

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR GENÉTICO BASADO EN SISTEMAS CRISPR-Cas PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi*

Idalia García, Melissa Morales & Armando Hernández García. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, Ciudad de México, C.P. 04510. igarcia9091@gmail.com

Palabras clave: CRISPR-Cas, Detección, Trypanosoma cruzi

Introducción. Se estima que hay 6 millones de personas infectadas con la Enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, que pueden desarrollar insuficiencia cardíaca, megacolon y lesiones cutáneas[1]. Debido a su importancia, es necesario desarrollar nuevos métodos de diagnóstico molecular con una mayor sensibilidad, especificidad y se entregue en un menor tiempo los resultados al paciente en comparación con otras técnicas actualmente usadas. La técnica de CRISPR-Cas puede ser usada para ello. CRISPR-Cas reconoce e hidroliza la secuencia diana a través de un complejo ribonucleoproteico (RNP) compuesto por la proteína Cas12 y un RNA guía; posteriormente corta DNA de cadena sencilla de forma inespecífica, el cual se utiliza como sonda que emite fluorescencia al ser cortada[2,3] permitiendo identificar la presencia de una secuencia genética asociada al parásito.

El objetivo del trabajo es desarrollar un biosensor genético basado en CRISPR-Cas acoplado a LAMP capaz de identificar secuencias específicas del parásito *Trypanosoma cruzi* para obtener un diagnóstico molecular rápido, sensible y específico.

Metodología. Diseño de Primers LAMP en software Primer Explorer y de gRNA software ChopChop para secuencia de DNA satélite y DNA minicírculos del cinetoplasto. Los primers y los gRNAs se sintetizaron comercialmente con IDT. La extracción de DNA genómico de *Trypanosoma cruzi* se hizo con el kit de extracción de ZymoBiomics DNA miniprep kit. La amplificación isotérmica del DNA blanco se llevó a cabo en un Termoblock a 65°C por 15 minutos, mientras que la reacción de detección con CRISPR-Cas se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. La lectura de fluorescencia se realizó con el equipo Cytation.

Resultados.

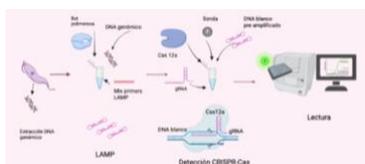


Fig. 1. Esquema del sistema CRISPR-Cas acoplado a LAMP para la detección de *Trypanosoma cruzi*

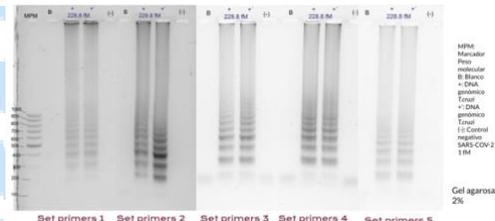


Fig. 2 Amplificación de DNA satélite mediante LAMP con set de primers diseñados, donde se observa que el set de primers 2 y 4 tiene una mayor intensidad las bandas de amplicones.

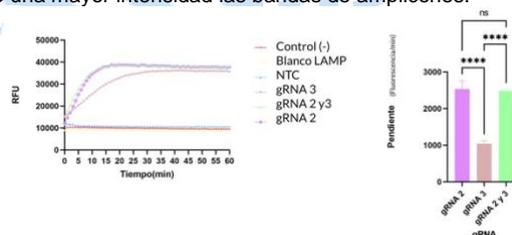


Fig. 3 Detección con sistema CRISPR-Cas de DNA satélite pre amplificado mediante LAMP con set de Primers alternativos set 4, donde se observa que el gRNA 2 tiene una mayor eficiencia de detección en menor tiempo con la mayor pendiente.

Conclusiones. Se implementó el sistema CRISPR-Cas acoplada a LAMP para la detección molecular de manera eficaz del DNA satélite de *Trypanosoma cruzi*.

Agradecimiento. Proyecto financiado por DGAPA-PAPIIT (IV200820) y por Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID)—Secretaría de Relaciones Exteriores Mexico (Proyectos COVID-19). Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez del Instituto de Investigaciones Biomédicas por la donación de los parásitos. Beca CONACYT con número de apoyo:189038978932.

Bibliografía.

1. OPS-OMS(2014)Enfermedad de chagas. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
2. Hernandez-Garcia, A., Morales-Moreno, M. D., Valdés-Galindo, E. G., Jimenez-Nieto, E. P., & Quezada, A. (2022). *Diagnostics*, 12(6), 1434.
3. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). *Science*, 360(6387), 436-439.
4. Ordóñez, D., Fernández-Soto, P., Fernández-Martín, A. M., Crego-Vicente, B., Febrer-Sendra, B., Diego, J. G. B., ... & Patarroyo, M. A. (2020). *Disease markers*, 2020