

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Diseño de un sistema CRISPR/LbCas12a y su evaluación en detección por corte de los genes *18s*, *H2A* y *Cytb* de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius pallescens* silvestres (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).

Luis Alejandro Ortiz Rodríguez

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Director
Jonny Edward Duque Luna

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

2024

Dedicatoria

A mis padres, Luis David Ortiz y Mónica Rodríguez, quienes han sido mis pilares inquebrantables a lo largo de este camino académico. Su apoyo constante, motivación y amor incondicional han sido mi mayor fortaleza. Siempre han estado a mi lado, tanto en los momentos de éxito como en los desafíos, brindándome su cariño, sabiduría y orientación. A mi abuelo, David Ortiz, cuyo apoyo y aliento fueron cruciales en los momentos más difíciles de esta tesis, cuando sentía que flaqueaba y no podía continuar, agradezco profundamente su presencia y sabios consejos, que siempre me impulsaron a seguir adelante. A mi pareja, Natalia Briceño, quien me apoyó en todo momento, siempre estuvo cuando la necesité, en mis momentos de desesperación fue la luz que me llevó de nuevo al camino correcto. Agradezco su amor incondicional y su paciencia. Su presencia ha sido un faro de esperanza y fortaleza en los momentos más desafiantes. Agradezco profundamente a mis profesoras, Adriana Martínez y Silvia Santander, cuyo amor por la pedagogía y dedicación me introdujeron al fascinante mundo de la ciencia. Sin su influencia, no hubiera podido comprender el alcance de mi potencial ni desarrollar mi pasión por la investigación científica. Finalmente, quiero expresar mi profundo agradecimiento al profesor Jonny Edward Duque y la profesora Stelia Mendez, por creer en mi potencial y su apoyo incondicional a lo largo de estos tres años. Su constante presencia y confianza en mí me permitieron superar obstáculos y alcanzar mis metas. Su apoyo ha dejado una huella imborrable en mi formación como científico. A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento por su inquebrantable apoyo, amor y contribuciones en este viaje

Agradecimientos

Agradecimientos especiales a mi director Jonny Edward Duque, que creyó en este proyecto desde el principio y me dio la oportunidad de participar. A la doctora Stelia Mendez, quien me apoyó en todo momento. A Juliana Cuadros, cuya investigación fue la base de este proyecto, gracias por su apoyo y paciencia. Al doctor Jeiczon Dueñez, por suministrar las muestras de ADN usadas como control. A la doctora Patricia Escobar, por suministrar el ADN de la cepa Silvio *T.cruzi*. Al doctor Duberney Chaverra, quien me aconsejó y apoyó en la metodología experimental. A la doctora Ruth Castillo, a quien le agradezco su enorme cariño y paciencia, permitiéndome tener claro el tipo de científico que quiero ser. A Diana Urbina, por acompañarme y aconsejarme en todo el proyecto. A Gustavo Rincón y José Cáceres, quienes me aconsejaron durante estos años. A Paula Rodríguez, Angélica Vargas y Wendy Triana, quienes me acompañaron en los experimentos de fluorescencia y me animaron en todo momento. Le agradezco a los doctores Fernando Rondón y Luz Nayibe Garzón, quienes me acogieron en su grupo e inculcaron en mí la curiosidad y me guiaron y durante mis primeros años en la carrera. Al profesor Jorge Hernández, quien me apoyó y me inculco el gusto por la biología molecular. A mi hermano Daniel Ortiz, quien me animó en estos años. A mis compañeros de estudio, Daniel Madrid, Mateo Quesada y Fabián Sierra, con quienes me animaron y apoyaron en todo el transcurso de mi carrera. A todos quienes aportaron su granito de arena en el transcurso de este proyecto y en mi desarrollo como científico, mil gracias.

Tabla de contenido

Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Tabla de contenido.....	4
Introducción.....	11
Antecedentes.....	14
Enfermedad de Chagas.....	14
Vectores.....	15
Vías de transmisión y fases de la enfermedad.....	17
Métodos diagnósticos.....	18
Métodos parasitológicos directos.....	18
Métodos Serológicos.....	20
Diagnóstico mediante sistemas CRISPR/ Cas.....	20
Justificación.....	23
Objetivos.....	24
General:.....	24
Específicos:.....	25
Metodología.....	25
Extracción de ADN del parásito a partir de intestinos de <i>Rhodnius pallescens</i>	25
Diseño y evaluación de cebadores.....	26
Diseño de ARN Guías.....	27
Evaluación del corte en el amplificado por visualización en gel.....	27
Evaluación del corte en el amplificado por reportero fluorescente.....	29
Evaluación de la sensibilidad del sistema CRISPR/LbCas12a.....	31
Evaluación del corte en ADN total.....	31
Análisis estadístico.....	31
Comparación de métodos de Diagnóstico.....	32
Resultados.....	34
Objetivo 1: Diseñar y evaluar cebadores que posibiliten la amplificación de los genes objetivos con los puntos de corte de las sgRNAs.....	34
Evaluación de la amplificación por PCR de los cebadores.....	37
Objetivo 2: Establecer y evaluar sgRNAs específicas para la detección de <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Rhodnius pallescens</i> utilizando el sistema CRISPR/LbCas12a en los genes <i>18s</i> , <i>H2A</i> y <i>Cytb</i>	38
Evaluación del corte en el amplificado por visualización en gel.....	41
Evaluación del corte en el amplificado por reportero fluorescente.....	43

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
 MODALIDAD INVESTIGACIÓN
 ESCUELA DE BIOLOGÍA

	5
Evaluación de la sensibilidad del sistema CRISPR LbCas12a.....	45
Objetivo 3. Describir las diferencias en los cortes entre los productos amplificados y el ADN total extraído de los intestinos de <i>Rhodnius pallescens</i>	49
Evaluación del corte en ADN total.....	49
Objetivo 4. Realizar un modelo comparativo entre de ventajas y desventajas del uso de la técnica PCR (Gold Standar) y el sistema CRISPR en muestras de ADN correspondiente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
Comparación de métodos de Diagnóstico.....	53
Discusión.....	55
Conclusiones.....	58
Bibliografía.....	59
Anexos.....	73
Anexo 1. Análisis de estructura secundaria.....	73
Anexo 2. Guías obtenidas en el análisis del amplificado, programa CHOPCHOP.....	74
Anexo 3. Alineamiento de las guías en el ADN control.....	75
En el programa Snapgene, se realizó el alineamiento de las guías diseñadas contra el ADN correspondiente al control negativo probado en la amplificación. Anexo 4. Resultado de la secuenciación.....	75
Anexo 5 Aval Comité de Ética de Investigación Científica.....	82

Lista de Tablas

Tabla 1. Empleando un análisis bibliográfico se establecieron criterios de comparación para categorizar y clasificar los métodos de diagnóstico de *T. cruzi*. El color azul indica un posible beneficio del método, el color rojo advierte de una posible desventaja del método. El color amarillo indica neutralidad..... 32

Tabla 2. Tabla de análisis de cebadores empleados para la amplificación en ADN de *Trypanosoma cruzi*. Las especies evaluadas en las tablas se usaron como control negativo de la amplificación. El porcentaje de cobertura indica la cantidad de bases seguidas que comparte con el ADN de referencia, donde exista 100% de identidad. El porcentaje de identidad, es indica el porcentaje de bases idénticas dentro de un segmento. El número de bases compartidas es la cantidad de bases seguidas que se relaciona un segmento referencia comparado con el ADN analizado..... 35

Tabla 3. Características de las guías diseñadas. La columna “cadena” se refiere al sentido en que se encuentra la guía, si es “Negativa”, se refiere a la cadena complementaria. El “Porcentaje de guanina-citosina” es la cantidad de G y C que hay dentro de la secuencia guía. La “Autocomplementariedad” es la probabilidad de que la guía se complemente con ella misma. La “Eficiencia” se refiere a la probabilidad de que la secuencia guía se complemente con la región objetivo. El “% Off-target” representa el porcentaje de secuencias no diana dentro del ADN total de la especie donde la guía podría unirse..... 39

Tabla 4. Tabla comparativa de los métodos de diagnóstico empleados para la detección de *Trypanosoma cruzi*. El color azul indica un posible beneficio del método, el color rojo advierte de una posible desventaja del método. El color amarillo indica neutralidad..... 54

Lista de Figuras

- Figura 1.** Flujo de trabajo para la detección por corte de *T. cruzi* en muestras de intestino de *R. pallescens*. 1. Disección de intestino medio y superior. 2. Extracción de ADN del intestino empleando Kit Quiagen. 3. Amplificación por PCR empleando los cebadores diseñados para cada gen. 4. El ADN amplificado producto de la PCR se agrega al mix de CRISPR/LbCas12a para ser cortado. 5. Visualización por bandas en un gel de agarosa al 2%..... 28
- Figura 2.** Visualización del corte de amplificado por reportero fluorescente. 1. El producto amplificado de la PCR es cortado por el sistema CRISPR/LbCas12a produciendo el primer corte en CIS. 2. Activación del sistema de corte colateral en TRANS, permite el corte de secuencias pequeñas y monocatenarias como el reportero fluorescente. 3. El quencher se separa del fluoróforo permitiendo la emisión a 530 nm. 4A. Se observa la emisión de la fluorescencia empleando una placa de 96 posos en un espectrofotómetro. 4B. Visualización de los tubos con ADN amplificado que activaron el sistema fluorescencia en luz ultravioleta. 30
- Figura 3.** Validación de los cebadores de los genes *Cytb*, *18s* y *H2A* en ADN correspondiente a *T. cruzi* cepa Silvio, *T. cruzi* extraído de intestino de *Rhodnius pallescens*, *Trypanosoma theileri*, *Leishmania infantum*, *Rhodnius pallescens* y *Lutzomyia sp*..... 38
- Figura 4.** Evaluación del corte en el ADN amplificado. En el carril uno el marcador de peso. El pozo dos la PCR sin el ADN amplificado. El carril cuatro, amplificado, diluido a 40 ng/uL. En el carril 5, evaluación del corte a la concentración de 40 ng/uL. A. Evaluación positiva del corte con la guía *Cytb*, las flechas señalan los dos fragmentos resultado del corte. B. Sin evidencia de corte en la guía *18s*. C. Sin evidencia de corte en la guía *H2A*. La señal en “X” indica la banda donde no se evidencia el corte..... 41
- Figura 5.** Secuenciación de la región de acoplamiento de las guías en los genes *Cytb*, *18s* y *H2A*. La secuencia está en el sentido en el que se diseñó la guía. La región enmarcada en rojo corresponde a la región PAM. Se evidencian mutaciones dentro de la región de acoplamiento en las guías *18s* y *H2A*..... 43
- Figura 6.** A. Datos crudos de fluorescencia de las guías *Cytb*, *18s* y *H2A*. RFU (RAW FLUORESCENSE UNITS) Unidades de fluorescencia cruda. B. Fluorescencia datos normalizados. fluorescencia en las tres guías dividido sobre los datos del blanco sin el ADN..... 45
- Figura 7. Evaluación de la fluorescencia bajo luz ultravioleta. Guía *Cytb* con emisión de fluorescencia visible. 45
- Figura 8.** Evaluación del corte en diluciones del amplificado. Las bandas observadas corresponden al tamaño del corte del amplificado. En 40 ng/uL se observa aún la banda correspondiente al peso normal del amplificado. En 1 ng/uL se observa una banda débil, que corresponde al fragmento grande del corte del amplificado, peso de 481 pb..... 46
- Figura 9.** Fluorescencia medida en espectrofotómetro de las diluciones en el amplificado del gen *Cytb*. A. Fluorescencia datos crudos de las diluciones. B. fluorescencia en las cinco diluciones dividido sobre los datos del blanco sin el ADN siendo para 40 ng/uL un $p=0.461$, para 20 ng/uL $p=0.2404$, en 10 ng/uL $p=0.240$, para 5 ng/uL $p=0.2559$, 1 ng/uL $p=0.1531$ y para el blanco $p=0.1343$ 47
- Figura 10.** Visualización del corte en diluciones del amplificado en el gen *Cytb* por reportero fluorescente bajo luz ultravioleta..... 48
- Figura 11.** Evaluación del corte con guía *Cytb* en ADN total. CRISPR (+) Corte del ADN amplificado del gen *Cytb* a concentración de 40 ng/uL. ADN TOTAL 1-2. ADN extraído de intestino de *Rhodnius pallescens* con presencia de *Trypanosoma cruzi*, cortado con el sistema CRISPR/LbCas12a dirigido con guía *Cytb*. ADN TOTAL BLANCO. ADN extraído de intestino de *R. pallescens* con presencia de *T. cruzi* diluido a la concentración final de 6 ng/uL, sin el sistema de corte CRISPR/LbCas12a..... 50
- Figura 12.** Comparación de los datos brutos de la fluorescencia emitida por el ADN total de *T. cruzi* extraído de intestino de *Rhodnius pallescens*, y el ADN total de *R. pallescens*..... 51

Figura 13. Visualización del corte por reportero fluorescente de ADN amplificado del gen *Cytb*, ADN no amplificado correspondiente a *T.cruzi* extraído de intestino y a *Rhodnius pallescens*.....52

Glosario

CRISPR: “clustered regularly interspaced short palindromic repeats”, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas

PAM: “protospacer adjacent motif”, motivo adyacente de protoespaciador.

PCR: “polymerase chain reaction”, Reacción en cadena de la polimerasa.

RPA: “recombinase polymerase amplification”, amplificación de la recombinasa polimerasa.

Resumen

Título: Diseño de un sistema CRISPR/LbCas12a y su evaluación en detección por corte de los genes *18s*, *H2A* y *Cytb* de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius pallescens* silvestres (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).

Autor: Luis Alejandro Ortiz Rodríguez

Palabras Clave: Chagas, Diagnóstico, CRISPR, LbCas12a

La enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* es una dolencia de importancia en la salud pública. En la actualidad, los sistemas de diagnóstico del agente etiológico son diversos, abarcando desde enfoques sencillos, como la observación de frotis

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

sanguíneo, pruebas serológicas, hasta pruebas moleculares, como la qPCR y PCR. En la búsqueda de alternativas de diagnóstico que combinen eficiencia, bajo coste y precisión, se ofrece la aplicación de la tecnología CRISPR en la detección de secuencias específicas como análisis diagnóstico. El objetivo del presente trabajo consistió en diseñar un sistema de detección de ADN por corte específico utilizando la tecnología CRISPR/LbCas12a dirigido los genes Citocromo B, Subunidad ribosomal *18s* y el gen de histona *H2A* de *Trypanosoma cruzi* en muestras de intestino de *Rhodnius pallescens*. Para ello, se implementó el sistema de corte colateral dirigido por guías de ARN diseñadas, usando amplificación por PCR y en ADN directo. La visualización del corte del amplificado, se realizó en gel de agarosa. Adicionalmente, empleando un reportero fluorescente, se evaluó el corte por espectrofotometría y confirmación visual bajo luz ultravioleta. Los resultados revelaron una eficiente capacidad de clivaje con la guía del gen *Cytb*, permitiendo una determinación efectiva y sensible incluso en concentraciones bajas como por ejemplo 1 ng/uL del amplificado. En contraste, en las pruebas en ADN sin preamplificación no hay evidencia del corte. El sistema CRISPR/LbCas12a con amplificación por PCR demostró ser efectivo para la detección de *Trypanosoma cruzi* en el vector *Rhodnius pallescens*. Para que el sistema sea asequible a cualquier necesidad de laboratorio se sugiere la implementación de técnicas de amplificación isotérmica que permita reducir el tiempo de detección y la necesidad de equipamiento técnico.

Abstract

Chagas disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* is an important public health issue. Currently diagnostic systems for the etiological agent are diverse, ranging from simple approaches such as blood smear observation, serological tests, to molecular tests like qPCR and PCR. In the search for detection alternatives that combine efficiency, low cost and precision, the application of CRISPR technology in detecting specific sequences as a diagnostic method is proposed. The aim of this study was to design a DNA detection system by specific cleavage using CRISPR/LbCas12a technology. Targeting the genes of *Trypanosoma cruzi*: Cytochrome B, 18S ribosomal subunit, and Histone H2A, in *Rhodnius pallescens* intestine samples. To achieve this, a cleavage CRISPR/LbCas12a system guided by designed RNA guides was implemented, using PCR amplification and direct DNA. Visualization of amplified cleavage was evaluated by spectrophotometry. Also, it was evaluated by visual confirmation under ultraviolet light. The results revealed an efficient cleavage capacity with the *Cytb* RNA guide, allowing effective visualization even at concentrations as low as 1 ng/uL of the amplified DNA. In contrast, there is no evidence of cleavage in tests on DNA without pre-amplification. The CRISPR/LbCas12a system with PCR amplification demonstrated to be effective for detecting *Trypanosoma cruzi* in the *Rhodnius pallescens* vector. Implementation of isothermal amplification techniques is suggested to reduce detection time and mitigate the necessity for technical equipment.

Title: Design of a CRISPR/LbCas12a system and its evaluation for targeted cleavage detection of *18s*, *H2A* and *Cytb* genes of *Trypanosoma cruzi* in wild *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).

Author: Luis Alejandro Ortiz Rodríguez

Key Words: Chagas, Diagnostic, CRISPR, LbCas12a

Introducción

El mal de Chagas es una enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* que afecta a millones de personas, especialmente en países en desarrollo (Echeverría et al., 2020). La transmisión del parásito ocurre a través de insectos de la subfamilia Triatominae (Castillo & Wolff, 2000). La distribución del vector se concentra en áreas rurales y periurbanas, impactando principalmente a poblaciones de escasos recursos (Abad-Franch et al., 2011). Además de la transmisión por picaduras del insecto, existen otras vías de contagio como la ingestión de alimentos contaminados, transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos y accidentes de laboratorio. En la actualidad, los esfuerzos de prevención de la enfermedad de Chagas se centran en el control vectorial y la creación de insecticidas (Briceño-León, 2009). La detección de la enfermedad se lleva a cabo tanto en pacientes, como en animales hospederos y el vector (Deborggraeve et al., 2009). Una rápida confirmación del parásito en el vector de la enfermedad, permite localizar zonas de riesgo para las comunidades, lo cual impacta positivamente en la prevención de la enfermedad y facilita la adopción de medidas preventivas. Las técnicas para la identificación de la enfermedad han cambiado con el transcurso del tiempo. Para la detección rápida de los parásitos causantes de enfermedades

en América, se emplean el uso de tinciones en la sangre observadas bajo el microscopio, que no son fácilmente detectables en su fase crónica (Saavedra et al., 2013). Por otro lado, las pruebas serológicas son ampliamente usadas y cuentan con mayor capacidad de detección, pero pueden presentar falsos negativos en fases avanzadas de la enfermedad y falsos positivos en fases tempranas (Abrás et al., 2016); (Gomes et al., 2009). Alternativamente, se adoptaron técnicas más precisas como la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), que posibilitan la elaboración de estudios diferentes a los morfológicos o bioquímicos (Kirchhoff et al., 1996). En la actualidad la PCR es el método Gold Standard para la identificación de *Trypanosoma cruzi* y es un sistema de amplificación empleado en el diagnóstico de diversas enfermedades, su principal ventaja es la amplificación en millones de fragmentos de una región diana. A pesar de sus ventajas, la PCR es susceptible a falsos positivos debido a contaminación y un diseño erróneo de cebadores (Stadhouders et al., 2010). Del mismo modo, puede ocasionar falsos negativos en casos de baja carga parasitaria. (Hirschhorn et al., 2023; Viljoen et al., 2005). Por lo tanto, resulta esencial desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico altamente precisas, rápidas, económicas y adaptables en América Latina, donde la enfermedad es endémica (OPS, 2006). El sistema CRISPR/LbCas12a se presenta como una alternativa sensible y específica para la detección de secuencias objetivo dentro del ADN total. Esta cualidad, ha sido puesta en práctica para la edición de genomas (Y. Chen et al., 2022). Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico de enfermedades se precisa de una amplificación previa de la región objetivo, donde se encuentra diseñada la guía (Kaminski et al., 2021). Esta amplificación puede llevarse a cabo mediante técnicas como PCR convencional, Lamp o

RPA (Y. Li et al., 2019). Con base en lo anterior, este proyecto implementó el sistema de detección CRISPR/LbCas12a, en muestras de ADN de intestino del vector *Rhodnius pallescens* con presencia del parásito *Trypanosoma cruzi*. Principalmente, el diseño tiene como fin crear un sistema de detección por corte específico con la capacidad de detectar la presencia del parásito en muestras de ADN. Como método de amplificación se empleó la amplificación por PCR en los genes *Cytb*, *18s* y *H2A* de *Trypanosoma cruzi*. Estos genes seleccionados han sido previamente utilizados en la literatura para la identificación del parásito por PCR, (Brisse et al., 2001, 2003; Pavia et al., 2007)). El problema de investigación se fundamenta en la importancia de establecer un sistema de detección altamente específico, sensible, rápido, programable, económico y adaptable, que pueda ser usado para el diagnóstico de enfermedades de alta prevalencia en Colombia como el caso Chagas.

Antecedentes

Enfermedad de Chagas

El mal de Chagas es generado por el *Trypanosoma cruzi* y se transmite por insectos de la subfamilia Triatominae (Kollien & Schaub, 2000). Es una enfermedad de gran importancia para la salud pública en Latinoamérica (Moncayo & Silveira, 2009). Los estudios epidemiológicos de esta enfermedad se dividen en áreas endémicas y no endémicas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en todo el mundo existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas por el parásito, de las cuales cada año

fallecen alrededor de 10.000 personas (WHO, 2002). Las áreas de mayor endemismo a nivel mundial se encuentran en Latinoamérica, pero por el modelo migratorio, países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, y Japón, presentan riesgo de transmisión, incluso en países como África se han reportado casos de la enfermedad (Palmezano Díaz et al., 2015). Según datos del Instituto Nacional de Salud, la enfermedad de Chagas en Colombia tiene una prevalencia estimada entre 700.000 y 1.200.000 personas infectadas. Además, se considera que 8.000.000 de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad (Instituto Nacional De Salud, 2017).

Vectores

Los insectos que cargan el parásito *Trypanosoma cruzi*, popularmente conocidos como “pitos” en Colombia, son insectos que se alimentan con sangre y se encuentran clasificados en la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Los géneros más relevantes en América latina son *Triatoma infestans* (Klug), *Rhodnius prolixus* (Stål), *Triatoma dimidiata* (Latreille), y *Triatoma brasiliensis* (Neiva) (Otálora-Luna et al., 2015). Los triatominos tienen metamorfosis incompleta y pasan por huevo y por estadios ninfales antes de llegar a adultos. Todos los estadios son susceptibles de infectarse con *T. cruzi* (Instituto Nacional De Salud, 2017). En Colombia, los vectores del parásito son *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus*, *Triatoma venosa*, y *Rhodnius pallescens* (Esteban et al., 2017).

Agente etiológico

Trypanosoma cruzi pertenece al orden Kinetoplastida, es un parásito unicelular flagelado con un kinetoplasto el cual es una masa de ADN circular con múltiples copias del ADN mitocondrial, este orden incluye también al género *Leishmania* sp causante de la enfermedad de Chagas (Carrada-Bravo, 2004). Cuando se encuentra dentro del vector, inicia su estadio infectivo, posteriormente pasa a mamíferos donde el vector hematófago realiza la picadura y defeca, el mamífero se infecta de las heces con el parásito que se encuentran cerca a la herida (Vidal-Acosta et al., 2000). Sus hospederos silvestres pueden ser los armadillos, los marsupiales y algunos primates. Sin embargo, se pueden observar en reservorios domésticos como perros, gatos y roedores (Sánchez & Russomando, 2012). En los humanos, el parásito puede transmitirse desde los triatominos o pasarse por transfusiones de sangre contaminadas, incluso directamente de la madre (Brenner, 1982). De acuerdo con la guía para la vigilancia del *Trypanosoma cruzi* del Instituto Nacional de Salud, se tiene una presentación morfológica caracterizada por tres estadios: la forma Amastigote, Epimastigote y Tripomastigote. En la forma de Amastigote mide entre 1.5 a 4.0 μm , el parásito no tiene flagelos y su ubicación es intracelular. El estado epimastigote posee flagelos y se encuentra en el triatomino. Por medio del proceso denominado metaciclologénesis, el estadio parasitario Amastigote se transforma en la etapa infectiva: Tripomastigotes metacíclicos. Finalmente, en la fase Tripomastigote metacíclico, su

morfología es fusiforme, mide aproximadamente entre 12 a 30 μm , (Instituto Nacional de Salud, 2017). El genoma de *T. cruzi* fue secuenciado completamente en el año 2005 por (El-Sayed et al., 2005). En su estudio sugiere que se compone de 110 Mb y 22.570 genes que codifican para RNAs y proteínas. Además, alrededor del 50% de su genoma está compuesto de secuencias repetitivas. El ADN mitocondrial o ADN del kinetoplasto está compuesto de maxi círculos y mini círculos con secuencias repetitivas. La cantidad de cromosomas de la especie varía con el linaje de *Trypanosoma cruzi* y se estima entre 28 y 30 en el linaje tipo II y entre 17 y 22 en el linaje tipo I. Sin embargo, depende de la variación alélica y su alto porcentaje de secuencias repetitivas, (Gutierrez & Monteón Padilla, 2008; Souza et al., 2011).

Vías de transmisión y fases de la enfermedad

Las formas principales de contagio de la enfermedad de Chagas son la transfusional, la transplacentaria, la vectorial, los accidentes de laboratorio y los trasplantes de órganos infectados (Toso M et al., 2011). La transmisión vectorial ocurre cuando el triatomino se alimenta y defeca cerca de la herida que genera el sitio de succión, el paciente internaliza el parásito a través del prurito (de Noya & González, 2015). En mamíferos salvajes que actúan como reservorio del parásito, el vector infecta por picadura y deposición de heces, principalmente a roedores que construyen nidos (Noireau et al., 2009) . Otras formas de infección, como la transmisión por vía oral, pueden producir brotes de la enfermedad, ocasionando altas tasas de mortalidad. Esta dispersión masiva de casos de Chagas, no

puede ser asociado a la transmisión vectorial (Velásquez-Ortiz & Ramírez, 2020). La transmisión oral ocurre por el consumo de alimentos contaminados por heces del vector, o secreciones de reservorios animales como las zarigüeyas (Barrett et al., 2003). De acuerdo con el estudio de Rassi et al , en la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases clínicas: La primera en presentarse es la fase aguda, en las dos semanas iniciales los pacientes pueden ser asintomáticos o provocar fiebres leves (Rassi et al., 2010). En la fase aguda se ocasionan las muertes de la enfermedad. Sin embargo, menos del 10 % de los afectados fallecen. La segunda es la fase crónica, menos del 40% de los infectados la padecen y se caracteriza por afectaciones en el colón, corazón y sistema digestivo.

Métodos diagnósticos

Métodos parasitológicos directos

En la identificación del *Trypanosoma cruzi* mediante la observación directa por microscopía o herramientas moleculares se encuentran seis métodos: La observación microscópica al fresco, el método de concentración, gota gruesa, el xenodiagnóstico, la PCR, la PCR tiempo real y la PCR digital (Apt B et al., 2008). La observación microscópica al fresco se realiza en una muestra de sangre extendida en una placa y es examinada bajo el microscopio (WHO, 2002). No requiere de equipos o reactivos de difícil

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

acceso y permite diagnosticar con rapidez. Sin embargo, su sensibilidad es baja y es susceptible a falsos negativos (Kirchhoff et al., 1996).

En el método de concentración se ejecuta una búsqueda de los parásitos en una muestra obtenida a partir de un microhematocrito (Torrico et al., 2005). Es un método sensible, rápido y económico (Vera-Ku et al., 2019). No obstante, se han encontrado inconvenientes en la detección por infección congénita del parásito (Bua et al., 2013). En la técnica de la gota gruesa se observan los Tripomastigotes en una placa con más de tres gotas de sangre teñidas con un colorante que facilita la visualización al microscopio (Carrada-Bravo, 2004). Sin embargo, es una técnica económica y rápida, pero de baja sensibilidad, es posible que genere falsos negativos y requiere de un personal capacitado (Pereira et al., 2022).

El xenodiagnóstico provee un diagnóstico en el vector, consiste en buscar el parásito en los excrementos de las ninfas de los triatomos que han succionado sangre de pacientes (Añez et al., 2009). Sin embargo, presenta una baja sensibilidad, requiere de una colonia y personal capacitado (Carvalho et al., 1993). La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se centra en el uso de cebadores que contienen secuencias complementarias a regiones en el genoma del *Trypanosoma cruzi* que indica la presencia del parásito (Britto et al., 1995). La principal ventaja de la PCR es la amplificación de una secuencia de ADN diana en el parásito, visualizada en un gel de electroforesis. Viljoen et al, describe algunos inconvenientes cómo la susceptibilidad a contaminantes dada su alta sensibilidad y la vulnerabilidad a las condiciones de temperatura, ciclos y preparación durante el procedimiento que precisa de una estandarización (Viljoen et al., 2005). De la misma forma, la PCR es susceptible a falsos positivos, dada que los cebadores (primers) presentan

alta tolerancia a secuencias no complementarias. Por lo anterior, es posible que amplifique ADN no correspondiente (Seiringer et al., 2017).

Finalmente, la qPCR cuantifica la carga parasitaria del paciente, al igual que la PCR, se utilizan cebadores para la amplificación de regiones en el genoma del *Trypanosoma cruzi* (Cummings & Tarleton, 2003). Es altamente sensible a pequeñas concentraciones de ADN, a diferencia de la PCR no requiere de un gel de agarosa para visualizar los resultados. No obstante, requiere un equipo costoso y de un personal capacitado con conocimiento técnico, dada su sensibilidad, y también es susceptible a contaminación cruzada (Padhi et al., 2020).

Métodos Serológicos

La Organización Mundial de la Salud, en su segundo reporte del control de la enfermedad de Chagas, indica tres pruebas indirectas para la detección del parásito: La inmunofluorescencia indirecta, La hemaglutinación indirecta, y el ensayo de ELISA (WHO, 2002). Las pruebas serológicas son sensibles en la localización de anticuerpos o proteínas específicas contra un patógeno. Por consiguiente dependen del tiempo de aparición de los mismos. Igualmente, la presencia de los anticuerpos puede darse en casos donde ya no exista parasitemia. El ensayo de ELISA lleva a cabo una prueba de identificación de anticuerpos ligados a enzimas, especialmente los colinérgicos muscarínicos, que fueron descritos por Borda et al, debido a que aumentan en presencia del parásito en el Chagas crónico (Borda et al., 1991). La prueba de hemaglutinación indirecta hace uso de los antígenos solubles del sobrenadante del lisado de Epimastigotes (Schmunis, 1991) La inmunofluorescencia indirecta detecta los anticuerpos IgM en suero sanguíneo

producido por la infección aguda de la enfermedad (Apt B et al., 2008). Es una técnica más precisa y sensible, capaz de detectar en bajas concentraciones (Gilber et al., 2013). Sin embargo, estas técnicas son susceptibles a errores dado que los anticuerpos encontrados pueden ser producto de la presencia de *Leishmania* sp (Gomes et al., 1999), (Malan et al., 2006).

Diagnóstico mediante sistemas CRISPR/ Cas

El acrónimo de CRISPR fue designado para describir secuencias repetitivas palindrómicas cortas agrupadas regularmente e inter espacialmente encontrados en la década de los 80s en taxones de algunas procariotas (Jansen et al., 2002). Posteriormente, se descubrió que la función del locus CRISPR se relaciona con la defensa natural contra bacteriófagos en arqueas y bacterias (Barrangou et al., 2007). Luego, de tener más claridad sobre su caracterización genética se logró usar ese sistema de defensa bacteriano como un método programable de ARN guía que dirige a la endonucleasa Cas9 para cortar en una secuencia de ADN doble cadena específica (Jinek et al., 2012). A partir del 2012, el sistema CRISPR ha sido implementado en diferentes usos como en la edición de genes, regulación génica, epigenética y en plantas en producción de cultivos mejorados. El sistema funciona empleando una proteína Cas y un ARN guía que se acopla a la proteína. La región de acoplamiento de la guía en el ADN objetivo debe tener una región PAM (proto-adjacent-motive) de tres a cuatro nucleótidos, que permite la activación del corte en la proteína Cas (Nidhi et al., 2021). Los sistemas de diagnóstico con CRISPR son

potencialmente sensibles, económicos y adaptables (Uppada et al., 2018). Se han implementado desde el año 2016 primeramente para la detección del virus del Zika usando la proteína Cas9 (Pardee et al., 2016). Posteriormente, se descubrió una nueva habilidad, aparte de realizar el primer corte en la secuencia complementaria a la guía (corte *Cis*), se conoció el corte colateral (corte *Trans*), adicional al ADN objetivo que fue descrita en la endonucleasa Cas 13 (Abudayyeh et al., 2016), lo cual permitió el avance de sistemas de detección con fluorescencia empleando el corte colateral en cadenas de ARN con Quencher y Reportero (East-Seletsky et al., 2016). Seguidamente, inició el empleo de sistemas de diagnóstico con variantes de la proteína Cas 13 tales como SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) y HUDSON-SHERLOCK (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases) con alta especificidad (Kellner et al., 2019; Myhrvold et al., 2018). Paralelamente, se descubrió que la proteína Cas 12 presentaba la facultad de generar un corte colateral al escindir secuencias de ADN objetivo con el sistema DETECTR (S.-Y. Li, Cheng, Liu, et al., 2018)). El corte colateral de la Cas 12 se aplicó como biosensor para detectar secuencias de ADN blanco de parásito o virus que ocasionan enfermedades, primero se empleó en la tecnología HOLMES (an one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System) (S.-Y. Li, Cheng, Wang, et al., 2018), que requiere de una amplificación previa por PCR del sitio objetivo. Seguidamente, se diseñó el método de DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter) que utiliza una amplificación isotérmica y rápida con RPA, usando la proteína LbCas12a. (J. S. Chen et al., 2018). El sistema de corte con CRISPR/LbCas12a, efectúa el corte a 18 nucleótidos del sitio de reconocimiento PAM en sentido 5' prima. Un aspecto a resaltar es que los

sistemas CRISPR pueden ser complementados con los métodos tradicionales, con el objetivo de optimizar la precisión, acelerar el diagnóstico efectivo y reducir los costos.

En parásitos, los sistemas de diagnóstico CRISPR se han implementado en la detección de los parásitos responsables de la Leishmaniasis, principalmente en la detección de la especie *Leishmania donovani* (Gao et al., 2022) y del subgénero *Viannia* (Dueñas et al., 2022). Para generar una detección precisa se han buscado secuencias preservadas en genes de la subunidad 18s ribosomal, ADN del kinetoplasto, el espaciador interno transcripcional (ITS) y la proteína HSP70 de choque térmico. Para *L. donovani* se empleó el sistema GsubCas12, en el cual la proteína corta una secuencia objetivo del parásito y en su corte colateral escinde el complejo G4, una estructura tridimensional compuesta de cuatro guaninas con la capacidad de catalizar la oxidación de la resorufina, causando fluorescencia. En las especies del subgénero *Viannia* como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) amazonensis*, *L. (V.) donovani*, *L. (V.) major* y *L. (V.) infantum*, se empleó el método de detección por fluorescencia. Este sistema de detección realmente es una consecuencia de la localización del blanco lo cual activa un corte colateral con la Cas 12 escindiendo la secuencia de ADN objetivo dirigido por el ARN guía. Actualmente, no existen estudios para la detección de *T. cruzi* con el sistema CRISPR/Cas, sin embargo, se ha empleado el sistema SHERLOCK4HAT (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing for Human African Trypanosomiasis) para el diagnóstico a *Trypanosoma brucei*, causante de tripanosomiasis africana humana (Sima et al., 2022).

Justificación

La enfermedad de Chagas en Colombia pone en riesgo la vida de 8 millones de personas. Por consiguiente, La ejecución de este proyecto pretende contribuir en el desarrollo de herramientas de identificación novedosas que propicien un diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* empleando nuevas técnicas de diagnóstico como el sistema CRISPR/Cas, con la adaptabilidad de un método altamente programable y preciso. El cual pueda determinar la presencia del parásito de manera visual, contribuyendo a la identificación, diagnóstico y confirmación de la enfermedad. Lo cual, le permita a médicos especialistas emplear un tratamiento propicio en laboratorios de cualquier nivel, que no requiera de la implementación de equipos especializados, con tiempos de identificación cortos y con un coste de ejecución asequible, especialmente en América Latina, donde la enfermedad es endémica y de alta prevalencia.

Objetivos

General:

Diseñar un sistema CRISPR/LbCas12a de detección de ADN por corte específico en los genes *18s*, *H2A* y *CyB* de *Trypanosoma cruzi* que determine la parasitemia en muestras de intestino de *Rhodnius pallescens*.

Específicos:

- Diseñar y evaluar cebadores que posibiliten la amplificación de los genes objetivos con los puntos de corte de las sgRNAs.
- Establecer y evaluar sgRNAs específicas para la detección de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius pallescens* utilizando el sistema CRISPR/LbCas12a en los genes *18s*, *H2A* y *Cytb*.
- Describir las diferencias en los cortes entre los productos amplificados y el ADN total extraído de los intestinos de *Rhodnius pallescens*.
- Realizar un modelo comparativo entre de ventajas y desventajas del uso de la técnica PCR (Gold Standar) y el sistema CRISPR en muestras de ADN correspondiente a *Trypanosoma cruzi*.

Metodología

Extracción de ADN del parásito a partir de intestinos de *Rhodnius pallescens*

La recolección de los individuos de la especie *Rhodnius pallescens* se llevó a cabo por personal del Laboratorio de Entomología Médica entre noviembre del 2021 y febrero de 2022. La colecta se efectuó con trampas tipo Ángulo, en tres fragmentos de bosques en sectores del área metropolitana de Bucaramanga. Se colectaron 12 individuos en el barrio de Pan de azúcar, ocho en Limoncito y seis en Bucarica. La extracción de ADN se realizó con el Kit de extracción Quiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit), a partir de la disección del intestino superior. Posteriormente, el ADN extraído fue almacenado a -20 °C. El ADN extraído y la colecta de los insectos hizo parte de la tesis de maestría en microbiología de la estudiante Juliana cuadros que se encuentra en proceso de sustentación. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) el día 27 de agosto de 2021, **Anexo 5**. “Análisis metagenómico del intestino medio y posterior de *Rhodnius pallescens* (Barber, 1932) en insectos de laboratorio y silvestres colectados en Bucaramanga y su área metropolitana”.

Diseño y evaluación de cebadores

En el diseño de cebadores se utilizó el programa el Benchling, considerando un porcentaje de Guanina-Citocina entre el 40-60%, diferencias de melting menor a 5° C y un análisis en BLAST que asegurara una identidad del 100% en *Trypanosoma cruzi*. Se seleccionaron tres genes que han sido empleados en la literatura para la identificación del parásito mediante PCR: el gen Citocromo B (*Cytb*) (Brisse et al., 2003), el gen de la subunidad ribosomal pequeña (*18s*) (Brisse et al., 2001) y el gen de Histona (Pavia et al., 2007).

Una vez terminado el diseño computacional, se procedió con la amplificación mediante PCR empleando la polimerasa 2x Master mix Q5 NEB y un termociclador BIORAD. Las temperaturas de alineamiento de los genes fueron de 63 °C para *Cytb*, 72°C en el *18s* , 62° en el *H2A* como se estableció en la aplicación NEB TMcalculator. Para cada muestra, se agregó al mix 2 uL del ADN extraído de los intestinos de *Rhodnius pallescens* con una concentración de 18 ng/uL. La visualización de los amplificados se efectuó en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe. Las condiciones de la electroforesis se aplicaron a 100 voltios, 90 miliamperios en 50 minutos. Como control negativo, se emplearon los cebadores diseñados en ADN de *Rhodnius prolixus*, *Lesihmania infantum*, *Trypanosoma theileri* y *Lutzomya* sp.

Diseño de ARN Guías

Las especificaciones de las ARN guías se basaron en el método descrito por J. S. Chen et al. Se diseñaron en el programa CHOPCHOP, con un tamaño de 24 pares de base y un PAM

TTTTV (J. S. Chen et al., 2018). Las guías seleccionadas se diseñaron específicamente para *Trypanosoma cruzi* en las regiones de los genes seleccionados, con una baja probabilidad de acoplamiento en otras regiones del genoma. Seguidamente, se filtraron los diseños con mejores porcentajes de eficiencia y baja probabilidad de apareamiento en ADN no correspondiente en el programa BLAST para seleccionar el diseño más óptimo.

Evaluación del corte en el amplificado por visualización en gel

La evaluación del corte en el amplificado se empleó con base a la metodología establecido en el protocolo de New England Biolabs (M0653) para la digestión in vitro de ADN con el sistema CRISPR/LbCas12a, con modificaciones en la concentración durante la estandarización del método. Para la preparación del mix en se empleó 6 uL de la LbCAS12a a 300 nM, 6 uL de ARN guía a 300 nM, 6 uL del buffer de reacción de NEB en un volumen final de 30 uL. Seguidamente, se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 3 uL del ADN amplificado de cada gen en una concentración final de 40 ng/uL. Finalmente, se incubó a 37° C por 10 minutos. En la visualización del corte se tomaron 15 uL y se sembraron en un gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR SAFE, como se observa en la **Figura 1**. El tamaño de la banda fue estimado con un marcador de peso y analizado en el programa Gelanalyzer.

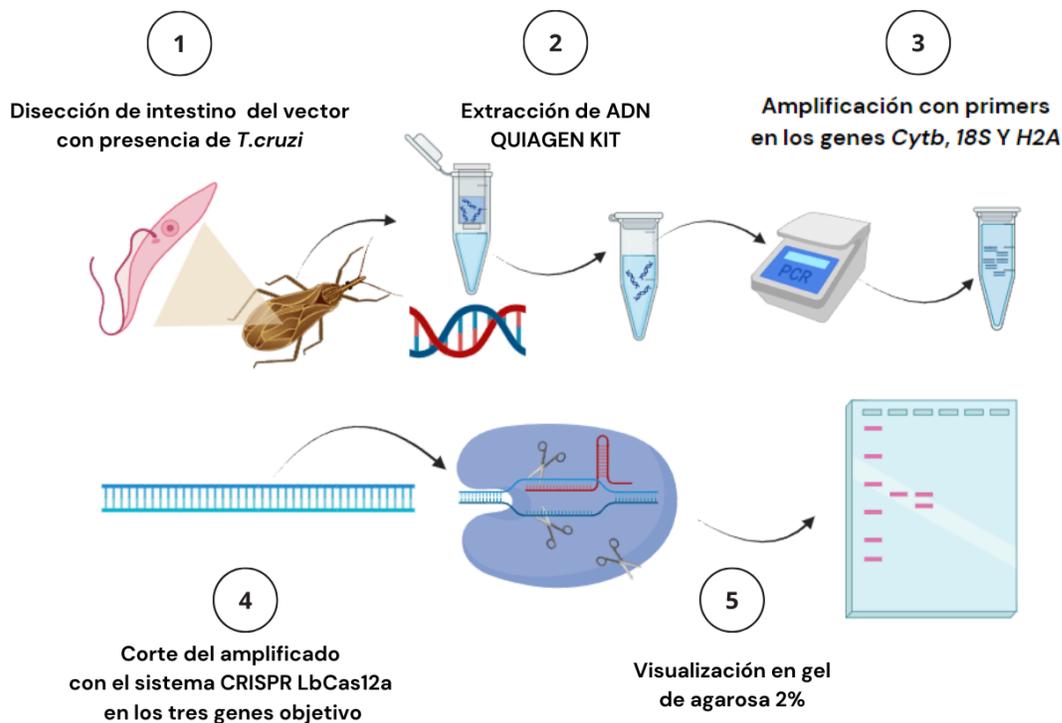


Figura 1. Flujo de trabajo para la detección por corte de *T. cruzi* en muestras de intestino de *R. palllescens*. 1. Disección de intestino medio y superior. 2. Extracción de ADN del intestino empleando Kit Quiagen. 3. Amplificación por PCR empleando los cebadores diseñados para cada gen. 4. El ADN amplificado producto de la PCR se agrega al mix de CRISPR/LbCas12a para ser cortado. 5. Visualización por bandas en un gel de agarosa al 2%.

Evaluación del corte en el amplificado por reportero fluorescente

El diseño del sistema de fluorescencia se basó en el enfoque de J. S Chen et al, de usando el reportero fluorescente 56-FAM/TTATT/3IABkFQ (J. S. Chen et al., 2018). Las concentraciones del reportero fluorescente, ARN guía y la proteína LbCas12a fueron adaptados de (Lee et al., 2020). La concentración del reportero fue ajustada a 600 nM, mientras que para la ARN guía y la LbCAS12a se empleó una concentración final de 360

nM. Además, se empleó un volumen correspondiente al agregado para la LbCas12a del buffer NEB, en un volumen final 50 uL. Posteriormente, se agregó el ADN amplificado para cada gen, con una concentración final de 40 ng/uL. La mezcla se dispuso en placas oscuras y se midió usando una longitud 485 nm de excitación de 530 de absorbancia en un espectrofotómetro SYNERGY H1. La medición se realizó durante dos horas cada tres minutos, con intervalos de 40 segundos de agitación entre cada medida, manteniendo una temperatura constante de 37° C. Finalmente, las muestras obtenidas se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta que permitió la identificación visual de las muestras positivas como se observa en la **Figura 2**.

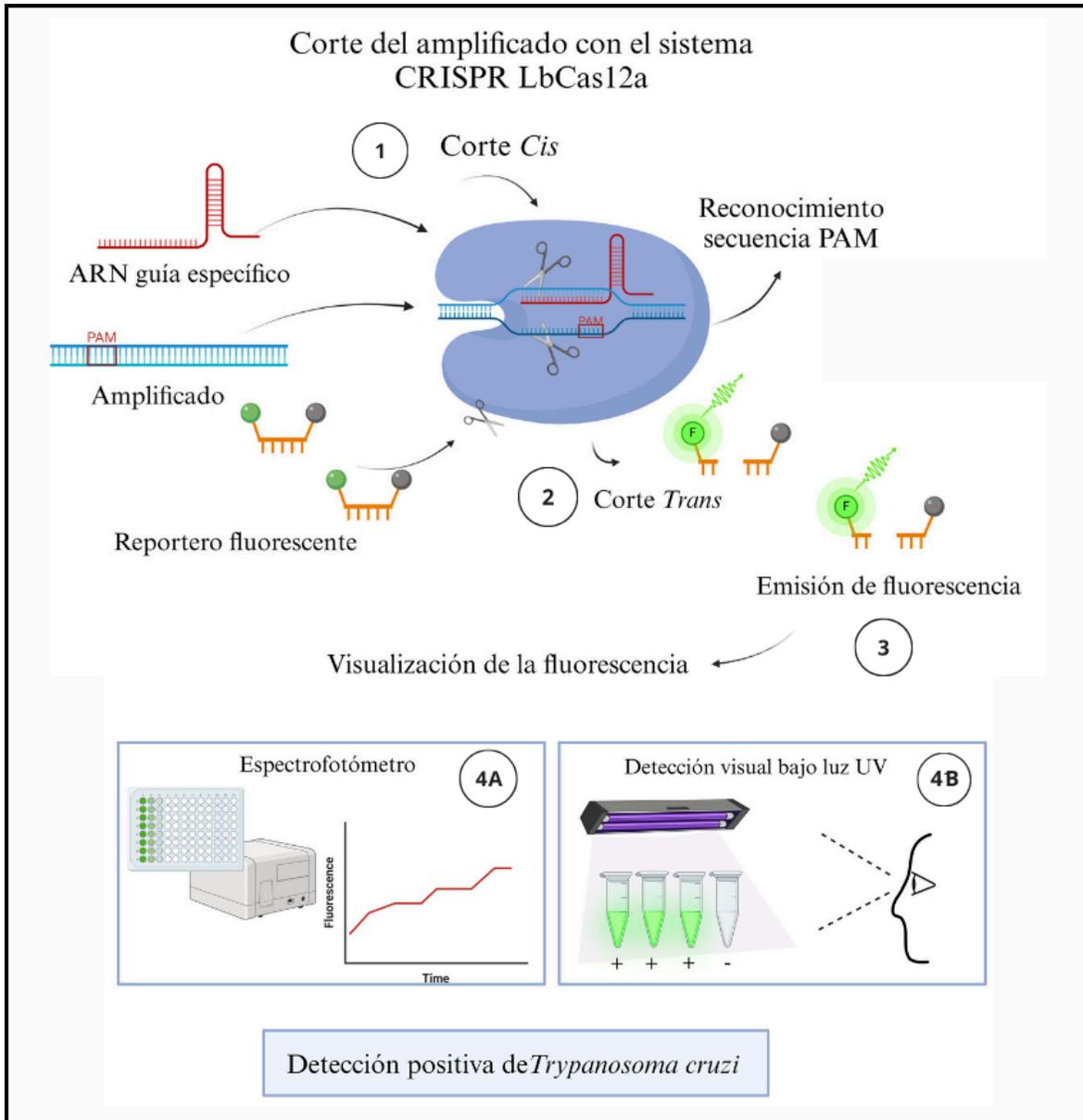


Figura 2. Visualización del corte de amplificado por reportero fluorescente. **1.** El producto amplificado de la PCR es cortado por el sistema CRISPR/LbCas12a produciendo el primer corte en *CIS*. **2.** Activación del sistema de corte colateral en *TRANS*, permite el corte de secuencias pequeñas y monocatenarias como el reportero fluorescente. **3.** El quencher se separa del fluoróforo permitiendo la emisión a 530 nm. **4A.** Se observa la emisión de la fluorescencia empleando una placa de 96 pozos en un espectrofotómetro. **4B.** Visualización de los tubos con ADN amplificado que activaron el sistema fluorescencia en luz ultravioleta.

Evaluación de la sensibilidad del sistema CRISPR/LbCas12a

Para evaluar la sensibilidad del sistema se diluyó el ADN amplificado a concentraciones finales de 40 ng/uL, 20 ng/uL, 10 ng/uL, 5 ng/uL, 1 ng/uL. Se verificó el corte por visualización en gel, emisión de fluorescencia en espectrofotómetro e identificación visual bajo luz ultravioleta.

Evaluación del corte en ADN total

El sistema de corte fue evaluado en el ADN total extraído del intestino de *Rhodnius pallescens* con presencia del parásito. Se ajustó el protocolo de corte del amplificado adicionando 10 uL del ADN total a una concentración de 18 ng/uL, a un volumen final de 30 uL con el sistema CRISPR/LbCas12a. Las pruebas se compraron contra el ADN total sin el sistema corté. La evaluación del corte se realizó en gel de agarosa al 2% y por corte del reportero fluorescente en el espectrofotómetro e identificación visual bajo luz ultravioleta.

Análisis estadístico

Los ensayos de fluorescencia en espectrofotómetro, del corte de las guías *Cytb*, *18s* y *H2A* se realizaron por triplicado. Del mismo modo, se evaluó por triplicado las diluciones del amplificado del gen *Cytb* y los ensayos de fluorescencia en ADN directo. Se realizó una

prueba de normalidad de Kosmogorov Smirnov a los ensayos de fluorescencia. Por lo tanto, se implementó la prueba estadística de Kruskal Wallis en los datos no paramétricos, para corroborar la homogeneidad de las réplicas y una prueba post hoc de Dunnes. En los datos paramétricos se realizó una ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. Todos los análisis se usaron ejecutaron en el programa Statistica Versión 10. Los datos crudos se dividieron sobre el blanco de cada ensayo para obtener las gráficas de normalización de los datos.

Comparación de métodos de Diagnóstico

Basado en análisis bibliográfico, se diseñó una tabla comparativa entre los métodos de diagnóstico empleados para la identificación de *T. cruzi* y el sistema CRISPR/Lb Cas12a. La tabla comparativa se dividió en seis categorías: Tiempo de ejecución, facilidad de ejecución, precio, sensibilidad a baja parasitemia, probabilidad de falsos negativos y probabilidad a falsos positivos. Cada categoría se dividió en 3 clasificaciones que agrupan los métodos de diagnóstico dependiendo del beneficio que tenga en la categoría como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Empleando un análisis bibliográfico se establecieron criterios de comparación para categorizar y clasificar los métodos de diagnóstico de *T. cruzi*. El color azul indica un posible beneficio del método, el color rojo advierte de una posible desventaja del método. El color amarillo indica neutralidad.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
 MODALIDAD INVESTIGACIÓN
 ESCUELA DE BIOLOGÍA

Criterios de comparación de métodos de diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i> basado en análisis bibliográfico		
Tiempo de ejecución		
Corto	Moderado	Prolongado
1 hora	1-2 horas	2-4 horas
Facilidad de ejecución		
Fácil	Moderada	Difícil
Bajo conocimiento técnico	Conocimiento técnico estándar	Conocimiento especializado
Equipos accesibles	Equipo técnico	Equipos o materiales específicos
Interpretación de datos básica	Mayor interpretación de datos	Interpretación especializada
Precio		
Bajo	Moderado	Alto
Menor a 100.000 \$/ Equipos no especializados	Menor a 200.000 \$/ Equipos especializados	Mayor a 200.000 \$/ Equipos especializado
Sensibilidad a baja parasitemia		
Eficiente	Moderada	Reducida
Permite detectar pequeñas concentraciones de ADN o Antígenos	Dificultad en bajas concentraciones de ADN o Antígenos	Ineficaz para identificar pequeñas concentraciones de material biológico
Probabilidad de falsos positivos		
Baja	Moderada	Alta
Precisión en discernir material biológico específico	Dificultad para diferenciar material biológico específico	Ineficaz para asegurar con precisión la presencia del parásito
Probabilidad de falsos Negativos		
Baja	Moderada	Alta
Sensibilidad para corroborar la ausencia de material biológico específico	Dificultad para detectar la ausencia del parásito	Ineficaz para asegurar con precisión la ausencia del parásito

Resultados

Objetivo 1: Diseñar y evaluar cebadores que posibiliten la amplificación de los genes objetivos con los puntos de corte de las sgRNAs

Los cebadores del gen Citocromo B se tomaron de (Brisse et al., 2003), La secuencia Forward 5' GACAGGATTGAGAAGCGAGAGAG '3 con 23 pares de bases, un % GC de 52.17 y Tm de 56.6 °C. El cebador Reverse 5' CAAACCTATCACAAAAGCATCTG 3' con secuencia de 24 pb, GC% 37.5 y Tm de 53.1 °C.

En el gen *I8s* empelado por (Brisse et al., 2001) para la identificación de *T. cruzi* se diseñó un juego de cebadores con una amplificación de 664 pares de bases. El primer forward tiene una longitud de 22 pares de bases, un porcentaje de guanina citocina (GC%) del 59 %, y temperatura de melting (Tm) de 61.5 °C con la secuencia: 5' ATGTTCTCTGTTCCGGCGGCAG '3 . De la misma manera, el primer reverse contiene una longitud de 22 pares de bases, GC% del 59.09%, Tm de 62 °C y una secuencia 5' AAAAATCACGGGCGCCCTCTGG 3'.

El diseño de los cebadores en el *H2A* se efectuó tomando como partida el estudio de (Pavia et al., 2007). El amplificado presentó un tamaño de 843 pares de bases. El cebador forward se diseñó con un tamaño de 20 pares de bases, un GC% de 45, y un Tm de 52.1 °C con secuencia 5' GTTTTTCGCAGACAAGGATG '3. De la misma manera, el cebador Reverse

se diseñó con un tamaño de 20 pares de bases un GC% de 45% y un Tm de 51.6 con secuencia 5' TTA CTTACGAAGTGGCAGAC '3.

Los cebadores diseñados se analizaron en BLAST para corroborar la especificidad del diseño para *T. cruzi*. Las secuencias de los cebadores se compararon contra el ADN de las especies *Rhodnius prolixus*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma theileri* y *Lutzomyia* sp., usadas como control negativo. **Tabla 2.**

Tabla 2. Tabla de análisis de cebadores empleados para la amplificación en ADN de *Trypanosoma cruzi*. Las especies evaluadas en las tablas se usaron como control negativo de la amplificación. El porcentaje de cobertura indica la cantidad de bases seguidas que comparte con el ADN de referencia, donde exista 100% de identidad. El porcentaje de identidad, es indica el porcentaje de bases idénticas dentro de un segmento. El número de bases compartidas es la cantidad de bases seguidas que se relaciona un segmento referencia comparado con el ADN analizado.

	Análisis de especies en BLAST cebadores <i>Cytb</i>					
	Forward			Reverse		
	5' GACAGGATTGAGAAGCGAGAGAG '3			5' CAAACCTATCACAAAAAGCATCTG 3'		
Especie	% Cobertura	% Identidad	Número de pb compartidas	% Cobertura	% Identidad	Número de pb compartidas
<i>Trypanosoma theileri</i>	100	100	23	100	100	24
<i>Leishmania infantum</i>	100	100	23	100	94	24
<i>Rhodnius pallescens</i>	69	100	9	41	100	9
<i>Lutzomyia</i> sp.	69	100	15	100	100	17

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
 MODALIDAD INVESTIGACIÓN
 ESCUELA DE BIOLOGÍA

	Análisis de especies en BLAST cebadores <i>I8s</i>					
	Forward			Reverse		
	5' ATGTTCTCTGTTCCGGCGGCAG '3			5' AAAAATCACGGGCGCCCTCTGG 3'		
Especie	% Cobertura	% Identidad	Número de pb compartidas	% Cobertura	% Identidad	Número de pb compartidas
<i>Trypanosoma theileri</i>	77	100	17	100	100	22
<i>Leishmania infantum</i>	95	100	15	100	100	15
<i>Rhodnius pallescens</i>	54	100	9	72	100	8
<i>Lutzomyia</i> sp.	100	100	15	100	100	14

	Análisis de especies en BLAST cebadores <i>H2A</i>					
	Forward			Reverse		
	5' GTTTTTTCGACAGACAAGGATG '3			5' TTACTTACGAAGTGGCAGAC '3		
Especie	% Cobertura	% Identidad	Número de pb compartidas	% Cobertura	% Identidad	Número de pb compartidas
<i>Trypanosoma theileri</i>	60	100	12	85	100	17
<i>Leishmania infantum</i>	100	100	14	90	100	14
<i>Rhodnius pallescens</i>	40	100	8	35	100	7
<i>Lutzomyia</i> sp.	100	100	14	100	100	14

Evaluación de la amplificación por PCR de los cebadores

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de los cebadores diseñados para los genes *Cytb*, *18s* y *H2A* en diferentes muestras de ADN control, tal como se ilustra en la **Figura 3**. Los amplificadores resultaron positivos en las muestras de *T. cruzi* de intestino de *R. pallescens*, con menor intensidad a una concentración de 18 ng/uL, mientras en *T. cruzi* de cultivo con una concentración de 50 ng/uL se evidenció una banda fuerte. En *T. theileri* a una concentración de 203 ng/uL, se observó amplificación positiva con bandas débiles con los cebadores de los genes *18s* y *H2A*. De manera similar, con *L. infantum* con una concentración de 9.9 ng/uL se visualizó una amplificación positiva con en el gen *18s* y una amplificación ambigua con el gen *Cytb*. Por otro lado, en *Lutzomya* sp., con una concentración de 3.9 ng/uL, se observó una amplificación debil en el gen *18s* y una amplificación ambigua en el gen *H2A*. Por último, en ADN de *Rhodnius pallescens* con concentración 23.9 ng/uL, no se observó amplificación positiva en los genes.

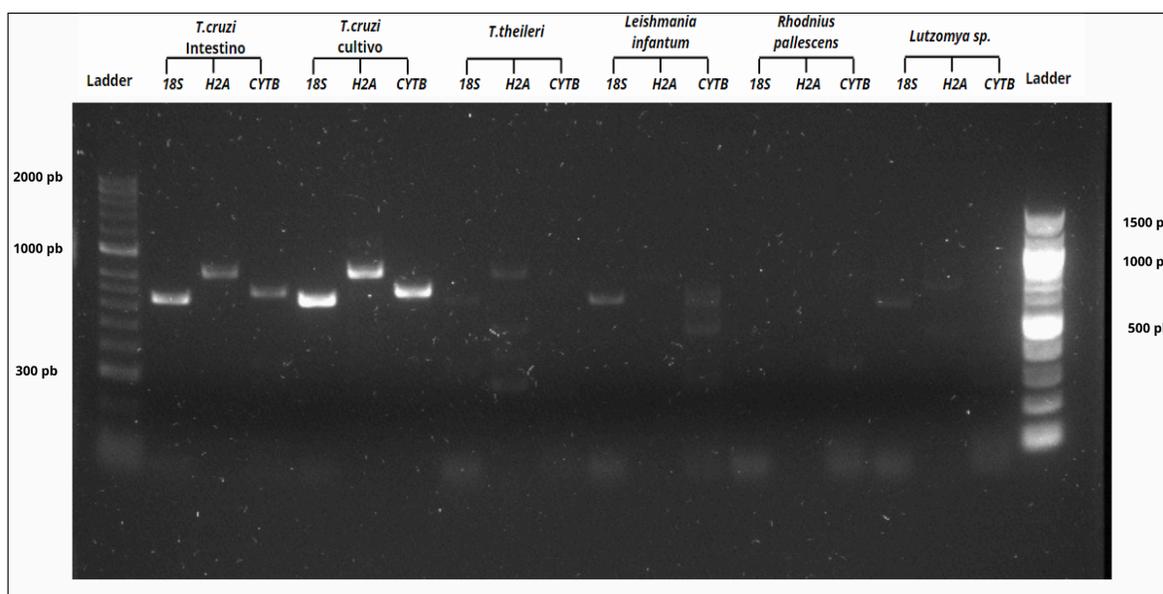


Figure 3. Validación de los cebadores de los genes *Cytb*, *18s* y *H2A* en ADN correspondiente a *T. cruzi* cepa Silvio, *T. cruzi* extraído de intestino de *Rhodnius pallescens*, *Trypanosoma theileri*, *Leishmania infantum*, *Rhodnius pallescens* y *Lutzomya* sp.

Objetivo 2: Establecer y evaluar sgRNAs específicas para la detección de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius pallescens* utilizando el sistema CRISPR/LbCas12a en los genes *18s*, *H2A* y *Cytb*.

El diseño de las guías en la región amplificada por los cebadores correspondientes para cada gen, generó una lista de posibles sitios de acoplamiento donde existieran regiones PAM (TTTV). Se seleccionaron las diez mejores secuencias para cada gen, asegurando que no tuvieran probabilidad de unión a otras regiones del genoma, es decir, con un bajo porcentaje de “Off-target” (interpretación al español como fuera de rango). Posteriormente, se realizó un posterior análisis en BLAST para elegir la secuencia con mayor especificidad para *Trypanosoma cruzi* en la región amplificada de cada gen, como se detalla en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características de las guías diseñadas. La columna “cadena” se refiere al sentido en que se encuentra la guía, si es “Negativa”, se refiere a la cadena complementaria. El “Porcentaje de guanina-citosina” es la cantidad de G y C que hay dentro de la secuencia guía. La “Autocomplementariedad” es la probabilidad de que la guía se complemente con ella misma. La “Eficiencia” se refiere a la probabilidad de que la secuencia guía se complemente con la región objetivo. El “% Off-target” representa el porcentaje de secuencias no diana dentro del ADN total de la especie donde la guía podría unirse.

Secuencia objetivo <i>Cytb</i>	Cadena	% Guanina-Citosina	Autocomplementariedad	Eficiencia	% Off-target
5' TTTGCACAAATAAA ACAACTAAAAACA 3'	Negativa	21	0	63	0
Secuencia objetivo <i>18s</i>	Cadena	% Guanina-Citosina	Autocomplementariedad	Eficiencia	% Off-target
5' TTTCTGAATGTCTG TTCACGGACCACAA 3'	Negativa	46	0	57	0
Secuencia objetivo <i>H2A</i>	Cadena	% Guanina-Citosina	Autocomplementariedad	Eficiencia	% Off-target
5' TTTCTTCATAGGTA CTTTCTACCGTAT 3'	Postiva	33	1	29	0

En el gen Citocromo B se identificaron 65 resultados con baja probabilidad de “off target”. La guía seleccionada se diferenció de otros posibles diseños dado que presentaba la mayor especificidad. Sin embargo, el análisis en BLAST reveló que es una secuencia conservada en el orden Kinetoplastea. Las especies *Leishmania pifanoi* y *T. rangeli*, presentaron un 96 % cobertura. Al realizar el alineamiento se observó una mutación de diferencia en la secuencia guía. De manera similar, al analizar con BLAST la secuencia de *Trypanosoma*

theileri, se encontró una cobertura del 92% y una identidad del 100% en la secuencia **HQ664783.1**. Sin embargo, en otras cepas del mismo estudio indica un porcentaje de cobertura del 92% y una identidad del 92.31%

Para el gen de la subunidad ribosomal *18s* se obtuvieron 35 distintos diseños de guías distintos proporcionados por el programa CHOPCHOP. El criterio se basó en la diferencia de eficiencia entre ellas. Se llevó a cabo un análisis de homología en otras especies con BLAST y se observó que la especie con la que compartía mayor cobertura era *L. chagasi*. Sin embargo, los primeros cuatro nucleótidos correspondientes a la región PAM, necesarios para el reconocimiento de la secuencia, no son iguales en las especies descritas. Igualmente, se analizó la secuencia guía con el *Trypanosoma rangeli*, obteniendo un 42% de coincidencia con con 12 nucleótidos compartidos con la secuencia objetivo. En *Trypanosoma theileri* se obtuvo un 57% compartiendo 16 pares de bases.

En el gen de Histona *H2A* se obtuvieron 28 posibles guías, de las cuales solo 2 no presentaron secuencias off-target. La guía seleccionada mostró el mayor porcentaje de eficiencia. El análisis en BLAST sugiere que la secuencia es única para *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, presenta un 75 % de cobertura con dos especies del género *Seriola* sp., un pez de la familia Carangidae, compartiendo 21 de las 28 bases. Del mismo modo, se encontró similitudes con *Trypanosoma theileri*, presentando un 50% de cobertura con 14 bases compartidas. Con secuencias de *T. rangeli*, se obtuvo el 53% de cobertura con 15 bases compartidas.

Evaluación del corte en el amplificado por visualización en gel

El complejo CRISPR/LbCas12a se aplicó al ADN de *Trypanosoma cruzi* extraídos de los intestinos de *Rhodnius pallescens* en los tres amplificados a una concentración final de 40 ng/uL. En el gen *Cytb*, se produjo el corte del amplificado y se observó dos bandas adicionales que son correspondientes a los fragmentos que deja el sitio de corte de la guía. El fragmento más grande pertenece a una banda de 481 pares de bases, mientras que el segundo fragmento tiene un tamaño de 241 pares de bases, como se observa la **Figura 3A**. En contraste, a pesar de variar las concentraciones de la proteína LbCas12a y la ARN guía correspondiente, no se evidenció corte en los amplificados de los genes *18s* y *H2A* como se observa en la **Figura 4. B-C**.

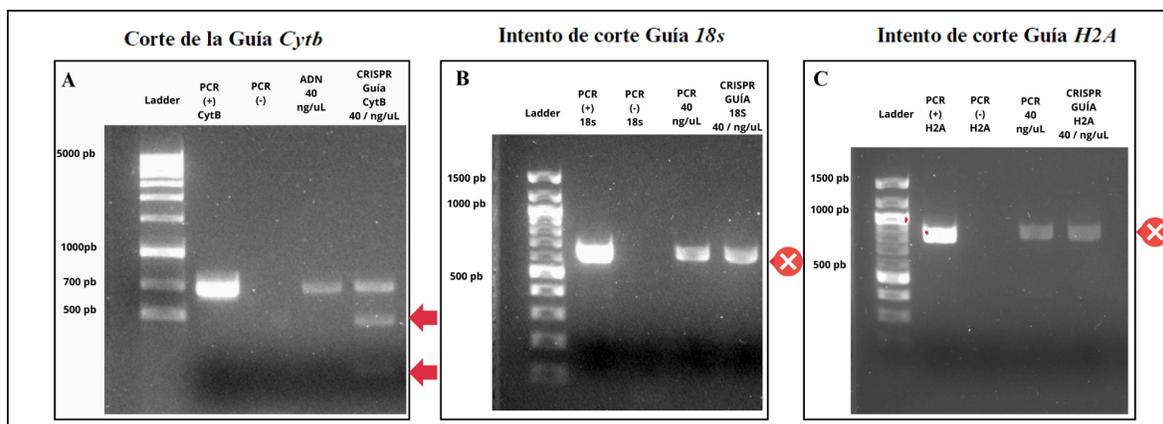


Figura 4. Evaluación del corte en el ADN amplificado. En el carril uno el marcador de peso. El pozo dos la PCR sin el ADN amplificado. El carril cuatro, amplificado, diluido a 40 ng/uL. En el carril 5, evaluación del corte a la concentración de 40 ng/uL. **A.** Evaluación positiva del corte con la guía *Cytb*, las flechas señalan los

dos fragmentos resultado del corte. **B.** Sin evidencia de corte en la guía *18s*. **C.** Sin evidencia de corte en la guía *H2A*. La señal en “X” indica la banda donde no se evidencia el corte.

Las muestras de ADN amplificado de los tres genes fueron sometidas a secuenciación Sanger **Anexo 4**. La secuencia de diseño para la guía *Cytb* fue idéntica al segmento secuenciado en la muestra. En contraste, los resultados revelaron la presencia de mutaciones e inserciones en la región de acoplamiento de las guías *18s* y *H2A* como se observa en la **Figura 5**. Estas alteraciones impidieron el correcto apareamiento de las guías diseñadas con el ADN objetivo, en consecuencia no se produjo la activación del sistema de corte.

uL, el sistema de corte con la ARN guía de *Cytb* generó fluorescencia durante las dos horas de la medición, teniendo su máxima intensidad entre los 30 y 60 minutos después de iniciar la reacción. Los valores obtenidos superaron los 20,000 RFU (Unidades de fluorescencia cruda). En contraste, el sistema evaluado con las guías *18s* y *H2A* no produjeron fluorescencia y presentaron un patrón similar al obtenido con el sistema de corte sin el ADN (**Figura 6**). Posteriormente, el sistema de corte con el ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta, donde se observó la fluorescencia emitida de la ARN guía a 40 ng/uL. A diferencia de las guías *18s* y *H2A* que no activaron el sistema fluorescente (**Figura 7**).

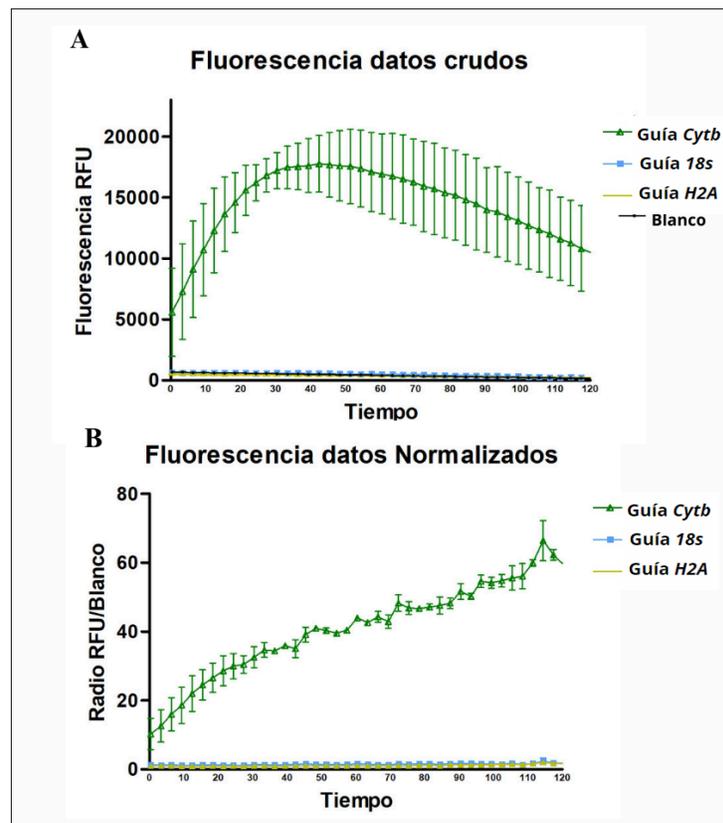


Figura 6. A. Datos crudos de fluorescencia de las guías *Cytb*, *18s* y *H2A*. RFU (RAW FLUORESCENCE UNITS) Unidades de fluorescencia cruda. B. Fluorescencia datos normalizados. fluorescencia en las tres guías dividido sobre los datos del blanco sin el ADN.

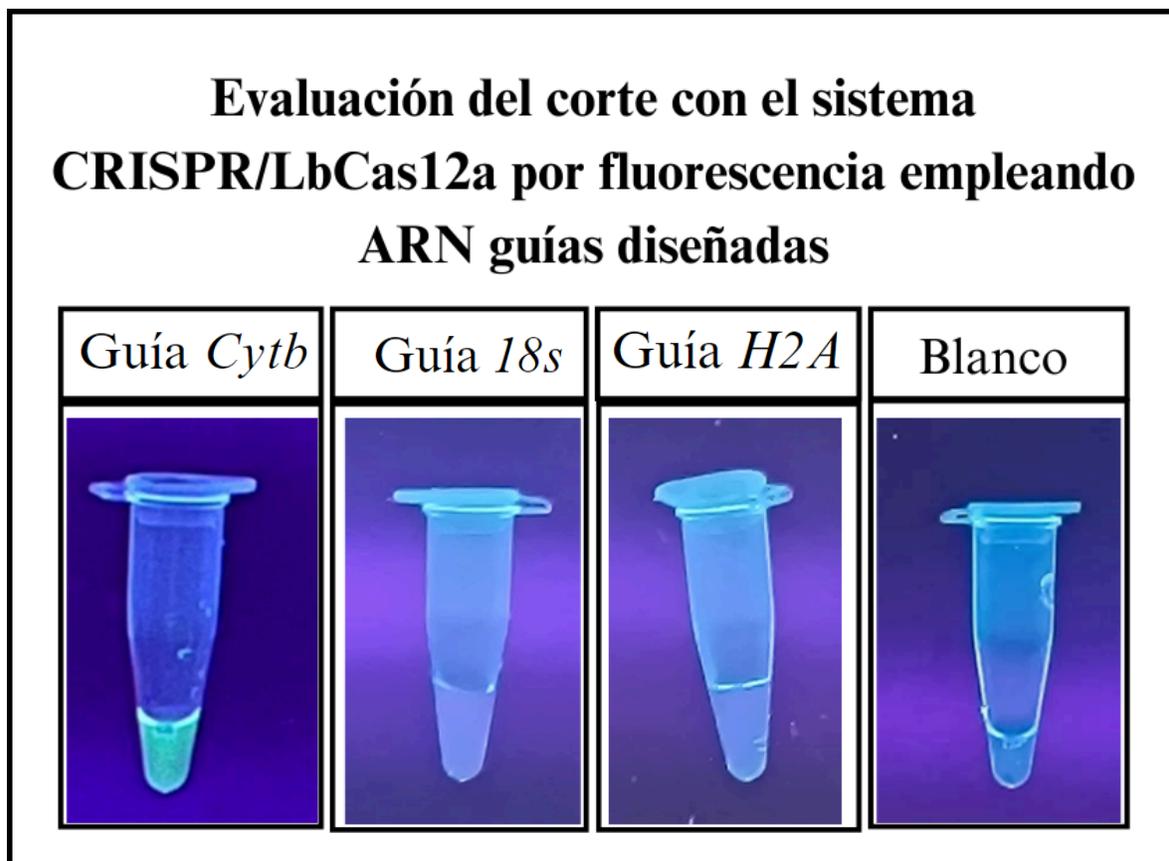


Figura 7. Evaluación de la fluorescencia bajo luz ultravioleta. Guía *Cytb* con emisión de fluorescencia visible.

Evaluación de la sensibilidad del sistema CRISPR LbCas12a

El ADN amplificado del gen *Cytb* se diluyó a concentraciones de 40 ng/uL, 20 ng/uL, 10 ng/uL, 5 ng/uL y 1 ng/uL. Posteriormente, se sometió a prueba en el sistema

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

45

CRISPR/LbCas12a utilizando la ARN guía específica para el gen *Cytb*. Los resultados demuestran que el corte del amplificado se efectúa en todas las diluciones y es visible en un gel de agarosa, como se observa en la **Figura 8**. El corte observado a la concentración de 1 ng/uL presenta un corte con una banda débil que coincide con el fragmento grande de 481 pares de bases.

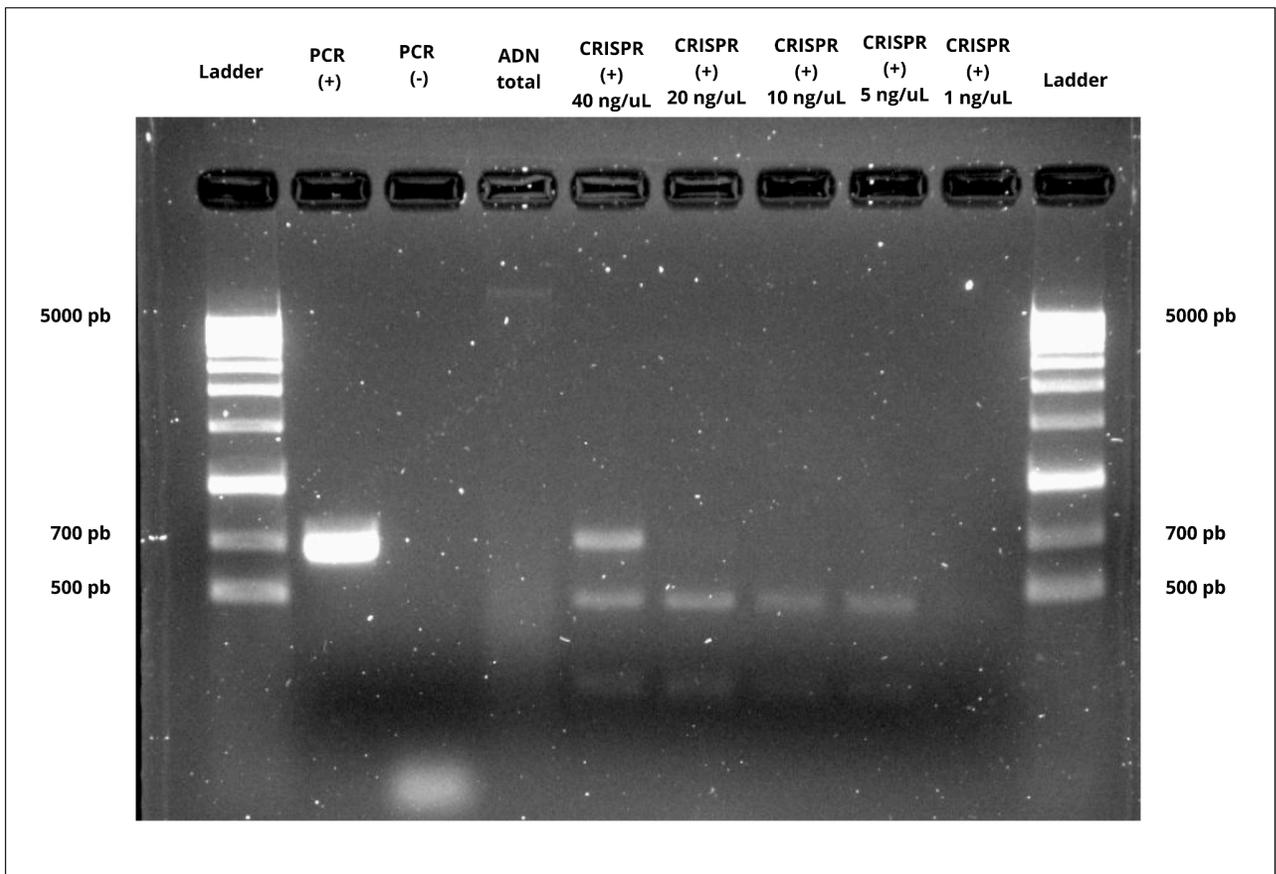


Figura 8. Evaluación del corte en diluciones del amplificado. Las bandas observadas corresponden al tamaño del corte del amplificado. En 40 ng/uL se observa aún la banda correspondiente al peso normal del amplificado. En 1 ng/uL se observa una banda débil, que corresponde al fragmento grande del corte del amplificado, peso de 481 pb.

El sistema de corte con las diluciones del amplificado se validó por fluorescencia en el espectrofotómetro, donde se observó emisión de fluorescencia en todas las diluciones. Se observó que el tiempo necesario para alcanzar la fluorescencia máxima se incrementa dependiendo de la concentración del ADN amplificado, como se observa en la **Figura 9A**.

Los valores obtenidos fueron normalizados dividiéndolos por los valores obtenidos para

cada medición en el control sin el ADN (**Figura 9B**). La homogeneidad de las réplicas para cada dilución, fue confirmada mediante una prueba de Kruskal Wallis con un $p > 0.05$.

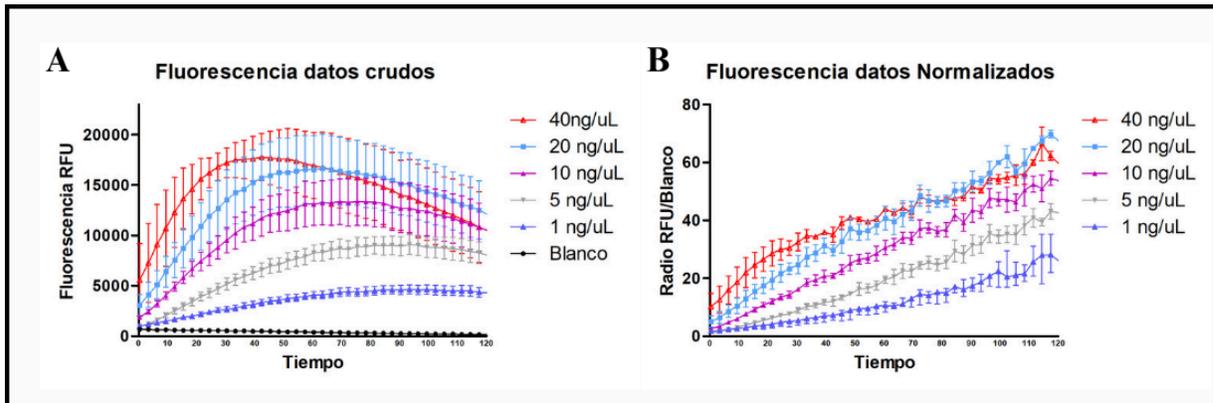


Figura 9. Fluorescencia medida en espectrofotómetro de las diluciones en el amplificado del gen *Cytb*. **A.** **Fluorescencia datos crudos de las diluciones.** **B.** fluorescencia en las cinco diluciones dividido sobre los datos del blanco sin el ADN siendo para 40 ng/uL un $p = 0.461$, para 20 ng/uL $p = 0.2404$, en 10 ng/uL $p = 0.240$, para 5 ng/uL $p = 0.2559$, 1 ng/uL $p = 0.1531$ y para el blanco $p = 0.1343$.

Las diluciones con el sistema de corte se visualizaron bajo luz ultravioleta, revelando la emisión de la fluorescencia visible en todas las diluciones. Incluso en la concentración más baja a 1 ng/uL se observa una diferencia notable con el control sin el ADN, como se observa en la **Figura 10**.

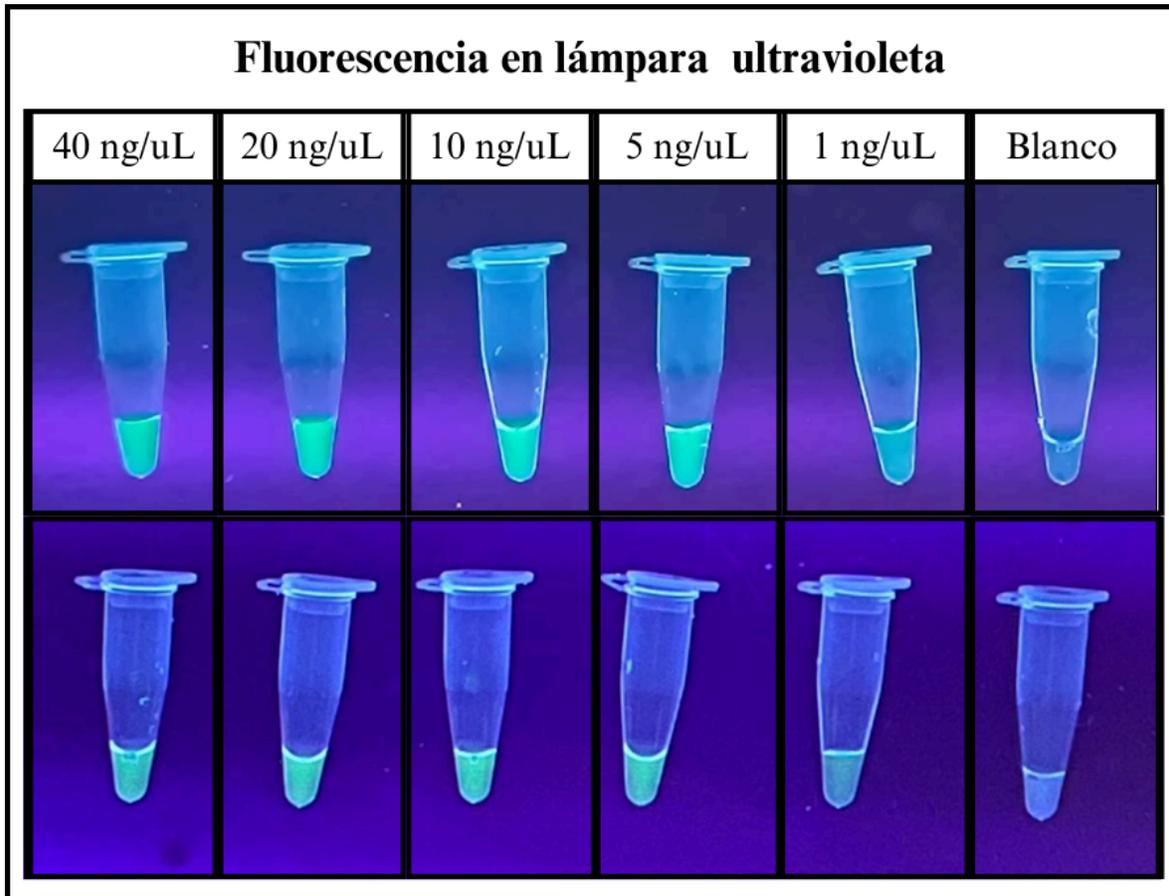


Figura 10. Visualización del corte en diluciones del amplificado en el gen *Cytb* por reportero fluorescente bajo luz ultravioleta.

Objetivo 3. Describir las diferencias en los cortes entre los productos amplificados y el ADN total extraído de los intestinos de *Rhodnius pallescens*.

Evaluación del corte en ADN total

La sensibilidad del sistema de corte empleando la guía *Cytb* demostró ser eficiente incluso a concentraciones bajas. Por lo tanto, el sistema de corte fue evaluado también en ADN total directo, extraído de los intestinos de *R. pallescens*. Sin embargo, a diferencia del corte del amplificado, la visualización en corte de ADN total no se observó en un gel de agarosa al ser comparado con el ADN total sin el sistema CRISPR (**Figura 11**).

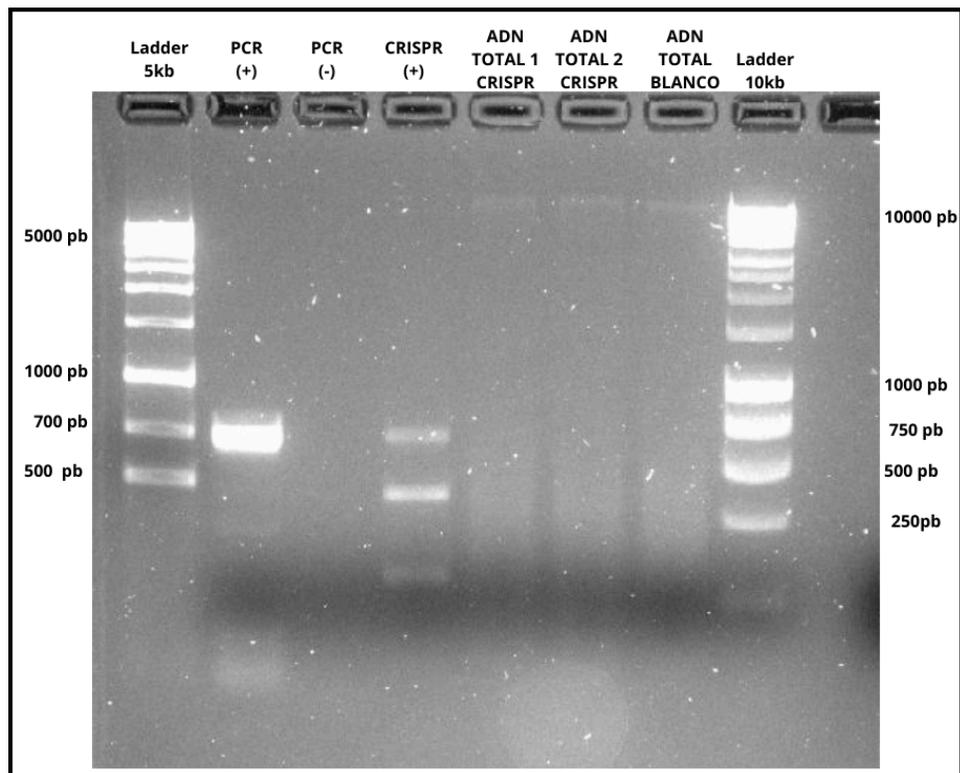


Figura 11. Evaluación del corte con guía *Cytb* en ADN total. **CRISPR (+)** Corte del ADN amplificado del gen *Cytb* a concentración de 40 ng/uL. **ADN TOTAL 1-2.** ADN extraído de intestino de *Rhodnius pallescens* con presencia de *Trypanosoma cruzi*, cortado con el sistema CRISPR/LbCas12a dirigido con guía *Cytb*. ADN TOTAL BLANCO. ADN extraído de intestino de *R. pallescens* con presencia de *T.cruzi* diluido a la concentración final de 6 ng/uL, sin el sistema de corte CRISPR/LbCas12a.

Del mismo modo que con el ADN amplificado, se evaluó el ADN total con el sistema de detección por fluorescencia. Los resultados obtenidos no revelaron un incremento en la fluorescencia al agregar el ADN total. Sin embargo, se evidencia significativamente mayor fluorescencia inicial con respecto al blanco con un valor $p=0.000022$. No obstante, al compararse con el ADN total extraído del intestino de *Rhodnius pallescens* sin presencia del parásito, no se observan diferencias significativas entre las muestras evaluadas con un valor de $p=0,247114$. **Figura 12.**

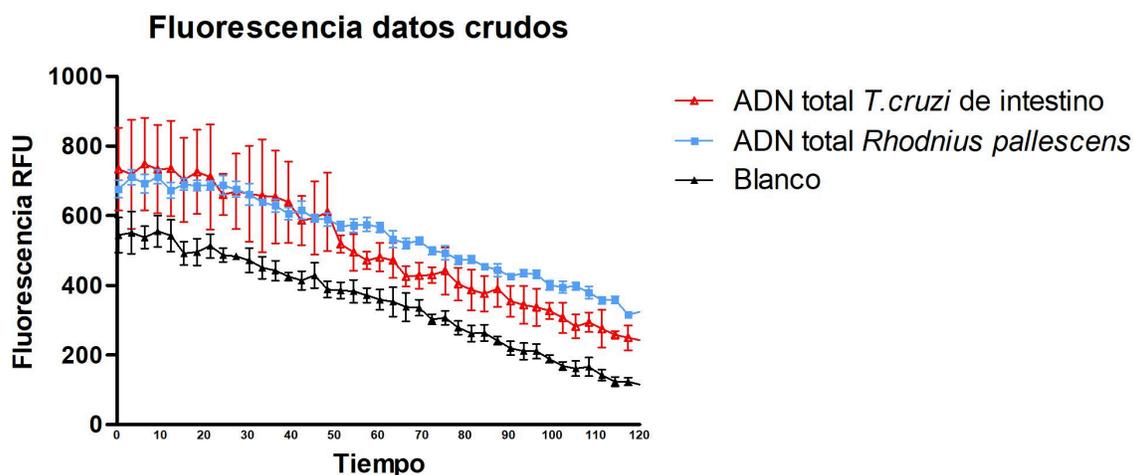


Figura 12. Comparación de los datos brutos de la fluorescencia emitida por el ADN total de *T.cruzi* extraído de intestino de *Rhodnius pallescens*, y el ADN total de *R. pallescens*.

Al someter las muestras de ADN total con en sistema de corte bajo luz ultravioleta, no se evidenció diferencias visibles en la fluorescencia emitida con respecto al control sin el ADN. De la misma manera, no se evidenció diferencias con el ADN de intestino de sin presencia de *T.cruzi* (**Figura 13**).

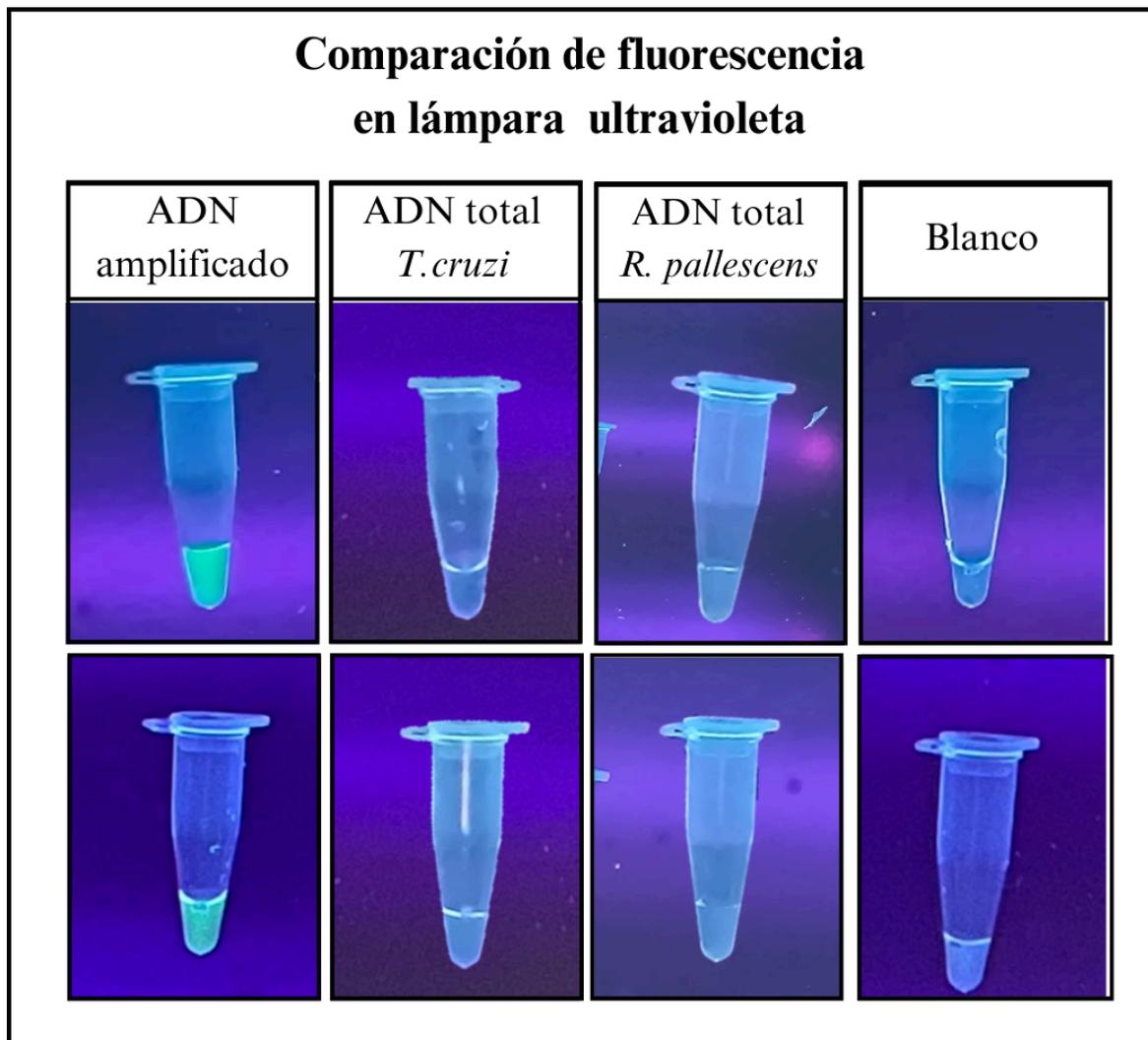


Figura 13. Visualización del corte por reportero fluorescente de ADN amplificado del gen *Cytb*, ADN no amplificado correspondiente a *T.cruzi* extraído de intestino y a *Rhodnius pallescens*.

Objetivo 4. Realizar un modelo comparativo entre de ventajas y desventajas del uso de la técnica PCR (Gold Standar) y el sistema CRISPR en muestras de ADN correspondiente a *Trypanosoma cruzi*.

Comparación de métodos de Diagnóstico

Los resultados obtenidos al realizar la tabla comparativa revelan que en la categoría de tiempo de ejecución, tanto la visualización de sangre bajo el microscopio y la amplificación isotérmica destacaron por la capacidad diagnosticar en un tiempo menor a 1 hora. De la misma manera, la visualización en sangre bajo el microscopio es la metodología de mayor facilidad de ejecución y menor precio. La amplificación isotérmica y el sistema CRISPR también presentan costos bajos. En la categoría de sensibilidad a la baja parasitemia, únicamente la PCR tiempo real y el sistema CRISPR permiten una detección eficiente a diferencia de los otros métodos empleados. La susceptibilidad a falsos positivos es más baja en los métodos de PCR tiempo real, CRISPR y la inmunofluorescencia indirecta. La probabilidad de obtener falsos negativos es más alta en la detección con frotis de gota gruesa y en las pruebas de ELISA. En contraste, la metodología de PCR tiempo real y CRISPR tienen menor probabilidad de falsos negativos.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
 MODALIDAD INVESTIGACIÓN
 ESCUELA DE BIOLOGÍA

Tabla 4. Tabla comparativa de los métodos de diagnóstico empleados para la detección de *Trypanosoma cruzi*.

Comparación de métodos de diagnóstico para <i>Trypanosoma cruzi</i>								
Métodos de diagnóstico	Visualización de sangre bajo el microscopio	PCR	PCR tiempo real	Amplificación isotérmica	CRISPR	ELISA	Inmunofluorescencia indirecta	Xenodiagnóstico
Tiempo de ejecución	1 hora	2-4 horas	1-2 horas	1 hora	1-2 horas	2-4 horas	1-2 horas	2-4 horas
Facilidad de ejecución	Bajo conocimiento técnico/Equipos accesibles	Conocimiento especializado/Equipos o materiales específicos	Conocimiento especializado/Equipos o materiales específicos	Conocimiento técnico estándar/Equipo técnico	Conocimiento técnico estándar/Equipo técnico	Conocimiento técnico estándar/Equipo técnico	Conocimiento especializado/Equipos o materiales específicos	Conocimiento especializado/Equipos o materiales específicos
Precio	Menor a 100.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos no especializados	Menor a 200.000 \$ por unidad de muestra/ por muestra Equipos especializados	Menor a 200.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos especializados	Menor a 100.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos no especializados	Menor a 100.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos no especializados	Menor a 200.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos especializados	Menor a 200.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos especializados	Mayor a 200.000 \$ por unidad de muestra/ Equipos especializado
Sensibilidad a baja parasitemia	Ineficaz para identificar pequeñas concentraciones de material biológico	Dificultad en bajas concentraciones de ADN o Antígenos	Permite detectar pequeñas concentraciones de ADN o Antígenos	Dificultad en bajas concentraciones de ADN o Antígenos	Permite detectar pequeñas concentraciones de ADN o Antígenos	Dificultad en bajas concentraciones de ADN o Antígenos	Permite detectar pequeñas concentraciones de ADN o Antígenos	Ineficaz para identificar pequeñas concentraciones de material biológico
Susceptibilidad de falsos positivos	Dificultad para diferenciar material biológico específico	Dificultad para diferenciar material biológico específico	Precisión en discernir material biológico específico	Dificultad para diferenciar material biológico específico	Precisión en discernir material biológico específico	Dificultad para diferenciar material biológico específico	Precisión en discernir material biológico específico	Dificultad para diferenciar material biológico específico
Susceptibilidad a falsos negativos	Ineficaz para asegurar con precisión la presencia del parásito	Dificultad para detectar la ausencia del parásito	Sensibilidad para corroborar la ausencia de material biológico específico	Dificultad para detectar la ausencia del parásito	Sensibilidad para corroborar la ausencia de material biológico específico	Ineficaz para asegurar con precisión la presencia del parásito	Dificultad para detectar la ausencia del parásito	Dificultad para detectar la ausencia del parásito
Referencias	(Kirchhoff et al., 1996) (Vera-Ku et al., 2019) (Pereira et al., 2022)	(Piron et al., 2007).	(Seiringer et al., 2017)	(Thekisoe et al., 2010)	(Harrington et al., 2018).	(Gomes et al., 1999).	(Gilber et al., 2013)	(Avila et al., 1993) (Añez et al., 2009). (Carvalho et al., 1993)
		(Seiringer et al., 2017)	(Piron et al., 2007).	(Piepenburg et al., 2006)	(Uppada et al., 2018)	(Malan et al., 2006)	(Apt B et al., 2008)	

Discusión

La detección de *Trypanosoma cruzi* en el vector es fundamental para prevenir casos de Chagas en zonas de distribución del vector que generalmente son comunidades vulnerables (Echeverría et al., 2020). Los nuevos métodos de detección del parásito, como el sistema CRISPR/LbCas12a, ofrecen alternativas que podrían tener facilidad de aplicación en zonas rurales. Actualmente, se han desarrollado sistemas portátiles de detección del parásito causante de la Toxoplasmosis que utilizan la precisión del sistema CRISPR con una amplificación isotérmica (Lei et al., 2022) .

Métodos alternativos para la detección del parásito en el vector *Rhodnius pallescens*, han sido empleados utilizando amplificación LAMP (Thekiso et al., 2010). Sin embargo, dada la baja especificidad del método, las pruebas no pueden discernir entre especies como por ejemplo *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. Del mismo modo, la amplificación por PCR es un método de diagnóstico altamente empleado y eficiente. No obstante, los resultados sugieren que un diseño de cebadores específico para *T. cruzi*, no garantiza la amplificación de especies con secuencias similares. Dada su alta tolerancia a secuencias no complementarias, la PCR es susceptible a falsos positivos, lo que ha sido previamente reportado para *T. cruzi* (Piron et al., 2007). En contraste, el sistema de detección con CRISPR ha sido empleado para la detección de mutaciones puntuales dada la sensibilidad

del método (Harrington et al., 2018). Los resultados de las guías *I8s* y *H2A* confirman la baja tolerancia del método a secuencias no complementarias.

Los resultados indican que el diseño de ARN guías específico para *Trypanosoma cruzi* requiere de una secuenciación previa del sitio a cortar. A diferencia del diseño de cebadores que puede basarse en secuencias de bases de datos disponibles. La secuenciación del gen mitocondrial Citocromo B, demostró una secuencia conservada, similar a la reportada en el NCBI, Lo que lo convierte en un sitio promisorio para la detección del parásito. En *Leishmania* sp, se ha empleado el ADN mitocondrial para la detección por el sistema CRISPR (Bengtson et al., 2022). Lo anterior indica que el ADN mitocondrial del grupo Kinetoplastea es altamente específico y conservado. Alternativamente, en *Trypanosoma brucei*, causante de la Trypanosomiasis humana africana, se ha empleado los genes 7SLRNA, TgSGP y SRA para la detección del parásito con el sistema CRISPR.

La confirmación del corte por visualización bajo luz ultravioleta, permite plantear un diseño confirmatorio más rápido, que no requiera del empleo de un equipo específico, como un espectrofotómetro de placa que ha sido usando en la identificación de enfermedades parasitarias como la Leishmaniasis (Dueñas et al., 2022) o la detección de *Salmonella* sp (Bai et al., 2022), caracterizando la versatilidad del sistema. Los resultados sugieren que la detección del sistema CRISPR/LbCas12a mediante visualización en gel y por corte de reportero fluorescente no es eficiente para la detección en ADN directo sin preamplificación como se ha probado previamente (Gootenberg et al., 2018). No obstante,

combinando el método con sistemas más sensibles, como el empleado por diferencia de voltaje en placas de grafeno (Balderston et al., 2021), podría ser la alternativa viable para la detección sin amplificación.

La combinación de la PCR y el sistema CRISPR ha sido utilizada previamente como método de diagnóstico para una amplia variedad de enfermedades bacterianas empleando el sistema HOLMES (S.-Y. Li, Cheng, Wang, et al., 2018). Dada la alta especificidad y sensibilidad que ambas metodologías ofrecen. Se ha demostrado que el tiempo de detección, puede ser reducido, estandarizando la cantidad de ciclos de la PCR en el termociclador (Dueñas et al., 2022). Si esta estrategia se combina con la visualización por luz ultravioleta, se podría tener una detección más rápida del ADN objetivo. Sin embargo, el empleo de un termociclador para la amplificación limita la metodología a laboratorios especializados. Una alternativa más aplicable a la detección sin equipos técnicos, es la combinación de la amplificación isotérmica por RPA (Piepenburg et al., 2006), con la visualización bajo luz ultravioleta, como ha sido usado previamente en la detección del parásito *Cryptosporidium parvum* (Yu et al., 2021).

Los resultados de la comparación de los métodos diagnósticos sugieren que el Xenodiagnóstico es la metodología con menores beneficios para la detección de *Trypanosoma cruzi*, siendo poco precisa y con alta probabilidad de falsos negativos, requiere de un equipo especializado y el mantenimiento de una colonia de Triatominos (Avila et al., 1993). Las pruebas de ELISA (Borda et al., 1991), tienen susceptibilidad a

presentar falsos positivos y requiere de un equipo especializado y costoso. La PCR es una metodología sensible. Sin embargo, es susceptible a falsos positivos y requiere de un equipo técnico (Hirschhorn et al., 2023). En contraste, el sistema CRISPR presenta varios beneficios que lo sitúan entre los métodos de diagnóstico más preciso, como la PCR tiempo real y la Inmunofluorescencia indirecta. Con la ventaja de poder utilizar pruebas con un coste menor a 100 mil pesos (Uppada et al., 2018). También, la adaptabilidad del método permite que la prueba sea realizada en un tiempo menor a dos horas, empleando únicamente empleando un bloque de calentamiento a una temperatura constante, a diferencia de las pruebas moleculares convencionales.

Conclusiones

La implementación del sistema CRISPR/LbCas12a permite la identificación precisa de la secuencia diana en el gen Citocromo B de *Trypanosoma cruzi*, mediante la visualización del corte del amplificado en geles de agarosa, la detección por corte secundario de reportero fluorescente y confirmación bajo luz ultravioleta. Ofreciendo un avance alternativo con un sistema versátil, potencialmente más rápido, preciso y específico en comparación con los métodos tradicionales.

Los cebadores diseñados permitieron la amplificación exitosa del ADN de *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, también se observó la amplificación de ADN no correspondiente

cuando se probó con otras muestras de ADN. El diseño computacional de la ARN guía diseñada en el gen Citocromo B. logró la activación del sistema CRISPR LbCas12a permitiendo el corte del amplificado. Por lo tanto, se resalta su potencial como sitio de identificación altamente conservado para la detección de *Trypanosoma cruzi*. El diseño teórico de las ARN guías *I8s* y *H2A* no correspondió a las secuencias presentes en el ADN del parásito encontrado en intestinos de *Rhodnius pallescens* en Bucaramanga. Por lo anterior, las secuencias diseñadas, no se recomiendan como sitio de identificación de *T. cruzi* basado en la variabilidad encontrada. La metodología empleada usando el sistema CRISPR/LbCas12a para la identificación sin pre-amplificación, no permite la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de intestino de *Rhodnius pallescens*.

Bibliografía

- Abad-Franch, F., Vega, M. C., Rolón, M. S., Santos, W. S., & Rojas de Arias, A. (2011). Community participation in Chagas disease vector surveillance: systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1207.
- Abras, A., Gállego, M., Llovet, T., Tebar, S., Herrero, M., Berenguer, P., Ballart, C., Martí, C., & Muñoz, C. (2016). Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? *Journal of Clinical Microbiology*, 54(6), 1566–1572.
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2016). C2c2 is a

single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector.

Science, 353(6299), aaf5573.

Añez, N., Crisante, G., & Romero, M. (2009). Supervivencia e infectividad de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados.

Boletín de Malariología Y Salud Ambiental, 49(1), 91–96.

Apt B, W., Heitmann G, I., Jercic L, M. I., Jofré M, L., Muñoz C. del, P., V., Noemí H, I.,

San Martín, A. M., V., Sapunar P, J., Torres H, M., & Zulantay A, I. (2008). Guías

clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Revista*

Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología,

25(3). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182008000300008>

Avila, H. A., Pereira, J. B., Thiemann, O., De Paiva, E., DeGrave, W., Morel, C. M., &

Simpson, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle

DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*,

31(9), 2421–2426.

Bai, L., Wang, L., Huang, S., Bai, R., Lv, X., Sun, L., Zhang, F., & Xu, X. (2022). Rapid,

Visual, and Sequence-Specific Detection of Salmonella in Egg Liquid with vis-NEAA,

a CRISPR/Cas12 Empowered New Strategy. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 70(7), 2401–2409.

Balderston, S., Taulbee, J. J., Celaya, E., Fung, K., Jiao, A., Smith, K., Hajian, R.,

Gasiunas, G., Kutanovas, S., Kim, D., Parkinson, J., Dickerson, K., Ripoll, J.-J.,

Peytavi, R., Lu, H.-W., Barron, F., Goldsmith, B. R., Collins, P. G., Conboy, I. M., ...

- Aran, K. (2021). Discrimination of single-point mutations in unamplified genomic DNA via Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nature Biomedical Engineering*, 5(7), 713–725.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., & Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *The Lancet*, 362(9394), 1469–1480.
- Bengtson, M., Bharadwaj, M., Franch, O., van der Torre, J., Meerdink, V., Schallig, H., & Dekker, C. (2022). CRISPR-dCas9 based DNA detection scheme for diagnostics in resource-limited settings. *Nanoscale*, 14(5), 1885–1895.
- Borda, E., Leirós, C. P., Sterin-Borda, L., & de Bracco, M. M. E. (1991). Cholinergic response of isolated rat atria to recombinant rat interferon- γ . *Journal of Neuroimmunology*, 32(1), 53–59.
- Brener, Z. (1982). Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bulletin of the World Health Organization*, 60(4), 463–473.
- Briceño-León, R. (2009). La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cadernos de Saúde Pública*, 25, S71–S82.
- Brisse, S., Henriksson, J., Barnabé, C., Douzery, E. J. P., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M. R. C., Buck, G. A., Dujardin, J.-C., & Tibayrenc, M. (2003). Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of*

Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2(3), 173–183.

Brisse, S., Verhoef, J., & Tibayrenc, M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*, 31(11), 1218–1226.

Britto, C., Cardoso, M. A., Vanni, C. M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S. S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C. M., & Wincker, P. (1995). Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 110 (Pt 3), 241–247.

Bua, J., Volta, B. J., Perrone, A. E., Scollo, K., Velázquez, E. B., Ruiz, A. M., De Rissio, A. M., & Cardoni, R. L. (2013). How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2476.

Carrada-Bravo, T. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Natural history and diagnosis of the Chagas' disease. *Revista Mexicana de Patología Clínica Y Medicina de Laboratorio*, 51(4), 205–219.

Carvalho, M. R., Krieger, M. A., Almeida, E., Oelemann, W., Shikanai-Yassuda, M. A., Ferreira, A. W., Pereira, J. B., Sáez-Alquézar, A., Dorlhiac-Llacer, P. E., & Chamone, D. F. (1993). Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*, 33(10), 830–834.

Castillo, D., & Wolff, M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos

- (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*, 20(1), 59–64.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436–439.
- Chen, Y., Cheng, M., Feng, X., Niu, X., Song, H., & Cao, Y. (2022). Genome Editing by CRISPR/Cas12 Recognizing AT-Rich PAMs in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ACS Synthetic Biology*, 11(9), 2947–2955.
- Cummings, K. L., & Tarleton, R. L. (2003). Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 129(1), 53–59.
- Deborggraeve, S., Coronado, X., Solari, A., Zulantay, I., Apt, W., Mertens, P., Laurent, T., Leclipteux, T., Stessens, T., Dujardin, J.-C., Herdewijn, P., & Büscher, P. (2009). T. cruzi OligoC-Test: a simplified and standardized polymerase chain reaction format for diagnosis of Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(6), e450.
- de Noya, B. A., & González, O. N. (2015). An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Tropica*, 151, 94–102.
- Dueñas, E., Nakamoto, J. A., Cabrera-Sosa, L., Huaihua, P., Cruz, M., Arévalo, J., Milón, P., & Aduai, V. (2022). Novel CRISPR-based detection of *Leishmania* species. *Frontiers in Microbiology*, 13, 958693.
- East-Seletsky, A., O’Connell, M. R., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, J. H. D., Tjian, R., & Doudna, J. A. (2016). Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable

guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 538(7624), 270–273.

Echeverría, L. E., Marcus, R., Novick, G., Sosa-Estani, S., Ralston, K., Zaidel, E. J., Forsyth, C., Ribeiro, A. L. P., Mendoza, I., Falconi, M. L., Mitelman, J., Morillo, C. A., Pereiro, A. C., Pinazo, M. J., Salvatella, R., Martinez, F., Perel, P., Liprandi, Á. S., Piñeiro, D. J., & Molina, G. R. (2020). WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. *Global Heart*, 15(1), 26.

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., ... Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), 409–415.

Esteban, L., Montes, J. M., & Angulo, V. M. (2017). [Diversity of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Santander, Colombia: Epidemiological implications]. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 37(1), 42–52.

Gao, H., Feng, M., Li, F., Zhang, K., Zhang, T., Zhang, Z., Yang, C., Deng, R., Zhang, J., & Jiang, P. (2022). G-Quadruplex DNzyme-Substrated CRISPR/Cas12 Assay for Label-Free Detection of Single-Celled Parasitic Infection. *ACS Sensors*, 7(10), 2968–2977.

Gilber, S. R., Alban, S. M., Gobor, L., Bescrovaine, J. de O., Myiazaki, M. I., & Thomaz-Soccol, V. (2013). Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(3), 310–315.

- Gomes, Galvao, L. M., Macedo, A. M., Pena, S. D., & Chiari, E. (1999). Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 205–210.
- Gomes, Y. M., Lorena, V. M. B., & Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 115–121.
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., & Zhang, F. (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 360(6387), 439–444.
- Gutierrez, A. G., & Monteón Padilla, V. M. (2008). Algunos aspectos de la organización y regulación genética en *Trypanosoma cruzi*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3-4), 103–118.
- Harrington, L. B., Burstein, D., Chen, J. S., Paez-Espino, D., Ma, E., Witte, I. P., Cofsky, J. C., Kyrpides, N. C., Banfield, J. F., & Doudna, J. A. (2018). Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 362(6416), 839–842.
- Hirschhorn, J. W., Avery, A., & Schandl, C. A. (2023). Managing a PCR Contamination Event in a Molecular Pathology Laboratory. In M. B. Myers & C. A. Schandl (Eds.), *Clinical Applications of Nucleic Acid Amplification* (pp. 15–26). Springer US.
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A

- Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
- Kaminski, M. M., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Zhang, F., & Collins, J. J. (2021). CRISPR-based diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*, 5(7), 643–656.
- Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols*, 14(10), 2986–3012.
- Kirchhoff, L. V., Votava, J. R., Ochs, D. E., & Moser, D. R. (1996). Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1171–1175.
- Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today*, 16(9), 381–387.
- Lee, R. A., Puig, H. D., Nguyen, P. Q., Angenent-Mari, N. M., Donghia, N. M., McGee, J. P., Dvorin, J. D., Klapperich, C. M., Pollock, N. R., & Collins, J. J. (2020). Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of Plasmodium species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25722–25731.
- Lei, R., Li, L., Wu, P., Fei, X., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, D., Zhang, Q., Yang, N., & Wang, X. (2022). RPA/CRISPR/Cas12a-Based On-Site and Rapid Nucleic Acid Detection of *Toxoplasma gondii* in the Environment. *ACS Synthetic Biology*, 11(5), 1772–1781.
- Li, S.-Y., Cheng, Q.-X., Liu, J.-K., Nie, X.-Q., Zhao, G.-P., & Wang, J. (2018).

CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA.

Cell Research, 28(4), 491–493.

Li, S.-Y., Cheng, Q.-X., Wang, J.-M., Li, X.-Y., Zhang, Z.-L., Gao, S., Cao, R.-B., Zhao, G.-P., & Wang, J. (2018). CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discovery*, 4, 20.

Li, Y., Li, S., Wang, J., & Liu, G. (2019). CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 730–743.

Malan, A. K., Avelar, E., Litwin, S. E., Hill, H. R., & Litwin, C. M. (2006). Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi*: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 2), 171–178.

Moncayo, A., & Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 17–30.

Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Metsky, H. C., Durbin, A. F., Kellner, M. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Parham, L. A., Garcia, K. F., Barnes, K. G., Chak, B., Mondini, A., Nogueira, M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Yozwiak, N. L., ... Sabeti, P. C. (2018). Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 360(6387), 444–448.

Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., Kuca, K., & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR-Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *International Journal*

of Molecular Sciences, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>

Noireau, F., Diosque, P., & Jansen, A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*, 40(2), 26.

Otálora-Luna, F., Pérez-Sánchez, A. J., Sandoval, C., & Aldana, E. (2015). Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 88(1), 1–13.

Padhi, B. K., Pelletier, G., & Shwed, P. S. (2020). A bioinformatics workflow for the evaluation of RT-qPCR primer specificity: Application for the assessment of gene expression data reliability in toxicological studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 111, 104575.

Palmezano Díaz, J. M., Plazas Rey, L. K., Rivera Castillo, K. E., & Rueda Rojas, V. P. (2015). Enfermedad de chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. *Medicas UIS*, 28(1), 81–90.

Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266.

Pavia, P. X., Vallejo, G. A., Montilla, M., Nicholls, R. S., & Puerta, C. J. (2007). Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone *H2A/SIRE* and the sno-RNA-C11 genes. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(1), 23–30.

Pereira, A. S., Mazza, L. O., Pinto, P. C. C., Gomes, J. G. R. C., Nedjah, N., Vanzan, D. F.,

- Pyrrho, A. S., & Soares, J. G. M. (2022). Deep convolutional neural network applied to *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *International Journal of Bio-Inspired Computation*, 19(1), 1–17.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, 4(7), e204.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., Gascón, J., Gómez i Prat, J., Portús, M., & Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 103(3), 195–200.
- Rassi, A., Jr, Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.
- Saavedra, M., Zulantay, I., Apt, W., Martínez, G., Rojas, A., & Rodríguez, J. (2013). Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. *Biological Research*, 46(3), 295–298.
- Sánchez, Z., & Russomando, G. (2012). Identificación molecular de linajes y sub-linajes de *Trypanosoma cruzi* en niños infectados congénitamente provenientes de áreas endémicas del Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 10(1), 56–61.
- Schmunis, G. A. (1991). *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, 31(6), 547–557.

- Seiringer, P., Pritsch, M., Flores-Chavez, M., Marchisio, E., Helfrich, K., Mengele, C., Hohnerlein, S., Bretzel, G., Löscher, T., Hoelscher, M., & Berens-Riha, N. (2017). Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(3), 225–232.
- Sima, N., Dujeancourt-Henry, A., Perlaza, B. L., Ungeheuer, M.-N., Rotureau, B., & Glover, L. (2022). SHERLOCK4HAT: A CRISPR-based tool kit for diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *EBioMedicine*, 85, 104308.
- Souza, R. T., Lima, F. M., Barros, R. M., Cortez, D. R., Santos, M. F., Cordero, E. M., Ruiz, J. C., Goldenberg, S., Teixeira, M. M. G., & da Silveira, J. F. (2011). Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PloS One*, 6(8), e23042.
- Stadhouders, R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H. M., & Schutten, M. (2010). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 12(1), 109–117.
- Thekisoe, O. M. M., Rodriguez, C. V., Rivas, F., Coronel-Servian, A. M., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawazu, S.-I., & Inoue, N. (2010). Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 855–860.
- Torrico, M. C., Solano, M., Guzmán, J. M., Parrado, R., Suarez, E., Alonzo-Vega, C., Truyens, C., Carlier, Y., & Torrico, F. (2005). Estimación de la parasitemia en la

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

infección humana por *Trypanosoma cruzi*: las altas parasitemias están asociadas con la severa y fatal enfermedad de Chagas congénita. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 58–61.

Toso M, A., Vial U, F., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Medica de Chile*, 139(2), 258–266.

Uppada, V., Gokara, M., & Rasineni, G. K. (2018). Diagnosis and therapy with CRISPR advanced CRISPR based tools for point of care diagnostics and early therapies. *Gene*, 656, 22–29.

Velásquez-Ortiz, N., & Ramírez, J. D. (2020). Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. *Research in Veterinary Science*, 132, 448–461.

Vera-Ku, M., Meza-González, G., Carlier, Y., Truyens, C., & Gamboa-León, R. (2019). Comparison of methodologies for detecting *Trypanosoma cruzi* parasites by microscopic observation of microhematocrit capillary tubes. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, e20180505.

Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal, S., & Martínez-Campos, C. (2000). Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Publica de Mexico*, 42(6), 496–503.

Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J. R. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer Science & Business Media.

WHO. (2002). *Control de la Enfermedad de Chagas*. Organización Mundial de la Salud.

Yu, F., Zhang, K., Wang, Y., Li, D., Cui, Z., Huang, J., Zhang, S., Li, X., & Zhang, L.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

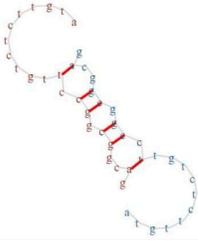
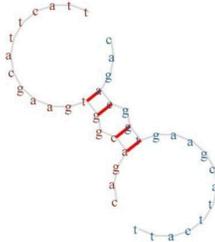
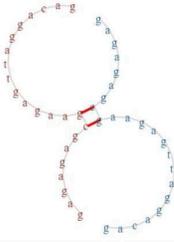
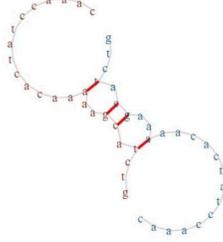
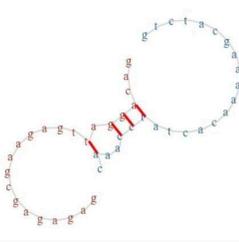
71

(2021). CRISPR/Cas12a-based on-site diagnostics of *Cryptosporidium parvum* IId-subtype-family from human and cattle fecal samples. *Parasites & Vectors*, 14(1), 208.

Anexos

Anexo 1. Análisis de estructura secundaria

El análisis de la estructura secundaria se realizó en el programa Benchling, para conocer la probabilidad de homodimerización y heterodimerización de los cebadores diseñados.

Genes empleados	Primer forward Homodimero	Primer Reverse Homodimero	Heterodimero
Subunidad 18s Ribosomal Temperatura de evaluación de estructura secundaria: 72°C			
Delta de Energía libre de Gibbs	-7.75 kcal	-8.28 kcal	-5.2 kcal
Histona H2A Temperatura de evaluación de estructura secundaria: 62°C			
Delta de Energía libre de Gibbs	-2.76 kcal	-3.73 kcal	-3.69 kcal
Citocromo B Temperatura de evaluación de estructura secundaria: 62°C			
Delta de Energía libre de Gibbs	-1.42 kcal	-2.44 kcal	-2.74 kcal

Anexo 2. Guías obtenidas en el análisis del amplificado, programa CHOPCHOP.

El análisis de los sitios de unión sugirió 10 posibles diseños de ARN guías en el sitio de amplificado para cada gen correspondiente

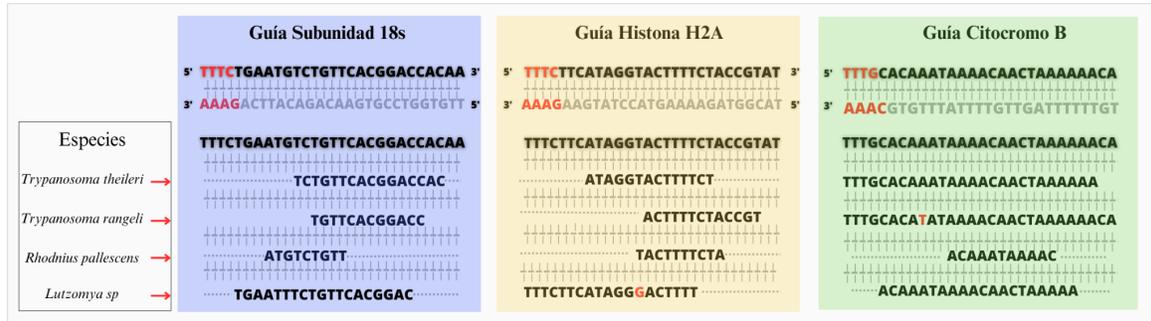
Secuencia objetivo <i>Cytb</i>	Cadena	% Guanina-Citosina	Autocomplementariedad	Eficiencia
TTTAAAATAATAATATATGTGATATATG	"+"	12	0	65
TTTGCACAAATAAAACAATAAAAAACA	-	21	0	63
TTTAATAATTCATATATCACATATATTA	-	12	0	61
TTTAGCAACTGTACCTGTGATCGGTCAG	"+"	54	0	60
TTTAAATAGTACTCTTAAAGACAAATT	-	21	0	57
TTTAAGAGTAACTATTTAAAATAATAAT	"+"	12	0	57
TTTAAAAGCGTAAAATCATTATAAAATT	-	17	0	55
TTTCGAGAGGGAAAAAATTTTAATTG	"+"	25	0	52
TTTATTGGATAATGTGTTACCATGTACAA	"+"	33	0	50
TTTGTAATTAGAAGTATTCATATTTGTT	"+"	17	0	48
Secuencia objetivo <i>I8s</i>	Cadena	% Guanina-Citosina	Autocomplementariedad	Eficiencia
TTTCTGAATGTCTGTTACGGACCACAA	-	46	0	57
TTTGTTTCTGAATGTCTGTTACGGACC	-	46	0	33
TTTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCAT	"+"	42	0	9
TTTTGTTTCTGAATGTCTGTTACGGAC	-	46	0	8
TTTCTCTGATTATCGCATGTCATGCATG	"+"	42	1	5
TTTTTTGTTTCTGAATGTCTGTTACGGG	-	42	0	2
TTTTTGTTTCTGAATGTCTGTTACGGGA	-	42	0	2
TTTTCGCTGCCTCATCTTTTTTTTTTTGA	-	38	0	1
TTTTCGCTGCCTCATCTTTTTTTTTTTGAC	-	38	0	1
TTTGACATTGGGCAATTTGCGCGCCTGC	-	58	1	17
Secuencia objetivo	Cadena	% Guanina-Citosina	Autocomplementariedad	Eficiencia

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
 MODALIDAD INVESTIGACIÓN
 ESCUELA DE BIOLOGÍA

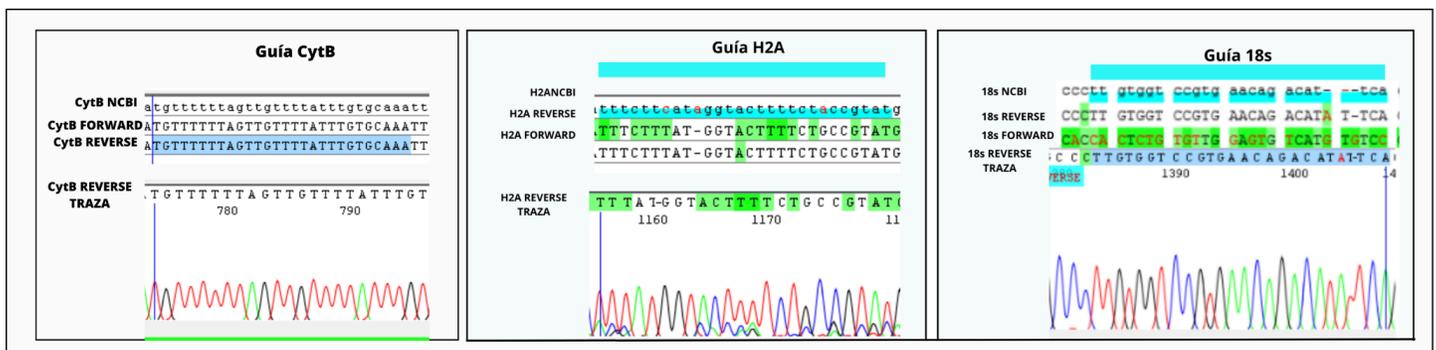
TTTCTTCATAGGTA CTTTCTACCGTAT	"+"	33	1	29
TTTTCGTTGTTTTCTTCTTGTTTTCTAC	"+"	33	0	1
TTTCGTTGTTTTCTTCTTGTTTTCTACT	"+"	29	0	2
TTTTTTCGTTGTTTTCTTCTTGTTTTCT	"+"	29	0	2
TTCCACCTCGCGGTGGGGTTTTGTGGC	"+"	67	2	25
TTTGCCATTCCACCCAGCCCCCTCGATTT	"+"	58	0	62
TTGTGGCTGGAGGACCCCAAAGTCTGC	"+"	62	0	48
TTTGTGGCTGGAGGACCCCAAAGTCTG	"+"	62	0	24
TTTGCCATTCCACCCAGCCCCCTCGATT	"+"	62	0	16
TTTTTCGCAGACAAGGATGGCAACCCCG	"+"	62	0	6

Anexo 3. Alineamiento de las guías en el ADN control.

En el programa Snappene, se realizó el alineamiento de las guías diseñadas contra el ADN correspondiente al control negativo probado en la amplificación.



Anexo 4. Resultado de la secuenciación

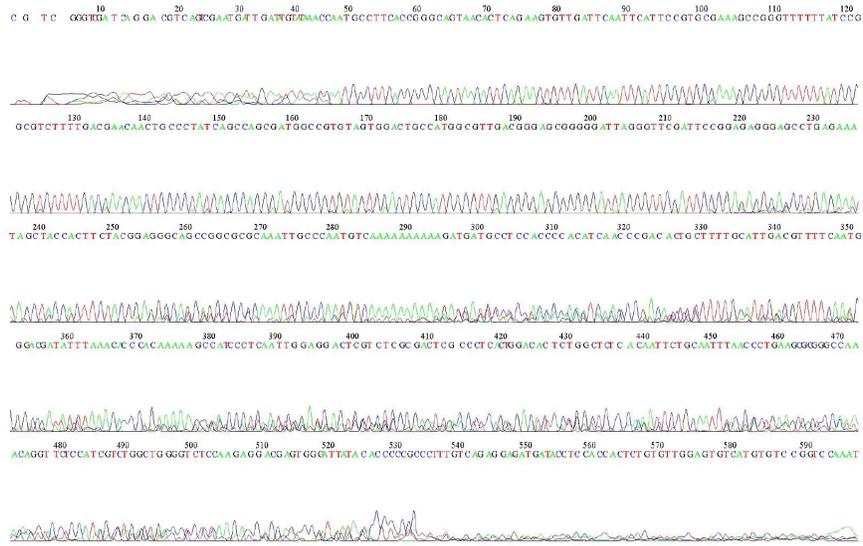




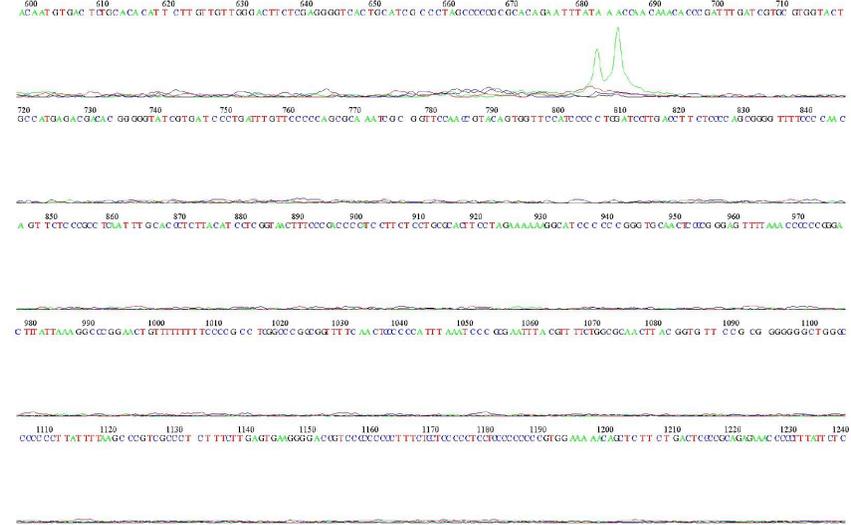
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Secuencias 18s FORWARD

File: 18S_18FORWARD.ab1 Run Ended: 2024/2/9 0:58:36 Signal G:300 A:445 C:577 T:591
Sample: 18S_18FORWARD Lane: 52 Base spacing: 15.765961 1761 bases in 20998 scans Page 1 of 2



File: 18S_18FORWARD.ab1 Run Ended: 2024/2/9 0:58:36 Signal G:300 A:445 C:577 T:591
Sample: 18S_18FORWARD Lane: 52 Base spacing: 15.765961 1761 bases in 20998 scans Page 2 of 2

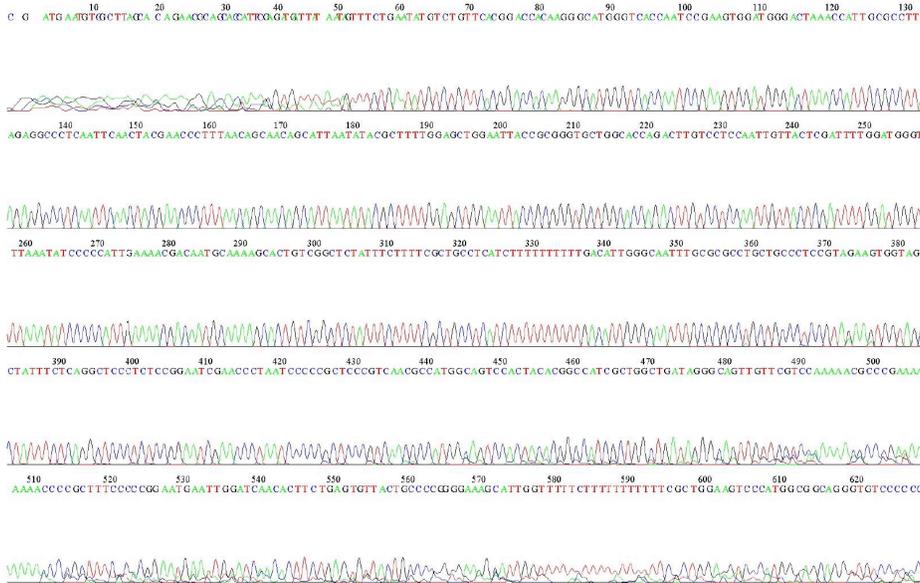




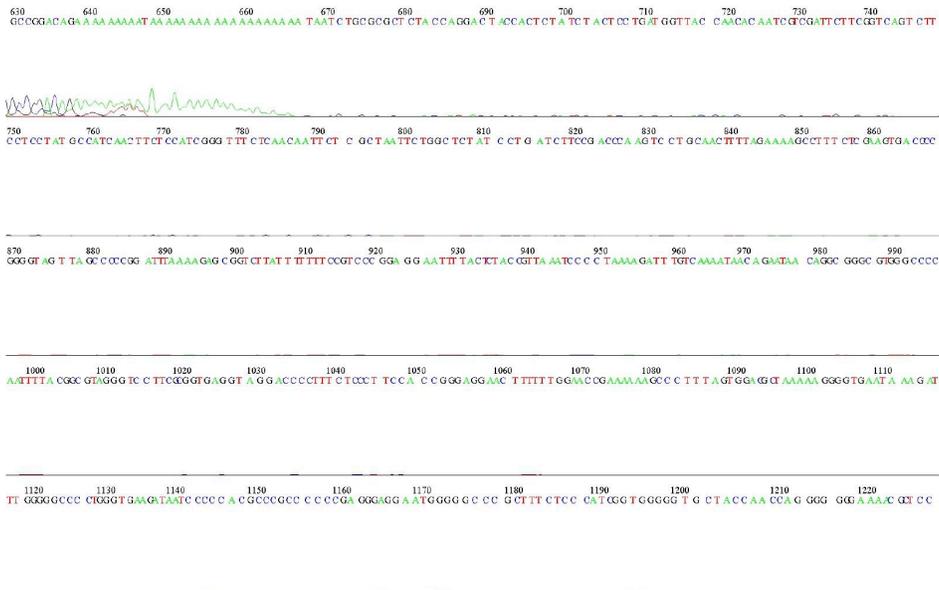
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Secuencias 18s REVERSE

File: 18S_18-REVERSE.ab1 Run Ended: 2024/2/9 0:58:36 Signal G:1717 A:2418 C:3458 T:3165
Sample: 18S_18-REVERSE Lane: 50 Base spacing: 16.078657 1440 bases in 18045 scans Page 1 of 2



File: 18S_18-REVERSE.ab1 Run Ended: 2024/2/9 0:58:36 Signal G:1717 A:2418 C:3458 T:3165
Sample: 18S_18-REVERSE Lane: 50 Base spacing: 16.078657 1440 bases in 18045 scans Page 2 of 2





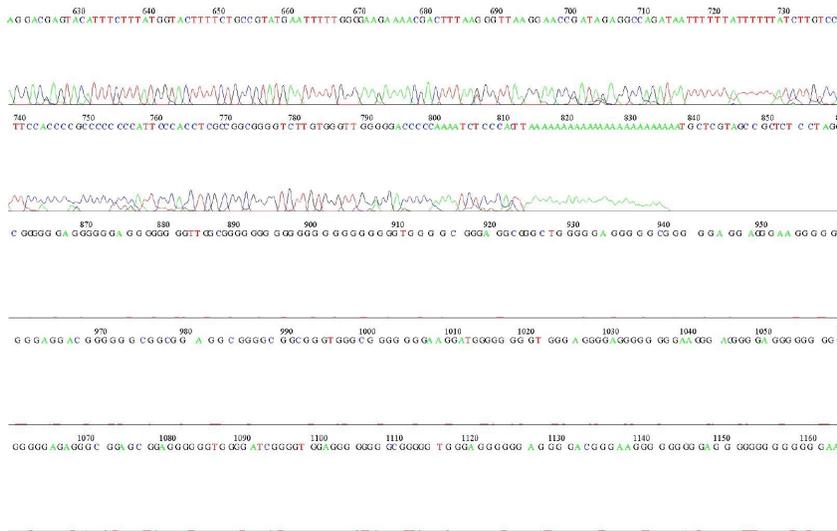
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Secuencias H2A FORWARD

File: H2A_H2A-FORWARD.ab1 Run Ended: 2024/2/13 17:49:40 Signal G:1086.A:1451 C:2989 T:2066
Sample: H2A_H2A-FORWARD Lane: 79 Base spacing: 17.30889 1167 bases in 15078 scans Page 1 of 2



File: H2A_H2A-FORWARD.ab1 Run Ended: 2024/2/13 17:49:40 Signal G:1086.A:1451 C:2989 T:2066
Sample: H2A_H2A-FORWARD Lane: 79 Base spacing: 17.30889 1167 bases in 15078 scans Page 2 of 2

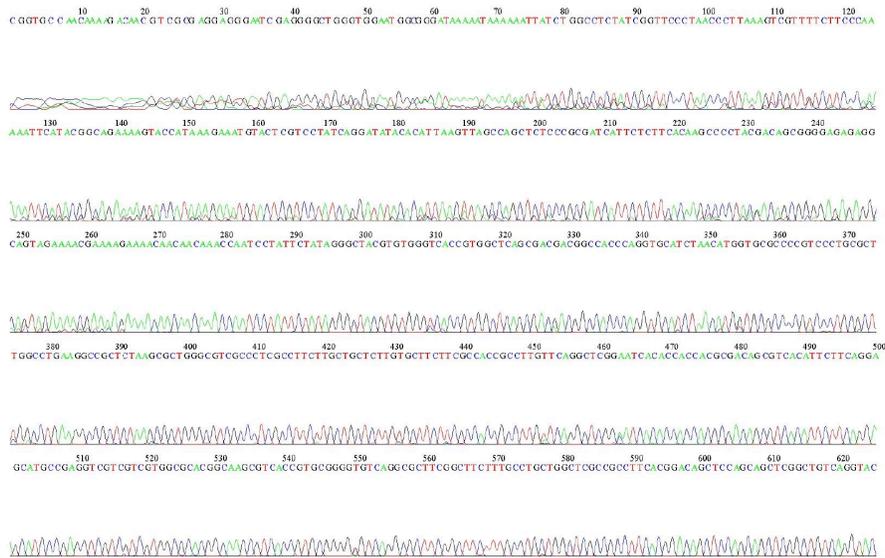




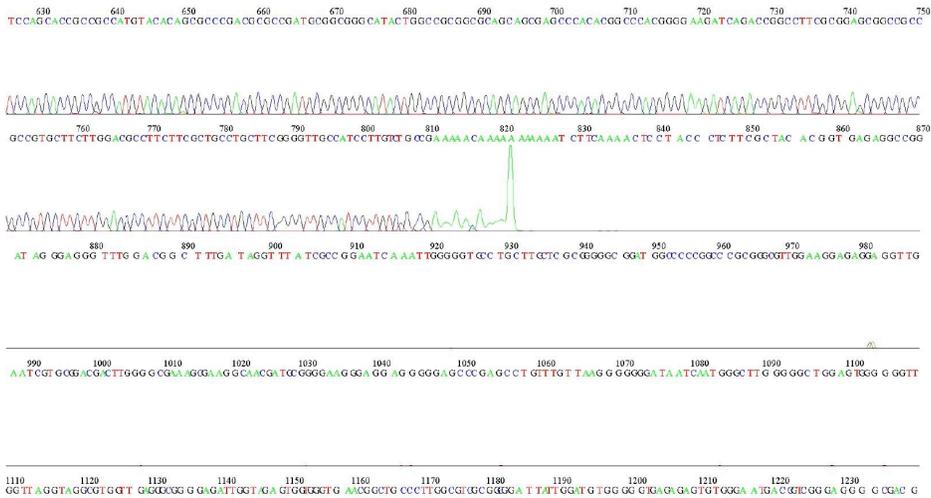
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Secuencias H2A REVERSE

File: H2A_H2A-REVERSE.ab1 Run Ended: 2024/2/9 0:58:36 Signal G:120 A:194 C:338 T:262
Sample: H2A_H2A-REVERSE Lane: 77 Base spacing: 15.811516 1305 bases in 13853 scans Page 1 of 2



File: H2A_H2A-REVERSE.ab1 Run Ended: 2024/2/9 0:58:36 Signal G:120 A:194 C:338 T:262
Sample: H2A_H2A-REVERSE Lane: 77 Base spacing: 15.811516 1305 bases in 13853 scans Page 2 of 2



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN
ESCUELA DE BIOLOGÍA

VERSIÓN 2021



81

Anexo 5 Aval Comité de Ética de Investigación Científica



4110

Bucaramanga, 27 de agosto de 2021

Estudiante
JULIANA CUADROS MARTÍNEZ
Maestría de Microbiología
Escuela de Microbiología
Facultad de Salud

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto "Análisis metagenómico del Intestino medio y posterior de *Rhodnius pallescens* (Barber, 1932) en insectos de laboratorio y silvestres colectados en Bucaramanga y su área metropolitana".

Cordial Saludo. El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión con presencialidad remota realizada del día 27 de agosto de 2021, según consta en el Acta N° 15, evaluó los ajustes realizados al proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos, el Comité de Ética acordó, por consenso, **APROBAR** el documento digital en su última versión.

De igual manera, aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.jsp>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

Así mismo, realizar los trámites y/o permisos necesarios para la recolección de los microorganismos o muestras requeridas para la investigación.

En caso de presentarse cualquiera de las siguientes circunstancias, solicitamos lo informe al correo comitedetica@uis.edu.co:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo, las cuales deben ir aprobadas, mediante acta, por su Maestría.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.
- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido en el Formato FIN 65.
- El informe debe ser enviado al correo: ceinci.seguimientos@uis.edu.co

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Centro, Carrera 19 - calle 35 - 02, Piso 2.
PBX: (7) 634-4000 Ext. 3808, Bucaramanga, Colombia.
E-mail: comitedetica@uis.edu.co <http://www.uis.edu.co>