación de LAMP para detección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Auge del sistema CRISPR-Cas como técnica de detección molecular	18
Sistema de detección CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP	19
Detección de parásitos mediante el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP....	23
Justificación.....	24
Hipótesis	24
Objetivos	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Metodología experimental	25
Diseño de primers LAMP y gRNAs	26
Análisis bioinformático de las secuencias	26
Síntesis de los ácidos nucleicos.....	26
Producción y purificación de la proteína AsCas12a.....	26
Obtención de muestras biológicas	27
Extracción de ADN genómico	27
Amplificación isotérmica del ADN blanco.....	28
Detección de ADN con sistema CRISPR-Cas12a mediante fluorescencia	28
Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de detección molecular ...	29
Detección de ADN con sistema CRISPR-Cas12a mediante tiras de flujo lateral	29
Análisis estadístico.....	30
Resultados y discusión.....	31
Análisis bioinformático de las secuencias a detectar	31
Primers LAMP y gRNAs para los diferentes blancos genéticos	33

Amplificación isotérmica de la secuencia satDNA mediante LAMP	36
Amplificación isotérmica mediante LAMP de satDNA en dilución seriada 1/100	37
Amplificación isotérmica mediante LAMP de la secuencia de kDNA	38
Detección de satDNA con el sistema CRISPR-Cas12a.....	39
Evaluación de gRNAs en la detección de satDNA mediante CRISPR-Cas12a.....	40
Evaluación de CRISPR-Cas12a con gRNA2 para detectar satDNA amplificado.....	43
Evaluación de gRNAs en la detección de kDNA mediante CRISPR-Cas12a.....	44
Evaluación de CRISPR-Cas12a con gRNA2 para detectar kDNA amplificado	46
Evaluación de la sensibilidad de CRISPR-Cas12a en la detección de satDNA.....	47
Evaluación de la sensibilidad de CRISPR-Cas12a en la detección de kDNA	50
Especificidad de CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA	52
Detección de satDNA en muestras de sangre de ratón	54
Detección de satDNA con CRISPR-Cas12a integrado a tiras de flujo lateral.....	57
Conclusiones	61
Perspectivas	62
Referencias	63
Apéndice	68

Lista de Abreviaturas

3SD	Tres veces su desviación estándar (SD, standard deviation)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
a.u.	Unidades arbitrarias
BIP	Cebador interno opuesto (Backward Inner Primer)
B3	Primer externo opuesto (Backward Outer Primer)
BLAST	Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local (Basic Local Alignment Search Tool)
Bst	ADN polimerasa de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Cas	Proteína asociada a CRISPR
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CRISPR-Cas12a	CRISPR asociado a la proteína Cas12a
dsDNA	ADN de doble cadena
DTU	Unidad Discreta de Tipificación (Discrete Typing Units)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FAM	Carboxifluoresceína
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FIP	Cebador interno directo (Forward Inner Primer)
F3	Cebador externo directo (Forward Outer Primer)
GNP	Nanopartículas de oro
LF	Primer de bucle directo (Loop Forward Primer)
LB	Primer de bucle opuesto (Loop Backward Primer)
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
gRNA	ARN guía
kDNA	ADN de cinetoplasto
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop-Mediated Isothermal Amplification)
LoD	Límite de detección (Limit of Detection)
M	Molaridad: nM (nanomolar), pM (picomolar), fM (femtomolar), aM (attomolar), zM (zeptomolar), yM (yoctomolar)
Mb, kb, pb	Megabase, kilobase, par de bases
NEB	New England Biolabs
NTC	Control blanco (No Template Control)
NTS	Hebra no diana (Non-Target Strand)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAM	Motivo adyacente de protoespaciador (Protospacer Adjacent Motif)
pADN	ADN plasmídico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PoC	Punto de atención primaria (Point of Care)
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RNP	Ribonucleoproteína
RPA	Amplificación por recombinación de polimerasa
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
satDNA	ADN satélite
ssDNA	ADN de cadena sencilla
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TS	Hebra diana (Target Strand)

Introducción

El diagnóstico molecular ha avanzado notablemente en los últimos años, facilitando la detección y cuantificación del material genético en muestras biológicas de origen infeccioso. Estas técnicas permiten identificar la presencia de microorganismos, ya sean virus, bacterias o parásitos, ofreciendo una detección más precisa y rápida de las enfermedades.

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida principalmente por insectos triatomíneos. Es endémica en varios países de América, incluido México. En su fase aguda, la enfermedad presenta síntomas inespecíficos o los pacientes son asintomáticos, lo que dificulta el diagnóstico temprano. Sin tratamiento la infección progresa a la fase crónica, que permanece asintomática hasta que aparecen complicaciones cardíacas y gastrointestinales[1].

Anteriormente para el diagnóstico de la enfermedad se utilizaban métodos como el xenodiagnóstico o hemocultivo, pero requerían largos períodos de tiempo para obtener un resultado clínico. En la actualidad es común detectar el parásito mediante microscopía óptica, siendo accesible para los laboratorios, pero solo resulta efectivo en la fase aguda de la enfermedad. Para la fase crónica se recomienda utilizar las pruebas serológicas, las cuales detectan anticuerpos específicos contra el parásito. Sin embargo, debido a la variabilidad antigénica del parásito se debe realizar al menos dos pruebas distintas para tener una certeza diagnóstica[2].

Para superar estas limitaciones la técnica molecular de PCR ha sido utilizada porque confiere una mayor sensibilidad y especificidad al detectar genes específicos del parásito. No obstante, su aplicación se ve restringida por la dificultad de acceso a equipos y reactivos por su alto costo, siendo un obstáculo para laboratorios con pocos recursos. Además, se requiere personal capacitado para evitar la incidencia de falsos positivos o negativos[3].

Este proyecto propone la evaluación e implementación de una innovadora técnica molecular conocida como sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmica. Esta metodología busca proponer una alternativa precisa y accesible para la detección del parásito *Trypanosoma cruzi*. De igual manera, se espera que en el futuro pueda ser utilizada para el diagnóstico temprano de la enfermedad en puntos de atención primaria (PoC, por sus siglas en inglés, *Point of Care*), donde se brinda atención médica básica, lo que facilitaría un tratamiento oportuno y reduciría el riesgo de progresión a la fase crónica.

Antecedentes

Generalidades de la enfermedad de Chagas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida debido a su alta prevalencia en América Latina y su impacto en la calidad de vida de los pacientes. El tratamiento actual, ya sea con Nifurtimox o con Benznidazol, es más eficaz en la primera fase de la enfermedad[4,5].

En cuanto la epidemiología de la enfermedad de Chagas, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que globalmente hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, con una incidencia anual de 30,000 casos nuevos y 12,000 decesos relacionados con la enfermedad. Además, alrededor de 75 millones de personas están en riesgo de infección [4]. Recientemente se reportó que solo el 3% de los portadores del parásito han sido diagnosticados, lo que resalta la importancia de desarrollar o implementar técnicas de diagnóstico molecular accesibles en regiones PoC [6]. En México se estima que hay 1.1 millones de infectados y 30 millones en riesgo de contraer esta enfermedad[7]. En los últimos años, la Secretaría de Salud ha reportado que los estados con mayor número de casos son Veracruz, Yucatán, Oaxaca, Morelos y Chiapas, con una incidencia mayor en hombres. Además, entre el año 2000 y 2016, se registraron 487 defunciones relacionadas con la enfermedad, y en 2022 se diagnosticaron 860 casos en total[2,8].

La sintomatología de la enfermedad varía según la fase en la que se encuentre el paciente. La fase aguda ocurre durante las primeras 4 a 8 semanas de la infección, en la cual la mayoría de los pacientes son asintomáticos o presentan síntomas inespecíficos como fiebre, dolor muscular, ganglios linfáticos inflamados, palidez, dolor abdominal o torácico. También pueden presentarse síntomas más específicos como el chagoma, un nódulo en el sitio de la picadura, o el signo de Romaña, una hinchazón en un párpado donde está el sitio de entrada del parásito. Si no hay una detección a tiempo de la enfermedad, el paciente no puede recibir los medicamentos para ser tratado y progresa a la fase crónica, que permanece asintomática durante cinco a veinte años. Entre el 30% y 40% de los pacientes pueden desarrollar complicaciones cardíacas y digestivas como miocardiopatías, megacolon o megaesófago, las cuales pueden llegar a una etapa avanzada y provocar la muerte súbita[1,5].

El protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas y presenta varias formas morfológicas durante su ciclo de vida. Se ha clasificado en seis diferentes Unidades Discretas de Tipificación (DTUs, por sus siglas en inglés, *Discrete Typing Units*), entre ellas comparten la variabilidad en ciertas familias genéticas lo que puede influir en el tropismo, virulencia, y adaptación del parásito al vector[9]. Igualmente, la epidemiología varía según el tipo de DTU. En el caso de la DTU I, es más prevalente en Norteamérica, y se asocia principalmente con miocardiopatías. Por otro lado,

las DTUs II-VI predominan en Sudamérica, y están vinculadas tanto con miocardiopatías como con complicaciones digestivas[7]. Cada DTU está conformada por diferentes cepas, las cuales son clones relacionados entre sí debido a que comparten marcadores genéticos. En el caso de las cepas Ninoa y Querétaro, presentes en México, se han clasificado dentro de la DTU I al estar asociadas genéticamente con la cepa Silvio, originaria de Brasil y considerada referencia de esta DTU[10,11].

La principal vía de transmisión del parásito es a través de los vectores triatominos, pertenecientes a la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, de diferentes géneros como *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, conocidos coloquialmente en México como “chinche besucona”. Entre 2009 y 2010, se logró eliminar al principal vector del país, *Rhodnius prolixus*. Sin embargo, aún persisten 13 especies capaces de transmitir la enfermedad. Estos insectos se alimentan de la sangre de los mamíferos, y al picar defecan cerca de la herida liberando el parásito en su forma tripomastigote metacíclico, ingresando al cuerpo a través de la picadura, heridas cercanas o vías conjuntivas para continuar el ciclo de transmisión (Figura 1) [1,2,4].

La transmisión también puede ocurrir de forma congénita, por transfusión sanguínea o trasplante de órganos de donantes infectados, y por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados con heces del vector. En América Latina el riesgo de transmisión vertical es aproximadamente del 5%, y se calcula que unos 9,000 a 15,000 recién nacidos adquieren la infección durante la gestación[12]. Respecto a la transmisión por transfusiones, en el 2010 la OPS estimó que el 0.93% de la sangre donada en América Latina estaba infectada con el parásito, con un riesgo residual de 1 en 200,000 unidades[13]. En México la seroprevalencia en bancos de sangre es de aproximadamente 0.4% [2]. La transmisión por trasplante de órganos es poco frecuente, sin embargo, la tasa de infección varía según el órgano, alcanzando hasta un 75% en trasplantes de corazón[13]. Por último, se han reportado pocos brotes epidémicos causados por la transmisión oral a través de alimentos y bebidas contaminados. No obstante, en este caso la carga parasitaria suele ser mayor, lo que resulta en infecciones más graves en comparación con la transmisión vectorial[12].

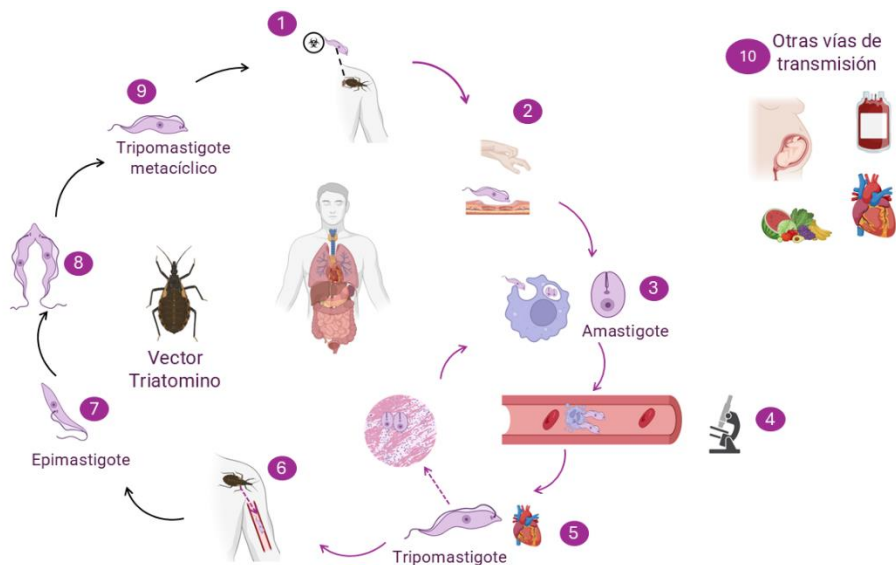


Figura 1. Esquema del ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* a través el vector Triatomino. 1) El vector se alimenta de sangre de mamíferos, y al mismo tiempo defeca transmitiendo la fase infecciosa del parásito (tripomastigote metacíclico). 2) *T. cruzi* entra al cuerpo a través de la herida de picadura o por vía conjuntiva. 3) El parásito penetra las células cerca de la picadura, y se transforma en amastigote para dividirse por fisión binaria. 4) Se transforma nuevamente en tripomastigote para romper la célula huésped y entra en el torrente sanguíneo. Esta es la forma que se detecta en las pruebas diagnósticas habituales en la fase aguda de la enfermedad. 5) El tripomastigote invade otras células, como las del músculo cardíaco o del colon, repitiendo el ciclo de infección. 6) El vector adquiere el parásito al alimentarse de un hospedador infectado. 7) En el intestino del vector, el parásito se transforma en epimastigote. 8) Los epimastigotes se multiplican en el intestino del vector. 9) El parásito se transforma en tripomastigote metacíclico en la ampolla anal del vector y es expulsado con las heces para continuar con el ciclo de transmisión. 10) Otras vías de transmisión: congénita, transfusiones de sangre o trasplante de órganos de donantes infectados, o consumo de alimentos o bebidas contaminados. Figura creada en Biorender, 2024.

Detección de *Trypanosoma cruzi*

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Chagas en México se basa en el cuadro clínico del paciente. En la fase aguda se recomienda realizar pruebas parasitológicas debido a la alta parasitemia, o si han pasado 4 semanas desde la infección se puede realizar pruebas serológicas. En la fase crónica se deben realizar dos pruebas serológicas de formato distinto[2,14].

Además, para minimizar riesgos de transmisión la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012 establece la obligatoriedad del tamizaje serológico en los donadores de sangre y órganos. En casos de transmisión congénita se realizan pruebas parasitológicas o de PCR en el primer mes de vida del neonato de madres infectadas, seguido de un monitoreo serológico a los 12 meses[2,15].

Métodos directos: Pruebas parasitológicas

Las pruebas parasitológicas buscan identificar de forma directa al parásito en muestras de sangre. En México se recomienda para pacientes en fase aguda o a los recién nacidos de madres con la enfermedad de Chagas[2].

El método más usado es la observación del parásito mediante microscopia óptica en frotis sanguíneo teñido con Giemsa. La sensibilidad de esta técnica en la fase aguda puede oscilar entre el 80% al 90%, se recomienda el uso de métodos de concentración de sangre para aumentar la sensibilidad entre 90% a 100%. Estas pruebas no requieren equipo costoso, pero sí necesitan personal capacitado que pueda identificar al parásito, y el tiempo de procesamiento puede superar las tres horas. Anteriormente eran utilizadas las técnicas de hemocultivos, inoculación en animales o el xenodiagnóstico, actualmente sólo se emplean para fines de investigación debido a su complejidad y el excesivo tiempo de procesamiento[2,14].

Métodos indirectos: Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos anti-*T. cruzi*, y se utilizan principalmente en pacientes en fase crónica. Las técnicas que se utilizan son Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta, Western Blot y hemaglutinación indirecta[2,3].

La OMS determina que el estándar para el tamiz de la enfermedad sea con dos pruebas serológicas. Por lo tanto, la Secretaria de Salud sugiere realizar una prueba con elevada sensibilidad y otra con elevada especificidad para confirmar el diagnóstico. Si los resultados son discrepantes, se recomienda una tercera prueba serológica distinta para ser certeros. Este algoritmo de diagnóstico se establece debido a que hay una alta variabilidad en la expresión antigénica entre las diversas cepas o DTUs del parásito que pueden influir en los resultados de las pruebas. También existe la posibilidad de una reacción cruzada con organismos relacionados filogenéticamente al parásito[2,14].

Los kits serológicos usan distintas composiciones de antígenos, pueden provenir de extractos crudos, antígenos recombinantes, péptidos sintéticos o antígenos quiméricos. En México, la combinación de pruebas utilizados principalmente son el kit de ELISA con antígenos crudos y con antígenos recombinantes, los cuales alcanzan una sensibilidad del 98% - 100%. Sin embargo, sus limitaciones son que los equipos que se utilizan en estas pruebas pueden ser de costo elevado y en ocasiones se presentan resultados dentro de la zona de incertidumbre o discrepantes[14].

Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares buscan identificar secuencias específicas del ADN del parásito. Actualmente en México sólo se emplea la técnica de PCR en laboratorios de investigación o para monitorear el tratamiento de pacientes en fase crónica. Sin embargo, aún no se ha establecido un protocolo de PCR específico para ser utilizado como prueba de detección única o rutinaria debido a la alta variabilidad en la sensibilidad y especificidad entre diversos estudios [2,3].

Secuencias empleadas para la detección molecular de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito con un genoma nuclear diploide, con 19 a 40 cromosomas y el tamaño del genoma varía entre 60 y 150 Mb dependiendo del tipo de DTU[16]. Su genoma contiene múltiples secuencias repetidas que se han empleado como principales objetivos genéticos para la detección molecular, dado que al tener varias copias aumenta la probabilidad de detectar el parásito con una elevada sensibilidad y especificidad. Las secuencias más utilizadas como blancos para la detección son ADN satélite (satDNA) y el ADN de cinetoplasto (kDNA), específicamente la región variable de los minicírculos (Figura 2) [3].

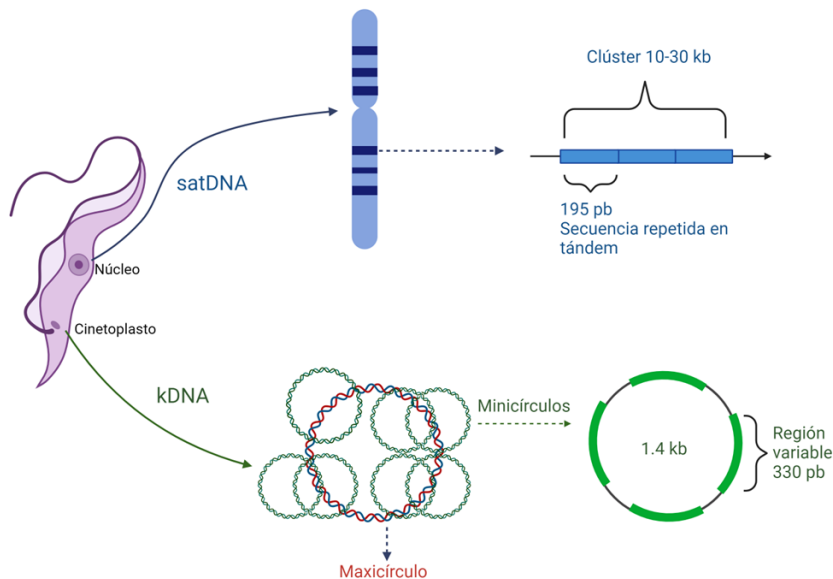


Figura 2. Esquema de la localización de las secuencias empleadas para la detección de *Trypanosoma cruzi*. El ADN satélite (satDNA) es una secuencia repetida en tándem y agrupada, distribuyéndose a lo largo de los cromosomas. El ADN de cinetoplasto (kDNA) está distribuido en maxicírculos y minicírculos, de los cuales, su región variable es la secuencia de interés. Figura creada en Biorender, 2024.

ADN satélite (satDNA)

El ADN satélite es una de las regiones más utilizadas en el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi*, debido a que es una secuencia repetitiva en tándem de 195 pb y agrupada en clústeres de aproximadamente 10 a 30 kb con 150 repeticiones cada uno. Está presente en la mayoría de los cromosomas del parásito, particularmente en el centrómero y los telómeros, representando el 10% del genoma total. Por lo tanto, habrá aproximadamente 120,000 copias de la secuencia en el genoma, lo que aumenta significativamente la sensibilidad de las técnicas moleculares. Actualmente el satDNA es el principal blanco molecular que se utiliza en centros de investigaciones para el diagnóstico de *T. cruzi* [3].

ADN del cinetoplasto (kDNA)

Los tripanosomátidos cuentan con una estructura mitocondrial conocida como cinetoplasto, donde se localiza el ADN mitocondrial en forma de círculos, divididos en maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos tienen los genes necesarios para el metabolismo mitocondrial, mientras que los minicírculos codifican ARN que permiten la maduración de los ARN mensajeros (mRNA) de los maxicírculos. En *Trypanosoma cruzi* los maxicírculos tienen una longitud de 20 a 40 kb y los minicírculos de 1.4 kb, este tipo de círculo presenta regiones altamente conservadas y entre ellas se sitúa la región altamente variable de 330 pb. La posición y secuencia de la región variable es específico para cada especie, lo que le permite ser un blanco adecuado para la detección molecular[17,18].

El kDNA representa alrededor del 25% del genoma total del parásito, con 10,000 a 30,000 minicírculos con cuatro copias de la región variable, dando un total de 40,000 a 120,000 copias de la secuencia, lo cual incrementa la probabilidad de detección del parásito y su sensibilidad[3,19].

Detección de satDNA y kDNA con PCR

Con el objetivo de implementar la técnica de PCR para la de detección de *Trypanosoma cruzi*, diversos laboratorios evaluaron el desempeño de la prueba molecular. Se emplearon diferentes métodos de extracción de ADN, tipos de PCR y blancos genéticos. El kDNA demostró una alta sensibilidad, con un límite de detección (LoD) de 0.01 fg/ μ L de ADN de cepa DTU I, y de 5×10^{-3} parásitos/mL en muestras de sangre infectadas artificialmente. Por su parte el satDNA mostró mayor especificidad para la detección de diferentes cepas, con un LoD de 0.1 fg/ μ L de ADN de cepa DTU I, y en muestras de sangre un promedio de 0.05 a 0.5 parásitos/mL. Las mejores metodologías obtuvieron una sensibilidad de 83.3-94.4% y especificidad de 85-95% [20].

Posteriormente, se evaluó la eficiencia de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para detectar *T. cruzi*. La qPCR de kDNA mostró mayor sensibilidad analítica (0.23 parásitos/mL) que la qPCR de satDNA (0.70 parásitos/mL) en muestras de sangre que se les añadió previamente ADN de una cepa DTU VI. En muestras seropositivas la qPCR de kDNA detectó un mayor número de muestras con baja parasitemia, mostrando una sensibilidad analítica de 84.14%, en comparación con el 80.69% para satDNA [21,22].

De igual manera, se han comparado los distintos tipos de PCR para detectar las secuencias del parásito presentes en pacientes de fase crónica. Evaluaron el kit comercial *TCRUZIDNA.CE* (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl) de qPCR satDNA, así como técnicas diseñadas por los laboratorios para satDNA y kDNA. El kit comercial mostró mayor sensibilidad (98%) y un LoD más bajo de 2 copias/μL (aproximadamente 400 fg/μL) a comparación de 400 copias/μL (aproximadamente 7.9 pg/μL) de kDNA. No obstante, el proceso de PCR de punto final de kDNA excede a dos horas, y el parásito *Trypanosoma rangeli* puede generar falsos positivos. Por otro lado, las DTUs con bajas copias de satDNA podrían dar falsos negativos en la qPCR. Por lo tanto, para mejorar la certeza de la detección recomendaron combinar estas dos técnicas de PCR, aunque se vea comprometido el tiempo para obtener los resultados [23].

A pesar de las ventajas de la qPCR por su alta sensibilidad y especificidad, aún no ha sido implementado globalmente como estándar diagnóstico a causa de los diferentes resultados entre los estudios. Para superar este reto se continúa el desarrollo de varios kits de PCR. Recientemente el kit *NAT Chagas* (Instituto de Biología Molecular do Paraná) diseñado para detectar satDNA, mostró un LoD de 0.16 parásitos/mL así como una sensibilidad y especificidad del 100% al compararlo con la qPCR estándar. Sin embargo, frente a pruebas serológicas el kit solo detectó el 54% de las muestras de pacientes en fase crónica[24]. A pesar de ello representa un avance en la detección molecular del parásito, ya que podría permitir estandarizar la metodología y hacerla reproducible en diferentes laboratorios, aunque su aplicación seguiría siendo limitado en las localidades de recursos limitados debido al costo elevado del equipo de qPCR. Como alternativa se ha impulsado la investigación en técnicas de amplificación isotérmica, que permiten amplificar el ADN a temperatura constante sin requerir equipos tan complejos ni caros[25].

Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Notomi y colaboradores desarrollaron la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la cual permite amplificar secuencias de ADN blanco en tan solo una hora a una temperatura constante de 65 °C. Inicialmente se emplearon cuatro oligonucleótidos cebadores (*primers* en inglés), dos son para la región interna del ADN, conocidos como “Forward Inner Primer” (FIP), compuesto por F2 y F1c, y “Backward Inner Primer” (BIP), compuesto por B2 y B1c, estos contienen dos secuencias distintas que corresponden al ADN sentido y anti sentido. Los otros dos primers son de la región externa,

denominados como “Forward Primer” (F3) y “Backward Primer” (B3). Posteriormente, se añadieron dos primers de bucle el “Loop Forward” (LF) y “Loop Backward” (LB) aumentando la especificidad de la amplificación y reduciendo el tiempo de reacción a solo media hora [26,27].

En la Figura 3 se ejemplifica el ciclo de amplificación de LAMP. Este comienza cuando el primer FIP, con su región F2, se une a la cadena diana, mientras que su región F1c queda libre. La secuencia complementaria se desplaza cuando el primer F3 se une al ADN. Este fenómeno sucede en el otro extremo con los primers BIP y B3. Se tendrá una cadena sencilla con secuencias que se complementan generando una estructura en forma de mancuerna, aquí los primers FIP y BIP pueden unirse nuevamente para obtener más producto de amplificación. Igualmente, entre la región F1c y F2 se unirá el primer LF, y entre la región B2 y B1c se unirá el primer LB, incrementando la reacción de amplificación y teniendo amplicones en forma de concatémeros o bucles, los cuales se observan como un barrido en forma de escalera en un gel de agarosa[28].

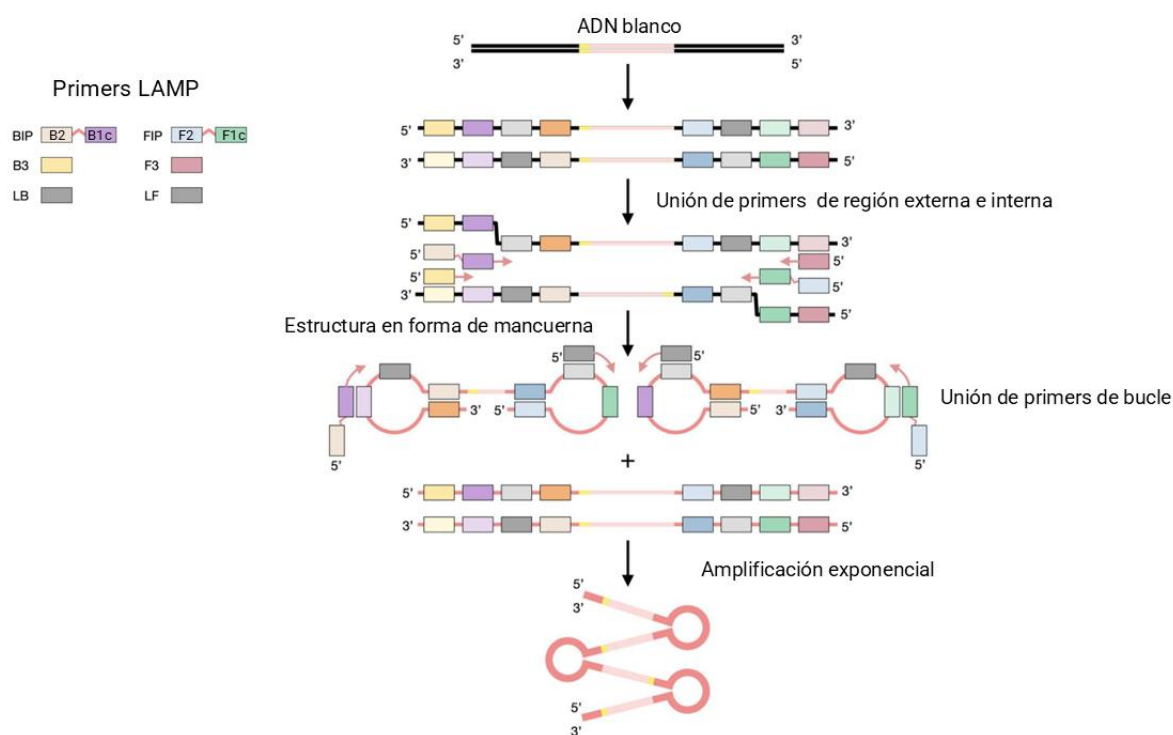


Figura 3. Esquema del ciclo de amplificación mediante LAMP para obtener los amplicones en forma de concatémeros de la secuencia de interés. Modificado de “Recent progress in diagnosis and treatment of Human African Trypanosomiasis has made the elimination of this disease a realistic target by 2030” [29]. © 2022 The Authors.

La reacción de LAMP requiere una enzima conocida como Bst polimerasa, originaria de *Geobacillus stearothermophilus*, tiene un peso aproximado de 99 kDa (kilodalton) su temperatura óptima es de 65 °C y es estable a un pH de 8.8. Durante la amplificación, esta enzima se distingue por su capacidad de separar la doble cadena de ADN y desplazar la cadena original, lo cual facilita la síntesis de amplicones a una temperatura constante. La Bst polimerasa ha sido modificada mediante mutaciones para mejorar sus características fisicoquímicas. La Bst 2.0 WarmStart® tiene mayor termoestabilidad, es tolerante a altas concentraciones de sal y amplifica eficazmente a los 20 minutos, además contiene un aptámero reversible que inhibe su actividad a temperaturas menores a 45 °C [30,31].

Debido a las características de la polimerasa utilizada, se pueden realizar las reacciones de amplificación en un termobloque o baño María a una temperatura constante, a diferencia de la PCR que requiere varios cambios de temperatura y ciclos de amplificación, siendo necesario un termociclador. Por lo tanto, LAMP es una técnica accesible de realizar en los laboratorios por su reducido tiempo y costo[28]. Sin embargo, una limitación de la técnica radica en el diseño de los primers, si estos no se diseñan con los parámetros adecuados puede propiciar una mayor interacción entre los primers causando falsos positivos (Tabla 1), representando un inconveniente si se identifica la amplificación de manera visual con agentes intercalantes de ADN, como SYBR Green I, o indicadores de iones metálicos[32].

Tabla 1. Parámetros óptimos para diseñar los primers para LAMP

T _m (Temperatura de fusión)		Distancia entre los primers (par de bases)		%GC
F2 y B2	59 a 61 °C	De 5' de F2 a 5' de B2	120-160	40-65%
F3 y B3	59 a 61 °C	De 3' de F3 a 5' de F2	0-60	
F1c y B1c	64 a 66 °C	De 5' de F2 a 5' de F1c	40-60	
LF y LB	64 a 65 °C			

Nota: Tabla elaborada con información de "Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V5)" [33]

Aplicación de LAMP para detección de *Trypanosoma cruzi*

Primero se utilizó el gen 18s rRNA (ARN ribosomal) como blanco genético en LAMP para identificar al parásito *T. cruzi* en muestras de infección congénita, mostrando un LoD de 50 parásitos/mL y generó falsos positivos en muestras de *Leishmania braziliensis* y *T. rangeli*. Por lo tanto, esta secuencia tiene una baja sensibilidad y no es tan específico[34], [35]. Debido a estas limitaciones Ordoñez y colaboradores buscaron una secuencia que fuera más precisa. Analizaron blancos genéticos que previamente han sido utilizados en PCR. Seleccionaron y diseñaron primers para el ADN satélite, debido a que la secuencia esta conservada en las cepas del parásito. Lograron amplificar al satDNA de las cepas CL Brener (DTU VI) y Dm28 (DTU I) en 60 minutos, con un LoD de 5 fg (5×10^{-6} ng/μL) y 50 fg (5×10^{-5} ng/μL), respectivamente. Además, fue específico para las cepas de *T. cruzi*, al no amplificar ADN de *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*[36].

Se ha desarrollado un kit de LAMP llamado *T. cruzi Loopamp* (Eiken Chemical Co.) para facilitar la amplificación del satDNA y disminuir el riesgo de falsos positivos. Se demostró que tiene una sensibilidad analítica de 1×10^{-2} fg/ μ L para las cepas CL Brener (DTU VI) y Sylvio X10 (DTU I), siendo más sensible que la muestra amplificada por la técnica de PCR (1×10^{-1} a 1 fg/ μ L), y fue específica al no reconocer otros parásitos como *Leishmania sp.* o *Trypanosoma brucei*. De igual manera, el LoD en sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa CL Brener fue de 1×10^{-2} a 1 parásito/mL[37]. En diferentes muestras de pacientes previamente diagnosticados mostró una sensibilidad y especificidad promedio de 93% a 100%, respectivamente. Sin embargo, no logró detectar una muestra con baja parasitemia (0.003 parásitos/mL), dando un falso negativo[38].

Con el fin de mejorar la eficacia del kit de LAMP se han utilizado diferentes técnicas para purificar el ADN de las muestras de sangre. Se optimizó al integrar el equipo *PrintrLab* que utiliza el brazo automático de la impresora 3D, evitando así la contaminación cruzada. Se logró un LoD de 0.1 parásitos/mL para DTU II (cepa Y), 1 parásito/mL para DTU VI (Cepa CL Brener) y 2 parásitos/mL para DTU V. Además, mostró una alta sensibilidad al detectar el mismo número de pacientes con infección congénita identificados con serología y una mayor sensibilidad que la qPCR [39]. También se ha empleado el kit *PURE* (Eiken Chemical Co.) para la extracción rápida de ADN de muestras de sangre heparinizada o manchas de sangre secas en papel filtro (DBS), infectadas artificialmente por dos cepas diferentes. Obteniendo en las muestras de sangre un LoD de 5 parásitos/mL de la cepa CL Brener (DTU VI) y 10 parásitos/mL de la cepa Silvio X-10 (DTU I), y las muestras DBS un LoD de 15–20 parásitos/mL. Por lo tanto, se ha recomendado utilizar el kit *PURE* para pacientes con infección congénita o en fase aguda, donde la parasitemia es elevada[40].

Recientemente se utilizaron los sets de primers diseñados por Ordoñez et. al para la amplificación de satDNA, dónde se introdujo un indicador de pH (rojo fenol) facilitando la observación colorimétrica de la reacción de LAMP sin necesidad de abrir el tubo. De igual manera, implementaron equipos de bajo costo para amplificar el ADN en solo 30 minutos. Se obtuvo un LoD de 1.2 parásitos/reacción o 0.6 parásitos/ μ L, equivalente a 600 parásitos/mL, en muestras de sangre infectadas artificialmente con ADN de Dm28 (DTU I), y se demostró una especificidad y sensibilidad al 100% con muestras de sangre de caninos infectados[41].

En resumen, LAMP es una técnica simple y rápida, con alta sensibilidad y especificidad. Además, han logrado mostrar LoD alrededor de 1 parásito/mL. No obstante, en algunos casos este valor ha sido mayor, lo que puede dificultar la identificación del parásito en pacientes crónicos[25]. Así que se plantea, como una perspectiva, la integración del sistema CRISPR-Cas12a con LAMP para mejorar la sensibilidad analítica de la detección del parásito *T. cruzi*, con el fin de ser utilizado en casos con baja carga parasitaria. Igualmente, este sistema al ser más específico permitiría reducir los falsos positivos que se han reportado.

Auge del sistema CRISPR-Cas como técnica de detección molecular

El sistema CRISPR-Cas, presente en el genoma de arqueas y bacterias, está conformado por secuencias repetitivas denominadas CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas) que codifican los CRISPR RNA (crRNA), y están flanqueadas por genes que codifican las proteínas Cas. Estas proteínas guiadas por el crRNA reconocen la secuencia diana y degradan el ADN de los fagos, evitando así que el material genético exógeno invada el genoma bacteriano[42], [43]. Este sistema se ha clasificado en diferentes clases y tipos dependiendo de la composición de su complejo Cas. Los sistemas de la clase 2, como Cas9, Cas12 y Cas13, destacan por tener una proteína de gran tamaño con multidominios y entre estas proteínas cuentan con distintos dominios catalíticos para el corte de ADN o ARN[44].

Basado en el sistema CRISPR-Cas9, las investigadoras Emanuelle Charpentier y Jennifer Doudna desarrollaron la tecnología de edición genética con fines de terapia genética. Actualmente tiene diversas aplicaciones en microbiología, medicina y biotecnología[45]. Posteriormente, se usó el sistema como una herramienta de detección genética, en el cual la proteína Cas9 es modificada para que pueda reconocer la secuencia blanco sin cortar el ADN, pero requiere otro sistema de detección, como una proteína u aptámero, para traducir la señal de detección. Por lo cual este sistema puede ser complejo de diseñar y su sensibilidad es limitada[46,47].

Para simplificar el diseño de detección genética con el sistema CRISPR-Cas se ha explorado el uso de la proteína Cas12 y Cas13, ya que presentan una actividad enzimática *trans*. Esta propiedad permite la hidrólisis de reporteros fluorescentes tras la activación del sistema, lo que aumenta la señal de detección a bajas concentraciones. Además, al amplificar previamente el ADN o ARN blanco se aumenta la sensibilidad de la detección. En la Tabla 2 se presentan ejemplos de sistemas desarrollados en diversas investigaciones para la detección de patógenos, los cuales difieren en la proteína Cas o el método de amplificación isotérmica. Así mismo, estos sistemas se han optimizado al hacer la lectura de la detección con tiras de flujo lateral o al realizar en un solo paso la reacción de amplificación y detección (*One pot*) [46, 47, 48].

Tabla 2. Ejemplos de estudios sobre sistemas de detección basados en CRISPR-Cas acoplados a un paso previo de amplificación.

Nombre	Tipo de proteína Cas	Tipo de amplificación	Ejemplo de detección	Referencia
SHERLOCK	Cas13	RPA	Detección de virus (Zika o Dengue) y de bacterias (<i>E. coli</i> o <i>P. aeruginosa</i>)	[49]
DETECTR	Cas12a	RPA	Detección de variantes de VPH	[50]
HOLMES	Cas12a	PCR	Detección virus de ADN (PRV) y de ARN (JEV)	[51]
HOLMESv2	Cas12b	LAMP	Detección <i>one pot</i> de ADN	[52]
SHERLOCK4HAT	Cas13	RPA	Detección de subespecies <i>T. brucei</i>	[53]
DETECTR BOOST™ SARS-CoV-2 Reagent Kit (Mammoth Bioscences)	Cas12	RT-LAMP	Kit de detección para SARS-Cov-2	[54]
Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2 kit (Sherlock Bioscences)	Cas13	RT-LAMP	Kit de detección para SARS-CoV-2	[55]

RPA: Amplificación de la Recombinasa Polimerasa. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle. RT-LAMP: LAMP con Transcripción Reversa. VPH: Virus del Papiloma Humano. PRV: Virus de la Pseudorrabia. JEV: Virus de la Encefalitis Japonesa.

Tabla elaborada con información de "CRISPR-based diagnostics"[46].

Sistema de detección CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP

El sistema CRISPR-Cas12 pertenece a la Clase 2 Tipo V, y puede reconocer tanto ADN de doble cadena (dsDNA) como de cadena sencilla (ssDNA). Dentro de este sistema el subtipo Cas12a, también conocido como Cpf1, presenta una mayor actividad de corte *trans* cuando el blanco genético es dsDNA[56]. En este proyecto se emplea la proteína AsCas12a, del microorganismo *Acidaminococcus spp.*, debido a su mayor sensibilidad en comparación a la de otros ortólogos de Cas12, alcanzando a detectar concentraciones en el rango attomolar[57]. Esta proteína tiene un peso molecular de 151 kDa, con un pH óptimo de 8.0 y una temperatura óptima de 37 °C. Su estructura es bilobulada, REC (*Recognition*) y NUC (*Nuclease*) son los lóbulos principales. El lóbulo NUC está conformado por los dominios WED (*Wedge*), PI (*Pam-interacting*), BH (*Bridge Helix*), Nuc y RuvC, siendo este último donde se localiza el sitio catalítico de la enzima (Figura 4A y B) [58].

El crRNA, igualmente conocido como ARN guía (gRNA), del sistema CRISPR-Cas12a, es una secuencia de 43 nucleótidos (nt) que está organizado en dos regiones. En el extremo 5' se encuentra la región repetida, que se une a Cas12a formando una estructura conocida como *pseudoknot* facilitando la eficacia de la actividad enzimática. A continuación, se encuentra la región variable con una longitud de 20 nt que se une de manera complementaria con el dsDNA formando un heterodúplex de ADN-RNA (Figura 4C). Esta estructura programable permite la detección específica de secuencias de interés[59, 60].

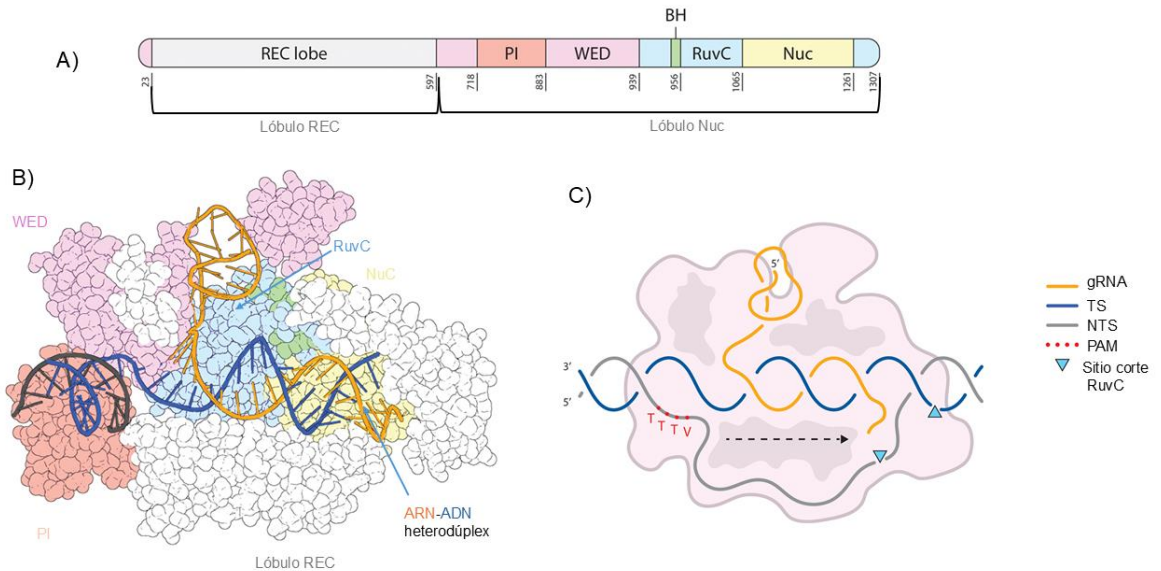


Figura 4. Esquema de la estructura de la proteína AsCas12a en complejo con el heterodúplex ARN-ADN. A) Diagrama representativo de los dominios funcionales de la proteína AsCas12a. B) Estructura AsCas12a con el complejo heterodúplex ARN-ADN. C) Esquema del complejo heterodúplex ARN-ADN. TS: *Target Strand*. NTS: *Non-Target Strand*. PAM: Motivo Adyacente de Protoespaciador. Modificado de "Editor's cut: DNA cleavage by CRISPR RNA-guided nucleases Cas9 and Cas12a" [59] © 2019 The Authors.

El proceso de detección del sistema CRISPR-Cas12a comienza con la unión del segmento repetido del gRNA a la proteína Cas12a, formando la ribonucleoproteína (RNP). Posteriormente, los dominios WED y PI de la proteína reconocen en el ADN blanco el Motivo Adyacente de Protoespaciador (PAM), 5'-TTTV-3', una secuencia formada por tres nucleótidos de timina (T) seguidos de un nucleótido variable. Este reconocimiento facilita el desenrollamiento del dsDNA. A continuación, los primeros cinco nucleótidos del gRNA, conocidos como región semilla, se unen a la secuencia objetivo provocando la unión complementaria con la hebra diana (TS, *Target Strand*). Se forma el heterodúplex ARN-ADN desplazando el lóbulo REC, provocando un cambio conformacional en Cas12a y quedando activo el dominio catalítico RuvC para realizar el corte *cis* de la dsDNA. Este corte se lleva a cabo primero en la hebra no diana (NTS, *Non-Target Strand*), es decir, la región que no está unida complementariamente al gRNA, seguida por el corte de la TS en la parte alejada de la secuencia PAM[61].

Cuando Cas12a realiza el corte de la dsDNA el sitio catalítico permanece activo, ya que aún está presente el heterodúplex ARN-ADN, continuando con el corte *trans* de cualquier ssDNA adyacente en la solución. Este corte permite utilizar una sonda de ADN

de 5 a 16 nt, marcada con un fluoróforo y un apagador de fluorescencia (*quencher*), que se separan tras su hidrólisis, generando fluorescencia que se detecta a una longitud de onda específica mediante un lector de microplacas de fluorescencia o se utiliza una sonda biotinilada para hacer la lectura con tiras de flujo lateral (Figura 5). Por lo tanto, este sistema ofrece una detección rápida, sensible y específica de una secuencia blanco de interés[50, 61].

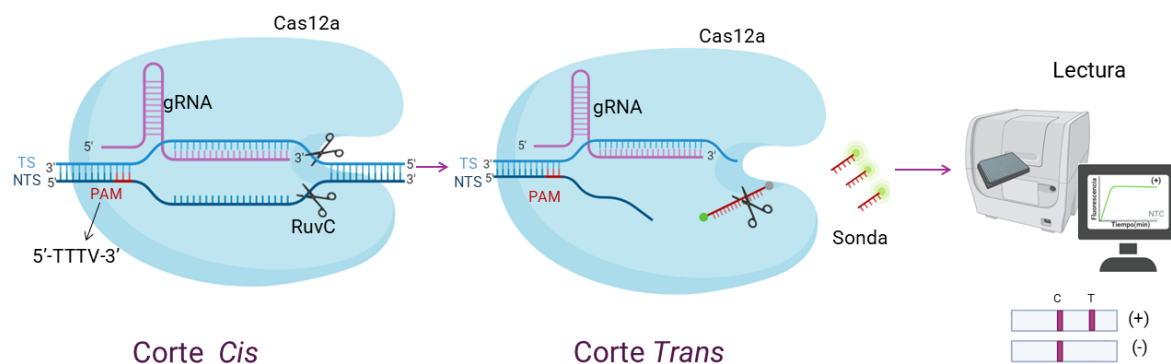


Figura 5. Esquema de detección utilizando el sistema CRISPR-Cas12a. Se ilustra el mecanismo de corte *cis* y *trans* realizado por la proteína Cas12a, que en conjunto con el gRNA forman el sistema de detección empleando una sonda reportera. La lectura de la detección se hace con un lector de placas de fluorescencia o con tiras de flujo lateral. TS: Target Strand. NTS: Non-Target Strand. PAM: Motivo Adyacente de Protoespaciador. Figura creada en Biorender, 2024.

Se ha establecido que el LoD del sistema CRISPR-Cas12a está delimitado por parámetros enzimáticos, alcanzando a detectar hasta concentraciones picomolares[62]. Para aumentar la sensibilidad del sistema se acopla a una amplificación isotérmica previa, como LAMP, que permite amplificar el ADN objetivo a temperatura constante y aumenta su concentración inicial hasta 10^9 veces[63]. De esta manera la combinación de estas técnicas incrementa la sensibilidad analítica a concentraciones attomolares o inferiores ($<10^{-18}$ M), con una sensibilidad y especificidad comparables con la PCR[32].

Un estudio reciente utilizó gRNAs múltiples incrementando 4.5 veces la velocidad de hidrólisis de la sonda, logrando detectar muestras de SARS-CoV-2 en un tiempo de 25 a 45 minutos, reduciendo así el tiempo de detección[64]. Por ende, el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP tiene potencial uso como herramienta de detección genética en puntos de atención primaria (PoC), donde las pruebas se realizan con recursos limitados que dificultan el uso de un termociclador[29].

Con el propósito de reducir costos y el tiempo de detección, el sistema CRISPR-Cas12a se ha adaptado para su uso con análisis de flujo lateral (Figura 6). Este método emplea tiras reactivas comerciales de nitrocelulosa *HybriDetect* (Milenia® Biotec), que

presentan una región recubierta con estreptavidina y nanopartículas de oro (GNP) ancladas con anticuerpos anti-isotiocianato de fluoresceína (anti-FITC), y cuentan con bandas de control y de prueba pre-fijadas. La sonda que se utiliza es de tipo reportero dual, marcada en su extremo 3' con biotina, la cual es reconocida por la estreptavidina, mientras que en el extremo 5' se encuentra marcado con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (6-FAM), que interactúa con el anticuerpo anti-FITC. Entonces, si la sonda ha sido hidrolizada por el sistema CRISPR-Cas12a en la banda control se quedará anclado la región de la sonda marcada con biotina, mientras que las GNP unidas a la parte de la sonda con FAM migrarán hacia la banda de prueba donde serán reconocidos por el anticuerpo anti-conjugado, resultando en la aparición de esta banda e indicando una muestra positiva. En el caso de una muestra negativa solo se observará la banda control ya que la sonda intacta permanecerá anclada en esa región[64, 65, 66].

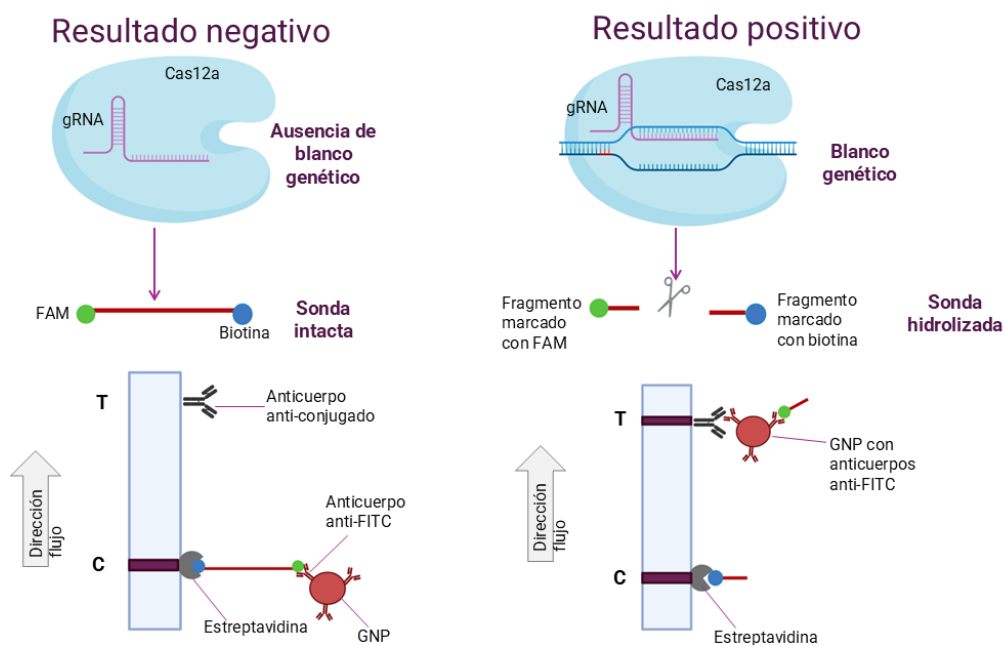


Figura 6. Esquema del Sistema CRISPR-Cas12a acoplado al Análisis de Flujo Lateral. Lectura de la detección del Sistema CRISPR-Cas12a con tiras de flujo lateral. GNP: nanopartículas de oro. T: Banda prueba. C: Banda control. GNP: Nanopartículas de oro. Figura creada en Biorender, 2024.

Detección de parásitos mediante el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP

Hasta el momento en que se realizó este proyecto no se ha reportado el uso del sistema CRISPR-Cas12a acoplado a una técnica de amplificación para la detección de *Trypanosoma cruzi*. Aunque sí se ha aplicado para un parásito relacionado filogenéticamente, donde lograron detectar diversas cepas de *Leishmania*, y específicamente a la especie *L. (Viannia)* mediante su secuencia característica de kDNA, con un LoD de 5×10^{-2} parásitos equivalentes por reacción (aproximadamente 2 parásitos/mL). Además, el sistema no detectó muestras de ADN de *T. cruzi*. No obstante, emplearon la técnica de PCR como paso previo de amplificación, lo que prolonga el tiempo de detección a más de una hora[67].

El uso del sistema de CRISPR-Cas12a para la detección de patógenos parasitarios ha tenido resultados prometedores, aplicando en un paso previo la Amplificación de la Recombinasa Polimerasa (RPA). Sin embargo, esta técnica puede generar productos inespecíficos, y el costo de los reactivos o el kit de RPA pueden ser elevados, limitando su uso en regiones endémicas de las infecciones parasitarias. En la Tabla 3 se presentan estudios que emplean el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a la amplificación isotérmica para la detección de parásitos[68].

Tabla 3. Sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmica para la detección de parásitos

Parásito detectado	LoD Sistema CRISPR-Cas12a (DETECTR)	Información	Referencia
Diferentes especies de <i>Plasmodium</i>	<2 parásitos/ μ L	Detección por fluorescencia o con tiras reactivas en muestras de sangre en 60 minutos.	[69]
<i>Toxoplasma gondii</i>	3.3 copias/ μ L	Detección <i>one pot</i> con fluorómetro o tiras reactivas en muestras ambientales.	[70]
<i>Schistosoma haematobium</i>	1.35 pg ADN	Detección en muestras simuladas de orina con resultados en dos horas.	[71]
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1×10^{-18} M pDNA	Detección a simple vista con luz azul o tiras reactivas de muestras fecales.	[72]

Nota: Tabla elaborada con información de "Detection of Parasites in the Field: The Ever-Innovating CRISPR/Cas12a" [68]

Justificación

El uso del sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmica representa un avance significativo en la detección molecular de *Trypanosoma cruzi*, con el potencial de mejorar la identificación de pacientes portadores del parásito. Eso es debido a que la tecnología combina la precisión y programabilidad de CRISPR-Cas12a con la técnica de LAMP, la cual amplifica el ADN de manera rápida y sencilla en menos de media hora. El acoplamiento de ambas técnicas puede superar las limitaciones de los métodos convencionales, ofreciendo resultados rápidos, sensibles y específicos. Dichas características son especialmente importantes en entornos con recursos limitados, donde la prevalencia de la enfermedad de Chagas es un problema de salud pública. Por lo tanto, este proyecto busca sentar las bases para promover la investigación y el uso de esta técnica molecular como una alternativa accesible, económica y sencilla para la detección de *T. cruzi*.

Hipótesis

Al emplear el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso de previo de amplificación isotérmica tipo LAMP se podrá detectar eficazmente al parásito *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos

Objetivo general

Implementar el sistema de CRISPR-Cas12a acoplado a un paso de previo de amplificación isotérmica tipo LAMP como técnica de detección molecular rápida, sensible y específica de *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

- Diseñar primers para la amplificación de las secuencias genéticas específicas del parásito mediante LAMP.
- Diseñar gRNAs para que en conjunto con la proteína Cas12a puedan detectar las secuencias genéticas previamente amplificadas.
- Evaluar la eficacia de la reacción de detección de CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP para la identificación de *T. cruzi*.
- Determinar la sensibilidad y especificidad analítica de la detección molecular del parásito.
- Implementar el uso de tiras de flujo lateral para facilitar la lectura de la detección de *T. cruzi*.

Metodología experimental

De manera general, como se representa en la Figura 7, para identificar *Trypanosoma cruzi* en muestras biológicas se diseñaron los primers LAMP y los gRNAs para las secuencias genéticas de interés. Una vez sintetizados, se procedió a extraer el ADN de cada muestra. Posteriormente, se procedió a amplificar el blanco genético utilizando la técnica de LAMP y se detectó la secuencia empleando el sistema CRISPR-Cas12a. Los resultados se obtuvieron mediante un lector de microplacas o utilizando tiras de flujo lateral.

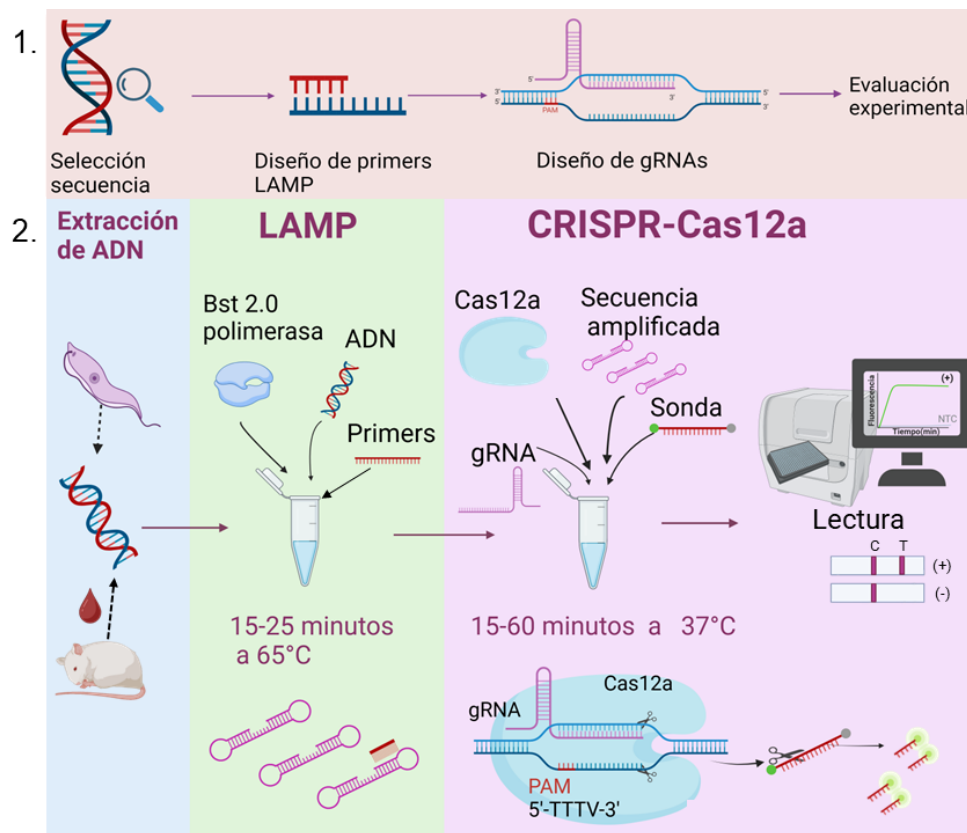


Figura 7. Esquema general de la metodología para la detección de *T. cruzi* en diferentes muestras con el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmico, mediante LAMP. 1) Diseño *in silico* de los primers LAMP y gRNAs para cada blanco genético. 2) Metodología experimental del sistema de detección CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP. Figura creada en Biorender, 2024.

Diseño de primers LAMP y gRNAs

Se escogieron las secuencias del ADN satélite (satDNA) de 195 pb (AY520036.1) así como del ADN minicírculos del cinetoplasto (kDNA) 336 pb (AJ748042.1), debido a que ambas han sido utilizadas previamente para la detección molecular de *T. cruzi*. Ambas secuencias son pertenecientes a la cepa de referencia CL Brener (DTU VI).

Para el diseño de los primers LAMP se utilizó el programa LAMP Primer Design Explorer (<https://primerexplorer.jp/e/index.html>). Los gRNAs fueron diseñados utilizando el software CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) seleccionando las regiones de la secuencia amplificada mediante LAMP. Se seleccionaron cinco sets de primers para cada secuencia y tres gRNAs que no hibriden con los primers de LAMP.

Análisis bioinformático de las secuencias

Para evaluar *in silico* la especificidad del sistema se realizó un análisis bioinformático de las secuencias de satDNA (AY520036.1) y de kDNA (AJ748042.1). Se utilizó la herramienta Nucleotide BLAST, la cual permite identificar posibles alineamientos con secuencias del parásito *Leishmania* u otras especies de *Trypanosoma*, así confirmando que los primers y los gRNAs diseñados fueran específicos para *T. cruzi*.

Síntesis de los ácidos nucleicos

Los primers de LAMP, gRNAs y sondas reporteras, FAM/Quencher (5'-/6-FAM/TTATTATT/3BHQ_1/-3') y FAM/Biotina (5'-/6-FAM/TTATTATT/Biotina/-3), fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). Las muestras liofilizadas se disolvieron en agua libre de nucleasas a una concentración final de 100 μ M y se almacenaron a -80 °C.

Producción y purificación de la proteína AsCas12a

La proteína AsCas12a fue producida y purificada previamente por Morales-Moreno y Valdés-Galindo [64], del Laboratorio BioNano del Instituto de Química de la UNAM, siguiendo el protocolo “Heterologous Expression and Purification of CRISPR-Cas12a/Cpf1” [73]. De manera general para su expresión se utilizó el vector pMBP-AsCas12a adquirido de Addgene, donde fue donado por Jennifer Doudna (Addgene plasmid # 113430; <http://n2t.net/addgene:113430>; RRID: Addgene_113430) [50], en células *E. coli* BL21 (DE3) inducidas con Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) incubándose a 12°C durante la noche en medio Terrific Broth (TB).

La purificación de la proteína se realizó a partir del lisado celular mediante cromatografía de afinidad por níquel, seguida de la eliminación de la etiqueta de histidina mediante su digestión con proteasa TEV (Virus del Grabado del Tabaco) y diálisis. Se procedió a la purificación por cromatografía de intercambio iónico, usando una columna de heparina. Por último, la proteína se pasó por una cromatografía de exclusión molecular y se utilizó el equipo FPLC Äkta Pure. La proteína purificada se obtuvo con concentraciones finales que oscilaron entre 1.8 y 4.5 mg/mL. A la proteína se le añadió glicerol al 10% y se almacenó a -80 °C.

Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas utilizadas fueron cultivos de epimastigotes *T. cruzi* DTU I. En todos los casos los cultivos se centrifugaron y lavaron con solución amortiguadora de fosfato (PBS) para obtener el pellet de células. La cepa Ninoa ($2,400 \times 10^6$ – $2,800 \times 10^6$ células) fue donada por la Dra. Bertha Josefina Espinoza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. La cepa Silvio (1.22×10^8 células) y la cepa Texas (1.1×10^8 células) fueron donadas por la Dra. Ingeborg Becker Fauser de la Facultad de Medicina, UNAM. Además, se utilizó una muestra de ADN purificado de la cepa Querétaro proporcionada al Instituto de Química por la Dra. Bertha Josefina Espinoza. Se utilizaron cultivos de parásitos de *Leishmania mexicana* cepa LAC (1.4×10^8 parásitos/mL) y *Leishmania braziliensis* cepa Frida (5.6×10^6 parásitos/mL), donados por la Dra. Ingeborg Becker Fauser. Las muestras de sangre de ratón infectadas con *T. cruzi* DTU I, cepa Ninoa (1×10^6 parásitos/mL) o cepa Querétaro (8×10^6 – 13×10^6 parásitos/mL), y las muestras de sangre de ratones no infectados fueron donadas por la Dra. Bertha Josefina Espinoza.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN Genómico de los diferentes pellets celulares proporcionados se empleó el kit *ZymoBiomix DNA miniprep* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cuanto a las muestras de sangre de ratón se les añadió Heparina y EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) en una relación 1:1 respecto a 200 µL de la muestra y se procedió a la extracción del ADN con el kit *GeneJET Genomic DNA Purification* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN genómico se cuantificó la concentración y se verificó su pureza mediante el espectrofotómetro Nanodrop. En algunos casos, la integridad del ADN purificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v, realizada durante una hora a 100 voltios (ver Apéndice, Tablas S1.1-S1.3 y Figura S1).

Amplificación isotérmica del ADN blanco

La amplificación isotérmica mediante LAMP se llevó a cabo a partir de un protocolo reportado por NEB (New England Biolabs) [74]. Primero se preparó el mix de los primers a 10x en un volumen final deseado con las siguientes concentraciones: 16 μM de FIP y BIP, 2 μM de F3 y B3, y 4 μM de LF y LB, en agua libre de nucleasas. Antes de utilizarse en la reacción se incubaron a 70 °C por 1 min. Se incorporaron los reactivos de amplificación de LAMP (Tabla 4) y se añadió 1 μL del ADN genómico a la concentración final deseada, en un volumen total de 12.5 μL . El buffer de amplificación a 1x contiene 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM KCl, 2 mM MgSO_4 y 0.1% Tween® 20 con un pH 8.8 a 25°C. Se incubó en un termobloque a 65 °C durante 15 a 25 minutos y se inactivó la reacción por 5 minutos a 80 °C. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v a 100 V por una hora para corroborar la amplificación.

Tabla 4. Cantidad y concentración de los reactivos que se utilizaron para la amplificación isotérmica.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer amplificación isotérmica	1.25	1x
MgSO_4	0.81	6 mM
dNTP	1.75	1.4 mM
Mix primers	1.25	1x
Bst 2.0 WarmStart®	0.50	320 U/mL

Detección de ADN con sistema CRISPR-Cas12a mediante fluorescencia

La reacción de detección se siguió conforme a un estudio previo del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de SARS-Cov-2, que se realizó en el laboratorio BioNano [64]. Primero se preparó el complejo RNP al añadirse el buffer NEB 2.1 a 1x (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g/mL}$ albumina recombinante, pH 7.9 a 25 °C), la proteína AsCas12a y el gRNA, el cual se calentó previamente a 85 °C por un minuto. La RNP se incubó a 37 °C durante 20 minutos.

Posteriormente, se agregaron la sonda reportera FAM/Quencher y 3 μL del ADN previamente amplificado por LAMP, en un volumen final de 75 μL , que incluye tres reacciones de detección. Las cantidades y concentraciones de cada componente se especifican en la Tabla 5. Se distribuyeron 25 μL de la mezcla de reacción en una placa de 384 pocillos. Con el fluorómetro Cytation se efectuó la medición de fluorescencia cada 30 segundos durante 1 hora a 37 °C, con excitación a 480 nm y emisión a 528 nm.

Tabla 5. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados en la reacción de detección CRISPR-Cas12a mediante fluorescencia.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer NEB 2.1	7.5	1x
AsCas12a	1.5	200 nM
gRNA	1.5	200 nM
Sonda FAM/Quencher	0.9	125 nM
ADN blanco	3	-

Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de detección molecular

Se determinó el LoD del sistema para evaluar su sensibilidad. Primero se realizaron diluciones seriadas del ADN de *T. cruzi* cepa Ninoa hasta alcanzar una concentración attomolar (aM) o yoctomolar (yM), dependiendo del blanco genético a identificar. Se amplificó el ADN de cada dilución mediante LAMP, y posteriormente se detectó con CRISPR-Cas12a, como fue descrito anteriormente. Para evaluar la especificidad del método, en el tubo de reacción de LAMP se añadieron 50 ng del ADN genómico, teniendo una concentración final de 4 ng/μL. La reacción de amplificación isotérmica se extendió a 25 minutos. La detección con CRISPR-Cas12a se realizó siguiendo el procedimiento previamente descrito. Para la detección de las secuencias de ADN de las muestras de sangre de ratón infectadas con *T. cruzi* se emplearon las metodologías anteriormente mencionadas.

Detección de ADN con sistema CRISPR-Cas12a mediante tiras de flujo lateral

Se preparó el complejo RNP y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. El gRNA se calentó previamente a 85 °C por un minuto. Posteriormente, se añadieron la sonda reportera FAM/Biotina y 2 μL del ADN previamente amplificado por LAMP, en un volumen final de 25 μL. Las cantidades y concentraciones de cada componente se detallan en la Tabla 6. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C en un termobloque durante 15 a 30 minutos. Se preparó un tubo Eppendorf con 50 μL de *HybriDetect Assay Buffer* (Milenia® Biotec). A continuación, se tomaron 7.5 μL de la reacción y se colocaron en la almohadilla de aplicación de muestra de la tira reactiva de flujo lateral comercial *HybriDetect* (Milenia® Biotec), luego se introdujo la parte inferior de la tira en el buffer durante cinco minutos, permitiendo que la reacción fluyera por capilaridad hacia las bandas. Finalmente, se escaneó la tira reactiva. Para calcular el coeficiente de intensidad entre la banda prueba y control, se midió la intensidad colorimétrica de las bandas con el software ImageJ.

Tabla 6. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados en la reacción de detección CRISPR-Cas12a mediante tiras de flujo lateral.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer NEB 2.1	2.5	1x
AsCas12a	0.5	200 nM
gRNA	0.5	200 nM
sonda FAM/Biotina	1.2	500 nM
ADN blanco	2	-

Análisis estadístico

Los datos experimentales de las detecciones por fluorescencia con CRISPR-Cas12a, obtenidos mediante lecturas triplicadas, se graficaron utilizando el software GraphPad Prism 10.2.3. Se representaron la media y la desviación estándar de las mediciones. Para el análisis estadístico, se seleccionaron seis datos correspondientes a la porción inicial de la fluorescencia, es decir, desde el aumento de la señal base (equivalente a la señal del control blanco) hasta antes de alcanzar su máximo de fluorescencia, considerando que la velocidad de la reacción de detección varió en cada caso. Posteriormente, se aplicó una regresión lineal simple para calcular las pendientes de estas señales, que se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey, utilizando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Para determinar el LoD, se graficó la media de la señal de fluorescencia a los 30 minutos para cada concentración de ADN. Se definió que el LoD debía ser mayor a la señal de fluorescencia del control blanco (NTC, *No Template Control*) más tres veces su desviación estándar (3SD, *standard deviation*).

En el caso de la evaluación de la especificidad del sistema con las diferentes cepas y las muestras de sangre de ratón, se compararon las medias de fluorescencia a los 30 o 35 minutos mediante un ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Dunnett, utilizando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Se consideró que una muestra era positiva o negativa si la señal de fluorescencia era mayor a la señal del control blanco más tres veces su desviación estándar.

Resultados y discusión

Análisis bioinformático de las secuencias a detectar

El análisis de las secuencias a amplificar fue fundamental para determinar si estas coincidían con algún otro parásito relacionado filogenéticamente a *Trypanosoma cruzi*, ya que se han reportado casos de coinfección[75]. No se encontró una coincidencia significativa al analizar la secuencia de satDNA contra otros parásitos, a excepción de una secuencia reportada de *Leishmania braziliensis* (Figura 8A y B), aunque en la base de datos no está anotada como una repetición en tándem ni se reconoce como parte oficial de su genoma, por lo que fue descartada como posible inespecificidad.

A)

<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania donovani</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
Job Title: gb AY520036.1 RID: SUE833ZJ016 Search expires on 05-13 02:50 am Download All ▾ Program: Citation ▾ Database: genomic/929439/GCA_000234665.4 See details ▾ Query ID: AY520036.1 Description: Trypanosoma cruzi clone CIBE07 satellite sequence Molecule type: nucleic acid Query Length: 195 Other reports: ?	Job Title: gb AY520036.1 RID: 7CNAJ351016 Search expires on 06-01 03:58 am Download All ▾ Program: Citation ▾ Database: genomic/5661/GCA_003719575.1 See details ▾ Query ID: AY520036.1 Description: Trypanosoma cruzi clone CIBE07 satellite sequence Molecule type: nucleic acid Query Length: 195 Other reports: ?	Job Title: gb AY520036.1 RID: 7CS45G1P016 Search expires on 06-01 04:45 am Download All ▾ Program: Citation ▾ Database: genomic/185431/GCF_000002445.2 See details ▾ Query ID: AY520036.1 Description: Trypanosoma cruzi clone CIBE07 satellite sequence Molecule type: nucleic acid Query Length: 195 Other reports: ?
 No significant similarity found. For reasons why, click here	 No significant similarity found. For reasons why, click here	 No significant similarity found. For reasons why, click here

B)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 LBRM2903 SCAF000646.1, whole genome shotgun seque...	355	557	100%	5e-98	99.49%	309	AOSE02003871.1

Figura 8. Resultados del análisis de la secuencia satDNA en BLAST contra las secuencias de parásitos relacionados filogenéticamente. A) La secuencia satDNA no mostró una similitud significativa con *L. mexicana*, *L. donovani* ni *T. brucei*. Resultado marcado con rojo. B) La secuencia satDNA presentó una similitud con la secuencia AOSE02003871.1 de *L. braziliensis*. Porcentaje de identidad y query cover marcados en rojo.

Con el apoyo del alumno Bernardo Chombo Álvarez, del Centro de Ciencias Genómicas, se realizó un análisis más detallado utilizando BLAST y el lenguaje de programación Python 3.11 (librería Biopython v1.81), con el fin de investigar si la secuencia AOSE02003871.1 de *Leishmania braziliensis* mostraba homología con otras especies de *Leishmania*. Los resultados indicaron que las secuencias con las que coincidía solo pertenecían a *T. cruzi*, y no tenía homología con otras especies de *Leishmania* (Figura 9A). Adicionalmente, se evaluaron las secuencias de los gRNAs diseñados para este blanco, los cuales revelaron una homología predominante con *T. cruzi* (Figura 9B a 9D). Estos

hallazgos sugieren que la coincidencia encontrada con AOSE02003871.1 no afectaría la capacidad del sistema CRISPR-Cas12a para detectar a *T. cruzi* de manera particular.

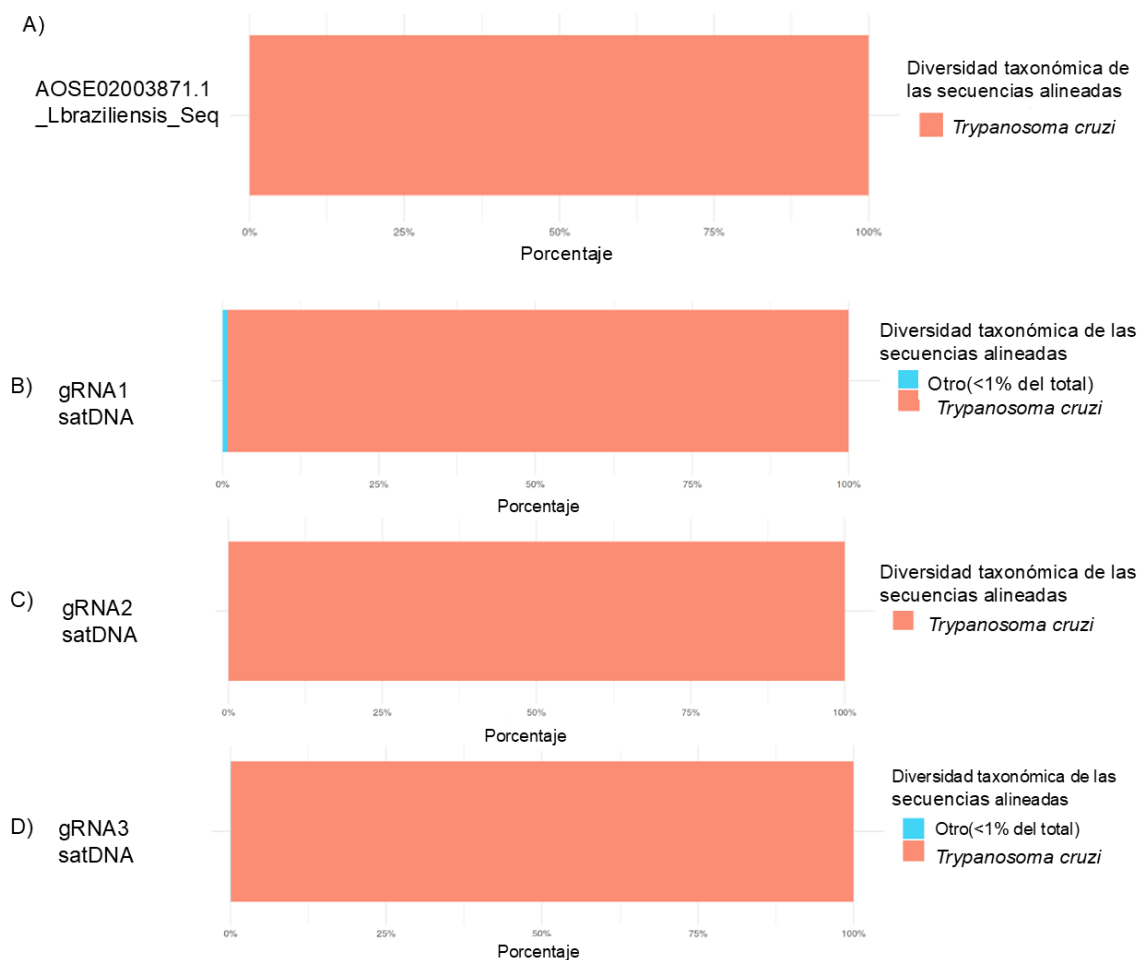


Figura 9. Resultados del análisis de los gRNAs para la secuencia satDNA en BLAST y el programa Python 3.11 con la librería Biopython v1.81. A) Resultado del análisis de la secuencia AOSE02003871.1 B) Alineamiento de la secuencia de gRNA1 satDNA. C) Alineamiento de la secuencia de gRNA2 satDNA. D) Alineamiento de la secuencia de gRNA3 satDNA.

Para el caso de la secuencia de kDNA, el análisis no reveló ninguna coincidencia significativa (Figura 10). Esto indica que dicha secuencia no tiene homología con las secuencias de otros parásitos relacionados filogenéticamente, permitiendo la detección específica de *Trypanosoma cruzi*.

<i>Leishmania mexicana</i>		<i>Leishmania braziliensis</i>	
Job Title	AJ748042:Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle,...	Job Title	emb AJ748042.1
RID	5UEND0A8016 Search expires on 05-13 02:57 am Download All	RID	5UGVCE4V01N Search expires on 05-13 03:35 am Download All
Program	Citation	Program	Citation
Database	genomic/929439/GCA_000234665.4 See details	Database	genomic/420245/GCA_000002845.2 See details
Query ID	AJ748042.1	Query ID	AJ748042.1
Description	Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage lle, str: ...	Description	Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage lle, str: ...
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	335	Query Length	335
Other reports		Other reports	
No significant similarity found. For reasons why,click here		No significant similarity found. For reasons why,click here	
<i>Leishmania donovani</i>		<i>Trypanosoma brucei</i>	
Job Title	emb AJ748042.1	Job Title	AJ748042:Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle,...
RID	65W6NXWG01N Search expires on 05-17 10:56 am Download All	RID	7ZW6J02A016 Search expires on 05-28 10:54 am Download All
Program	Citation	Program	Citation
Database	genomic/981087/GCA_000227135.2 See details	Database	wgs (7 databases) See details
Query ID	AJ748042.1	Query ID	AJ748042.1
Description	Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage lle, str: ...	Description	Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle, lineage lle, str: ...
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	335	Query Length	335
Other reports		Other reports	
No significant similarity found. For reasons why,click here		No significant similarity found. For reasons why,click here	

Figura 10. Resultados del análisis de la secuencia kDNA en BLAST contra las secuencias de parásitos relacionados filogenéticamente. La secuencia no mostró una similitud significativa con *L. mexicana*, *L. donovani*, *T. brucei* y *L. braziliensis*. Resultado marcado con rojo.

Primers LAMP y gRNAs para los diferentes blancos genéticos

En la Figura 11 se presenta un esquema de la secuencia de satDNA con las alineaciones 5'→3' de los primers de LAMP previamente reportados por Ordóñez et al. [36], que en este proyecto se nombraron set A. Además, se muestran los cinco sets de primers diseñados en este estudio, asignados como set 1 a 5. Las secuencias específicas de estos primers están detalladas en las Tablas S2.1 y S2.2 del Apéndice. También, se incluyen los gRNAs diseñados que se unen de manera complementaria al ADN blanco. Las secuencias de la región variable de los gRNAs se encuentran en la Tabla 7. En general, la principal diferencia entre los primers diseñados radica en el primer BIP. Además, el gRNA1 sólo puede utilizarse con el ADN amplificado por el set A, ya que podría reconocer de forma no deseada al primer LF de los sets 1-5. Esto se debe a que la secuencia del primer es semejante a la secuencia del ADN blanco con la que hibrida el gRNA1 lo que podría generar un falso positivo. Por lo tanto, se evaluó la eficiencia de los gRNAs 2 y 3 para detectar el satDNA amplificado con los sets de primers 1-5, y la eficiencia de los tres gRNAs para identificar el ADN amplificado con el set A.



Figura 11. Esquema de los sets de primers A y los diseños 1-5, junto con los gRNAs diseñados alineados en la secuencia satDNA. Las secuencias PAM reconocidas por el complejo RNP están señaladas en rojo. Los gRNAs se representan por color: gRNA1 satDNA (verde), gRNA2 satDNA (rosa) y gRNA3 satDNA (naranja). Entre paréntesis, se indica el set de primers con el que pueden utilizarse, y se resalta con el mismo color la región donde hibridan. Los primers LAMP están codificados por color: BIP y FIP (amarillo), F3 y B3 (azul), LF y LB (morado). Junto al nombre de cada primer se indica a que set pertenece.

Tabla 7. Secuencias de la región variable de los gRNAs diseñados para satDNA de *T. cruzi*

Nombre gRNA	Secuencia de la región variable (5'→3')	Set de primers compatibles
gRNA1 satDNA	GAGCGGCTGCTGCATCACAC	Set A
gRNA2 satDNA	GACCACAACGTGTGATGCAG	Set A y sets 1- 5
gRNA3 satDNA	CGTGTTCCACACTGGACAC	Set A y sets 1-5

En cuanto a la secuencia de kDNA, se muestra un esquema de la alineación de los cinco sets de primers diseñados junto con los gRNAs correspondientes (Figura 12). Dado que es una secuencia larga, los sets de primers delimitan la zona de amplificación entre los nucleótidos 105 y 335. Las secuencias específicas de estos sets de primers están detalladas en la Tabla S3 del Apéndice. Para kDNA, el programa LAMP Primer Explorer no fue capaz de diseñar el primer “Loop Forward”, el cual debe situarse entre las secuencias F2 y F1c, que conforman el primer FIP. Según la Tabla 1, se establece que en el extremo 5' de esta región debe haber una distancia de 40-60 nt, lo cual no fue posible lograr ya que el espacio disponible era de solo 20 nt. Aunque no se han reportado casos donde sólo se haya utilizado un único primer bucle, se infiere que el tiempo de amplificación necesario

podría ser mayor o igual a 20 minutos. Respecto a los gRNAs, aunque los tres son compatibles con los sets de primers, el gRNA3 no mostró la eficiencia esperada al evaluarse experimentalmente con el set 1. Por ello, se optó por utilizar los gRNAs 1 y 2 para evaluar la detección de kDNA amplificado con los demás sets de primers. Las secuencias de la región variable de los gRNAs se detallan en la Tabla 8.

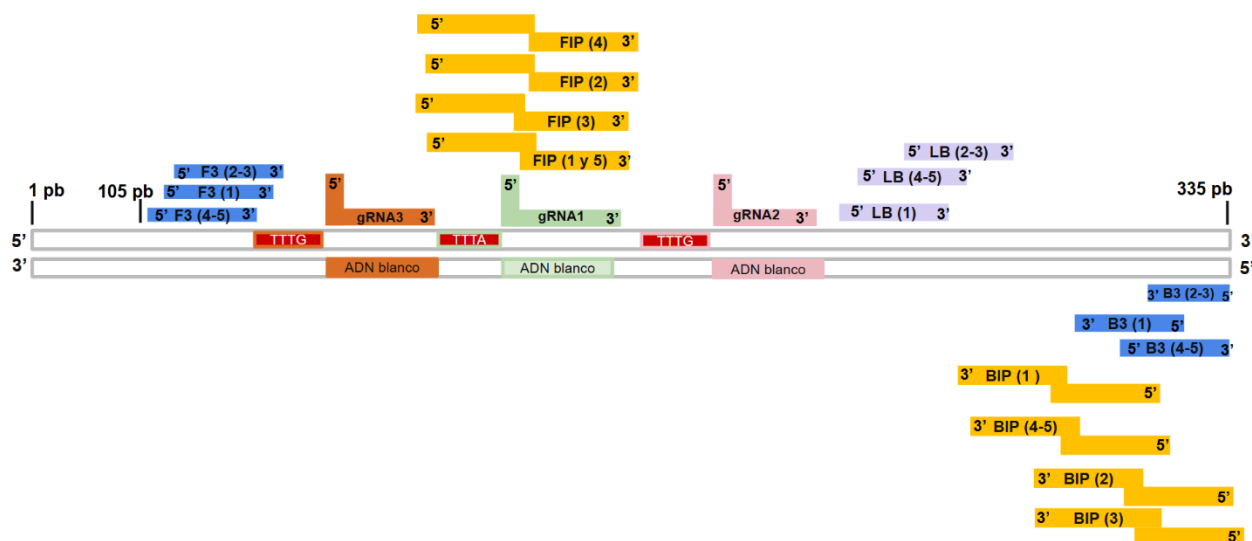


Figura 12. Esquema de los sets de primers y los gRNA diseñados alineados en la secuencia de kDNA. La región amplificada y detectada abarca del par de bases 105 al 335. Las secuencias PAM reconocidas por el complejo RNP están señaladas en rojo. Los gRNAs se representan por color: gRNA1 kDNA (verde), gRNA2 kDNA (rosa) y gRNA3 kDNA (naranja). Entre paréntesis, se indica el set de primers con el que pueden utilizarse, y se resalta con el mismo color la región donde hibridan. Los primers LAMP están codificados por color: BIP y FIP (amarillo), F3 y B3 (azul), y LB (morado). Junto al nombre de cada primer se indica a que set pertenece.

Tabla 8. Secuencias de la región variable de los gRNAs diseñados para kDNA de *T. cruzi*

Nombre gRNA	Secuencia de la región variable (5→3')
gRNA1 kDNA	ATTGTAATATGTTGAGTGTAATGT
gRNA2 kDNA	GTTAATGGTGGCTATGATCTATAG
gRNA3 kDNA	TATATGATAGATTTGATTGTAATA

Amplificación isotérmica de la secuencia satDNA mediante LAMP

Se amplificó la secuencia satDNA del ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa con la técnica de LAMP, utilizando los cinco sets de primers diseñados, así como el set A previamente reportado. Con un tiempo de reacción de 15 minutos se observó en los geles de agarosa la presencia de bandas en forma de escalera, lo que indicó una amplificación exitosa con todos los sets (Figura 13). Igualmente se observó que los sets A, 2 y 4 presentaron bandas de mayor intensidad, sugiriendo una mayor eficiencia de amplificación, por lo que se seleccionaron para evaluar al sistema CRISPR-Cas12a. En el gel 12.A el carril correspondiente al control blanco mostró una amplificación inespecífica, aunque con menor intensidad que los carriles que contenían ADN genómico. Este tipo de resultado es común en la técnica de LAMP, ya que el uso de múltiples primers pueden favorecer la formación de dímeros o hibridarse de manera inespecífica cuando no hay alguna secuencia de ADN presente o en muestras negativas. Sin embargo, también podría atribuirse a una posible contaminación cruzada durante la preparación de la reacción, lo que puede afectar la especificidad del ensayo [76]. Es esencial considerar estos factores para interpretar adecuadamente los resultados y optimizar la técnica en ensayos futuros.

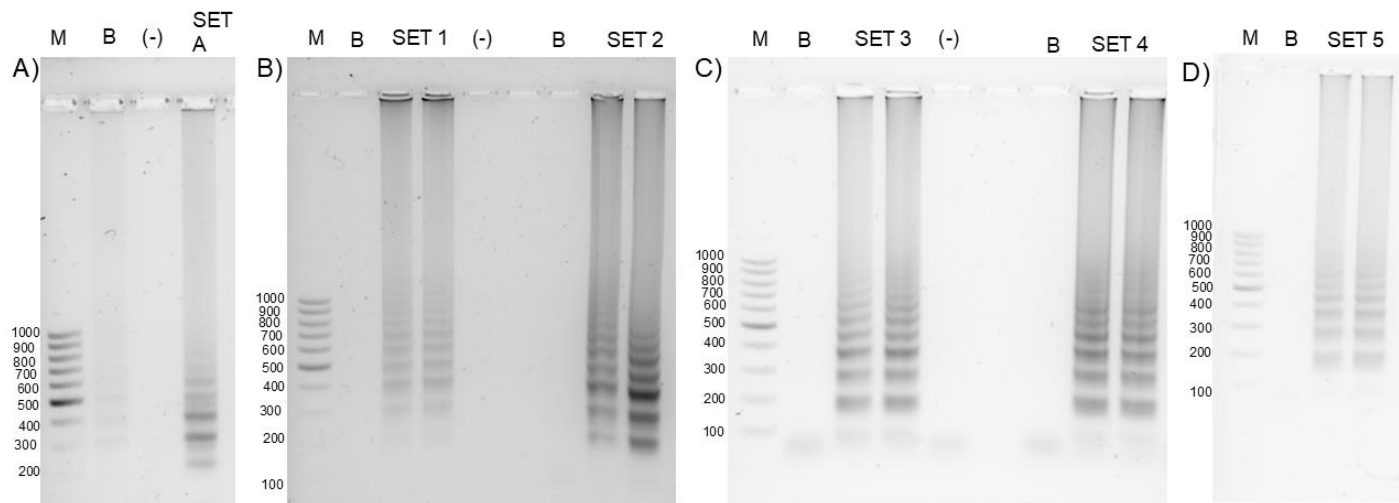


Figura 13. Amplificación isotérmica mediante LAMP de satDNA de *T. cruzi* cepa Ninoa durante 15 minutos. A) Amplificación de satDNA con LAMP set A. B) Amplificación de satDNA con LAMP set 1 y 2. C) Amplificación de satDNA con LAMP set 3 y 4. D) Amplificación de satDNA con LAMP set 5.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v. En los carriles indicados con el nombre del set de primers contienen la reacción de LAMP con ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa a 244.2 fM. M: Marcador peso molecular *Generuler 100 bp DNA ladder*. B: Control blanco. (-): Control Negativo, Muestra de pADN de Gen N de SARS-CoV-2 a 80 aM.

Amplificación isotérmica mediante LAMP de satDNA en dilución seriada 1/100

Se estableció la concentración mínima de ADN genómico que el set de primers A podía amplificar para que el producto satDNA fuera observable en un gel de agarosa. Esto permitió determinar la concentración mínima para evaluar la sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a. Para ello, se realizaron diluciones seriadas 1/100 de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa hasta una concentración zeptomolar (zM). Se observó la amplificación del satDNA hasta 244.2 zM, equivalente a 9.1 fg de ADN/ μ L, aunque las bandas se percibieron levemente a esta concentración (Figura 14). Por lo tanto, se logró observar la amplificación del satDNA a concentraciones menores a aM ($<10^{-18}$ M).

En comparación con un estudio previo que utilizó el mismo set de primers, en este proyecto la concentración mínima amplificada fue menor a la reportada de 50 fg de ADN/ μ L de la cepa Dm28 (DTU I). Sin embargo, resultó ligeramente mayor a los 5 fg de ADN/ μ L obtenidos para la cepa CL Brener[36]. Esto sugiere que el sistema CRISPR-Cas12a podría ser capaz de detectar concentraciones aún más bajas, lo que sería beneficioso en casos donde los pacientes presentan una baja cantidad de parásitos en circulación.

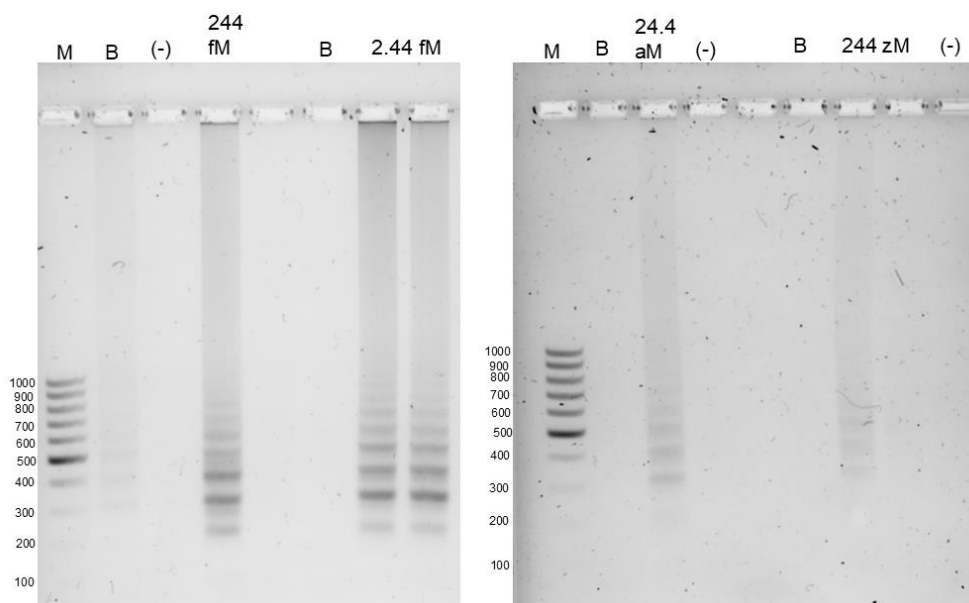


Figura 14. Amplificación de satDNA en dilución seriada 1/100 del ADN genómico *T. cruzi* cepa Ninoa mediante LAMP set A durante 15 minutos. Electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v. En los carriles donde está la concentración del ADN genómico contiene la reacción de LAMP con ADN genómico *T. cruzi* cepa Ninoa en dilución seriada 1/100. M: Marcador peso molecular *GeneRuler 100 bp DNA Ladder*. B: Control blanco, se observa tenuemente bandas de amplificación inespecíficas. (-): Control Negativo, Muestra de pADN de SARS-CoV-2 a 80 aM.

Amplificación isotérmica mediante LAMP de la secuencia de kDNA

La amplificación de kDNA del ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* con los cinco sets de primers LAMP fue eficaz ya que se observaron las bandas de amplificación esperadas en la electroforesis en gel de agarosa. La reacción de amplificación se realizó por 20 minutos ya que, como se mencionó, solo se pudo diseñar un primer bucle. En la Figura 15 se destaca que los sets 1, 4 y 5 mostraron una mayor intensidad de bandas, por lo cual estos sets fueron utilizados para evaluar el sistema CRISPR-Cas12a. En el caso del ADN de *Leishmania mexicana* no mostró amplificación, lo que sugiere que en el futuro puede ser utilizado como control negativo, y respalda la especificidad de los primers diseñados.

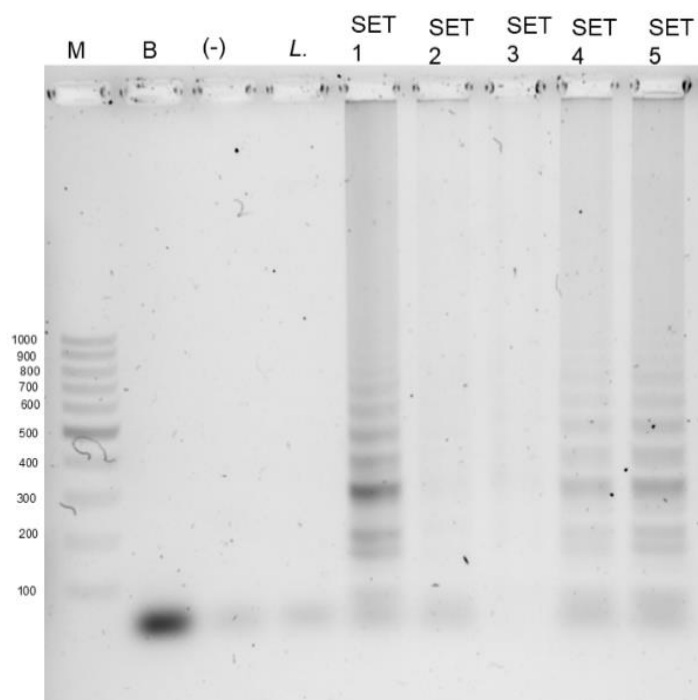


Figura 15. Amplificación isotérmica mediante LAMP de kDNA de *T. cruzi* cepa Ninoa durante 20 minutos
Electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v. En los carriles indicados con el nombre del set de primers contienen la reacción de LAMP con ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa a 244.2 fM. M: Marcador peso molecular *Generuler 100 bp DNA Ladder*. B: Control blanco. (-): Control Negativo, muestra de pDNA de gen N de SARS-CoV-2 a 80 aM. L.: Muestra de ADN genómico de *Leishmania mexicana* a 17.7 fM.

Detección de satDNA con el sistema CRISPR-Cas12a

Se realizó una prueba del sistema CRISPR-Cas12a para detectar satDNA previamente amplificado isotérmicamente y de ADN genómico del parásito sin amplificar. Los resultados indicaron que amplificar el ADN genómico y luego detectar la secuencia blanco mediante el sistema CRISPR-Cas12a con el gRNA2 satDNA permitió alcanzar la fluorescencia máxima en menor tiempo que con el ADN sin amplificar (Figura 16A). La señal de fluorescencia del ADN sin amplificar fue perceptiblemente distinta de la del control negativo y del control de la reacción de detección (NTC, *No Template Control*) hasta el minuto 45. Se comparó la media de la señal de cada muestra a los 60 minutos con el valor de la señal de fluorescencia del control blanco más 3 veces su desviación estándar (NTC + 3SD), para determinar si era significativamente diferente a la del control blanco y así asegurar la correcta interpretación de un resultado positivo al superar el umbral del ruido del NTC[77]. En este caso la señal del ADN sin amplificar estaba por debajo de este umbral, indicando que la muestra era negativa (Figura 16B). Esto se debe a que en la reacción de detección la concentración final del ADN genómico era femtomolar (fM), lo cual es inferior al LoD reportado para Cas12a, que corresponde a concentraciones pM[62].

Estos resultados confirman la necesidad de que el sistema CRISPR-Cas12a se debe acoplar a un paso previo de amplificación isotérmica para detectar eficazmente al parásito *Trypanosoma cruzi* a bajas concentraciones. Al utilizar una secuencia objetivo con múltiples copias en el genoma se aumenta la probabilidad de la detección si se realiza una amplificación inicial, ya que la técnica de LAMP aumenta la concentración de ADN hasta 10^9 veces, permitiendo que el sistema de CRISPR-Cas12a lo identifique en menor tiempo[32].

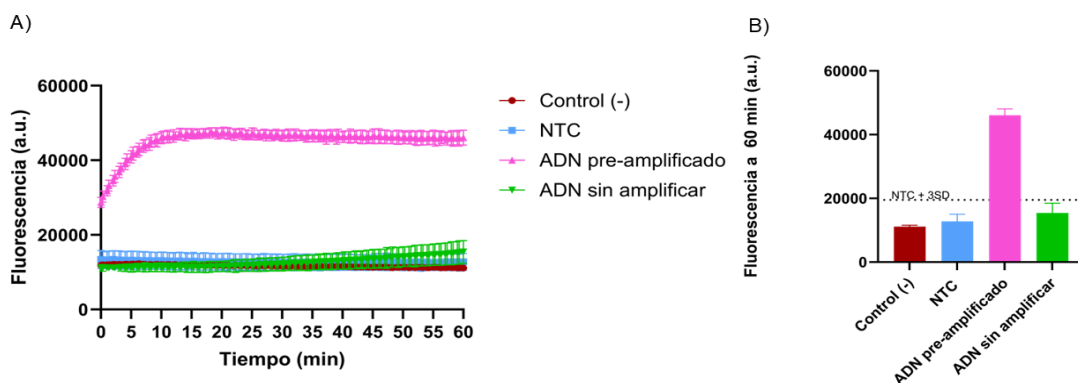


Figura 16. Detección mediante CRISPR-Cas12a de satDNA pre-amplificado y sin amplificar. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada por cada tipo de ADN. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. ADN pre-amplificado: ADN genómico del parásito pre-amplificado previamente con una concentración inicial de 244.42 fM. ADN sin amplificar: ADN genómico *T. cruzi* cepa Ninoa a 9.7 fM. B) Gráfica de barras que representa la media de la señal de fluorescencia a los 60 minutos. NTC + 3SD: Señal Blanco (NTC) más tres veces su desviación estándar (3SD).

Evaluación de gRNAs en la detección de satDNA mediante CRISPR-Cas12a

Se analizó la eficiencia de los tres gRNAs diseñados para la detección de la secuencia de satDNA previamente amplificada por LAMP a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa. Para ello, se formaron los complejos RNP con los gRNAs específicos para cada set de amplificación, y se evaluó su capacidad de detección tanto de manera individual como en combinaciones de 2 o 3 gRNAs. La concentración de cada gRNA se ajustó para tener en la mezcla una concentración final de 200 nM. Esta estrategia se basó en estudios previos donde se demostró que el uso de múltiples gRNAs disminuyó el tiempo de detección de SARS-CoV-2 [64]. La eficiencia de detección se determinó al calcular mediante regresión lineal la pendiente de la fase inicial del aumento de fluorescencia, ya que permite evaluar la máxima tasa de generación de señal fluorescente por minuto, además se complementó con un análisis estadístico usando ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey.

En la detección mediante CRISPR-Cas12a de ADN genómico amplificado con el set A destaca que al usar el gRNA2 satDNA se obtiene una señal máxima de fluorescencia en un menor tiempo, aproximadamente a los 5 minutos (Figura 17A). Contrario a lo reportado, la combinación de los gRNAs resultó en una detección ligeramente más lenta que con los individuales. Al analizar las pendientes obtenidas de la señal de fluorescencia, el gRNA2 mostró un valor significativamente mayor en comparación con las pendientes de los demás gRNAs utilizados, excepto la combinación de los gRNAs 2 y 3 (Figura 17B).

Por lo tanto, el gRNA2 satDNA presentó una mejor eficiencia en el sistema de detección, posiblemente por su alineación en la región de bucle del ADN amplificado por LAMP. Esta ubicación podría facilitar la unión del complejo RNP optimizando el reconocimiento de la secuencia blanco. Además, la estructura en mancuerna generada durante la reacción de LAMP se encuentra en mayores cantidades lo que aceleraría la detección. Por lo tanto, es importante diseñar el gRNA de manera que hibride con la estructura secundaria del ADN amplificado para maximizar la efectividad de la detección[78].

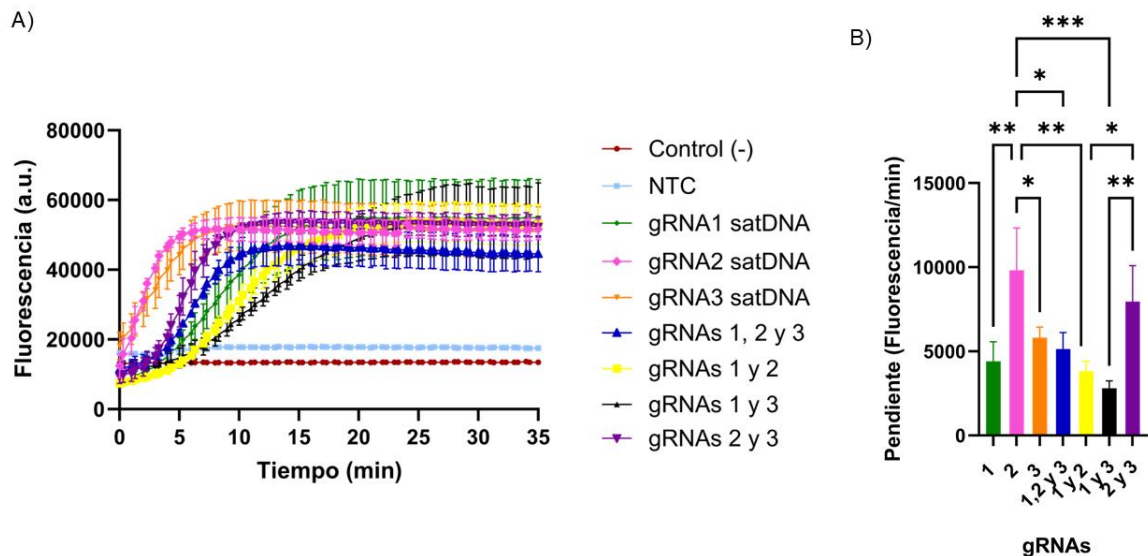


Figura 17. Detección mediante sistema CRISPR-Cas12a de satDNA amplificado por set A de LAMP. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada por cada RNP formado por un gRNA o su combinación. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestras con secuencia blanco y gRNAs: contienen satDNA pre-amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa (concentración inicial de 244.42 fM). B) Gráfica de barras que representa las pendientes de fluorescencia por minuto. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, indicando niveles de significancia estadística.

Una vez analizada la eficiencia de los gRNAs para el set A se procedió a realizar el mismo análisis para los sets de primers 2 o 4 de LAMP diseñados para la secuencia satDNA, ya que como se describió, en el gel de agarosa las bandas de amplificación eran un poco más intensas, sugiriendo que había más producto de amplificación. En este caso se evaluó el gRNA2 o 3 satDNA, así como su combinación.

La detección del satDNA amplificado con el set 2 mostró una señal de fluorescencia máxima en un menor tiempo cuando se utilizaron en conjunto los gRNAs 2 y 3 (Figura 18A). Mientras que la secuencia amplificada con el set 4, la señal de fluorescencia fue similar tanto al usar solo el gRNA2 satDNA como al combinarlo con el gRNA3 satDNA (Figura 18C). Al comparar las pendientes, en ambos casos no hubo alguna diferencia significativa entre el uso individual del gRNA2 y de forma combinada (Figura 18B y D). Por lo tanto, esto confirma una mayor eficiencia de estos gRNAs para la detección de satDNA amplificado por los sets 2 o 4. Sin embargo, se optó por usar únicamente el gRNA2 satDNA para identificar el parásito, debido a que al utilizarlo de manera individual simplificaría la técnica sin comprometer la rapidez de los resultados.

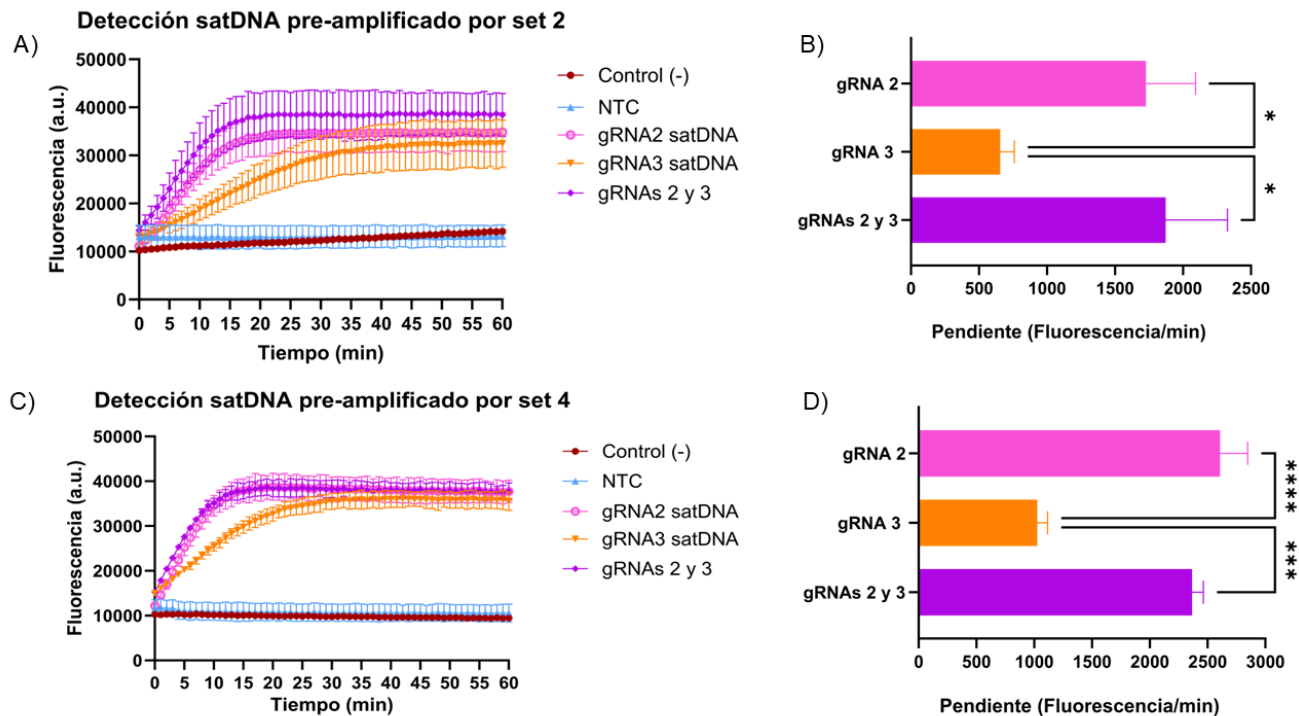


Figura 18. Detección con sistema CRISPR-Cas12a de satDNA amplificado por set 2 o 4 de LAMP. A) Curva de señal de fluorescencia en función del tiempo de la detección de satDNA pre-amplificado por set 2. B) Gráfica de barras con las pendientes de fluorescencia por minuto de la gráfica A. C) Curva de señal de fluorescencia en función de tiempo de la detección de satDNA pre-amplificado por set 4. D) Gráfica de barras con las pendientes de fluorescencia por minuto de la gráfica C. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestras con secuencia blanco y gRNAs: contienen satDNA pre-amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa (concentración inicial de 244.42 fM). Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, niveles de significancia estadística.

Evaluación de CRISPR-Cas12a con gRNA2 para detectar satDNA amplificado

Se evaluó si la eficiencia del sistema de detección CRISPR-Cas12a con el gRNA2 satDNA variaba al utilizar un set específico de primers LAMP. Por ende, se amplificó el satDNA con cada set de primers y posteriormente se detectó mediante el método diseñado. Se observó que, aunque el set 1 presentó la mayor señal de fluorescencia, el set A alcanzó su máximo de fluorescencia en menor tiempo (Figura 19A). Esto es crucial para optimizar la rapidez de la detección con el sistema CRISPR-Cas12a. Al comparar las pendientes se obtuvo que los sets A y 5 generaron los valores más elevados, pero no hubo una diferencia significativa entre ellos (Figura 19B). Esto indica que los sets de primers utilizados para la amplificación no influyeron significativamente en la eficiencia del sistema CRISPR-Cas12a para detectar satDNA. Aun así, para seguir evaluando el método de detección molecular se seleccionaron los sets A y 5 para amplificar previamente la secuencia de interés, ya que mostraron los valores más altos en las pendientes.

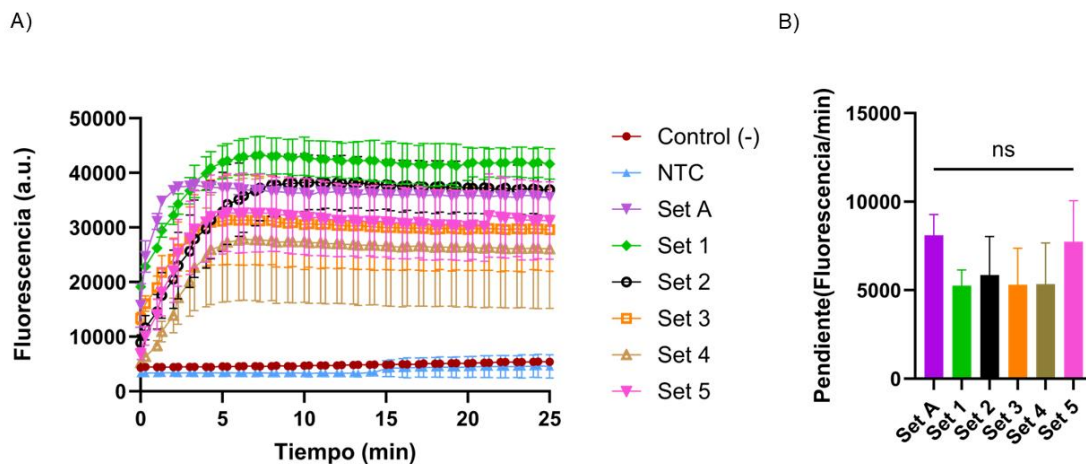
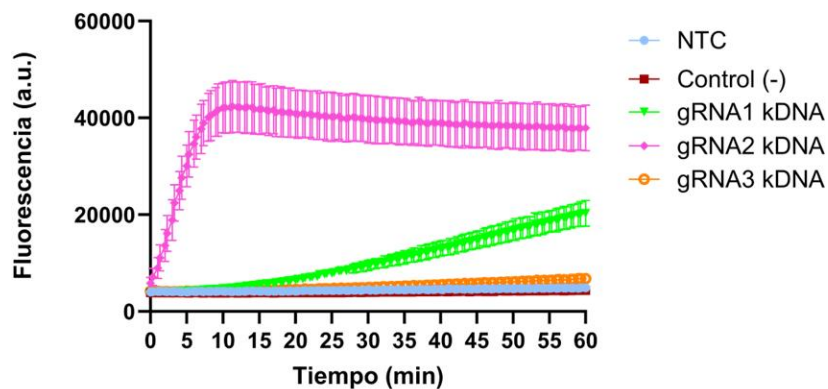


Figura 19. Detección con sistema CRISPR-Cas12a de satDNA amplificado por los diferentes sets de LAMP. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo obtenida al detectar el satDNA amplificado por los diferentes sets de LAMP. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestras Sets: Contienen satDNA pre-amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa (concentración inicial de 244.42 fM) B) Gráfica de barras con las pendientes de la señal de fluorescencia obtenida al detectar el satDNA amplificado por cada set de primers LAMP. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. ns: sin diferencia significativa ($p > 0.05$)

Evaluación de gRNAs en la detección de kDNA mediante CRISPR-Cas12a

Se realizaron ensayos del sistema CRISPR-Cas12a para la detección del blanco genético kDNA. Se evaluó la eficiencia de los tres gRNAs individuales para detectar kDNA amplificado con LAMP. En el caso de la detección de la secuencia de interés amplificada previamente con el set 1 se evidenció que el gRNA2 kDNA fue el más eficiente, ya que alcanzó una señal de fluorescencia máxima en menor tiempo (Figura 20A). Al calcular las pendientes, el gRNA2 kDNA mostró una diferencia significativa en comparación con los otros dos gRNAs diseñados (Figura 20B). Esta mayor eficiencia puede atribuirse a que el RNP se alinea en una región entre el primer FIP y el primer bucle LB, donde se forma la estructura de ADN en mancuerna. Además, la amplificación exponencial incrementa la cantidad de estructuras disponibles para detectar. En contraste, el gRNA3 kDNA presentó una reacción de detección muy lenta debido a que se une entre la región F3 y FIP, lo que impide su hibridación con la estructura en mancuerna.

A)



B)

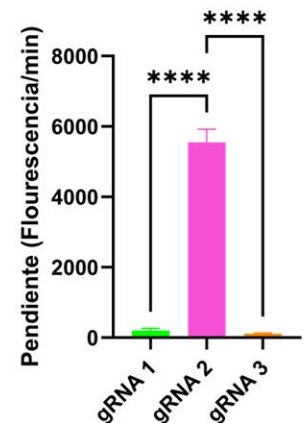


Figura 20. Detección mediante sistema CRISPR-Cas12a de kDNA amplificado por set 1 de LAMP. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada por cada gRNA. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestras con secuencia blanco y gRNAs: contienen satDNA pre-amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa (concentración inicial de 244.42 fM) B) Gráfica de barras con las pendientes de la señal de fluorescencia por minuto. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey **** $p < 0.0001$, niveles de significancia estadística.

Para los sets de primers LAMP 4 y 5, se evaluaron los gRNA1 y 2 de manera individual, o en combinación. En ambos casos, el gRNA2 kDNA y su combinación con el gRNA1 kDNA alcanzaron una señal de fluorescencia máxima en menor tiempo (Figura 21A y 21C). Se observó que en el set 4 hubo una diferencia significativa entre las pendientes del gRNA2 kDNA y su combinación, siendo más eficiente el gRNA2 kDNA en solitario (Figura 21B). Para el caso del set 5, aunque no hubo diferencia significativa entre las pendientes, el gRNA2 kDNA mostró una pendiente mayor que los gRNAs múltiples (Figura 21D). Por lo tanto, con el fin de simplificar la técnica de detección y favorecer la rapidez del sistema, se decidió utilizar únicamente el gRNA2 para la detección de kDNA amplificado previamente por los sets de LAMP 1, 4 y 5.

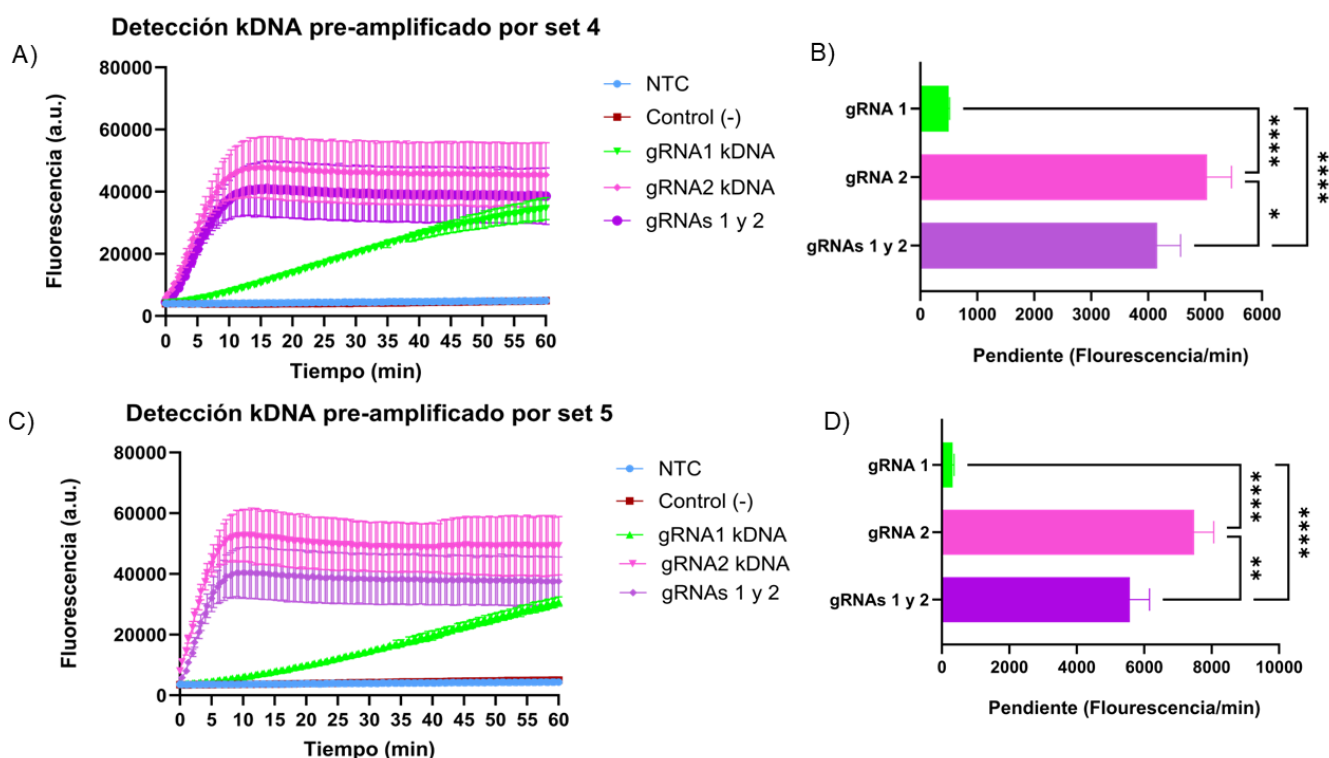


Figura 21. Detección con sistema CRISPR-Cas12a de kDNA amplificado por set 4 o 5 de LAMP A) Curva de señal de fluorescencia en función del tiempo de la detección de kDNA pre-amplificado con set 4. B) Gráfica de barras con las pendientes de fluorescencia por minuto de la gráfica A. C) Curva de señal de fluorescencia en función de tiempo de la detección de kDNA pre-amplificado con set 5. D) Gráfica de barras con las pendientes de fluorescencia por minuto de la gráfica C. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestras con secuencia blanco y gRNAs: contienen satDNA pre-amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa (concentración inicial de 244.42 fM). Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, niveles de significancia estadística.

Evaluación de CRISPR-Cas12a con gRNA2 para detectar kDNA amplificado

Debido a los resultados anteriores se realizó un ensayo para evaluar si los otros primers diseñados (Set 2 o 3) influían en la eficiencia de la detección usando CRISPR-Cas12a con el gRNA2 kDNA. Se observó que el set de primer 3 generó una señal máxima de fluorescencia equivalente a la del set de LAMP 5, ambas en un tiempo menor en comparación con los otros sets (Figura 22A). Esto sugiere que la visualización de los productos de amplificación de LAMP en los geles de agarosa no es suficiente para determinar cuál de los sets de primers sería más eficiente para el sistema de detección. Posteriormente, se compararon las pendientes de la señal de fluorescencia, obteniendo que la del set de LAMP 5 era significativamente mayor a las demás (Figura 22B). Por lo tanto, se obtuvo un mejor desempeño en la detección del sistema CRISPR-Cas12a al usar el gRNA2 kDNA, y al amplificar previamente la secuencia de kDNA con el set 5.

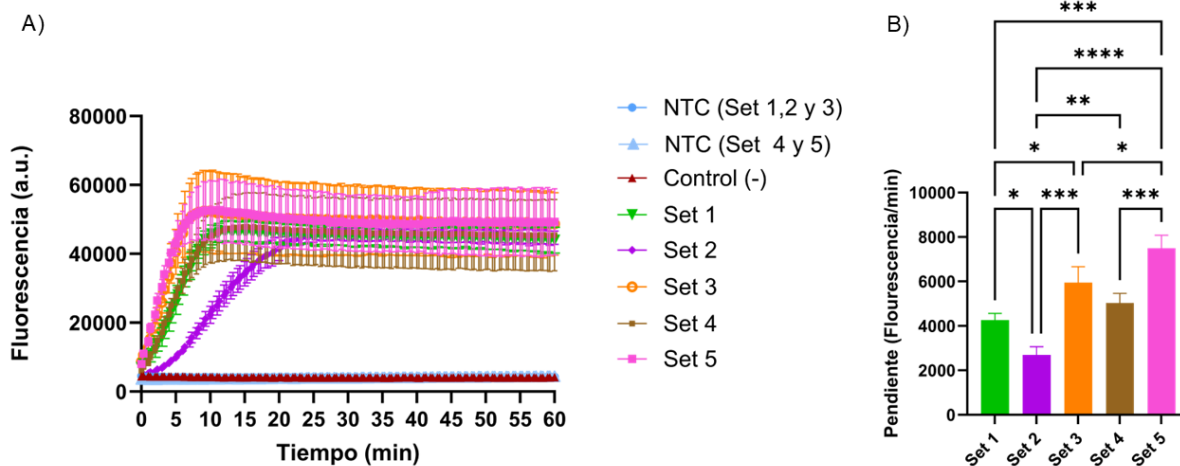


Figura 22. Detección mediante sistema CRISPR-Cas12a de por los diferentes sets de LAMP. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo obtenida al detectar kDNA amplificado por los distintos sets de LAMP. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestras Sets: Contienen satDNA pre-amplificado a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa (concentración inicial de 244.42 fM) B) Gráfica de barras con las pendientes obtenida al detectar el kDNA amplificado por cada set de primers LAMP. Los datos de la señal de fluorescencia se les hizo una corrección de la línea base. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, niveles de significancia estadística.

Evaluación de la sensibilidad de CRISPR-Cas12a en la detección de satDNA

Una vez definido que el sistema de CRISPR-Cas12a acoplado a un paso previo de amplificación isotérmica mediante LAMP es eficaz para detectar los diferentes blancos genéticos, se procedió a evaluar la sensibilidad del método al determinar el límite de detección (LoD) para cada secuencia. Para esto, se realizaron diluciones del ADN genómico de la cepa Ninoa, que posteriormente fueron amplificadas y detectadas.

En el caso del satDNA amplificado con el set LAMP A y usando el sistema CRISPR-Cas12a con el gRNA2, se logró detectar hasta a una concentración de 2.1 yM (Figura 23A), aunque fue lento el aumento de la señal de fluorescencia esta fue mayor que los controles de la reacción. En contraste, a una concentración de 1.1 yM la señal de fluorescencia fue similar a la del control negativo. Para determinar el LoD, se graficaron los valores de fluorescencia a los 30 minutos para cada muestra. Se estableció que lo mínimo detectado por el método corresponde a una concentración la cual su señal de fluorescencia es mayor que la del control blanco más tres veces su desviación estándar (NTC + 3SD), asegurando estadísticamente que la variabilidad de la señal blanco no se superponga con la señal de la muestra a baja concentración [77]. En la gráfica se observa que la concentración de 2.1 yM está por arriba de este umbral (Figura 23C). Por lo tanto, el LoD de la secuencia de satDNA amplificada por set LAMP A es de 2.1 yM, equivalente a 8×10^{-5} fg/ μ L de ADN, lo que corresponde a 1.2×10^{-3} parásitos/mL (ver ejemplo de los cálculos en el Apéndice Figuras S3.2 y S3.3).

En el caso del satDNA amplificado por el set 5 de LAMP, se logró detectar hasta una concentración de 247.8 yM, ya que a 12.3 yM la señal de fluorescencia fue semejante a la del control blanco (Figura 23B). Además, la señal de fluorescencia de 247.8 yM, está por arriba del umbral NTC + 3SD (Figura 23C). Por lo tanto, el LoD de la secuencia de satDNA amplificado por set LAMP 5 es de 247.8 yM, equivalente a 9.2×10^{-3} fg/ μ L, lo cual corresponde aproximadamente a 0.1 parásito/mL.

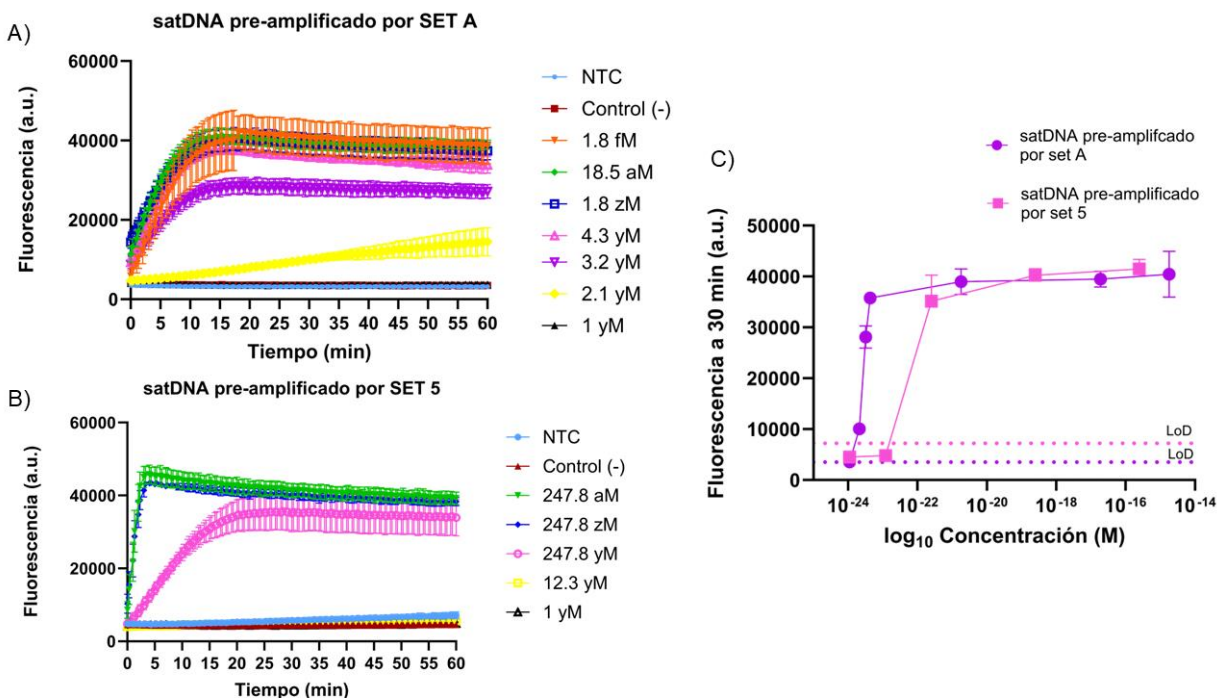


Figura 23. Determinación del LoD del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA amplificado por los sets LAMP A o 5. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada para cada dilución de ADN pre-amplificado con LAMP set A. B) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada para cada dilución de ADN pre-amplificado con LAMP set 5. C) Curva de sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a para determinar el LoD de satDNA amplificado por LAMP set A o set 5. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Límite de detección (LoD): NTC + 3SD (Señal del NTC más tres veces su desviación estándar).

Los LoD de satDNA obtenidos con CRISPR-Cas12a en este estudio se compararon con los valores reportados en la literatura para las técnicas moleculares de PCR y LAMP, (Tabla 9), observándose que el sistema se encuentra dentro de los rangos previamente descritos e incluso en algunos casos presenta una mayor sensibilidad. En términos de número de parásitos, el LoD de satDNA pre-amplificado por set A es hasta tres órdenes de magnitud menor que el reportado para qPCR, lo que indicaría una capacidad para detectar el parásito en muestras con baja carga parasitaria[20,21]. De igual manera, el LoD de satDNA pre-amplificado con el set 5, está dentro de los rangos obtenidos con diferentes kits de LAMP y PCR, lo que sugiere que esta metodología es comparable en sensibilidad con técnicas optimizadas de amplificación[24,37,39].

Al comparar las concentraciones mínimas de ADN reportadas, el LoD de satDNA pre-amplificado por set 5 es hasta dos órdenes de magnitud menor que el obtenido para PCR (0.1 fg/μL) y un orden de magnitud menor que con el kit de LAMP (0.01 fg/μL), lo que confirma que la combinación de CRISPR-Cas12a con amplificación isotérmica mejora la

sensibilidad analítica[20,37]. Además, el LoD de satDNA pre-amplificado con set A es casi cinco órdenes de magnitud menor que el reportado por Ordoñez y colaboradores, a pesar de que se utilizaron las mismas secuencias de los primers LAMP[36]. Esta diferencia puede atribuirse a la alta sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a cuando se emplea un lector de microplacas de fluorescencia, lo que permite detectar concentraciones de ADN más bajas con mayor precisión.

En resumen, el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP, utilizando los sets A o 5, mostró una alta sensibilidad al detectar concentraciones de satDNA de hasta 10^{-24} M, equivalentes a menos de 0.1 fg/μL y 0.1 parásitos/mL. Estos valores son comparables a los reportados con otras técnicas moleculares, resaltando su potencial como alternativa para la detección de *T. cruzi* en la etapa temprana de la enfermedad. Además, el sistema cumple con el criterio para la detección en pacientes de fase crónica, de al menos 1 parásito por cada 10 mL de sangre. No obstante, para validar su implementación es recomendable evaluar su eficacia en muestras clínicas[20].

Tabla 9. LoD de diferentes técnicas moleculares para la identificación del satDNA de *T. cruzi*

Técnica molecular	LoD	Muestra	Referencia
CRISPR-Cas12a + LAMP (SET A)	2.1 yM, equivalente a 8×10^{-5} fg/μL y a 1.2×10^{-3} parásitos/mL	ADN de la cepa Ninoa (DTU I)	Este estudio
CRISPR-Cas12a + LAMP (SET 5)	247.8 yM, equivalente a 9.2×10^{-3} fg/μL y a 0.1 parásitos/mL	ADN de la cepa Ninoa	Este estudio
qPCR/PCR	0.05-0.5 parásitos/mL	Sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa CL Brener (DTU VI)	[20]
	0.1 fg/μL	ADN de la cepa Silvio (DTU I)	
qPCR	0.70 parásitos /mL	Sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa CL Brener	[21]
qPCR (NAT Chagas kit)	0.16 parásitos/mL	ADN de la Cepa Y (DTU II)	[24]
LAMP (Loopamp kit)	0.01-1 parásitos/mL	Sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa CL Brener	[37]
	0.01 fg/μL	ADN de las cepas CL Brener y Silvio X10	
LAMP	5 fg/μL y 50 fg/uL	ADN de la cepa CL Brener y Dm28	[36]
LAMP+ PrintrLab	0.1-2 parásitos/mL	Sangre infectada artificialmente con ADN de cepa Y, Cepa CL Brener y DTU V	[39]

Nota: Tabla elaborada con información de "In vitro diagnostic methods of Chagas disease in the clinical laboratory: a scoping review" [25]. Ejemplos de cálculos para la conversión del LoD de molaridad a fg/μL y molaridad a parásitos/mL están en el Apéndice (Figuras S3.2 y S3.3)

Evaluación de la sensibilidad de CRISPR-Cas12a en la detección de kDNA

En el caso de la evaluación de la sensibilidad del método para identificar la secuencia de kDNA, se realizaron diluciones seriadas del ADN genómico, se amplificó con el set de LAMP 5 y se detectó con el sistema CRISPR-Cas12a usando el gRNA2 kDNA. Se observó un aumento de la señal de fluorescencia hasta una concentración de 534 aM (Figura 24A), dado que a una concentración de 106.8 aM su señal de fluorescencia no mostró un incremento diferente a los controles de la reacción. A partir de la gráfica de sensibilidad, se determinó que el LoD para kDNA del sistema CRISPR-Cas12a acoplado al set LAMP 5 es aproximadamente de 534 aM, ya que esta concentración fue mayor al umbral del control blanco más tres veces su desviación estándar. Esta concentración mínima detectable es equivalente a 19.9 pg/μL y corresponde a 3.2×10^5 parásitos/mL (Figura 24B).

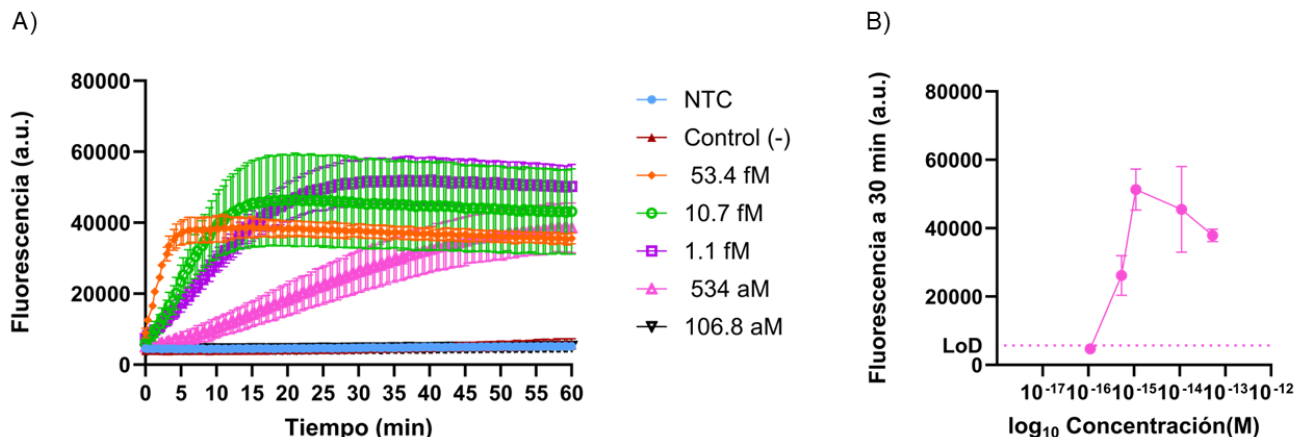


Figura 24. Determinación del LoD del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de kDNA amplificado por set 5 de LAMP. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada por cada dilución de kDNA pre-amplificado con LAMP set 5. B) Curva de sensibilidad del sistema CRISPR-Cas para determinar el LoD de kDNA amplificado con LAMP set 5. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. LoD = NTC + 3SD: Señal del control blanco (NTC) más tres veces su desviación estándar.

Al comparar el LoD de kDNA obtenido con CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP con los reportados para PCR, se observa que el valor obtenido en este estudio es mayor, lo que indica una menor sensibilidad del sistema en la detección de este blanco genético (Tabla 10). Específicamente, el LoD fue alrededor de cinco órdenes de magnitud superior al reportado para PCR punto final, cuyo rango oscila entre 5×10^{-3} y 0.2 parásitos/mL [20,21]. Además, en términos de concentración de ADN, el LoD fue más del doble que el descrito para la PCR estándar de kDNA, que es de 7.9 pg/μL [23]. La menor sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP para la detección de kDNA en comparación con satDNA, podría atribuirse a una menor eficiencia en la amplificación isotérmica a causa de que en este proceso solo se logró emplear un primer bucle, este hecho posiblemente redujo la cantidad de amplicones generados y por ende la cantidad de secuencias

detectables. Esto explicaría que el LoD obtenido se encuentra en el rango de aM, seis ordenes de magnitud por encima del de satDNA.

Para mejorar la sensibilidad del sistema en la detección de kDNA, se propone evaluar el incremento del tiempo de amplificación a más de media hora u optimizar el diseño de los primers LAMP. Además, se podría explorar el uso de múltiples gRNAs en el sistema CRISPR-Cas12a, estrategia que ha demostrado incrementar la sensibilidad de detección de SARS-CoV-2 [64]. La implementación de estos ajustes podría permitir reducir el LoD y mejorar la capacidad del sistema para detectar kDNA en muestras con baja carga parasitaria.

Tabla 10. LoD de diferentes técnicas moleculares para la identificación del kDNA de *T. cruzi*

Técnica molecular	LoD	Muestra	Referencia
CRISPR-Cas12a + LAMP (SET 5)	534 aM equivalente 19.9 pg/μL y a 3.2x10 ⁵ parásitos/mL	ADN de la cepa Ninoa (DTU I)	Este estudio
PCR	5x10 ⁻³ parásitos/mL	Sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa CL Brener (DTU VI)	[20]
	0.01 fg/μL	ADN de la cepa Silvio (DTU I)	
PCR	0.23 parásitos/mL	Sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa CL Brener	[21]
PCR	40 copias/μL (aproximadamente 7.9 pg/μL)	Sangre infectada artificialmente con ADN de la cepa Dm28 (DTU I)	[23]

Nota: Tabla elaborada con información de "In vitro diagnostic methods of Chagas disease in the clinical laboratory: a scoping review" [25]. Ejemplos de cálculos para la conversión del LoD de molaridad a fg/μL y molaridad a parásitos/mL están en el Apéndice (Figuras S3.2 y S3.3)

Especificidad de CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA

Se analizó si el sistema CRISPR-Cas12a acoplado al paso de amplificación con LAMP tenía la capacidad de detectar solamente el satDNA de diferentes cepas de *T. cruzi* y no de parásitos relacionados filogenéticamente. Para esto evaluó el sistema con las diferentes muestras de ADN extraídas de *T. cruzi* cepas Ninoa, Silvio, Texas, y Querétaro, todas pertenecientes a la DTU I. Así mismo, se utilizó el ADN de *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis*.

Las muestras de ADN genómico a 4 ng/μL fueron amplificadas con el set de LAMP A y detectadas con el complejo RNP conformado por el gRNA2 satDNA. La amplificación se realizó durante 25 minutos, ya que previamente se observó que a los 15 minutos los amplicones de la cepa Silvio no eran detectados (Figura S4.A). Como se muestra en la Figura 25A la señal de fluorescencia tanto de la cepa Ninoa y Querétaro alcanzaron su máximo de fluorescencia en un tiempo menor a media hora, a comparación de la cepa Silvio cuya señal de fluorescencia mostró un aumento lento. En el caso de la cepa Texas la señal de fluorescencia parecía diferenciarse apenas en los 60 minutos. Esto puede deberse a la variabilidad en la cantidad de ADN satélite entre diferentes DTUs y cepas de *T. cruzi*, además se ha reportado que la cepa Silvio tiene cinco veces menos repeticiones de satDNA que la cepa CL Brener [79]. En cuanto a las muestras de ADN de *L. mexicana* y *L. braziliensis* las señales de fluorescencia fueron similares a la del control negativo.

Para determinar la especificidad de la detección se graficó el promedio de fluorescencia a los 35 minutos. En el cual las muestras con mayor señal de fluorescencia que la del control blanco más tres veces su desviación estándar (NTC + 3SD) fueron las cepas Querétaro, Ninoa y Silvio, por lo que se considera como eficazmente detectadas. Un análisis estadístico ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Dunnett reveló que estas cepas presentaron diferencia significativa respecto al control blanco, confirmando su detección como positivas (Figura 25B). Respecto a las muestras de *L. braziliensis* y *L. mexicana* estaban por debajo del umbral de NTC + 3SD, lo cual se consideran como muestras negativas, pudiendo ser usadas en un futuro como controles negativos de la reacción.

En el caso de la cepa Texas al comparar la fluorescencia a los 60 minutos se observó que se encontraba levemente por encima del umbral de NTC + 3SD, pero su señal no presentó una diferencia significativa con el control blanco (Figura S4.B). Esto sugiere que su detección efectiva sucedería después de una hora, posiblemente a que el número de copias de satDNA sea menor para esta cepa[80]. Para estudios futuros se recomienda evaluar el aumento del tiempo de amplificación o la utilización de gRNAs múltiples con el fin de facilitar la detección de la cepa Texas u alguna otra cuyo número total de copias de satDNA no ha sido completamente caracterizado.

En conclusión, el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP fue específico para detectar la secuencia de satDNA de ciertas cepas de *T. cruzi* DTU I. Además, no se detectó las muestras de diferentes especies de *Leishmania*. Es recomendable evaluar este sistema contra otras DTUs, como la cepa CL Brener, así como otros parásitos con el fin de afinar los parámetros de la detección específica de *Trypanosoma cruzi*.

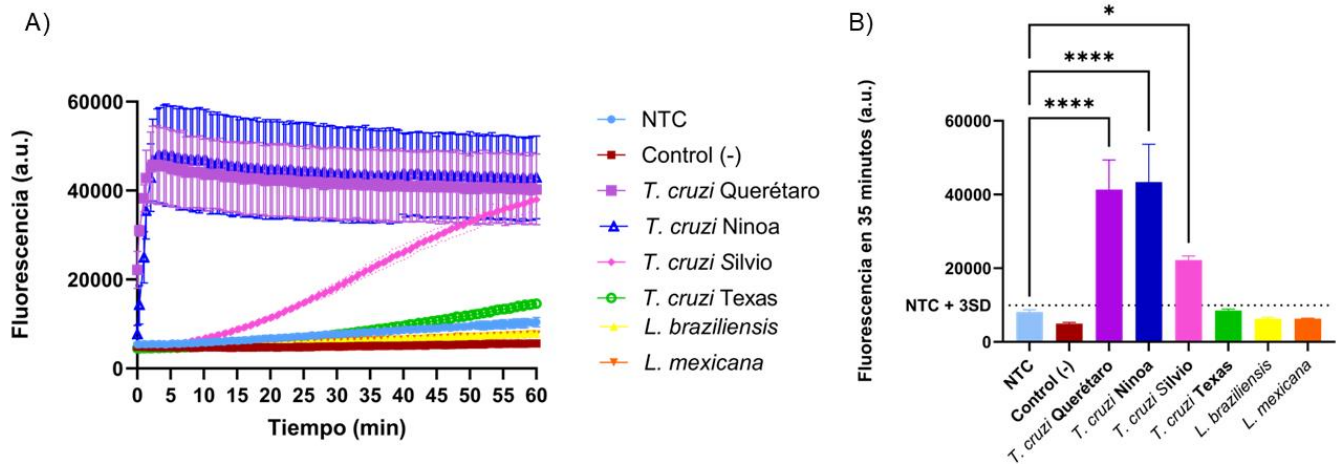


Figura 25. Evaluación de la especificidad del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA amplificado por set A. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada por cada muestra de ADN de diferente cepas o parásitos. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. B) Gráfica de barras que representa la media de la señal de fluorescencia a los 35 minutos. NTC + 3SD: Señal del control blanco (NTC) más tres veces su desviación estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, niveles de significancia estadística.

Detección de satDNA en muestras de sangre de ratón

Se decidió realizar ensayos del sistema CRISPR-Cas12a con muestras de sangre de ratón infectados recientemente con el parásito en su forma tripomastigote de la cepa Ninoa o Querétaro debido a que se logró demostrar que el sistema detectó los blancos genéticos de ADN purificados de epimastigotes *T. cruzi*. Se buscó determinar la eficiencia del método para detectar satDNA proveniente de una matriz sanguínea, las cuales en esta prueba se les nombró muestras positivas mientras que los ratones sin infección se les denominó muestras negativas.

En el primer ensayo se realizó la detección mediante el sistema CRISPR-Cas12a usando el gRNA2 de satDNA amplificado con el set A. Se observó que algunas muestras provenientes de ratones infectados alcanzaron su máximo de fluorescencia en un tiempo menor a la media hora (Figura 26A). Al graficar la señal de fluorescencia a los 30 minutos se identificó que tres de las cinco muestras positivas superaron el umbral de la señal del control blanco más 3 veces su desviación estándar (NTC + 3SD). Así mismo, estas tres muestras tuvieron una diferencia significativa con el control blanco, lo que confirma que fueron detectadas como positivas (Figura 26B).

Sin embargo, la muestra 3 (ratón infectado con cepa Ninoa) y la muestra 5 (infectado con cepa Querétaro) presentaron una señal de fluorescencia por debajo del umbral. Esto podría atribuirse a problemas en la extracción del ADN, ya que sustancias inhibitorias provenientes del método de extracción pudieron haber afectado la reacción de amplificación isotérmica, un fenómeno comúnmente observado en la técnica de PCR[6,23]. Otra posible causa es que el ADN se encuentre degradado debido a una inadecuada manipulación de las muestras. Por ende, se recomienda incluir un Control Interno de Amplificación (IAC, por sus siglas en inglés, *Internal Amplification Control*), el cual consiste en una secuencia de ADN diferente al blanco genético, que se añade a la reacción para verificar que la amplificación se realizó correctamente. Su inclusión permite determinar si fue inhibida por algún compuesto químico o biológico, y descartar falsos negativos derivados de este efecto. Otro punto para considerar sería purificar el ADN de las muestras que presenten una relación 260/230 menor a 1.8, como la muestra 3 (ver Tabla S1.3), mediante la técnica de precipitación con etanol para mejorar la pureza permitiendo asegurar que no se está afectando la amplificación isotérmica[20].

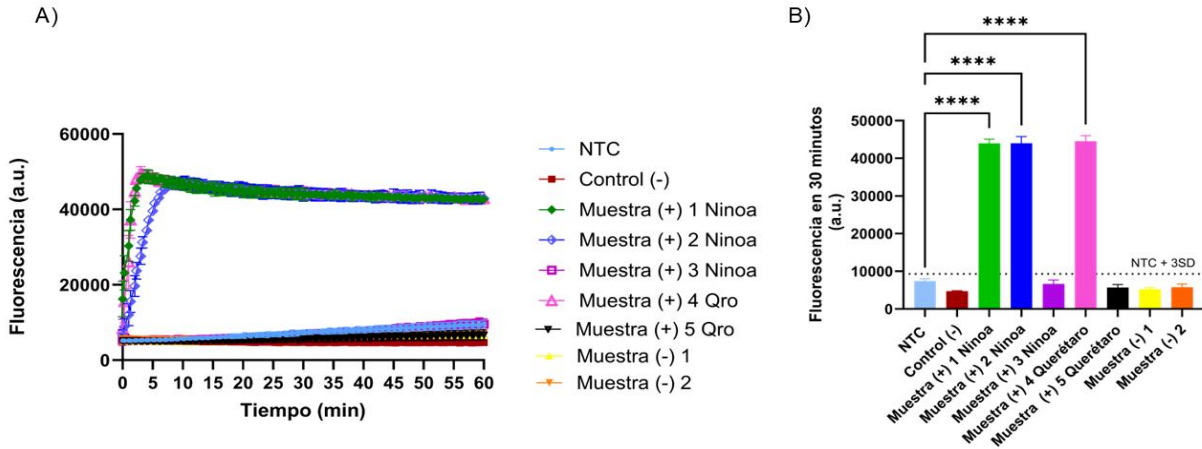


Figura 26. Eficiencia del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA amplificado por set A en muestras de sangre de ratón. A) Curva de fluorescencia generada por cada muestra de sangre. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestra (+) 1, 2 y 3 Ninoa: Ratón infectado con *T. cruzi* cepa Ninoa. Muestra (+) 4 y 5 Qro: Ratón infectado con *T. cruzi* cepa Querétaro. Muestra (-) 1 y 2: Ratón control sin infección. B) Gráfica de barras que representa la media de la señal de fluorescencia a los 30 minutos. NTC + 3SD: Señal del control blanco (NTC) más tres veces su desviación estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett. **** $p < 0.0001$, niveles de significancia estadística.

En el segundo ensayo, se realizó la detección de satDNA amplificado previamente con el set 5. Se observó que tres de las cinco muestras positivas generaron una señal de fluorescencia mayor a la del control (Figura 27A). Al graficar la señal de fluorescencia a los 30 minutos se confirmó la detección de estas tres muestras, al superar el umbral de NTC + 3SD y mostrando una diferencia significativa con el NTC (Figura 27B). En ese experimento la muestra 3 del ratón infectado con cepa Ninoa fue detectada, mientras que la muestra (+) 1 Ninoa presentó una señal similar al del NTC. Esto sugiere que el problema por el cual algunas muestras no se detectan podría estar relacionado con la fase de amplificación, siendo inhibida por la susceptibilidad de la técnica a la contaminación cruzada. En este sentido, se ha destacado la importancia de implementar áreas de trabajo separadas para la extracción de ADN genómico y para la amplificación de la secuencia, con el fin de evitar la contaminación cruzada al minimizar la exposición a posibles inhibidores que puedan estar presentes en el laboratorio o introducidos durante el método de extracción de ADN[23].

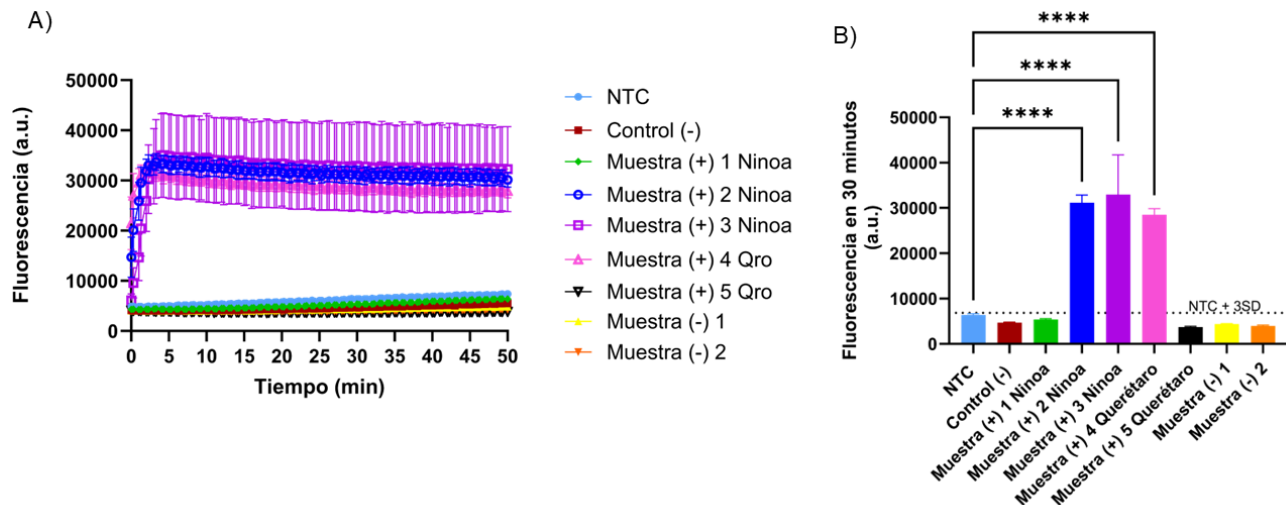


Figura 27. Eficiencia del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA amplificado por set 5 de LAMP en muestras de sangre de ratón. A) Curva de Fluorescencia generada por cada muestra de sangre NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra de ADN negativo + LAMP. Muestra (+) 1, 2 y 3 Ninoa: Ratón infectado con *T. cruzi* cepa Ninoa. Muestra (+) 4 y 5 Qro: Ratón infectado con *T. cruzi* cepa Querétaro. Muestra (-) 1 y 2: Ratón control sin infección. B) Gráfica de barras que representa la media de la señal de fluorescencia a los 30 minutos. NTC+3SD: Señal del control blanco (NTC) más tres veces su desviación estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett. **** $p < 0.0001$, niveles de significancia estadística.

Con estos ensayos preliminares se demuestra que el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP es capaz de detectar al parásito *Trypanosoma cruzi* en su fase tripomastigote de muestras de sangre de ratón infectados con la cepa Ninoa o Querétaro. Además, en cuanto a los ratones no infectados sus señales de fluorescencia no superaron el umbral establecido. Por ende, el sistema CRISPR-Cas12a mostró una alta especificidad lo que garantizó que no hubiera señales falsas positivas. Es importante realizar estudios adicionales con diversas muestras mejorando la extracción del ADN, ya sea asegurándose de seguir los cuidados necesarios o empleando técnicas alternativas de extracción de ADN genómico, como previamente se ha reportado para el método de LAMP[39]. De igual manera, optimizar la reacción de amplificación para evitar una contaminación cruzada o la inhibición de la reacción, y evaluar el uso de ICA. Finalmente, se recomienda realizar estos experimentos por triplicado para determinar la tendencia de los resultados y establecer con mayor precisión la sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a en la detección en muestras de sangre[20,81].

Detección de satDNA con CRISPR-Cas12a integrado a tiras de flujo lateral

Con el fin de que la detección con el sistema CRISPR-Cas12a del parásito *T. cruzi* sea adaptable a laboratorios con pocos recursos se hicieron ensayos empleando las tiras de flujo lateral para determinar si la muestra era positiva o negativa. Se realizó la detección utilizando el complejo RNP conformado por el gRNA2 satDNA.

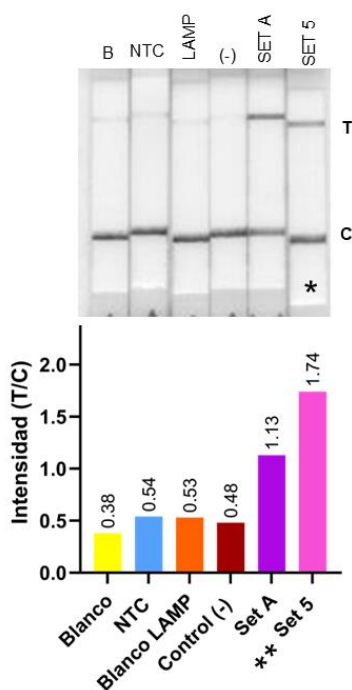
Primero se evaluó el tiempo de la reacción por 30 minutos y posteriormente se realizó la lectura en las tiras de flujo lateral (Figura 28A). En el caso de las tiras que contenían las muestras de satDNA previamente amplificado por los sets A o 5, se observaron las bandas de control y prueba, indicando un resultado positivo. Esto se debe a que el sistema CRISPR-Cas12a reconoció la secuencia de interés procediendo a la hidrólisis de la sonda biotinilada, quedando la parte marcada con biotina anclada a la estreptavidina (banda control), mientras que el extremo 5' marcado con FAM unido al GNP, mediante el anticuerpo anti-FITC, migraron por la tira hasta la banda prueba donde fueron reconocidos, así confirmando la reacción de detección[65].

En el caso de las tiras del control negativo, el blanco (buffer NEB 2.1 de la reacción de CRISPR-Cas12a), el NTC (RNP sin ADN), y el control blanco de la reacción de LAMP, sólo mostraron la banda control y una leve señal en la banda prueba. Este suceso puede deberse a que se degradó levemente la sonda o su concentración no es óptima para la tira, provocando el *Hook Effect* donde el exceso de sonda satura el sitio de unión de estreptavidina incrementando la intensidad de la banda prueba[66]. Por lo tanto, se comparó la señal colorimétrica de las tiras mediante la relación de intensidad entre la banda prueba y la banda control, observando que a los 30 minutos de la detección las muestras con satDNA pre-amplificado su relación fue mayor a 1 lo que confirma que son positivas, a comparación de los controles cuya proporción fue menor a 1.

Se redujo el tiempo de detección a 15 minutos para evaluar si se podía identificar las muestras positivas en las tiras de flujo lateral en un menor tiempo. Se observó definidamente la banda control y la banda prueba en las muestras con satDNA pre-amplificado. Además, al comparar la relación de intensidad entre ambas bandas de las tiras, se obtuvo un valor mayor a 1, confirmando que las muestras eran positivas. En contraste, la banda prueba de las muestras controles fue tenue a comparación de la banda control,

con un coeficiente de intensidad menor a 1 (Figura 28B). Por lo tanto, se logró visualizar en las tiras de flujo lateral que el sistema CRISPR-Cas12a en un tiempo de 15 minutos detectó el satDNA amplificado por el set A o 5, provenientes de una muestra de ADN genómico de *T. cruzi* a una concentración fM. Lo que en un futuro permitiría tener un resultado de alguna muestra en un tiempo menor a una hora.

A) Detección satDNA por 30 minutos



B) Detección satDNA por 15 minutos

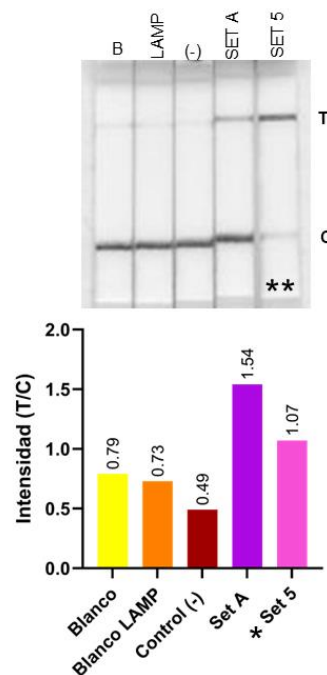


Figura 28. Evaluación de CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA pre-amplificado mediante tiras de flujo lateral. A) Tiras de flujo lateral para observar la detección de satDNA por 30 minutos, con gráfica de la relación de intensidad (T/C). B) Tiras de flujo lateral para observar la detección de satDNA por 15 minutos, con gráfica de la relación intensidad (T/C). Blanco (B): Control blanco CRISPR-Cas12a. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Blanco LAMP: Control blanco de LAMP. Control (-): Muestra negativa de LAMP. SET A/SET 5: ADN genómico a 244.24 fM amplificado con LAMP set A o set 5. T: Banda prueba. C: Banda control. T/C: Coeficiente de intensidad entre las bandas *Esta tira corresponde a la muestra detectada por 15 minutos. **Esta tira corresponde a la muestra detectada por 30 minutos.

Por último, se evaluó la eficacia de las tiras de flujo lateral para observar la especificidad del sistema CRISPR-Cas12a. Recordando que el ADN genómico de cada una las muestras estaban a una concentración de 4 ng/μL y la amplificación sucedió por 25 minutos usando el set LAMP A. Posteriormente por 30 minutos se llevó a cabo la reacción de detección por el RNP formado con el gRNA2 satDNA.

Se observó que las muestras de *T. cruzi* cepa Ninoa y Querétaro su banda prueba generó una señal intensa, indicando ser muestras positivas (Figura 29A). En el caso de la cepa Silvio, la banda de prueba es ligeramente más intensa que de las bandas de los controles, quedando en duda si era positiva. Al comparar la relación de intensidad entre las bandas prueba y control se determinó que las cepas Ninoa y Querétaro tienen resultados positivos al tener un valor mayor 1, en el caso de la cepa Silvio su valor fue de 0.9, por lo cual se consideraría negativa (Figura 29B). Este resultado se puede correlacionar con lo observado anteriormente de que hasta al minuto 35 la señal de fluorescencia de la muestra Silvio tuvo una diferencia significativa con el control blanco (Figura 25B). Se recomienda aumentar el tiempo de detección a 35 minutos para poder observar eficazmente la detección de esta cepa con las tiras de flujo lateral.

En el caso de la cepa Texas la intensidad de la banda prueba es muy semejante a las de los parásitos *L. mexicana* y *L. braziliensis*, así como la de los controles. Además, el coeficiente de la intensidad colorimétrica entre las bandas de cada muestra fue menor a 1, por lo cual se consideran como negativos (Figura 29A y B). En el caso de *T. cruzi* cepa Texas, como se mencionó, es recomendable evaluar aumentar el tiempo de amplificación, esto podría mejorar la efectividad de la detección ya que probablemente el número de copias de satDNA es menor a las otras cepas.

Con esto resultados, se recomienda optimizar el sistema de detección CRISPR-Cas12a con tiras de flujo lateral, de modo que en un futuro cercano pueda ser utilizado en muestras clínicas obteniendo un resultado de manera fácil, rápida y accesible del parásito *Trypanosoma cruzi*.

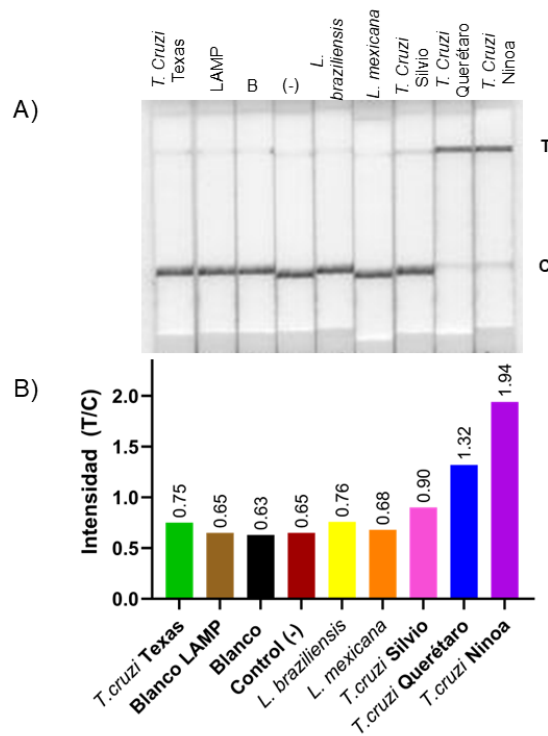


Figura 29. Evaluación de la especificidad del sistema CRISPR-Cas12a integrado a tiras de flujo lateral para la detección de satDNA amplificado por set A. A) Tiras de flujo lateral para la detección de satDNA pre-amplificado de diferentes cepas. B) Gráfica de la relación de intensidad (T/C) Blanco (B): Control blanco CRISPR-Cas12; Blanco LAMP: Control blanco LAMP. Control (-): Muestra negativa de LAMP. Muestras con ADN de los parásitos a 4 ng/μL. T: Banda prueba. C: Banda control. T/C: Coeficiente de intensidad entre las bandas

Conclusiones

Se logró la amplificación isotérmica del satDNA y kDNA del ADN *Trypanosoma cruzi* a partir de ADN genómico de epimastigotes de la cepa Ninoa, utilizando un set de primers reportado para satDNA y con cinco sets diseñados para ambos blancos genéticos. Al evaluar la detección con el sistema CRISPR-Cas12a, se determinó que el gRNA2 satDNA fue el más eficiente para identificar satDNA pre-amplificado por cualquier set de LAMP, mientras que para la detección de kDNA el gRNA2 kDNA mostró mayor eficiencia con el set de LAMP 5.

Se determinó la sensibilidad analítica del sistema CRISPR-Cas12a obteniendo el LoD de satDNA amplificado previamente con el set A, el cual fue de 2.1 yoctomolar (yM), mientras que para el satDNA pre-amplificado con el set 5 fue de 247.8 yM. Estas concentraciones son comparables o menores a los LoD reportados para las técnicas de PCR y LAMP. Esto evidencia que este método posee una alta sensibilidad analítica para este blanco genético, sugiriendo su uso como alternativa para detectar el parásito, principalmente en pacientes en fase aguda. Sin embargo, aún es necesario demostrar su eficacia en muestras clínicas. En el caso de kDNA, el LoD fue de 534 attomolar, un valor superior al reportado para la PCR, lo que indica la necesidad de optimizar la sensibilidad en esta detección.

Además, se evaluó la especificidad del sistema, obteniendo que el satDNA fue detectado en las cepas Querétaro, Ninoa y Silvio de *T. cruzi*, mientras que no se identificaron las especies de *Leishmania spp.*, demostrando la especificidad programada del sistema CRISPR-Cas12a para *T. cruzi*, particularmente para ciertas cepas del parásito. En el caso de la cepa Texas se recomienda aumentar el tiempo de amplificación debido al bajo número de copias de la secuencia satDNA. También, se comprobó que el sistema CRISPR-Cas12a puede detectar el satDNA pre-amplificado en la mayoría de las muestras de sangre de ratón infectadas con el parásito en su forma tripomastigote. Para mejorar la eficacia del método se propone optimizar el proceso de extracción de ADN y la amplificación del satDNA, con el fin de reducir el riesgo de una contaminación cruzada y prevenir la inhibición de la amplificación isotérmica causada por algún componente del proceso de extracción.

Finalmente, se implementó el uso de las tiras de flujo lateral para facilitar la detección de satDNA, logrando realizar la reacción de detección del parásito en un tiempo de 15 minutos con CRISPR-Cas12a. Esto confirma la rapidez y especificidad del sistema, siendo viable para su aplicación como una prueba en punto de atención primaria (PoC). A pesar de ello, se recomienda ajustar tiempos de detección o amplificación para optimizar la identificación de cepas como Silvio y Texas mediante este formato.

A partir de estos resultados, se concluye que el sistema CRISPR-Cas12a acoplado a una amplificación isotérmica como LAMP es eficaz para la detección de *Trypanosoma cruzi*. Se cumplió con el diseño de los primers y gRNAs específicos, lo que permitió evaluar la sensibilidad y especificidad del sistema, así como su adaptación en tiras de flujo lateral para que la detección del parásito sea sencilla.

Perspectivas

Ampliar la detección a otras cepas o DTUs de *T. cruzi*, y continuar evaluando la especificidad del método utilizando muestras de parásitos relacionados filogenéticamente, como *T. brucei* o *T. rangeli*.

Diseñar y optimizar un enfoque de un solo paso (*One Pot*) para simplificar la detección del parásito.

Optimizar el sistema de detección con tiras de flujo lateral para su implementación futura en laboratorios con recursos limitados.

Evaluar la sensibilidad y especificidad clínica del sistema CRISPR-Cas12a para su aplicación en muestras clínicas de pacientes en fase aguda o crónica.

Referencias

- [1] Centers for Disease Control and Prevention, "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)," American Trypanosomiasis. Accessed: May 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- [2] Secretaría de Salud, "Manual de procedimientos para la enfermedad de Chagas en México," 2018. Accessed: May 28, 2024. [Online]. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf
- [3] E. Ferrer, "T   moleculares para el diagn   de la enfermedad de Chagas," *Saber*, vol. 27, pp. 359–371, May 2015, [Online]. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000300002&nrm=iso
- [4] Organización Panamericana de la Salud, "Enfermedad de Chagas." Accessed: May 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- [5] Organización Mundial de la Salud, "Enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)." Accessed: Sep. 10, 2024. [Online]. Available: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- [6] A. G. Schijman, J. Alonso-Padilla, C. Britto, and C. P. Herrera Bernal, "Retrospect, advances and challenges in Chagas disease diagnosis: a comprehensive review," Aug. 01, 2024, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.lana.2024.100821.
- [7] I. Becker *et al.*, "The Low Variability of Tc24 in *Trypanosoma cruzi* TcI as an Advantage for Chagas Disease Prophylaxis and Diagnosis in Mexico," *Pathogens*, vol. 12, no. 3, p. 368, Feb. 2023, doi: 10.3390/pathogens12030368.
- [8] Secretaría de Salud, "099. Secretaría de Salud fortalece prevención de enfermedad de Chagas." Accessed: Feb. 05, 2025. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/salud/prensa/099-secretaria-de-salud-fortalece-prevencion-de-enfermedad-de-chagas>
- [9] L. M. De Pablos and A. Osuna, "Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity," *Infect Immun*, vol. 80, no. 7, pp. 2258–2264, Jul. 2012, doi: 10.1128/IAI.06225-11.
- [10] I. Martínez, B. Noguera, F. Martínez-Hernández, and B. Espinoza, "Microsatellite and Mini-Exon Analysis of Mexican Human DTU I *Trypanosoma cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 13, no. 3, pp. 181–187, Mar. 2013, doi: 10.1089/vbz.2012.1072.
- [11] M.-F. Bosseno *et al.*, "Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico," *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 2, pp. 627–632, Feb. 2002, doi: 10.1128/JCM.40.2.627-632.2002.
- [12] Z. M. Cucunubá *et al.*, "The epidemiology of Chagas disease in the Americas," *The Lancet Regional Health - Americas*, vol. 37, p. 100881, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.lana.2024.100881.
- [13] M. Beltrán Dur  n, "Control de la transmisión transfusional y por trasplante de Chagas Día Mundial de la Enfermedad de Chagas 2022," 2022.
- [14] Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, "Lineamientos de vigilancia por Laboratorio de la Enfermedad de Chagas," 2019. Accessed: Jun. 03, 2024. [Online]. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/483705/Lineamientos_Chagas__4T.pdf
- [15] L. A. M. E. O.-P. S. M. N. G. S. G. e I. E. B.-R. Janine M. Ramsey, "Enfermedad de Chagas: omisión u olvido en la salud pública de México," *INSP*, 2021. Accessed: Jun. 01, 2024. [Online]. Available: https://insp.mx/assets/documents/webinars/2021/CRISP_Chagas_1nov_2.pdf
- [16] A. Herreros-Cabello, F. Callejas-Hernández, N. Giron  s, and M. Fresno, "Trypanosoma Cruzi Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications," *Genes (Basel)*, vol. 11, no. 10, p. 1196, Oct. 2020, doi: 10.3390/genes11101196.

- [17] F. Callejas-Hernández, A. Herreros-Cabello, J. del Moral-Salmoral, M. Fresno, and N. Gironès, "The Complete Mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: Maxicircles and Minicircles," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, Jun. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.672448.
- [18] J. T. Smith Jr. *et al.*, "Developmental regulation of edited CYb and COIII mitochondrial mRNAs is achieved by distinct mechanisms in *Trypanosoma brucei*," *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 15, pp. 8704–8723, Sep. 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa641.
- [19] I. Martínez, A. Cervantes-Landín, and B. Espinoza, "Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas," *Gac Med Mex*, vol. 149, no. 3, pp. 363–365, 2013, Accessed: Sep. 10, 2024. [Online]. Available: https://anmm.org.mx/GMM/2013/n3/GMM_149_2013_3_363-365.pdf
- [20] A. G. Schijman *et al.*, "International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 5, no. 1, p. e931, Jan. 2011, doi: 10.1371/journal.pntd.0000931.
- [21] J. C. Ramírez *et al.*, "Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients," *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 17, no. 5, pp. 605–615, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
- [22] T. Duffy *et al.*, "Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 7, no. 1, 2013, doi: 10.1371/journal.pntd.0002000.
- [23] P. Seiringer *et al.*, "Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics," *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 88, no. 3, pp. 225–232, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.003.
- [24] O. C. Moreira *et al.*, "Validation of the NAT Chagas IVD Kit for the Detection and Quantification of *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples of Patients with Chagas Disease," *Life*, vol. 13, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/life13061236.
- [25] L. C. Ascanio, S. Carroll, A. Paniz-Mondolfi, and J. D. Ramírez, "In vitro diagnostic methods of Chagas disease in the clinical laboratory: a scoping review," 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fmicb.2024.1393992.
- [26] T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Res*, vol. 28, no. 12, pp. 63e–663, Jun. 2000, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [27] K. Nagamine, T. Hase, and T. Notomi, "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers," *Mol Cell Probes*, vol. 16, no. 3, pp. 223–229, Jun. 2002, doi: 10.1006/mcpr.2002.0415.
- [28] E. N. M. A. P. A. M. T. N. & V. RODRIGO. SÁNCHEZ, "Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico," *CONCIENCIA*, vol. 2, no. 1, pp. 127–140, 2014.
- [29] A. Álvarez-Rodríguez, B.-K. Jin, M. Radwanska, and S. Magez, "Recent progress in diagnosis and treatment of Human African Trypanosomiasis has made the elimination of this disease a realistic target by 2030," *Front Med (Lausanne)*, vol. 9, Nov. 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.1037094.
- [30] I. Ocorbin and M. Filipenko, "Bst polymerase — a humble relative of Taq polymerase," *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 21, pp. 4519–4535, 2023, doi: 10.1016/j.csbj.2023.09.008.
- [31] New England Biolabs, "Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase."
- [32] A. Hernandez-Garcia, M. D. Morales-Moreno, E. G. Valdés-Galindo, E. P. Jimenez-Nieto, and A. Quezada, "Diagnostics of COVID-19 Based on CRISPR–Cas Coupled to Isothermal Amplification: A Comparative Analysis and Update," *Diagnostics*, vol. 12, no. 6, p. 1434, Jun. 2022, doi: 10.3390/diagnostics12061434.
- [33] Ltd. Eiken Chemical Co., "Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V5)," 2019. Accessed: Jun. 03, 2024. [Online]. Available: [cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html](https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html)

- [34] R. Rivero *et al.*, "Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of congenital Chagas infection," *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 89, no. 1, pp. 26–28, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.012.
- [35] S. Quispe, Torrico, Bernardo, Guevara, and Palmira, "Diagnóstico Molecular de la Enfermedad de Chagas mediante Amplificación Isotérmica mediada por asas (LAMP)," 2014.
- [36] D. Ordóñez *et al.*, "A *Trypanosoma cruzi* Genome Tandem Repetitive Satellite DNA Sequence as a Molecular Marker for a LAMP Assay for Diagnosing Chagas' Disease," *Dis Markers*, vol. 2020, pp. 1–8, Feb. 2020, doi: 10.1155/2020/8074314.
- [37] S. A. Besuschio *et al.*, "Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 11, no. 7, p. e0005779, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005779.
- [38] S. A. Besuschio *et al.*, "Trypanosoma cruzi loop-mediated isothermal amplification (Trypanosoma cruzi Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 14, no. 8, p. e0008402, Aug. 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0008402.
- [39] D. P. Wehrendt *et al.*, "Development and Evaluation of a Three-Dimensional Printer–Based DNA Extraction Method Coupled to Loop Mediated Isothermal Amplification for Point-of-Care Diagnosis of Congenital Chagas Disease in Endemic Regions," *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 23, no. 4, pp. 389–398, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.12.007.
- [40] S. A. Longhi, L. J. García Casares, A. A. Muñoz-Calderón, J. Alonso-Padilla, and A. G. Schijman, "Combination of ultra-rapid DNA purification (PURE) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in dried blood spots," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 17, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.1371/journal.pntd.0011290.
- [41] T. J. Moehling, M. D. Worthington, P. Y. G. Wong, S. S. Wong, and R. J. Meagher, "Development of a Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of *Trypanosoma cruzi* in Low-Resource Settings," *Diagnostics*, vol. 14, no. 11, Jun. 2024, doi: 10.3390/diagnostics14111193.
- [42] B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, and J. A. Doudna, "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea," *Nature*, vol. 482, no. 7385, pp. 331–338, Feb. 2012, doi: 10.1038/nature10886.
- [43] B. Zetsche *et al.*, "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System," *Cell*, vol. 163, no. 3, pp. 759–771, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- [44] K. S. Makarova *et al.*, "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants," *Nat Rev Microbiol*, vol. 18, no. 2, pp. 67–83, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41579-019-0299-x.
- [45] J. A. Doudna and E. Charpentier, "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9," *Science (1979)*, vol. 346, no. 6213, Nov. 2014, doi: 10.1126/science.1258096.
- [46] M. M. Kaminski, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, F. Zhang, and J. J. Collins, "CRISPR-based diagnostics," *Nat Biomed Eng*, vol. 5, no. 7, pp. 643–656, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00760-7.
- [47] C. Qin *et al.*, "One-Pot Visual Detection of African Swine Fever Virus Using CRISPR-Cas12a," *Front Vet Sci*, vol. 9, Jul. 2022, doi: 10.3389/fvets.2022.962438.
- [48] T. Huang, R. Zhang, and J. Li, "CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: Retrospect, recent advances, and future perspectives," *J Adv Res*, vol. 50, pp. 69–82, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.jare.2022.10.011.
- [49] J. S. Gootenberg *et al.*, "Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2," *Science (1979)*, vol. 356, no. 6336, pp. 438–442, Apr. 2017, doi: 10.1126/science.aam9321.
- [50] J. S. Chen *et al.*, "CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity," *Science (1979)*, vol. 360, no. 6387, pp. 436–439, Apr. 2018, doi: 10.1126/science.aar6245.
- [51] S.-Y. Li *et al.*, "CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection," *Cell Discov*, vol. 4, no. 1, p. 20, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41421-018-0028-z.

- [52] L. Li *et al.*, "HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation," *ACS Synth Biol*, vol. 8, no. 10, pp. 2228–2237, Oct. 2019, doi: 10.1021/acssynbio.9b00209.
- [53] N. Sima, A. Dujeancourt-Henry, B. L. Perlaza, M.-N. Ungeheuer, B. Rotureau, and L. Glover, "SHERLOCK4HAT: A CRISPR-based tool kit for diagnosis of Human African Trypanosomiasis," *EBioMedicine*, vol. 85, p. 104308, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104308.
- [54] Mammoth Biosciences, "DETECTR BOOST™ SARS-CoV-2 Reagent Kit INSTRUCTIONS FOR USE For in vitro diagnostic (IVD) use For Prescription (Rx) use only For Emergency Use Authorization (EUA) only," 2022.
- [55] Sherlock Biosciences, "INSTRUCTIONS FOR USE Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2 kit Rx Only For Emergency Use Authorization (EUA) only," 2022.
- [56] L. Li *et al.*, "HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation," *ACS Synth Biol*, vol. 8, no. 10, pp. 2228–2237, Oct. 2019, doi: 10.1021/acssynbio.9b00209.
- [57] Z. Li, W. Zhao, S. Ma, Z. Li, Y. Yao, and T. Fei, "A chemical-enhanced system for CRISPR-Based nucleic acid detection," *Biosens Bioelectron*, vol. 192, p. 113493, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113493.
- [58] T. Yamano *et al.*, "Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA," *Cell*, vol. 165, no. 4, pp. 949–962, May 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.003.
- [59] T. Swartjes, R. H. J. Staals, and J. van der Oost, "Editor's cut: DNA cleavage by CRISPR RNA-guided nucleases Cas9 and Cas12a," *Biochem Soc Trans*, vol. 48, no. 1, pp. 207–219, Feb. 2020, doi: 10.1042/BST20190563.
- [60] A. Bandyopadhyay, N. Kancharla, V. S. Javalkote, S. Dasgupta, and T. P. Brutnell, "CRISPR-Cas12a (Cpf1): A Versatile Tool in the Plant Genome Editing Tool Box for Agricultural Advancement," *Front Plant Sci*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/fpls.2020.584151.
- [61] D. C. Swarts and M. Jinek, "Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a," *Mol Cell*, vol. 73, no. 3, pp. 589–600.e4, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.021.
- [62] D. A. Huyke, A. Ramachandran, V. I. Bashkirov, E. K. Kotseroglou, T. Kotseroglou, and J. G. Santiago, "Enzyme Kinetics and Detector Sensitivity Determine Limits of Detection of Amplification-Free CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13 Diagnostics," *Anal Chem*, vol. 94, no. 27, pp. 9826–9834, Jul. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c01670.
- [63] N. Atçeken, D. Yıgci, B. Ozdalgic, and S. Tasoglu, "CRISPR-Cas-Integrated LAMP," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 11, p. 1035, Nov. 2022, doi: 10.3390/bios12111035.
- [64] M. D. Morales-Moreno, E. G. Valdés-Galindo, M. M. Reza, T. Fiordelisio, J. Peon, and A. Hernandez-Garcia, "Multiplex gRNAs Synergically Enhance Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR-Cas12a," *CRISPR J*, vol. 6, no. 2, pp. 116–126, Apr. 2023, doi: 10.1089/crispr.2022.0074.
- [65] Milenia Biotec, "CRISPR-Cas & Lateral Flow." Accessed: Sep. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.milenia-biotec.com/en/method/crispr-cas-lateral-flow/>
- [66] Milenia Biotec, "Lateral Flow Readout for CRISPR/Cas-based detection strategies," 2020. Accessed: Sep. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.milenia-biotec.com/en/tips-lateral-flow-readouts-crispr-cas-strategies/>
- [67] E. Dueñas *et al.*, "Novel CRISPR-based detection of Leishmania species," *Front Microbiol*, vol. 13, Sep. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.958693.
- [68] X. Li *et al.*, "Detection of Parasites in the Field: The Ever-Innovating CRISPR/Cas12a," Mar. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/bios14030145.
- [69] R. A. Lee *et al.*, "Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, no. 41, pp. 25722–25731, Oct. 2020, doi: 10.1073/pnas.2010196117.

- [70] R. Lei *et al.*, "RPA/CRISPR/Cas12a-Based On-Site and Rapid Nucleic Acid Detection of *Toxoplasma gondii* in the Environment," *ACS Synth Biol*, vol. 11, no. 5, pp. 1772–1781, May 2022, doi: 10.1021/acssynbio.1c00620.
- [71] D. Cherkaoui, S. G. Mesquita, D. Huang, E. B. Lugli, B. L. Webster, and R. A. McKendry, "CRISPR-assisted test for *Schistosoma haematobium*," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, p. 4990, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-31238-y.
- [72] F. Yu *et al.*, "CRISPR/Cas12a-based on-site diagnostics of *Cryptosporidium parvum* IId-subtype-family from human and cattle fecal samples," *Parasit Vectors*, vol. 14, no. 1, p. 208, Dec. 2021, doi: 10.1186/s13071-021-04709-2.
- [73] P. Mohanraju, J. Oost, M. Jinek, and D. Swarts, "Heterologous Expression and Purification of the CRISPR-Cas12a/Cpf1 Protein," *Bio Protoc*, vol. 8, no. 9, 2018, doi: 10.21769/bioprotoc.2842.
- [74] New England Biolabs, "Typical LAMP Protocol (M0538)." Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.neb.com/en/protocols/2014/12/29/typical-lamp-protocol-m0538>
- [75] J. Pineda-Rios *et al.*, "Update of the state of knowledge on diagnostic techniques of Leishmaniasis and Chagas disease," *Rev Mex Biodivers*, vol. 95, Jan. 2024, doi: 10.22201/ib.20078706e.2024.95.5311.
- [76] B. N. Iqbal *et al.*, "Diagnostic utility and validation of a newly developed real time loop mediated isothermal amplification method for the detection of SARS CoV-2 infection," *Journal of Clinical Virology Plus*, vol. 2, no. 3, p. 100081, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.jcvp.2022.100081.
- [77] A. Shrivastava and V. Gupta, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods," *Chronicles of Young Scientists*, vol. 2, no. 1, p. 21, 2011, doi: 10.4103/2229-5186.79345.
- [78] Y. Cao, X. Lu, H. Lin, A. F. Rodriguez Serrano, G. C. Y. Lui, and I. M. Hsing, "CoLAMP: CRISPR-based one-pot loop-mediated isothermal amplification enables at-home diagnosis of SARS-CoV-2 RNA with nearly eliminated contamination utilizing amplicons depletion strategy," *Biosens Bioelectron*, vol. 236, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.bios.2023.115402.
- [79] M. C. Q. B. Elias, N. S. Vargas, B. Zingales, and S. Schenkman, "Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*," *Mol Biochem Parasitol*, vol. 129, no. 1, pp. 1–9, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0166-6851(03)00054-9.
- [80] R. T. Souza *et al.*, "Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi*," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, p. e23042, Aug. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0023042.
- [81] N. Yang, H. Zhang, X. Han, Z. Liu, and Y. Lu, "Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview," 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fmicb.2024.1406632.

Apéndice

Tabla S1.1 Cuantificación y pureza de cuatro lotes de ADN genómicos extraídos de la cepa Ninoa de *T. cruzi*.

Muestra	Concentración(ng/μL)	Relación Absorción 260/280	Relación Absorción 260/230
ADN lote 1	121.1	1.93	1.72
ADN lote 2	103.1	1.93	1.64
ADN lote 3	104.9	1.94	1.44
ADN lote 4	124.0	1.94	1.75
ADN genómico*	113.9	1.9	1.73

La concentración recomendada debe ser mayor a 50 ng/μL, y para determinar la pureza del ADN, la relación de absorción 260/280 debe estar entre 1.8-2.1 y la relación 260/230 entre 1.8-2.2. Un valor menor a 1.5 se considera contaminación significativa. *Los cuatro lotes provenían del mismo cultivo celular (2,800x10⁶ células) por lo que se decidió combinarlos. Este ADN genómico se utilizó para evaluar los gRNAs del sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP.

Tabla S1.2 Cuantificación y pureza de los ADN genómicos extraídos de diferentes cepas de *T. cruzi* y especies de *Leishmania*

Muestra	Número de parásitos /mL	Concentración de ADN total extraído (ng/μL)	Relación Absorción 260/280	Relación Absorción 260/230
<i>T. cruzi</i> Cepa Ninoa	2,400x10 ⁶	115.6	1.9	1.73
<i>T. cruzi</i> cepa Silvio	1.22x10 ⁸	80.5	1.86	0.13
<i>T. cruzi</i> cepa Texas	1.22x10 ⁸	64.5	1.8	1.04
<i>T. cruzi</i> cepa Querétaro	-	938.4	2.09	0.84
<i>Leishmania mexicana</i>	1.4 x10 ⁸	49.7	1.92	2.02
<i>Leishmania braziliensis</i>	5.6 x10 ⁶	28.8	1.97	2.02

La concentración recomendada debe ser mayor a 50 ng/μL, y para determinar la pureza del ADN la relación absorción 260/280 entre 1.8-2.1 y la relación 260/230 entre 1.8-2.2, si esta relación es menor a 1.5 se considera contaminación significativa debida a compuestos orgánicos. Estos ADN genómicos fueron utilizados para evaluar el LoD y especificidad del sistema CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP.

Tabla S1.3 Cuantificación y pureza del ADN genómico total extraído de las muestras de sangre de ratón infectados con *T. cruzi* cepa Ninoa y cepa Querétaro.

Muestra	Número de parásitos/mL sangre	Concentración de ADN total extraído (ng/μL)	Relación absorción 260/280	Relación absorción 260/230
Muestra positiva 1 cepa Ninoa	1x 10 ⁶	103.1	2.04	2.04
Muestra positiva 2 cepa Ninoa	1x 10 ⁶	120.9	2.05	1.68
Muestra positiva 3 cepa Ninoa	1x 10 ⁶	108	1.99	1.48
Muestra positiva 1 Cepa Querétaro	8x10 ⁶	65.9	2.04	1.72
Muestra positiva 2 cepa Querétaro	13x10 ⁶	78.2	2.04	1.98
Muestra negativa 1	-	36.6	1.9	1.28
Muestra negativa 2	-	22.4	1.96	1.68

La concentración recomendada debe ser mayor a 50 ng/μL, y para determinar la pureza del ADN la relación absorción 260/280 debe estar entre 1.8-2.1 y la relación 260/230 entre 1.8-2.2, para esta relación un valor menor a 1.5 se considera indicativo de contaminación significativa por compuestos orgánicos.

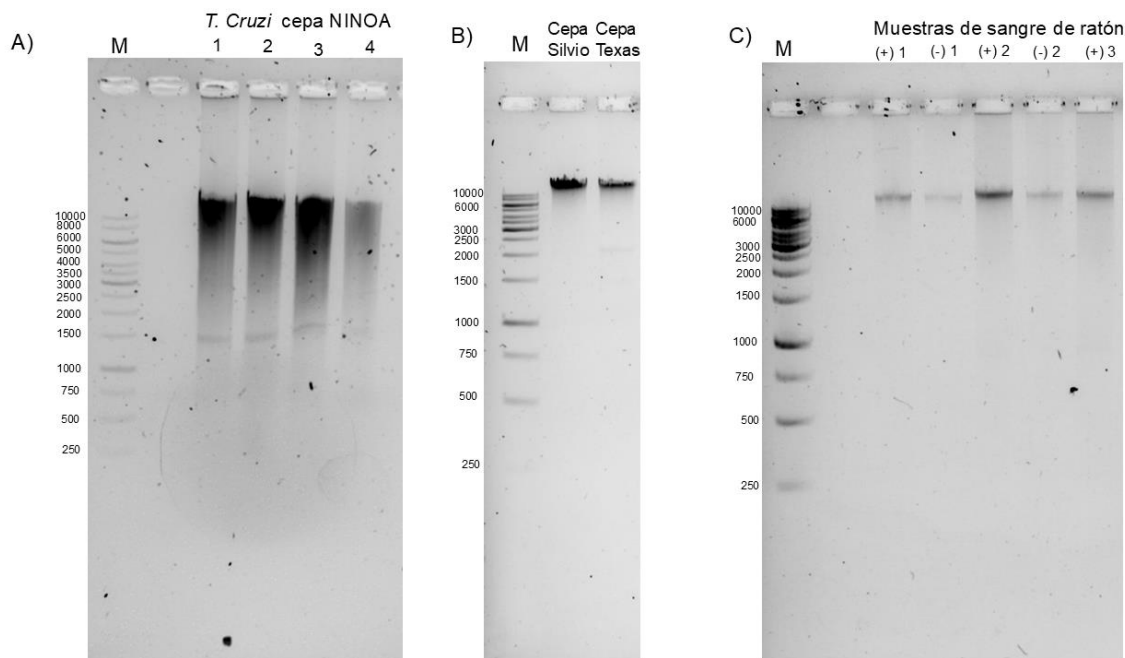


Figura S1. Integridad del ADN genómico extraído de muestras biológicas. Electroforesis en gel de agarosa. M: Marcador peso molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. A) Gel de agarosa al 1% de *T. cruzi* cepa Ninoa,

lotes 1-4. Se observan bandas superiores definida y ligeramente degradadas. B) Gel de agarosa al 2% de *T. cruzi* cepas Silvio y Texas. Bandas definidas y con mínima degradación. C) Gel de agarosa al 2% de muestras de sangre de ratón. Muestras (+) 1, 2 y 3 infectados con *T. cruzi* cepa Ninoa. Muestras (-) 1 y 2 controles negativos.

Tabla S2.1 Secuencias de primers LAMP set A para satDNA

Primer		Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Tm
F3		AACTATCCGCTGCTTGGA	18	60.8
B3		AAGAGCTCGCGAAATTCC	18	60.2
FIP	FIP	CCCACCATTACAAATCGGAAACCACTCGGCTGATCGTTTT	41	
	F1c	CCCACCATTACAAATCGGAAAC	20	65.1
	F2	CACTCGGCTGATCGTTTT	19	60.3
BIP	BIP	AGTCAGAGGCACTCTCTGTCAACCAAGCAGCGGATAGTTC	41	
	B1c	AGTCAGAGGCACTCTCTGTCAA	22	72.5
	B2	CCAAGCAGCGGATAGTTC	18	65.1
LF		TTGGACCACAACGTGTGAT	19	60.1
LB		TTCACACACTGGACACCAAA	20	64.4

Primers previamente reportados por Ordóñez et. al., 2020[36]

Tabla S2.2 Secuencias de set de primers LAMP diseñados para satDNA

Primer		Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Tm
F3 (SET 1-5)		AATTCGCGAGCTCTTGCC	19	59
B3 (SET 1-5)		TTCTCCAAGCAGCGGATA	19	57
FIP	FIP	CGGAAACAAAAATTTGGACCACACTCGGCTGATCGTTTTCG		
	F1c	CGGAAACAAAAATTTGGACCAC	22	56
	F2	ACTCGGCTGATCGTTTTCG	19	58
BIP (SET 1)	BIP	ATTGTGAATGGTGGGAGTCAGTTCAGGGTTGTTGGTGTC		
	B1c	ATTGTGAATGGTGGGAGTCAG	21	57
	B2	TTCAGGGTTGTTGGTGTC	19	55
BIP (SET 2)	BIP	ATTGTGAATGGTGGGAGTCAGATTCAGGGTTGTTGGTGTC		
	B1c	ATTGTGAATGGTGGGAGTCAGA	22	57
	B2	TTCAGGGTTGTTGGTGTC	19	55
BIP (SET 3)	BIP	ATTGTGAATGGTGGGAGTCAGAGTTCAGGGTTGTTGGTGTC		
	B1c	ATTGTGAATGGTGGGAGTCAGA	22	57
	B2	GTCAGGGTTGTTGGTGTC	20	55

BIP (SET 4)	BIP	TTGTGAATGGTGGGAGTCAGAGTTCAGGGTTGTTGGTGTC		
	B1c	TTGTGAATGGTGGGAGTCAGA	21	56
	B2	GTTTCAGGGTTGTTGGTGTC	20	55
BIP (SET 5)	BIP	TTGTGAATGGTGGGAGTCAGAGTTCAGGGTTGTTGGTGTC		
	B1c	TTGTGAATGGTGGGAGTCAGAG	22	58
	B2	GTTTCAGGGTTGTTGGTGTC	20	55
LF		GTGTGATGCAGCAGCCG	17	59
LB		GCACTCTCTGTCAATATCTGTTTGC	25	57

Tabla S3. Secuencias de set de primers LAMP diseñados para kDNA

Primer		Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Tm
F3 (SET 1)		AAAGATGAGACGTGTGTTGT	21	57.63
F3 (SET 2-3)		AAGATGAGACGTGTGTTGT	20	56.82
F3 (SET 4-5)		CAGAAAGATGAGACGTGTGTT	21	57.7
B3 (SET 1)		CATGAATTTCCGCCCCAA	18	57.24
B3 (SET 2-3)		AATAATGTACGGGGGAGATG	20	56.02
B3 (SET 4-5)		AGATGCATGAATTTCCGCC	19	57.91
FIP (SET 1 y 5)	FIP	CGTCCAACAATCTACCACACCTTGTAATATGTTGAGTGTAATGTC	45	
	F1c	CGTCCAACAATCTACCACACCT	22	62.01
	F2	TGTAATATGTTGAGTGTAATGTC	19	60.3
FIP (SET 2)	FIP	AACTCCGTCCAACAATCTACCGTAATATGTTGAGTGTAATGTCT	44	
	F1c	AACTCCGTCCAACAATCTACC	21	59.35
	F2	GTAATATGTTGAGTGTAATGTCT	23	53.60
FIP (SET 3)	FIP	CCGTCCAACAATCTACCACACCTGTAATATGTTGAGTGTAATGTC	45	
	F1c	CCGTCCAACAATCTACCACACC	22	62.82
	F2	TGTAATATGTTGAGTGTAATGTC	23	53.85
FIP (SET 4)	FIP	CGTCCAACAATCTACCACACCGTAATATGTTGAGTGTAATGTCT	44	
	F1c	CGTCCAACAATCTACCACACC	21	60.45
	F2	GTAATATGTTGAGTGTAATGTCT	23	53.6
BIP (SET 1)	BIP	GGTTTGGTTAATGGTGGCTATGAAGTTGAACGCCCCCTCC	39	
	B1c	GGTTTGGTTAATGGTGGCTATGA	23	60.79
	B2	AGTTGAACGCCCCCTCC	16	57.38
BIP	BIP	GGTTTGGTTAATGGTGGCTATGTTTCCGCCCAAAAGTTG	40	

(SET 2)	B1c	GGTTTGGTTAATGGTGGCTATG	22	59.35
	B2	TTTCCGCCCCAAAAGTTG	18	57.70
BIP (SET 3)	BIP	GGTGGCTATGATCTATAGGTGAAGATTTCCGCCCCAAAAGTTG	40	
	B1c	GGTGGCTATGATCTATAGGTGAAGA	25	61.15
	B2	TTTCCGCCCCAAAAGTTG	18	57.70
BIP (SET 4 y 5)	BIP	ATGGTGGCTATGATCTATAGGTGAACAAAAGTTGAACGCCCT	39	
	B1c	ATGGTGGCTATGATCTATAGGTGAA	25	60.9
	B2	CAAAAGTTGAACGCCCT	18	57.36
LB (SET 1)		GGGTATAAATTTGTGAAATTCTGG	25	56.77
LB (SET 2 -3)		GTGAAATTCTGGTTTGGGAGGG	25	56.77
LB (SET 4 - 5)		AATTTTGTGAAATTCTGGTTTGGG	25	59.37

Figura S3.1 Ejemplo del cálculo de la concentración molar (nM) del ADN genómico de cepa NINOA a partir de la concentración en ng/μL

$$(115.6 \text{ ng}/\mu\text{L})\left(\frac{1 \text{ nmol}}{3.73 \times 10^{10} \text{ ng}}\right)\left(\frac{10^6 \mu\text{L}}{1 \text{ L}}\right) = 3.1 \times 10^{-3} \text{ nM}$$

Figura S3.2 Ejemplo del cálculo de la concentración de ADN genómico de la cepa NINOA en ng/μL a partir de la concentración en nM

Si consideramos que 2.1 yM es equivalente a $2.1 \times 10^{-15} \text{ nM}$:

$$\left(\frac{2.1 \times 10^{-15} \text{ nmol}}{1 \text{ L}}\right)\left(\frac{3.73 \times 10^{10} \text{ ng}}{1 \text{ nmol}}\right)\left(\frac{1 \text{ L}}{10^6 \mu\text{L}}\right) = 7.9 \times 10^{-11} \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Figura S3.3 Ejemplo del cálculo de parásitos/mL a partir de la concentración molar del ADN genómico de la cepa NINOA

Si consideramos que 2.1 yM es equivalente a $2.1 \times 10^{-24} \text{ M}$ y que 1 genoma es equivalente a un parásito, tendremos que en un mL habrá:

$$\left(\frac{2 \times 10^{-24} \text{ moles}}{1 \text{ L}}\right)\left(\frac{6.022 \times 10^{23} \text{ genomas}}{1 \text{ mol}}\right)\left(\frac{1 \text{ parásito}}{1 \text{ genoma}}\right)\left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}\right) = 1.26 \times 10^{-3} \text{ parásitos/mL}$$

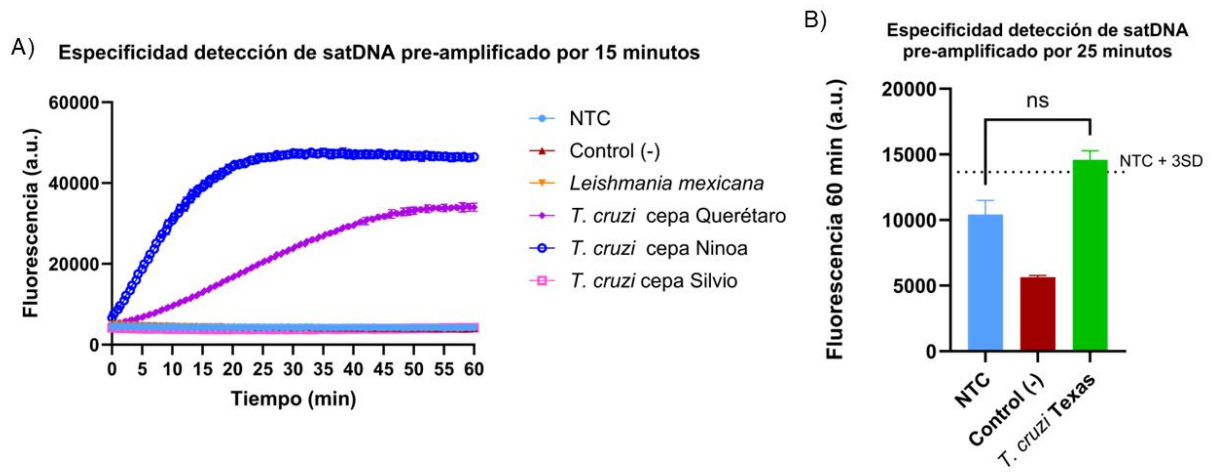


Figura S4. Evaluación de la especificidad del sistema CRISPR-Cas12a para la detección de satDNA de amplificado por set A de LAMP. A) Curva de fluorescencia en función del tiempo generada por cada muestra de ADN obtenida de diferente cepa o parásito. NTC: *No Template Control* (Control blanco). Control (-): Muestra negativa de LAMP. La amplificación isotérmica previa de cada muestra tuvo una concentración final diferente y el tiempo de amplificación fue de 15 minutos. B) Gráfica de barras que representa la media de la señal de fluorescencia a los 60 minutos NTC+3SD: Señal del control blanco (NTC) más tres veces su desviación estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett. ns: sin diferencia significativa ($p>0.05$), niveles de significancia estadística.