



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA**

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOCIENCIAS

**DESARROLLO DEL SISTEMA DETECTR (CRISPR-Cas12a) PARA LA DETECCIÓN
DEL VIRUS DEL DENGUE EN AGUAS RESIDUALES**

MARÍA ESTHER VIVANCO SUAZO

**DESARROLLO DEL SISTEMA DETECTR (CRISPR-Cas12a) PARA LA DETECCIÓN
DEL VIRUS DEL DENGUE EN AGUAS RESIDUALES**

MARÍA ESTHER VIVANCO SUAZO

Disertación de maestría presentada al Programa de Posgrado en Biociencias, del Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de Maestra en Ciencias.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

MARÍA ESTHER VIVANCO SUAZO

**DESARROLLO DEL SISTEMA DETECTR (CRISPR-Cas12a) PARA LA DETECCIÓN
DEL VIRUS DEL DENGUE EN AGUAS RESIDUALES**

Disertación de maestría presentada al Programa de Posgrado en Biociencias, del Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de Maestra en Ciencias.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Cristian Antonio Rojas
Orientador
UNILA

Dr. Julian Alberto Ferreras
Examinador
UNaM-CONICET

Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Examinador
UNILA

Foz de Iguacu, Estado de Paraná, 19 de diciembre de 2025.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

S939d

Suazo, María Esther Vivanco.

Desarrollo del sistema DETECTR (CRISPR-Cas12a) para la detección del virus del dengue en aguas residuales / María Esther Vivanco Suazo. - Foz do Iguaçu, 2025.

63 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

Orientador: Cristian Antonio Rojas.

1. Vírus da dengue. 2. Diagnóstico molecular. 3. Vigilância sanitária.

A Dios, el Creador del universo, fuente de toda ciencia y sabiduría, dedico este trabajo por ser la inspiración y la fortaleza que me han guiado en cada etapa de esta jornada.

A Él sea toda la gloria.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profunda gratitud a todas las personas e Instituciones que contribuyeron de manera directa e indirecta a la finalización de esta disertación.

A Dios, por la fuerza y la guía que iluminaron mi camino para finalizar esta etapa de forma exitosa.

A mi familia, por su amor, paciencia y apoyo incondicional, los cuales fueron el soporte fundamental para superar los desafíos en esta etapa de mi carrera.

A mi orientador, Prof. Dr. Cristian Rojas por su invaluable mentoría, dedicación y por contagiarme su pasión por la ciencia y la enseñanza. Agradezco especialmente la confianza depositada para realizar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, tanto técnico como estudiantes. Gracias por su compañía en las repeticiones de experimentos fallidos y por hacer de las largas horas en el laboratorio una experiencia de aprendizaje grata y enriquecedora.

Al apoyo financiero e Institucional que fue indispensable para el desarrollo de esta disertación. A la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA), a través del programa bolsa PROBIU (Programa de Bolsa Institucional). Asimismo, agradezco a la *Fundação Parque Tecnológico ITAIPU*, por la beca de *Desenvolvimento Tecnológico e Inovação* (DTI-I).

“Él revela lo profundo y lo escondido; conoce lo que está en tinieblas, y con él mora la luz”

Daniel 2:2 - Santa Biblia Versión Reina-Valera 1960.

SUAZO, María Esther Vivanco. 2025. **Desarrollo del sistema DETECTR (CRISPR-Cas12a) para la detección del virus del dengue en aguas residuales**. Orientadores: ROJAS, Cristian Antonio (orientador). 63 h.. Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Posgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz de Iguazu.

RESUMEN

El virus del dengue (DENV) constituye una amenaza significativa para la salud pública. Sus cuatro serotipos y la similitud de síntomas con otras infecciones virales complica su diagnóstico y control. En este contexto, la Epidemiología Basada en Aguas Residuales (WBE) emerge como una herramienta prometedora para el monitoreo del DENV, ya que monitorea la circulación a nivel poblacional sin la necesidad de exámenes individuales y contempla la excreción tanto de pacientes sintomáticos como asintomáticos. Sin embargo, la baja concentración y la rápida degradación del RNA viral en las muestras de aguas residuales exigen plataformas de detección con una sensibilidad superior a las metodologías convencionales. El objetivo de este proyecto fue desarrollar un sistema de diagnóstico molecular basado en DETECTR (CRISPR-Cas12a) para la detección sensible y específica del RNA del DENV en muestras de aguas residuales en la ciudad de Foz do Iguazu, PR. Para ello, se diseñaron crRNAs específicos para DENV-2 y DENV-3, se realizó la producción *in vivo* y la purificación de la proteína AsCas12a, y se comprobó la actividad catalítica del complejo ribonucleoproteico (RNP). Los resultados confirmaron la funcionalidad del sistema *in vitro*, aunque demostraron una fuerte dependencia de las condiciones del buffer de reacción; se desarrollaron metodologías de extracción de material genético viral de muestras de aguas residuales para la posterior validación del sistema DETECTR; así también, fue diseñado un complejo *in vivo* para la detección múltiple del DENV. Se concluye que el sistema DETECTR es una herramienta viable y sensible para la detección del DENV en aguas residuales, en la cual son necesarias optimizaciones en las condiciones de reacción para mitigar la inhibición de la matriz y garantizar la robustez de detección.

Palabras clave: DENV; AsCas12a; vigilancia sanitaria; epidemiología; WBE.

SUAZO, María Esther Vivanco. 2025. **Desenvolvimento do sistema DETECTR (CRISPR-Cas12a) na detecção do vírus da dengue em águas residuais**. Orientadores: ROJAS, Cristian Antonio (orientador). 63 f.. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

O vírus da dengue (DENV) constitui uma ameaça significativa à saúde pública. Seus quatro serotipos e a semelhança de sintomas com outras infecções virais complicam o diagnóstico e o controle da patologia. Neste contexto, a Epidemiologia Baseada em Águas Residuais (WBE) emerge como uma ferramenta promissora para o monitoramento do DENV, uma vez que permite observar a circulação em nível populacional sem a necessidade de exames individuais, contemplando a excreção de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Todavia, a baixa concentração e a rápida degradação do RNA viral em amostras de esgoto exigem plataformas de detecção com sensibilidade superior às metodologias convencionais. O objetivo deste projeto foi desenvolver um sistema de diagnóstico molecular baseado em DETECTR (CRISPR-Cas12a) para a detecção sensível e específica do RNA do DENV em amostras de águas residuais na cidade de Foz do Iguaçu, PR. Para tanto, foram delineados crRNAs específicos para DENV-2 e DENV-3, realizou-se a produção *in vivo* e a purificação da proteína AsCas12a, e comprovou-se a atividade catalítica do complexo ribonucleoproteico (RNP). Os resultados confirmaram a funcionalidade do sistema *in vitro*, embora tenham demonstrado uma forte dependência das condições do tampão de reação; foram desenvolvidas metodologias de extração de material genético viral de amostras de águas residuais para a posterior validação do sistema DETECTR; outrossim, foi projetado um complexo *in vivo* para a detecção múltipla do DENV. Conclui-se que o sistema DETECTR é uma ferramenta viável e sensível para a detecção do DENV em águas residuais, sendo necessárias otimizações nas condições de reação para mitigar a inibição da matriz e garantir a robustez da detecção.

Palavras-chave: DENV; AsCas12a; vigilância sanitária; epidemiologia; WBE.

SUAZO, María Esther Vivanco. 2025. **Development of the DETECTR system (CRISPR-Cas12a) for dengue virus detection in wastewater**. Advisor: ROJAS, Cristian Antonio (advisor). 63 s.. *Dissertation (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.*

ABSTRACT

The dengue virus (DENV) represents a significant threat to public health. The existence of four distinct serotypes, coupled with symptomatic similarities to other viral infections, complicates both diagnosis and disease control. In this context, Wastewater-Based Epidemiology (WBE) emerges as a promising tool for DENV surveillance, as it monitors population-level circulation without requiring individual testing, accounting for viral shedding from both symptomatic and asymptomatic individuals. However, the low concentration and rapid degradation of viral RNA in sewage samples necessitate detection platforms with sensitivity superior to conventional methodologies. The objective of this project was to develop a molecular diagnostic system based on DETECTR (CRISPR-Cas12a) for the sensitive and specific detection of DENV RNA in wastewater samples from Foz do Iguaçu, PR. To this end, specific crRNAs for DENV-2 and DENV-3 were designed; the in vivo production and purification of the AsCas12a protein were performed; and the catalytic activity of the ribonucleoprotein (RNP) complex was verified. The results confirmed the in vitro functionality of the system, albeit demonstrating a strong dependence on reaction buffer conditions. Furthermore, viral genetic material extraction methodologies from wastewater were developed for subsequent DETECTR validation, and an in vivo complex for multiplex DENV detection was designed. It is concluded that the DETECTR system is a viable and sensitive tool for DENV detection in wastewater, though optimizations in reaction conditions remain necessary to mitigate matrix inhibition and ensure detection robustness.

Keywords: DENV; AsCas12a; health surveillance; epidemiology; WBE.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El virus del dengue y sus principales estructuras.....	16
Figura 2. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 3. Ciclo de incubación del DENV en el mosquito	18
Figura 4. Transmisión del DENV.....	19
Figura 5. Panel de monitoreo del DENV a nivel nacional - Brasil.....	19
Figura 6. Epidemiología basada en aguas residuales.....	20
Figura 7. Amplificación viral RT-qPCR indicando el Ct.....	21
Figura 8. Clasificación sistemas CRISPR-Cas.....	22
Figura 9. Mecanismos del sistema inmunológico adaptativo CRISPR-Cas	23
Figura 10. Sistema de detección DETECTR.....	24
Figura 11. Activación proteína Cas12a.....	25
Figura 12. Diseño crRNA para la detección de DENV.....	35
Figura 13. Diseño control positivo/diana.....	36
Figura 14. Gel de agarosa 2% PCR de ensamblaje.....	37
Figura 15. Transformación de cepas <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	38
Figura 16. Inducción con IPTG cepas <i>E. coli</i> BL21 (DE3) con plásmido AsCas12a.....	39
Figura 17. Sonicado celular.....	39
Figura 18. Purificación I proteína AsCas12a.....	40
Figura 19. Purificación II proteína AsCas12a.....	41
Figura 20. Purificación III proteína AsCas12a.....	41
Figura 21. Test unión de RNP para DENV-3	42
Figura 22. RNP 50 nM para detección de DENV-2 con buffer r2.1.....	43
Figura 23. RNP 50 nM para detección de DENV-3 con buffer r2.1.....	43
Figura 24. RNP 50 nM para detección de DENV-2 con buffer 10X complejo.....	44
Figura 25. RNP 50 nM para detección de DENV-3 con buffer 10X complejo.....	44
Figura 26. Secuencias DENV-1 en el diseño de <i>locus</i> CRISPR.....	45
Figura 27. Secuencias DENV-2 en el diseño de <i>locus</i> CRISPR.....	45
Figura 28. Secuencias DENV-3 en el diseño de <i>locus</i> CRISPR.....	45
Figura 29. Secuencias DENV-4 en el diseño de <i>locus</i> CRISPR.....	46
Figura 30. Secuencias DENV-1,2,4 en el diseño de <i>locus</i> CRISPR.....	46
Figura 31. Secuencias DENV-2,3 en el diseño de <i>locus</i> CRISPR.....	46
Figura 32. Diseño <i>locus</i> I.....	47
Figura 33. Diseño <i>locus</i> II.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las proteínas estructurales y no estructurales del DENV.....	16
Tabla 2. Reacción PCR para unión y amplificación de primers oligonucleótidos.....	30
Tabla 3. Reacción transcripción <i>in vitro</i>	30
Tabla 4. Ensamblaje complejo ribonucleoproteico.....	33
Tabla 5. Cuantificación producto PCR de ensamblaje e IVT.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

b	Intersección del eje "y" de la curva estándar
cg/L	Copias Genómicas del virus por Litro de aguas residuales
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciales
CRISPR-Cas	CRISPR asociado a proteína Cas
crRNA	RNA CRISPR
Ct	ciclo umbral
DENV	Virus del Dengue
DETECTR	Reportero Trans CRISPR Dirigido a DNA Endonucleasa
DTI	<i>Desenvolvimento Tecnológico e Inovação</i>
dsDNA	DNA bicatenario
FD	Fiebre del Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica del Dengue
IVT	Transcripción <i>In Vitro</i>
Km	Kanamicina
LAMP	Amplificación Isotérmica Mediante Bucle
LB	Luria-Bertani
m	Pendiente de la curva estándar
MGEs	Elementos Genéticos Móviles
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
nt-nt	nucleótido- nucleótido
PAM	Motivo Adyacente al Protoespaciador
PPG-BC	Programa de Posgrado en Biociencias
pre-crRNA	crRNA precursor
PROBIU	Programa de Bolsa Institucional
qPCR	Reacción de la Cadena Polimerasa Cuantitativa
RNP	Complejo Ribonucleoproteico
RT	Transcripción Reversa
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Inversa Cuantitativa en Tiempo Real
RPA	Amplificación por Polimerasa Recombinasa
ssDNA	DNA monocatenario

ssRNA	RNA monocatenario
SOC	Medio de Recuperación Celular Competente
TB	Terrific Broth
UNILA	Universidad Federal de la Integración Latinoamericana
WBE	Epidemiología Basada en Aguas Residuales

ÍNDICE

RESUMEN	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 INTRODUCCIÓN	16
1.1 Marco teórico	16
1.1.1 <i>Virus del Dengue</i>	16
1.1.2 <i>Vigilancia sanitaria</i>	20
1.1.3 <i>Uso de CRISPR-Cas para detección</i>	22
1.2 Justificativa	26
1.3 Pregunta norte	26
1.4 Hipótesis	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 General	28
2.2 Específicos	28
3 METODOLOGÍA	29
3.1 Diseño de crRNAs	29
3.1.1 <i>Análisis bioinformático y diseño de crRNAs in silico</i>	29
3.1.2 <i>Amplificación por PCR y transcripción in vitro</i>	29
3.2 Producción proteína AsCas12a	30
3.2.1 <i>Extracción DNA plasmídico</i>	30
3.2.2 <i>Producción proteína recombinante</i>	31
3.2.3 <i>Inducción por IPTG y purificación</i>	31
3.2.4 <i>Cuantificación proteica</i>	32
3.2.5 <i>Gel SDS-page</i>	33
3.3 Complejo ribonucleoproteico	33
3.4 Extracción RNA de muestras de aguas residuales	33
3.5 Producción de un complejo ribonucleoproteico <i>in vivo</i>	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Diseño crRNAs	35
4.1.1 <i>Análisis bioinformático y diseño de crRNAs in silico</i>	35
4.1.2 <i>Amplificación por PCR y transcripción In Vitro</i>	36
4.2 Producción proteína recombinante	38
4.2.1 <i>Extracción DNA plasmídico y transformación en E. coli BL21 (DE3)</i>	38

4.2.2 Transformación, inducción y lisis celular.....	38
4.2.3 Purificación proteína AsCas12a.....	40
4.2.4 Cuantificación proteína AsCas12a.....	42
4.3 Complejo ribonucleoproteico.....	42
4.3.1 Prueba de unión de complejos.....	42
4.4 Complejo ribonucleoproteico <i>in vivo</i>.....	44
5 DISCUSIÓN.....	48
6 CONCLUSIONES.....	51
7 REFERENCIAS.....	52

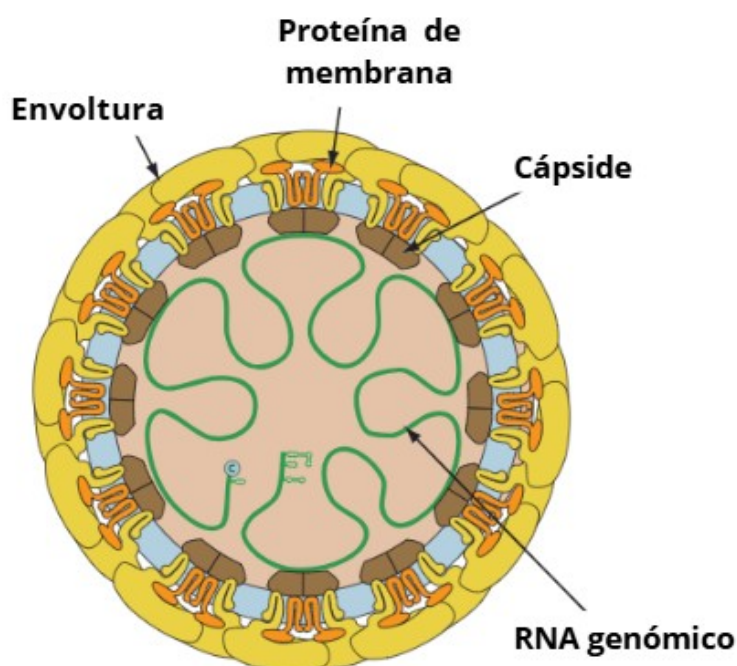
1 INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico

1.1.1 Virus del Dengue

El virus del dengue (DENV) es considerada la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos en humanos (HARAPAN *et al.*, 2020). Siendo un virus de RNA monocatenario (ssRNA), pequeño y esférico (Figura 1) que pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* (KULARATNE & DALUGAMA, 2022). Su genoma de RNA es de sentido positivo y de aproximadamente 10,7 kb, siendo conformado por tres proteínas estructurales (cápside, membrana y envoltura) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS3B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (MADHRY *et al.*, 2023) descritas en la Tabla 1.

Figura 1. El virus del dengue y sus principales estructuras



Fuente: VIRALZONE, 2025.

Tabla 1. Descripción de las proteínas estructurales y no estructurales del DENV

Proteína	Descripción
C	Participa en la encapsidación del genoma.
prM/M	Funciona como una estructura tipo tapón que protege al péptido de fusión E de una fusión prematura antes de la liberación del virus.
E	Media la unión y fusión del virus con la membrana de la célula huésped (dominio III) y es responsable de la determinación del alcance del huésped, el tropismo y la virulencia (dominio III)
NS1	Participa en el complejo de replicación del RNA viral, así como en la defensa a través de la inhibición de la activación del complemento.

NS2A	NS2A implica en la coordinación del cambio entre el empaquetamiento del RNA y la replicación y el antagonismo del interferón (IFN).
NS2B	NS2B se asocia con NS3 para formar el complejo de la proteasa del DENV y sirve como cofactor en la activación de la serina proteasa del DENV de la NS3.
NS3	La NS3 es una proteína multifuncional con actividad enzimática de serina proteasa similar a la quimotripsina, RNA helicasa y RNA trifosfatasa (RTP/NTPasa). NS3 participa en la escisión de la poliproteína del DENV, así como en la replicación del RNA.
NS4A	NS4A induce alteraciones en la membrana que son importantes para la replicación del virus.
NS4B	La NS4B ayuda a la replicación del RNA viral a través de su interacción directa con la NS3 y bloquea la transducción de señales inducidas por el IFN.
NS5	NS5 es una enzima bifuncional con un dominio metiltransferasa y RNA polimerasa dependiente de RNA.

Fuente: HARAPAN *et al.*, 2020.

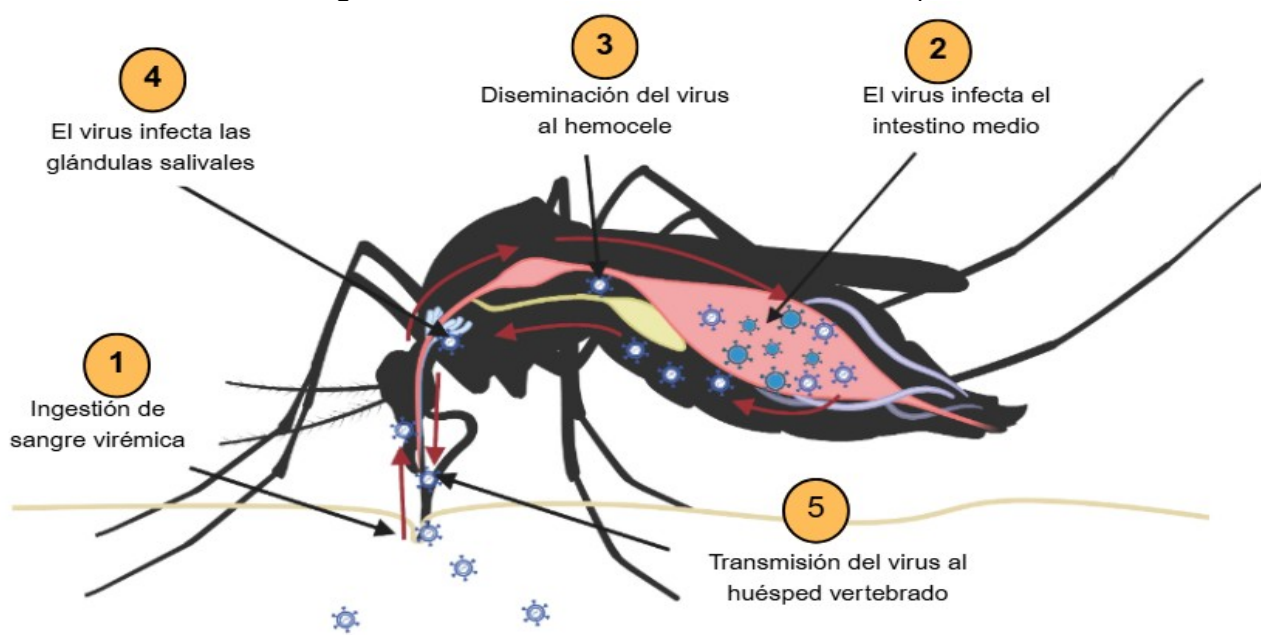
Existen cuatro serotipos antigénicos y genéticamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (AHMED *et al.*, 2022). La transmisión de todos los serotipos del virus hacia el hombre ocurre a través de la picadura de las hembras infectadas del principal vector en Brasil y en el mundo: el mosquito *Aedes aegypti* (Figura 2) (CAMARA, 2024). No obstante, en algunas regiones de África y Asia, la transmisión también ocurre a través de *Aedes albopictus* (MEDEIROS *et al.*, 2024).

Figura 2. Mosquito *Aedes aegypti*



Fuente: SOZZA, 2025.

Cuando un mosquito pica a una persona infectada (Figura 3.1), ésta ingiere la sangre infectada por DENV. Una vez el virus ingresa, se replica en el intestino medio del mosquito (Figura 3.2) y posteriormente se propaga por el hemocele (Figura 3.3) hasta infectar las glándulas salivales (Figura 3.4) (PERVEEN *et al.*, 2023).

Figura 3. Ciclo de incubación del DENV en el mosquito

Fuente: PERVEEN *et al.*, 2023.

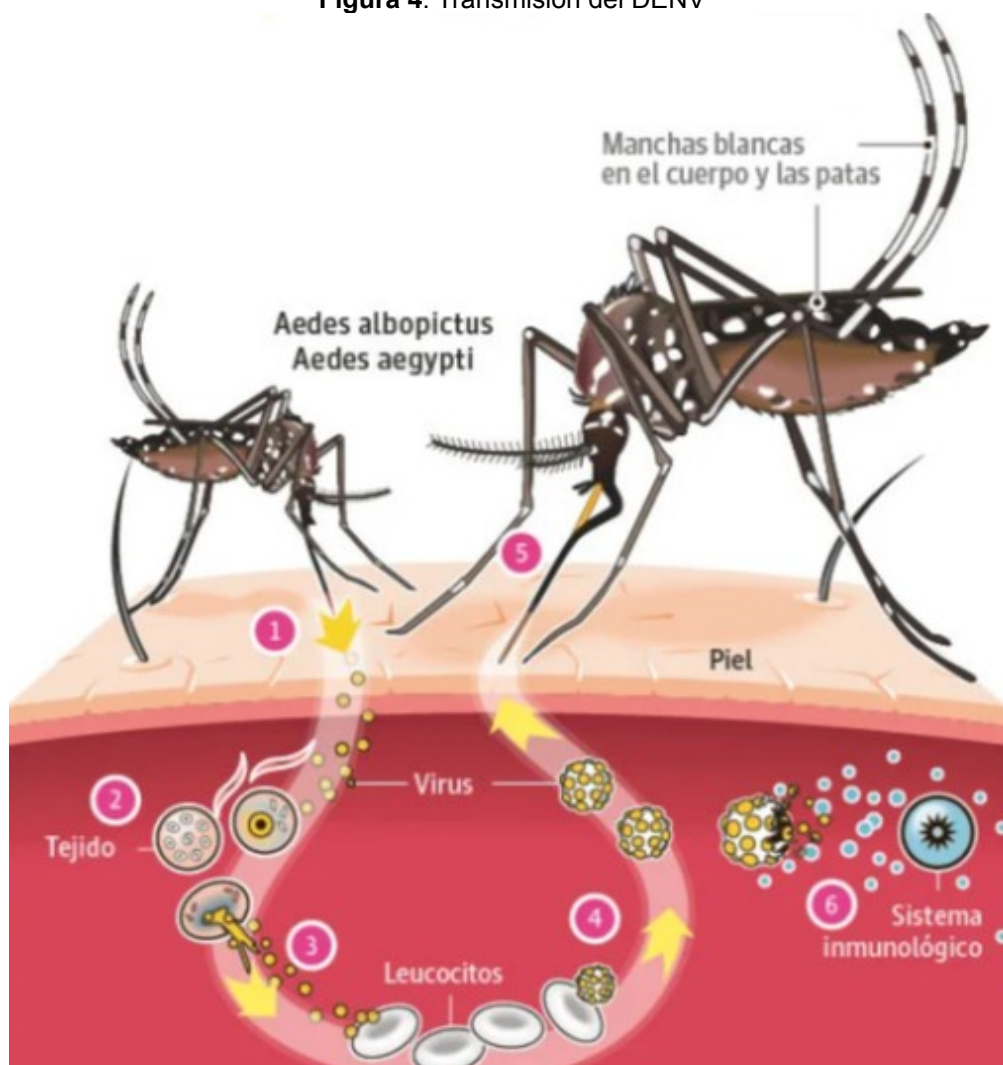
Una vez que el mosquito hembra infectado pica a una persona sana, el virus es transmitido por medio de su saliva (Figura 4.1) y replicado en los tejidos cercanos a la picadura o en el ganglio linfático (Figura 4.2), para luego propagarse a través de la sangre infectando a los leucocitos (Figura 4.3). El virus sale de los leucocitos y circula por la sangre (Figura 4.4) hasta que el sistema inmunológico comienza a destruir las células infectadas (Figura 4.6). Finalmente, otros mosquitos se alimentan de la persona infectada (Figura 4.5) y pican a otra persona sana, propagando el virus en la comunidad e iniciando el ciclo de contagio (LA VERDAD, 2018).

Se ha observado un incremento de casos por DENV en los últimos años, estimando un contagio de 390 millones de personas por año en el mundo (FREITAS *et al.*, 2024). Siendo Brasil uno de los países con mayor incidencia, según TREML *et al.* (2024). Estas incidencias ocurren principalmente en ubicaciones geográficas tropicales y subtropicales (ISLAM *et al.*, 2023). Por su parte, la mayoría de los casos de dengue es asintomática (AGUILAR *et al.*, 2024) y en casos sintomáticos se presentan síntomas similares con chikungunya, zika y fiebre amarilla, pudiendo ser diagnosticado erróneamente (CARABALI *et al.*, 2021; TCHIBOZO *et al.*, 2022). El número de casos confirmados y por confirmar en Brasil se observan en la Figura 5, donde se destacan más de 1 millón de casos de contagios probables por DENV.

Por consecuencia, un diagnóstico erróneo puede retrasar la atención de los pacientes (VICENTE *et al.*, 2021). Principalmente cuando la fiebre del dengue (FD) puede

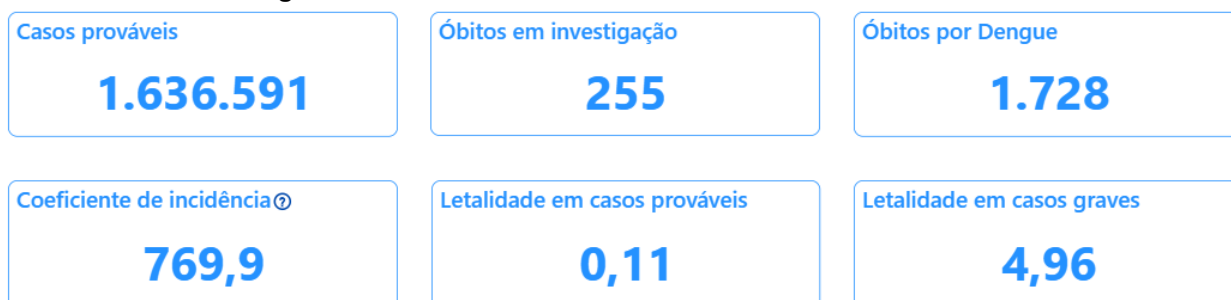
ser causada por cualquiera de los serotipos y evolucionar a fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (RAMYASOMA *et al.*, 2020). En los cuadros más graves, las manifestaciones son muy complejas y no se comprenden completamente (BHATT *et al.*, 2020).

Figura 4. Transmisión del DENV



Fuente: LA VERDAD, 2018.

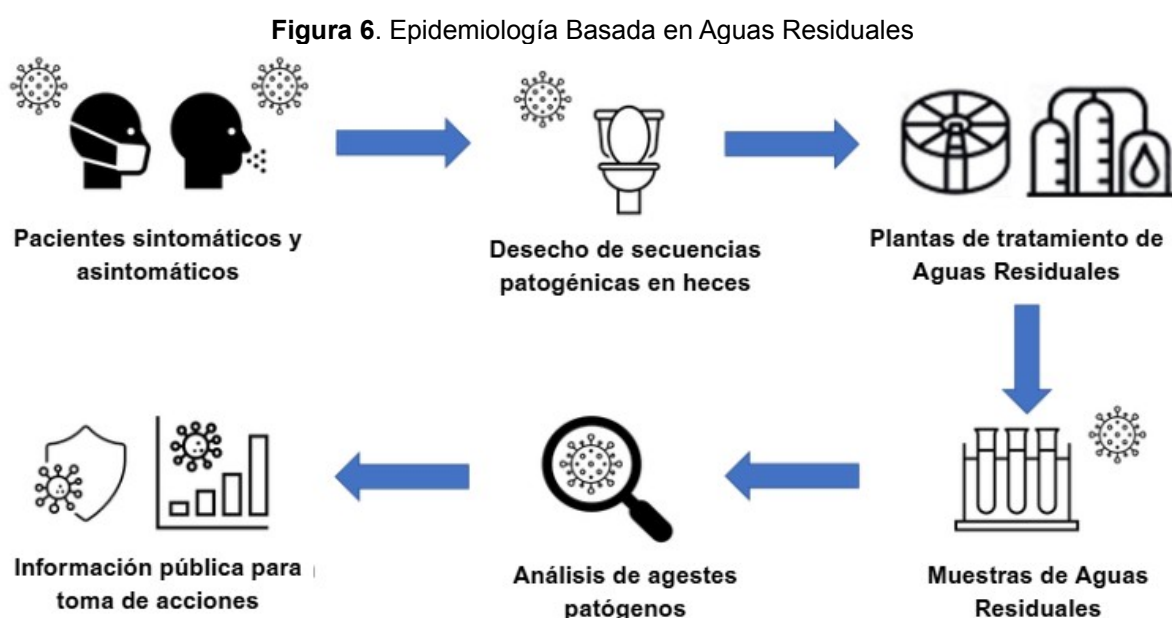
Figura 5. Panel de monitoreo del DENV a nivel nacional - Brasil



Fuente: MINISTERIO DA SAÚDE, 2025.

1.1.2 Vigilancia sanitaria

Hoy en día, metodologías como Epidemiología Basada en Aguas Residuales (WBE por sus siglas en inglés *Wastewater-Based Epidemiology*) ofrece una alternativa no invasiva y rentable a la vigilancia clínica tradicional (WOLFE *et al.*, 2024). Permitiendo monitorear un determinado patógeno presente en una población (CRONE *et al.*, 2020), estimando un aumento y/o disminución, circulación en determinados periodos de tiempo (PRADO *et al.*, 2023) y la detección de posibles brotes (PARACCHINI *et al.*, 2024). En la Figura 6, se observa el desarrollo de la metodología y principios de WBE.



Fuente: STONY BROOK UNIVERSITY, 2025. Modificada por autoría propia.

El uso de esta metodología fue de gran apoyo para la vigilancia del COVID-19. En Brasil, fue creada la *Rede Monitoramento Covid Esgotos* con el objetivo de ampliar la disponibilidad de informaciones para el enfrentamiento de la pandemia de Covid-19 (INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS E TECNOLOGIA ETEs SUSTENTAVEIS, 2025).

En este mismo ámbito, el genoma del DENV puede detectarse en aguas residuales utilizando métodos moleculares sensibles, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Inversa Cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR) (THAKALI *et al.*, 2022). En donde, la cuantificación del RNA viral en aguas residuales puede correlacionarse con la carga viral en la población y las tendencias de la enfermedad (SINGER *et al.*, 2023). Primeramente, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (2021) menciona que

la carga viral se expresa en cg/L (copias genómicas del virus por litro de aguas residuales), para ello se consideran los volúmenes de la muestra, concentrado (eluido), extracto de ácidos nucleicos y reacción RT-qPCR, según la siguiente fórmula:

$$\frac{cg}{L} mL = N^{\circ} \text{ copias genómicas} \times \frac{RNA_{total} mL}{RNA_{RTqPCR}} \times \frac{Concentrado_{Total}}{Concentrado_{Extraído}} \times \frac{1000}{muestra}$$

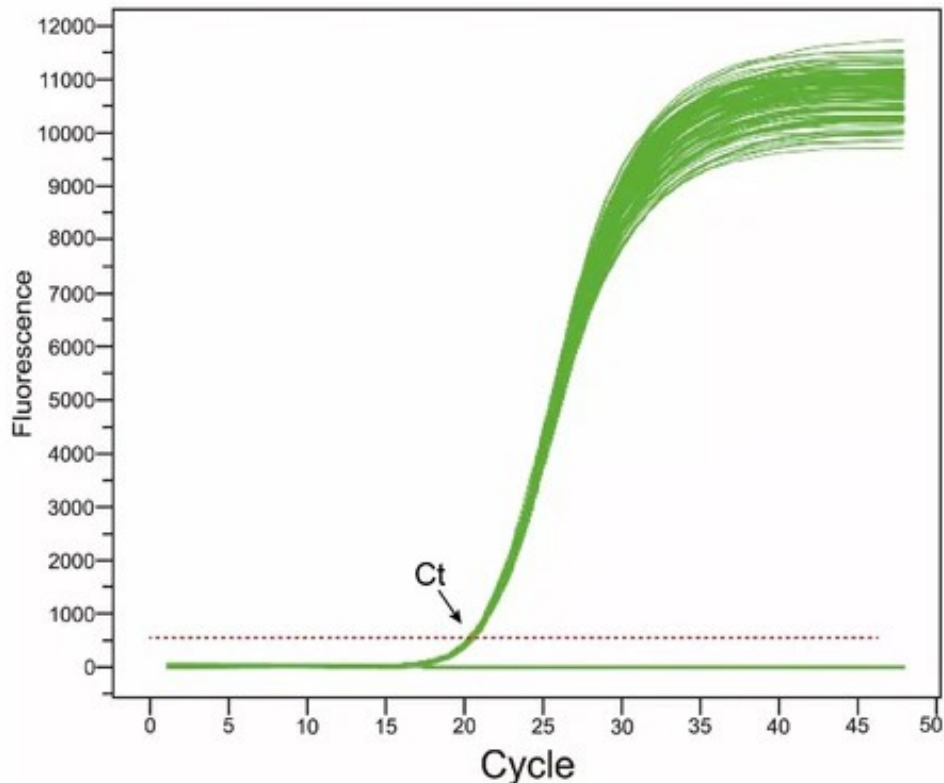
Para ello, el número de copias genómicas se calculan según:

$$N^{\circ} \text{ copias genómicas} = \frac{10^{Ct-b}}{m}, \text{ donde}$$

- Ct: valor del ciclo umbral medido para la muestra desconocida;
- b: intersección del eje "y" de la curva estándar; y
- m: pendiente de la curva estándar.

El umbral de ciclos (Ct) en RT-qPCR indica el ciclo en que se detecta el virus en la muestra (Figura 7). Es un valor inversamente proporcional, donde un número bajo de Ct indica una mayor carga viral (CUMPLIDO *et al.*, 2021).

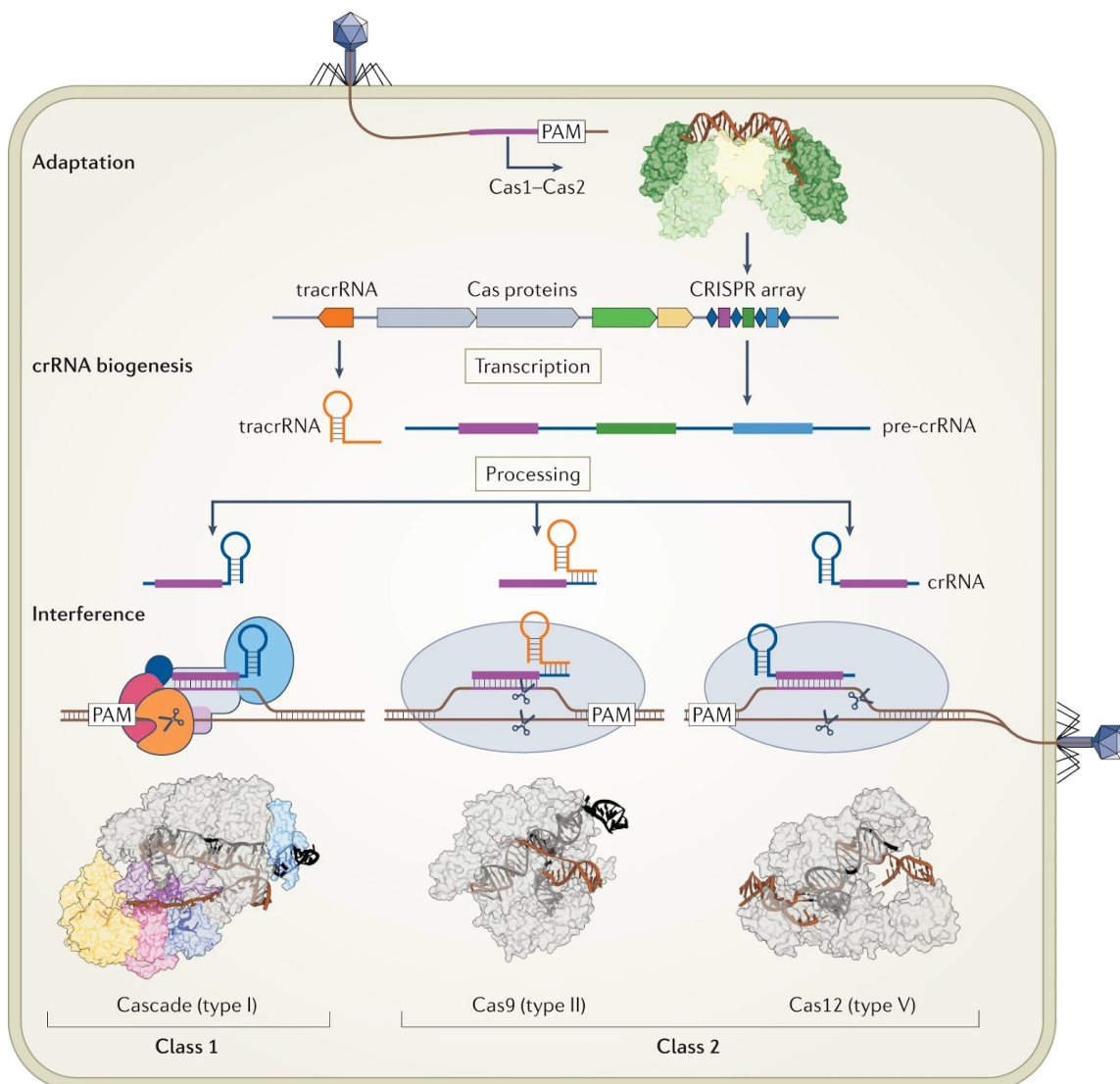
Figura 7. Amplificación viral de RT-qPCR indicando el Ct



Fuente: YEASFN. 2024.

invasor, creando un complejo ribonucleoproteico (RNP) con la capacidad de cortar el genoma del virus (GRONOWSKI, 2018). Posteriormente, Cas reconoce un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) rico en timina (GENG *et al.*, 2020) propio de genoma invasor. Este reconocimiento permite la especificidad del sistema CRISPR (SWARTS *et al.*, 2017). Activando, finalmente la activa endonucleasa de Cas.

Figura 9. Mecanismos del sistema inmunológico adaptativo CRISPR-Cas

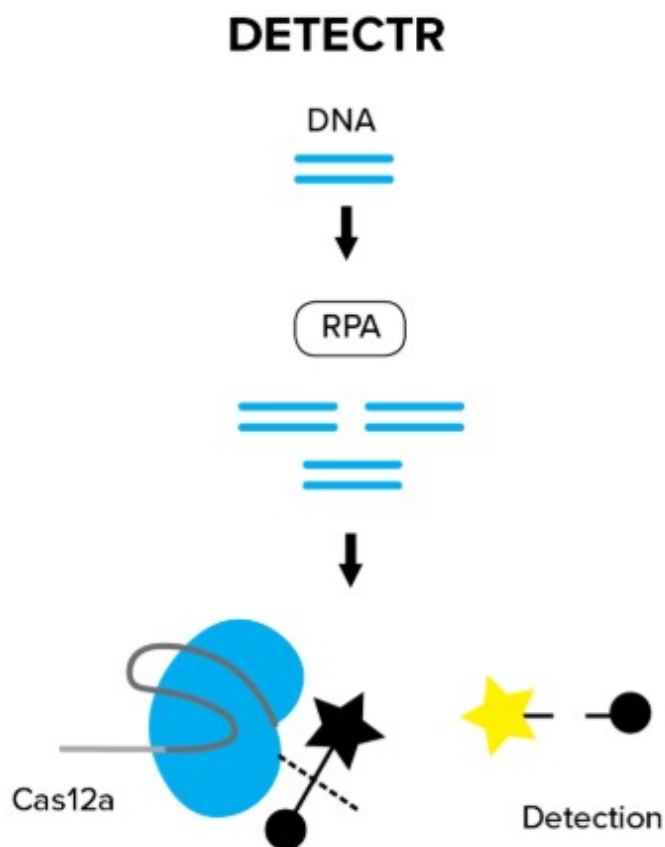


Fuente: WANG *et al.*, 2022.

Esta característica de las proteínas Cas para dirigirse a secuencias de ácidos nucleicos específicas las convierte en herramientas ideales para el diagnóstico molecular (ZAKIYYAH *et al.*, 2022). Entre ellas, herramientas como DETECTR (Reportero Trans CRISPR Dirigido a DNA Endonucleasa) (MUSTAFA & MAKHAWI, 2021) (Figura 10) utiliza

CRISPR-Cas12 para detectar secuencias de DNA específicas mediante un crRNA (RNA CRISPR) (CECCHETELLI, 2020).

Figura 10. Sistema de detección DETECTR



Fuente: CECCHETELLI, 2020.

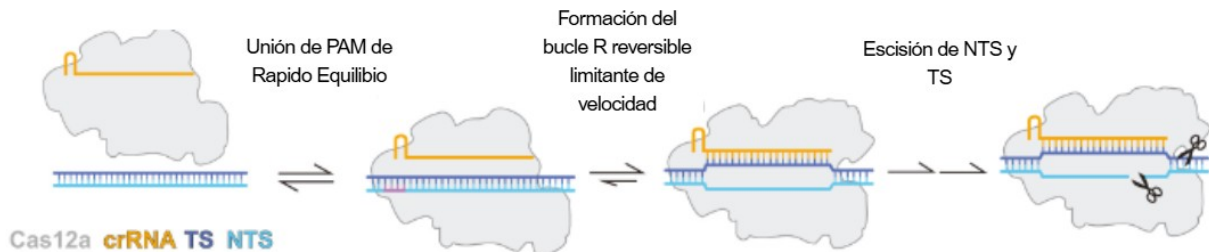
La activación de la proteína Cas12 genera una actividad colateral que amplifica la señal de detección (YUAN *et al.*, 2022). Esa actividad provoca un daño colateral cuando el complejo se forma y se activa la escisión indiscriminada e inespecífica de ácidos nucleicos cercados (KADAM *et al.*, 2023).

Las variantes como Cas12a son altamente versátiles, puesto que estas tienen la capacidad de procesar sus propios crRNA precursores (pre-crRNA) independiente de RNasa III del huésped (KURIHARA *et al.*, 2022). A la vez, RNP escinden dianas de DNA monocatenario (ssDNA) y bicatenario (dsDNA) específicos y complementarios al crRNA (NALEFSKI *et al.*, 2021).

Una vez unido, la guía de ARNcr invade el ADN objetivo, formando un bucle R que activa el dominio nucleasa RuvC. Esta activación secuencial y el estado de transición

tardío aseguran una alta especificidad en la escisión del ADN (Figura 11) (STROHKENDL *et al.*, 2024).

Figura 11. Activación proteína Cas12a



Fuente: STROHKENDL *et al.*, 2024.

Este sistema ha emergido como una plataforma prometedora para la detección rápida y precisa de ácidos nucleicos (ARAUJO *et al.*, 2024). Ofreciendo una alta sensibilidad, lo que permite la identificación de patógenos incluso a bajas concentraciones (Li *et al.*, 2023), además presenta gran sensibilidad y especificidad (GONG *et al.*, 2021).

El desarrollo de estas plataformas de diagnóstico ha abierto nuevas vías para la detección rápida y precisa de enfermedades (ARGARWAL, 2023), superando las limitaciones de tiempo de los métodos convencionales como la Reacción de la Cadena Polimerasa Cuantitativa (qPCR) enfrentan limitaciones como el tiempo y detección (CHENG *et al.*, 2025). Las ventajas logísticas son claras, ya que el bajo costo y la simplicidad de los ensayos basados en CRISPR los hacen accesibles para entornos con recursos limitados (CURTI *et al.*, 2020) y la capacidad de realizar todo el proceso de detección a una temperatura constante simplifica significativamente los requisitos de equipos (SU *et al.*, 2022). Esto permite un tiempo de respuesta rápido y adaptable para su uso en entornos con recursos limitados (PARK *et al.*, 2021) dando como resultado una detección muy sensible, más rápida y rentable en el futuro (KELLNER *et al.*, 2019).

Para la aplicación en vigilancia sanitaria es fundamental la optimización de las condiciones de reacción para los ensayos (STROHKENDL *et al.*, 2024) y la estabilidad de los biosensores Cas12a en condiciones ambientales variables son cruciales para aplicaciones de monitoreo a largo plazo (TRUJILLO *et al.*, 2022). Las orientaciones de la ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (2022) enfatizan la necesidad de pruebas precisas y oportunas para la vigilancia, el manejo clínico y la respuesta a brotes en el diagnóstico de laboratorio de arbovirus. En consecuencia, MANN & PITTS (2022), sugiere que la integración de la tecnología CRISPR-Cas en dispositivos de punto de

atención podría transformar el monitoreo de patógenos en agua potable y aguas residuales. GOOTENBERG *et al.* (2023) destaca que las innovaciones actuales en diagnósticos basados en CRISPR-Cas se centran en mejorar la velocidad, la capacidad de multiplexación y la portabilidad de las pruebas para aplicación en entornos clínicos y de vigilancia.

1.2 Justificativa

El virus del dengue representa en la actualidad una amenaza para la salud pública en Brasil. Tal es su magnitud, que existen sistemas de monitoreo a lo largo de todo el país mediante sistemas de vigilancia convencionales y campañas públicas sobre la vigilancia del mosquito *Aedes aegypti*. En este contexto, la Epidemiología Basada en Aguas Radiales representa una de las fronteras más prometedoras para la vigilancia sanitaria, pues permite evaluar la circulación viral en toda la comunidad de manera anónima y rentable, incluyendo a los portadores asintomáticos, un eslabón clave en la cadena de transmisión. Sin embargo, la rápida degradación del RNA significa un obstáculo en técnicas como el RTq-PCR. Este proyecto aborda directamente dicha barrera tecnológica mediante el desarrollo de un sistema de detección que aplica los principios de la ingeniería genética. El proyecto se centra en la construcción y adaptación de una plataforma de diagnóstico basada en la tecnología CRISPR, diseñada específicamente para identificar el RNA del virus del dengue con alta precisión y sensibilidad. El mérito científico de este trabajo radica en la validación e implementación de nuevas metodologías para laboratorios de análisis molecular en aguas residuales.

1.3 Pregunta norte

¿Es posible desarrollar y validar una plataforma de diagnóstico basada en el sistema DETECTR (CRISPR-Cas12) que alcance la sensibilidad y especificidad requeridas para la detección fiable del RNA del virus del dengue en la compleja matriz de las aguas residuales?.

1.4 Hipótesis

Se postula que una plataforma de diagnóstico molecular, basada en el sistema DETECTR puede ser desarrollada para alcanzar una alta sensibilidad y especificidad en la detección del RNA del virus del dengue. Se hipotetiza que, mediante la optimización de componentes clave como el diseño de crRNA y las condiciones de la reacción, la plataforma será capaz de identificar de manera fiable secuencias virales en la compleja matriz de las aguas residuales incluso en bajas concentraciones, validando su funcionalidad como una herramienta efectiva y viable para la vigilancia epidemiológica del dengue.

2 OBJETIVOS

2.1 General

- Desarrollar un sistema de diagnóstico molecular basado en el sistema DETECTR (CRISPR-Cas12) adaptado para la detección sensible y específica del RNA del virus del dengue en muestras de aguas residuales de la ciudad de Foz do Iguaçu, PR.

2.2 Específicos

- Identificar mediante análisis bioinformático, secuencias del virus del dengue (DENV) adecuadas para su reconocimiento específico por el sistema de detección en crRNAs;
- sintetizar crRNAs a partir de moldes generados por amplificación por PCR y posterior transcripción *in vitro* (IVT);
- producir la proteína AsCas12a mediante expresión *in vivo* y establecer un protocolo eficiente para su purificación;
- comprobar *in vitro* la formación del complejo ribonucleoproteico AsCas12a–crRNA y caracterizar su actividad enzimática;
- utilizar métodos de extracción de material genético viral en aguas residuales, garantizando su integridad y calidad para posterior detección molecular; y
- optimizar el sistema DETECTR implementado, ampliando su versatilidad y mejorando las técnicas de formación y desempeño del complejo ribonucleoproteico.

3 METODOLOGÍA

3.1 Diseño de crRNAs

3.1.1 Análisis bioinformático y diseño de crRNAs *in silico*

Se realizó una búsqueda mediante análisis bioinformático de las secuencias genéticas para los serotipos de DENV en el banco de genes NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Fue verificada la conservación de secuencias en cada serotipo utilizando la plataforma Crustal Omega de EMBL-EBI (Instituto Europeo de Bioinformática), posterior búsqueda de sitios PAM (TTTN) y verificación de secuencia propia de DENV mediante BLAST (nt-nt).

Se seleccionaron secuencias para los serotipos DENV-2 y DENV-3 y posterior diseño de los crRNAs y control positivo para ser sintetizados utilizando la plataforma Benchling, según GARRIGOS *et al.* (2025).

3.1.2 Amplificación por PCR y transcripción *in vitro*

Los oligonucleótidos iniciadores diseñados fueron suspendidos siguiendo las instrucciones del fabricante (Exxtend), quedando en una concentración final de 100 pmol/ μ L. Fue realizado PCR de ensamblaje utilizando JumpStart REDAccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), según Tabla 2 en termociclador B960 Heal Force con una configuración de programa de 1 ciclo de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos y 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos; y 1 ciclo de 4°C por tiempo ∞ . Posteriormente se evaluó en gel de agarosa 2%.

La síntesis de los crRNAs se llevó a cabo HiScribe® T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (E2040S, BioLabs) mediante RNA Synthesis Protocols. La reacción se encuentra detallada en la Tabla 3. Se utilizó termociclador B960 heal force en programación de reacción 37°C por 16 horas.

Fueron cuantificados los dsDNA y ssRNA obtenidos de las reacciones en NanoDrop One^c Thermo Scientific utilizando 2 μ L por muestra en triplicata y blanco TE 1X. Posteriormente se utilizó la plataforma NEBioCalculator versión 1.17.4 para convertir μ g/mL a moles.

Tabla 2. Reacción PCR para unión y amplificación de primers ologonucleótidos

Reactivo	DENV-2 (dsDNA)	DENV-3 dsDNA)	Diana/control positivo (dsDNA)
H2O libre de RNasa	38,5 µL	38,5 µL	38,5 µL
Buffer 10X	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl ₂ (50mM)	3 µL	3 µL	3 µL
primer UFO (ssDNA)	1 µL	3 µL	-
primer denv-2 (ssDNA)	1 µL	-	-
primer denv-3 (ssDNA)	-	1 µL	-
primer ctrl-F (ssDNA)	-	-	1 µL
primer ctrl-R (ssDNA)	-	-	1 µL
dNTPs (100 mM)	1 µL	1 µL	1 µL
Taq Polimerasa	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Volumen total	50 µL	50 µL	50 µL

Fuente: autoría propia.

Tabla 3. Reacción Transcripción *In Vitro*

Reactivo	crRNA DENV-2 (ssRNA)	crRNA DENV-3 (ssRNA)
H2O libre de RNasa	27 µL	27 µL
Buffer 10X	4 µL	4 µL
ATP	1,5 µL	1,5 µL
GTP	1,5 µL	1,5 µL
CTP	1,5 µL	1,5 µL
UTP	1,5 µL	1,5 µL
DENV-2 (dsDNA)	1 µL	-
DENV-3 (dsDNA)	-	1 µL
T7 Polimerasa	2 µL	2 µL
Volumen total	40 µL	40 µL

Fuente: autoría propia.

3.2 Producción proteína AsCas12a

3.2.1 Extracción DNA plasmídico

Fue utilizado el plásmido para expresión de la proteína AsCas12a (#114071, Addgene). Siguiendo las indicaciones del fabricante, fue replicada en medio sólido Luria-Bertani (LB) con antibiótico kanamicina 50 µg/mL (Km) y cultivada en estufa a 37°C por 16hrs.

Posteriormente fueron preparados inóculos cultivando colonias aisladas en 3 mL de medio líquido LB con Km en agitación 150 rpm a una temperatura de 37°C por 16 horas. Del inóculo fueron realizadas preservaciones en glicerol 30% y extracción de DNA

plasmídico, transfiriendo 1 mL a un microtubo de centrifuga de 1,5 mL estéril, siendo este centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos y descartado el sobrenadante. El pellet fue suspendido en 350 μ L de la solución I (Tris base 50 mM, EDTA-2H₂O 10 mM, RNAsa 100 μ g/mL, pH 8.0), aumentado con 350 μ L de solución II (NaOH 0,2 N y SDS 1%) para ser incubado en baño de hielo por 5 minutos. Fueron adicionados 400 μ L de la solución III (acetato de potasio 3 M y ácido acético ~2 M, pH 5,5) y centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Fueron transferidos 400 μ L del sobrenadante a un microtubo de centrifuga de 1,5 mL y aumentado el volumen con etanol puro 1 mL y congelados a -80°C por 20 minutos. Fue realizada una nueva centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C para descartar el sobrenadante. El pellet fue lavado dos veces, suspendiendo el pellet con etanol 70% 1 mL congelado y centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C y descartado el sobrenadante. Finalizado el segundo lavado, el microtubo fue dejado abierto hasta la evaporación total del etanol 70%. Al finalizar, fue adicionado TE 1X 50 μ L para suspender el pellet y realizadas lecturas de cuantificación de ADN en NanoDrop One^c Thermo Scientific utilizando 2 μ L en triplicata y utilizando como blanco TE 1X.

3.2.2 Producción proteína recombinante

Para la producción de la proteína AsCas12a se realizó una transformación, siendo colocados en un microtubo de centrifuga 1,5 mL de E. coli BL21 (DE3) 50 μ L y 2 μ L de ADN plasmídico. Incubación en baño de hielo por 30 minutos y luego un choque térmico, calentando el microtubo de centrifuga a 42°C por 40 segundos y posteriormente llevado a baño de hielo por 5 minutos. Fueron adicionados 900 μ L de medio de cultivo SOC (Caldo Súperóptimo con Represión Catabólica) y cultivados a 250 rpm a 37°C por 1 hora.

Se cultivaron 100 μ L de la transformación en placa Petri con medio LB con Km y distribuidos por toda la placa con ayuda de una espátula Drigalski. Las placas fueron cultivadas en estufa a 37°C por 16 horas. Posteriormente fueron cultivadas colonias aisladas, preservadas en glicerol 30% y almacenadas a -80°C.

3.2.3 Inducción por IPTG y purificación

La inducción fue realizada según QUINTERO *et al.* (2025), donde los cultivos preservados fueron reactivados en cultivo sólido LB con Km en incubadora a 37°C por 16 horas. Posteriormente, fue realizado un pre-inóculo cultivando una colonia aislada en

cultivo líquido LB 3 mL con Km en agitación 150 rpm a 37°C por 16 horas. Fue realizado el inóculo en medio líquido Terrific Broth (TB) con Km 50 mL utilizando 500 µL del pre-inóculo y cultivados en agitación 250 rpm a 37°C hasta llegar a OD 0,6 - 0,8.

Fue descendida la temperatura a 30°C por 30 minutos y adicionados 0,3 mM de IPTG para dejar en cultivo por 9 horas. El cultivo fue transferido a un tubo de centrifuga tipo Falcon 50 mL estéril previamente y centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartando el sobrenadante y almacenados a -80°C.

Fueron utilizados X20 volumen de buffer lisis (NaH₂PO₄*H₂O 5 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, glicerol 5%, Triton 0,03%, PMSF 100 mM, pH 7,2) para suspender el pellet del cultivo inducido. Para el cálculo de volumen de buffer lisis, fueron pesados tubos de centrifuga tipo Falcon 50 mL en vacío y con el pellet de inducción con IPTG. Fue utilizado un Disruptor QR850 (Ultronique) en configuración de programa potencia 90%, pulso/pausa de 2 segundos por tiempo de 15 minutos. Finalizado el sonicado, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante y sonicado fueron separados y almacenados a -80°C.

La purificación fue realizada utilizando kit His-Spin Protein Miniprep™ (ZYMO RESEARCH). Y posterior diálisis, utilizando membrana semipermeable y colocados los 150 µL de proteína eluida en la membrana, esta fue cerrada utilizando cierre hermético. La membrana fue colocada en un Becker y adicionados 100 mL de buffer lisis (NaCl 1M, acetato de sodio 40 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 2 mM, pH 6.0). Se mantuvo en agitación suave, 4°C por 3 días. Fue cambiando el buffer diálisis cada 24 horas. Finalmente, se recuperó la fase interna de la membrana, colocados en un microtubo de 1,5 mL, adicionado glicerol 50 % y almacenado a -20°C

3.2.4 Cuantificación proteica

La proteína eluida y dializada fue cuantificada por medio de un ensayo Bradford en el equipo *NanoDrop One^c Thermo Scientific*. Para la curva fueron utilizadas las concentraciones de proteína albúmina 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200. Fue utilizada la plataforma *NEBioCalculator* versión 1.17.4 para convertir µg/mL a moles.

3.2.5 Gel SDS-page

Para comprobar la eficacia de los experimentos fue realizada corrida en gel SDS-page 12% (H₂O ultrapura 3.290 µL, Tris-HCl 1,5M pH 8,8 2.500 µL, poliacrilamida 30% 4.000 µL, SDS 10% 100 µL, persulfato de amonio 10% 100 µL y TEMED 10 µL) y gel de apilamiento 5% (H₂O ultrapura 2.740 µL, Tris-HCl 1,5M pH 6,8 500 µL, poliacrilamida 30% 4670 µL, SDS 10% 50 µL, persulfato de amonio 10% 50 µL y TEMED 10 µL). Los reactivos fueron desecados previamente por 20 minutos). Para la revelación de las bandas fueron utilizadas las soluciones de coloración coomassie R250 (Brilliant Blue R 0,025%, metanol 40%, ácido acético 10% y H₂O ultrapura 50%) y solución decoloración (metanol 40%, ácido acético 10% y H₂O ultrapura 50%).

3.3 Complejo ribonucleoproteico

Fueron realizados ensayos en termociclador CFX Opues 96 (BioRad) con programa 37°C con lecturas de 1 minuto X30. Los complejos fueron ensamblados (Tabla 4) utilizando concentración total (sin diluir) y concentración diluida a 50 nM (1:1), tanto para proteína como para crRNA. Se utilizó sonda P2_Denv FAM (Thermo Fisher) a una concentración 10 nM. A la vez, fueron utilizados buffer r2.1 y buffer 10X complejo (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 1 M, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, BSA 1 mg/mL).

Tabla 4. Ensamblaje del Complejo Ribonucleoproteico

Reactivo	RNP control positivo	RNP control negativo
H ₂ O libre de RNasa	14 µL	15 µL
Buffer 10X	2 µL	2 µL
AsCas12a 50 nM	1 µL	1 µL
crRNA (ssRNA) 50 nM	1 µL	-
Diana (dsDNA)	1 µL	1 µL
Sonda FAM 10 nM	1 µL	1 µL
Volumen total	20 µL	20 µL

Fuente: autoría propia.

3.4 Extracción RNA de muestras de aguas residuales

Son entregadas muestras de aguas residuales de puntos estratégicos en la ciudad de Foz do Iguaçu, Paraná. La colecta es realizada por la empresa SANEPAR en convenio

con Itaipú Parquetec y entregada al Laboratorio de Biología Molecular para análisis físico-químico y molecular. Al tratarse de datos sensibles, los puntos de colecta serán enumerados y sólo será presentada la información ct (RT-qPCR) de las muestras reales utilizadas en el ensayo de validación.

En un tubo tipo Falcon 50 mL fue colocado Polietilenoglicol (PEG) 800 4 g, cloruro de sodio 0,9 g y muestra de aguas residuales hasta completar los 50 mL. Estos se homogeneizaron hasta disolver todos los reactivos y dejarlos en reposo por 1 hora a 4°C.

Las muestras fueron centrifugadas a 15.000 g por 1 hora a 4°C, descartado el sobrenadante y recuperado el pellet con PBS 1X 400 mL y aumentado con Fenol 1 mL. Las muestras son homogeneizadas en vortex y centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Para la extracción de RNA fue utilizado el PureLink RNA mini kit utilizando 400 uL de fase superior de la muestra previamente centrifugada.

3.5 Producción de un complejo ribonucleoproteico *in vivo*

Se realizó una búsqueda actualizada de secuencias genéticas para los serotipos del virus del Dengue. Fue verificada la conservación de secuencias por cada serotipo y entre ellos por medio de plataforma Crustal Omega y posterior búsqueda de sitios PAM (TTTN). A la vez, fue realizada una búsqueda bibliográfica del sitio de repetición de *Acidaminococcus sp.* conservadas.

Fueron diseñados dos plásmidos para la producción de crRNAs *in vivo* y sus respectivos controles positivos.

4 RESULTADOS

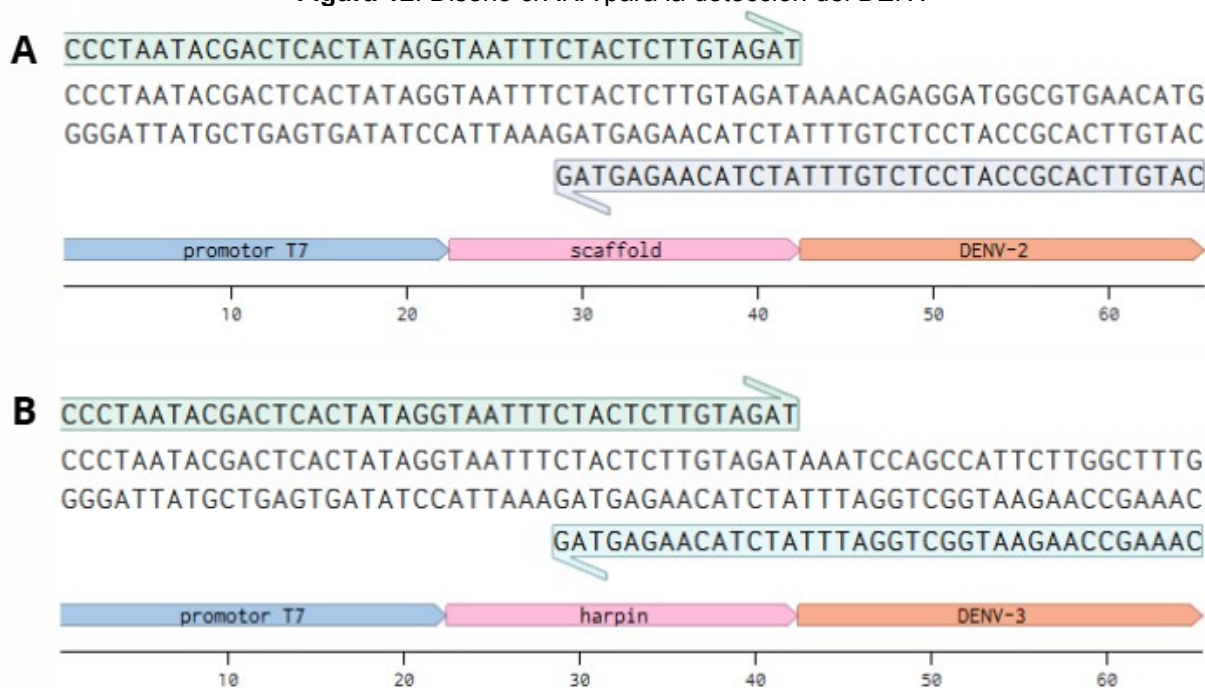
4.1 Diseño crRNAs

4.1.1 Análisis bioinformático y diseño de crRNAs in silico

Los crRNAs diseñados con las secuencias Promotor T7, Scaffold y secuencia específica de DENV (Figura 12), compuestos por las siguientes secuencias:

- Promotor T7: 5-CCCTAATACGACTCACTATAGG-3;
- Scaffold: 5-TAATTTCTACTCTTGTAGAT-3;
- Secuencia DENV-2: 5-AAACAGAGGATGGCGTGAACATG-3; y
- Secuencia DENV-3: 5-AAATCCAGCCATTCTTGGCTTTG-3.

Figura 12. Diseño crRNA para la detección del DENV



Descripción: **A** corresponde al diseño de crRNA-DENV-2 y, **B** corresponde al diseño de crRNA-DENV-3.

Fuente: autoría propia, creada utilizando la plataforma Benchling.

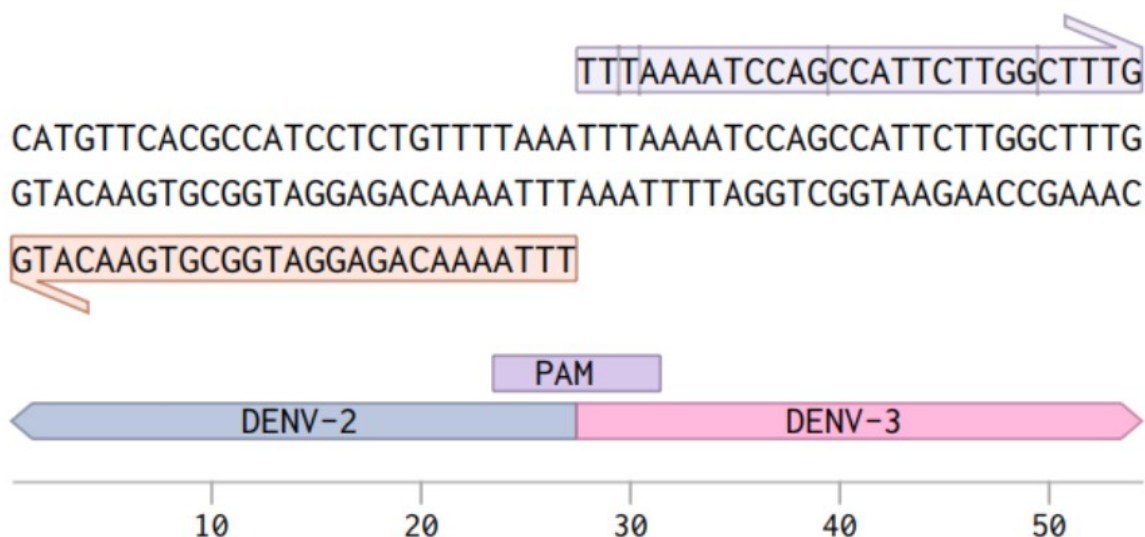
La síntesis de primers oligonucleótidos fueron:

- Primers Oligonucleotideo UFO:
5-CCCTAATACGACTCACTATAGGTAATTTCTACTCTTGTAGAT-3;
- Primers Oligonucleotideo rev2a:
5-CATGTTACGCCATCCTCTGTTTATCTACAAGAGTAG-3; y
- Primers Oligonucleotideo rev3a:

5-CAAAGCCAAGAATGGCTGGATTTATCTACAAGAGTAG-3.

El diseño del control positivo/diana quedó conformado por las secuencias específicas de DENV y su PAM correspondiente (Figura 13).

Figura 13. Diseño control positivo/diana



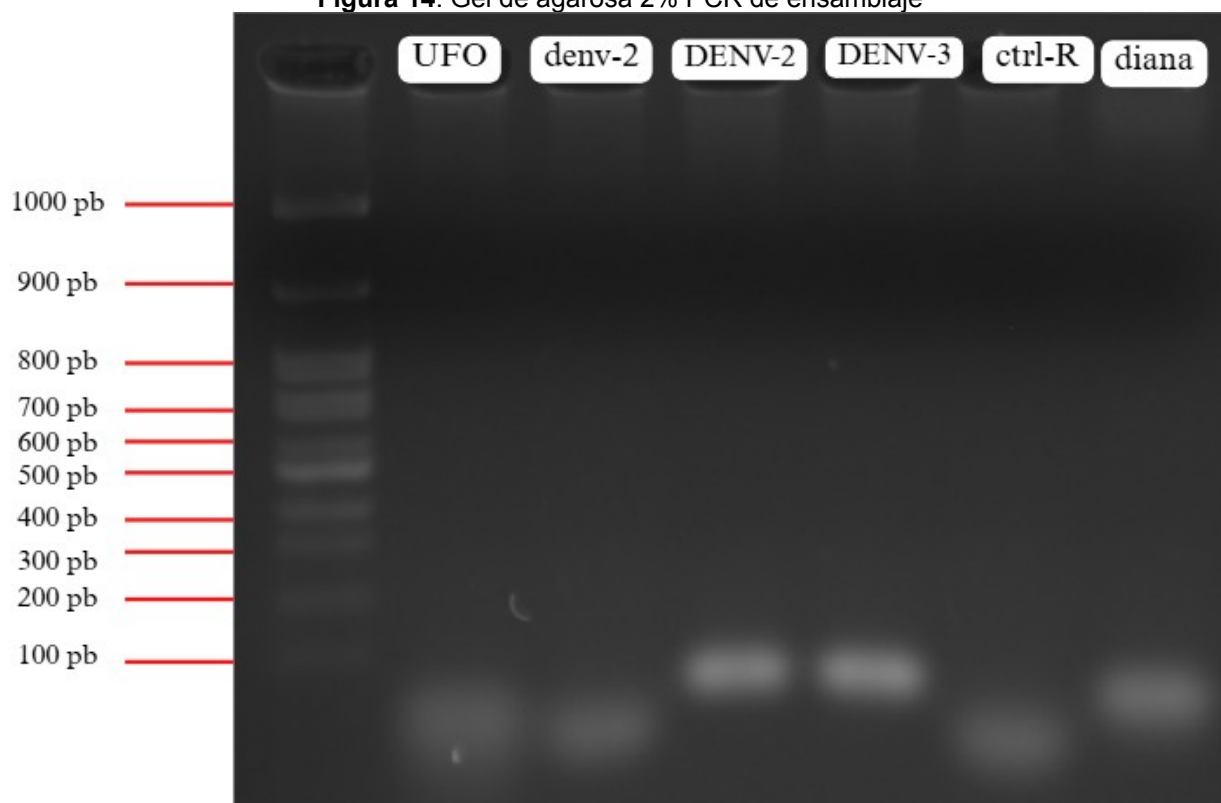
Fuente: autoría propia creada utilizando la plataforma Benchling.

La síntesis de primers oligonucleótidos fue la siguiente:

- Primers Oligonucleotideo ctrl-F:
5-CATGTTACGCCATCCTCTGTTTTAAATTTAAAATC-3; y
- Primers Oligonucleotideo ctrl-R:
5-CAAAGCCAAGAATGGCTGGATTTTAAATTTAAAACAG-3.

4.1.2 Amplificación por PCR y transcripción *In Vitro*

En el gel de agarosa 2% (Figura 14) se muestran la unión y amplificación primers oligonucleótidos sintetizados. Se puede observar la leve diferencia de tamaños, en donde primer UFO 42 nt, primer denv-2 37 nt, dsDNA DENV-2 65 pb, dsDNA DENV-3 65 pb, primer ctrl-R 37 nt y dsDNA diana 54 pb.

Figura 14. Gel de agarosa 2% PCR de ensamblaje

Descripción: UFO corresponde al primers oligonucleótido sintetizado de 42 nt; denv-2 corresponde al primers oligonucleótido sintetizado de 37 nt; DENV-2 y DENV-3 corresponde al producto de PCR de ensamblaje para los crRNAs diseñados con tamaño de 65 pb cada uno; ctrl-R corresponde al primers oligonucleótido sintetizado para control positivo de 37 nt y; diana corresponde al producto de PCR de ensamblaje para control positivo con tamaño de 54 pb.

Fuente: autoría propia.

La cuantificación se detalla en la Tabla 5 y al realizar la conversión a moles se obtuvieron los siguientes resultados:

- Diana: dsDNA, 54 nt, 1.640,13 μg = 4926,19 nM;
- crRNA-denv2: ssRNA, 43 nt, 5.498,83 μg = 398,5 nM; y
- crRNA-denv3: ssRNA, 43 nt, 5.849,37 μg = 423,9 nM.

Tabla 5. Cuantificación producto PCR de ensamblaje e IVT

Muestras	ug/mL	A260/280	A260/230
DENV-2 (dsDNA)	1.640,13	1,83	1,87
DENV-3 (dsDNA)	1.239,43	1,84	1,85
Diana/control positivo (dsDNA)	1.209,60	1,83	1,74
crRNA-2 (ssRNA)	5.498,83	2,18	2,52
crRNA-3 (ssRNA)	5.849,37	2,21	2,55

Fuente: autoría propia.

4.2 Producción proteína recombinante

4.2.1 Extracción DNA plasmídico y transformación en *E. coli* BL21 (DE3)

La cuantificación realizada de la extracción DNA plasmídico fue de 216,8 µg/mL, A260/280 1,89 y A260/230 1,89. Fueron transformadas de forma exitosa colonias de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido AsCas12a (#114071, Addgene) (Figura 15) obteniendo colonias aisladas.

Figura 15. Transformación de cepas *E. coli* BL21 (DE3)



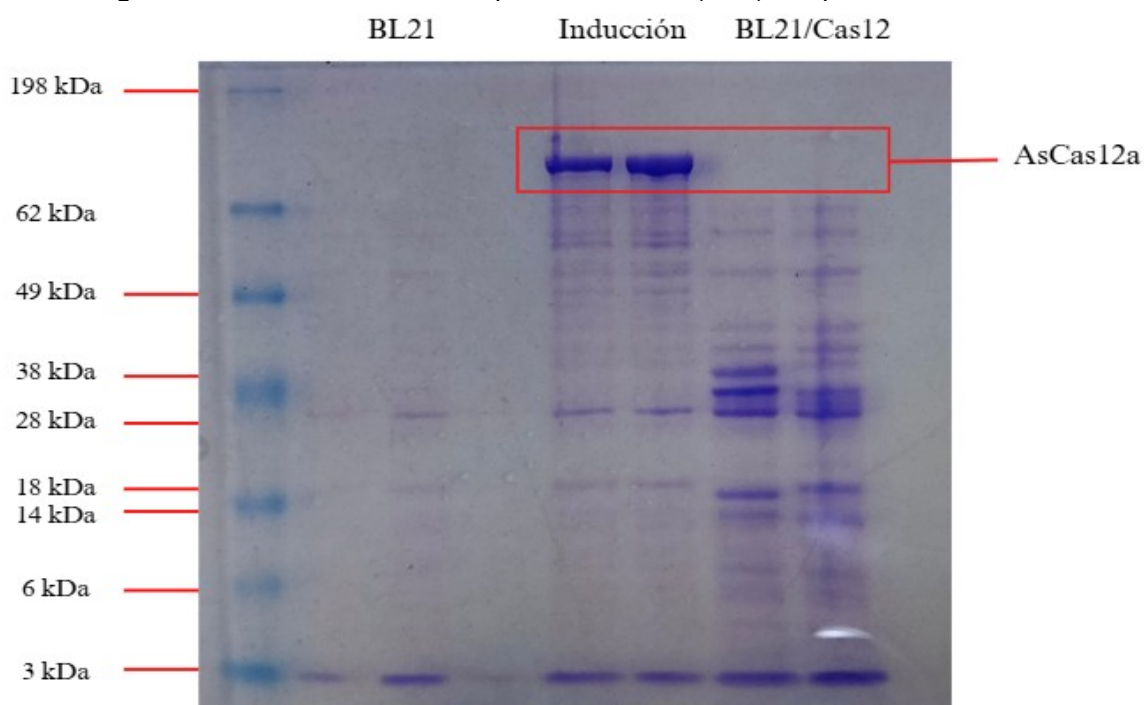
Fuente: autoría propia.

4.2.2 Transformación, inducción y lisis celular

En la Figura 16 se observa la inducción por IPTG 0,3 mM en *E. coli*. BL21 (DE3) mediante SDS-page.

Fueron obtenidos 0,5468 g de células inducidas (pellet) y utilizados 10,936 mL de buffer lisis. Fue realizado un gel SDS-page (Figura 17), donde se observan muestras de célula lisada y sonicada, tanto en pellet como en sobrenadante.

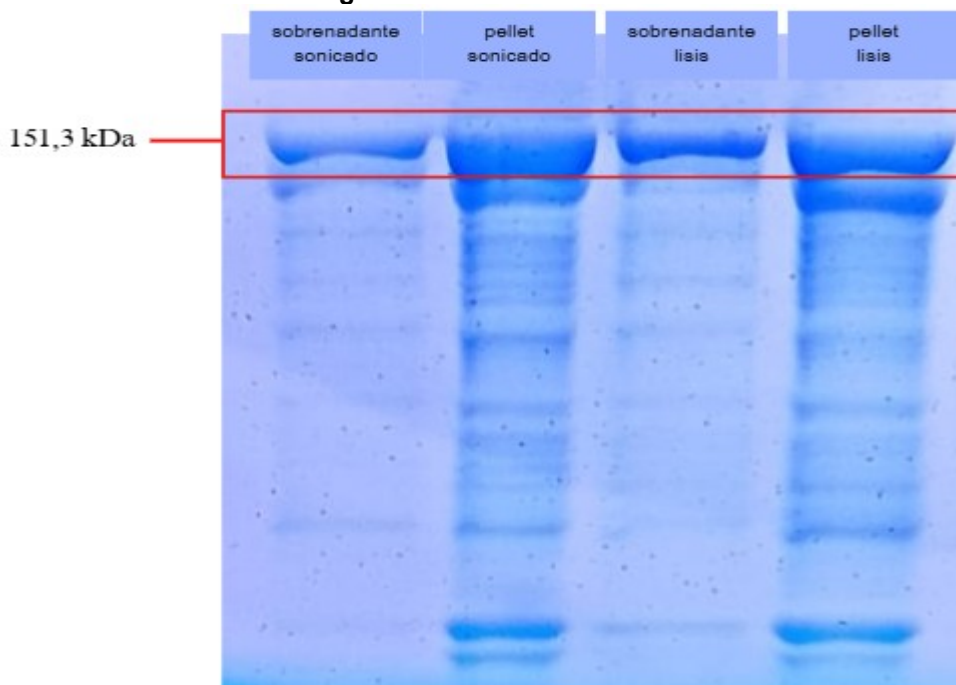
Figura 16. Inducción con IPTG cepas *E. coli* BL21 (DE3) con plásmido AsCas12a



Descripción: BL21 corresponde a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) utilizado como control negativo; Inducción corresponde al resultado de la inducción por IPTG 0,3 mM donde se observa una granja destacada y marcada, siendo el peso de AsCa12a 151,3 kDa y; BL21/Cas12 corresponde a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido AsCas12a.

Fuente: autoría propia.

Figura 17. Sonicado celular



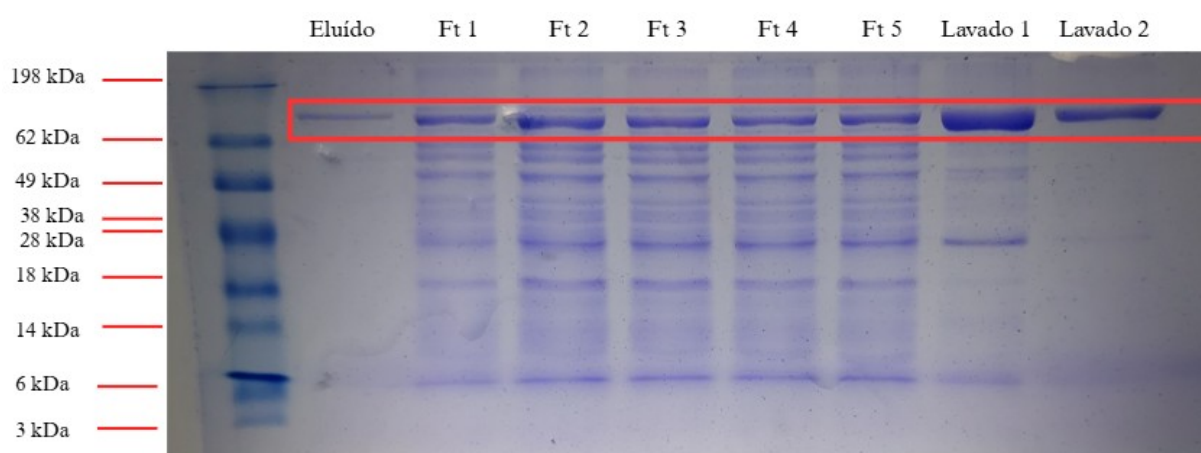
Descripción: muestra "sobrenadante sonicatedo" corresponde al producto de cepas inducidas, lisadas con buffer y sonicado fase líquida; muestra "pellet sonicatedo" corresponde al producto de cepas inducidas, lisadas con buffer y sonicadas fase sólida; muestra "sobrenadante lisis" corresponde al producto de cepas inducidas y lisadas con buffer fase líquida y; muestra "pellet lisis" corresponde al producto de cepas inducidas y lisadas con buffer fase sólida.

Fuente: autoría propia.

4.2.3 Purificación proteína AsCas12a

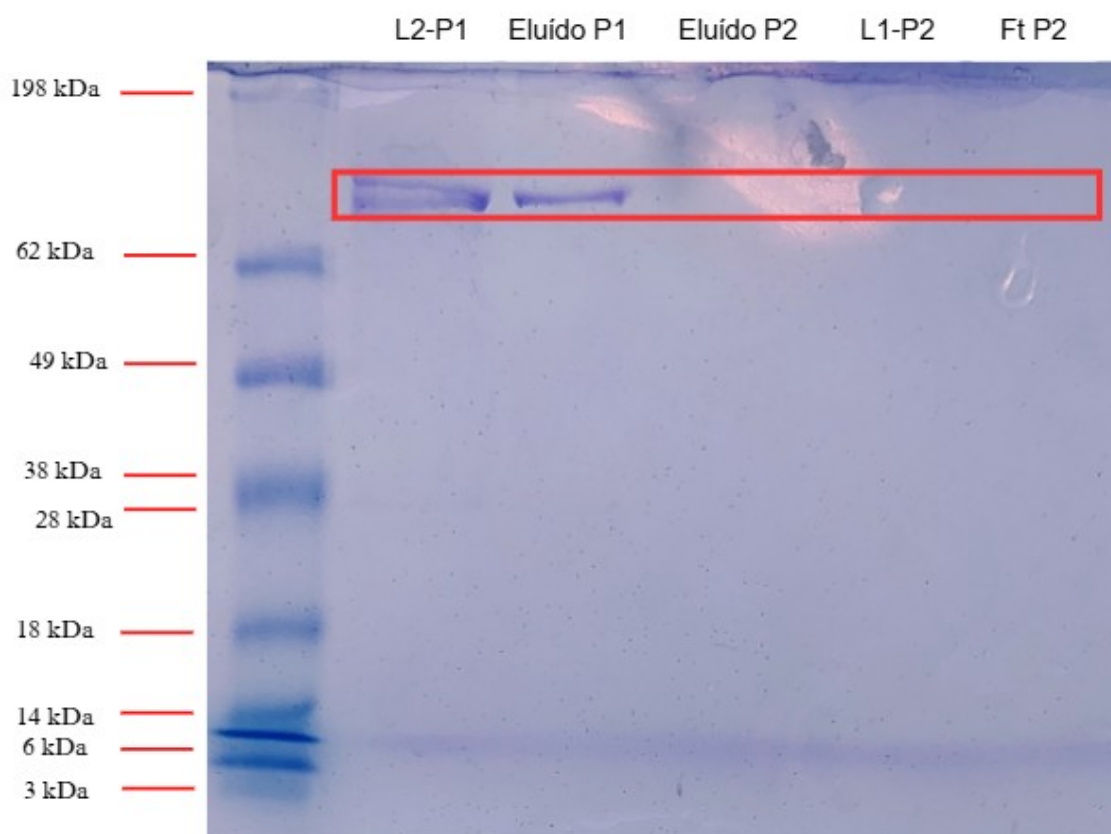
Fueron realizadas 3 purificaciones de AsCas12a. La primera de ellas (Figura 18), AsCas12a fue dializada, la segunda (Figura 19) no se obtuvo proteína purificada y la tercera (Figura 20) AsCas12a eluida fue utilizada para ensayo Bradford y unión de complejos.

Figura 18. Purificación I proteína AsCas12a



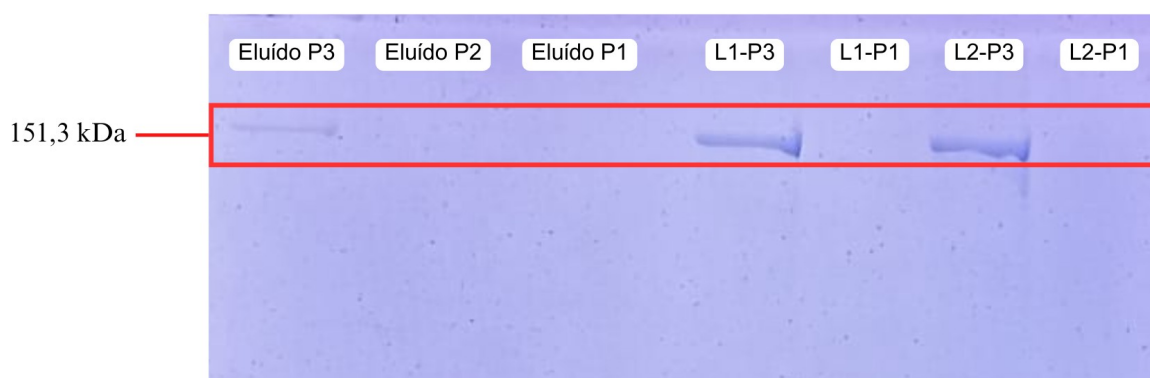
Descripción: "Eluido" corresponde a proteína purificada mediante kit de purificación en la etapa de elución; "Ft1" a "Ft5" corresponden a *flow-through* obtenida una vez pasada por la membrana; "Lavado 1" y "Lavado 2" corresponden al resultado de los lavados con buffer del kit.

Fuente: autoría propia.

Figura 19. Purificación II proteína AsCas12a

Descripción: "L2-P1" corresponde a muestra del lavado 1 de la purificación I; "Eluido P1" corresponde a proteína AsCas12a purificada en purificación I; "Eluido P2" corresponde a proteína AsCas12a purificada en purificación II; "L1-P2" corresponde al lavado 1 de la purificación II y; "Ft P2" corresponde al *flow-through* de las muestras de la purificación II.

Fuente: autoría propia.

Figura 20. Purificación III proteína AsCas12a

Descripción: "Eluido P3" corresponde a la proteína AsCas12a purificada en la purificación III; "Eluido P2" corresponde a la proteína AsCas12a purificada en la purificación II; "Eluido P1" corresponde a la proteína AsCas12a purificada en la purificación I; "L1-P3" corresponde a la muestra del lavado 1 de la purificación III; "L1-P1" corresponde a la muestra del lavado 1 de la purificación I; "L2-P3" corresponde a la muestra del lavado 2 de la purificación III y; "L2-P1" corresponde a la muestra del lavado 2 de la purificación I.

Fuente: autoría propia.

4.2.4 Cuantificación proteína AsCas12a

Mediante el ensayo Bradford, se obtuvo una concentración de AsCas12a eluida de 13,361 $\mu\text{g/mL}$ y al realizar la conversión de valores, se obtuvo 192,27 mM en aproximadamente 150 μL .

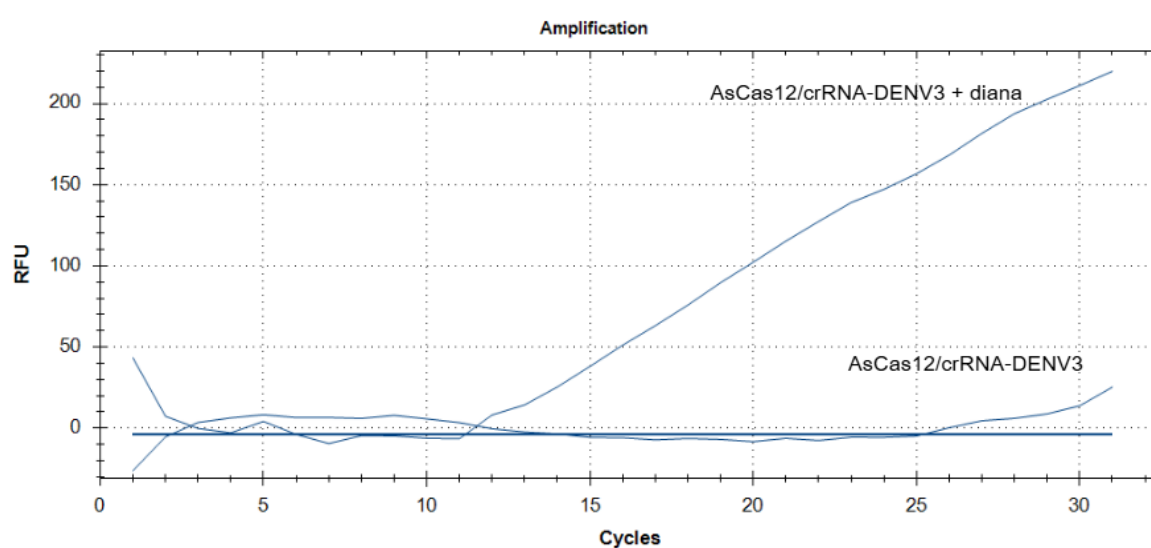
4.3 Complejo ribonucleoproteico

4.3.1 Prueba de unión de complejos

Se comprobó la unión de AsCas12a con crRNA-DENV3 en concentración total (192,27:423,9) en buffer 10X complejo. La Figura 21 muestra la degradación de la sonda FAM en presencia de Diana a partir del minuto 12 y una estabilidad al minuto 13. Se observa también, un pico al inicio de la formación del complejo.

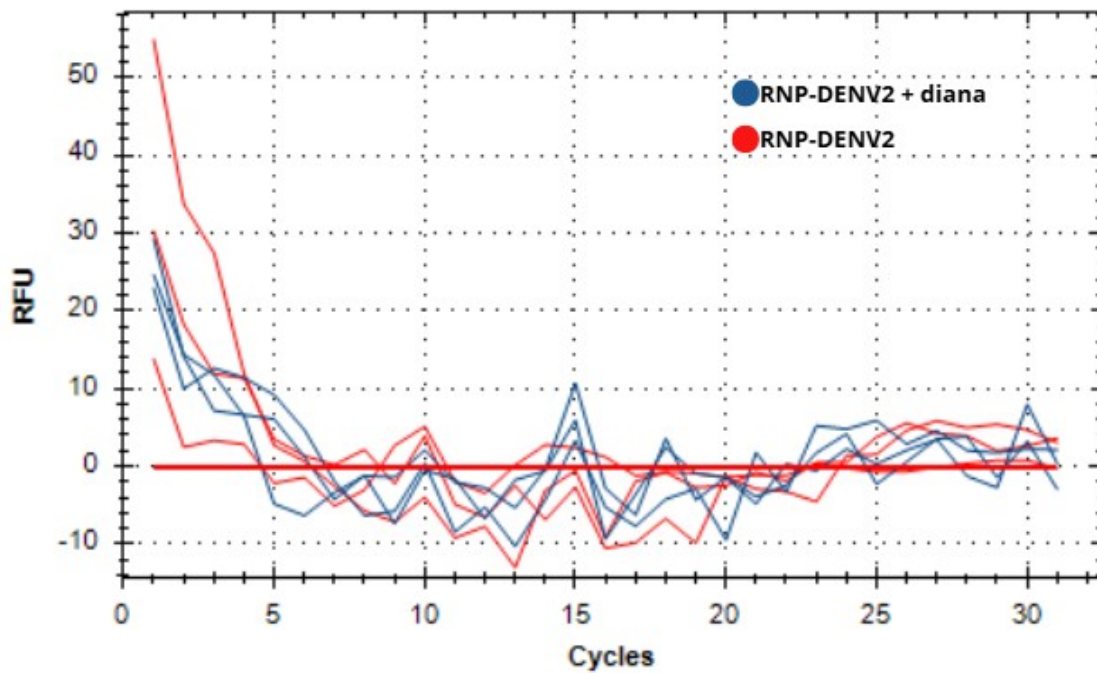
Los resultados de complejos a una concentración final 50 nM utilizado buffer r2.1 se observa en la Figura 22 (DENV-2) e Figura 23 (DENV-3). En la cual no se observa la formación de curva de degradación. En el caso del complejo para DENV-2, se observan varios picos inestables durante el ciclo de reacción y en ambos complejos se observan picos al inicio de la unión del complejo.

Figura 21. Prueba de unión RNP para DENV-3



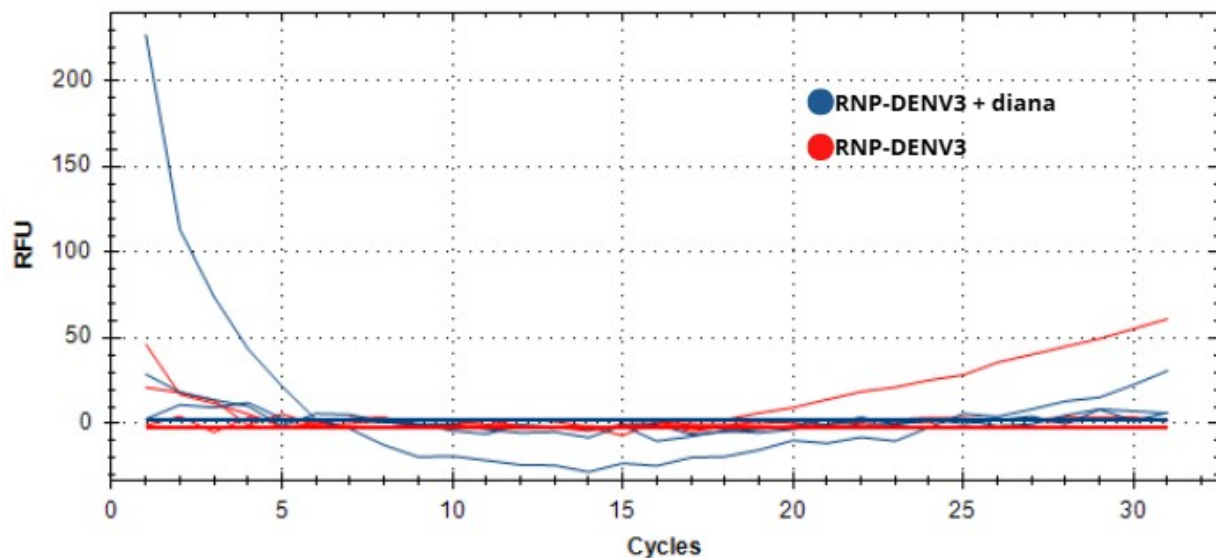
Fuente: autoría propia. *Software* Bio-Rad CFX Maestro.

Figura 22. PNP 50 nM para detección de DENV-2 con buffer r2.1



Fuente: autoría propia. Software Bio-Rad CFX Maestro.

Figura 23. RNP 50 nM para detección de DENV-3 con buffer r2.1

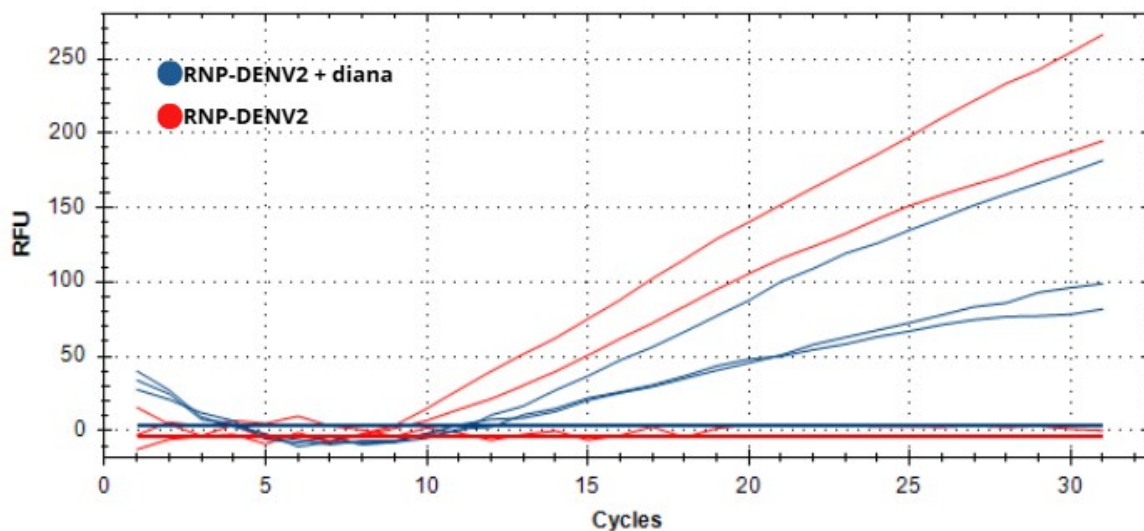


Fuente: autoría propia. Software Bio-Rad CFX Maestro.

Al realizar una una unión de complejos en buffer 10X complejo se observa la formación de curvas. En el caso del complejo para DENV-2 (Figura 24), se observa degradación del control negativo (H₂O free) en dos de las muestras en triplicata. Por otro lado, en el complejo para DENV-3 (Figura 25), no se presentan picos en el control

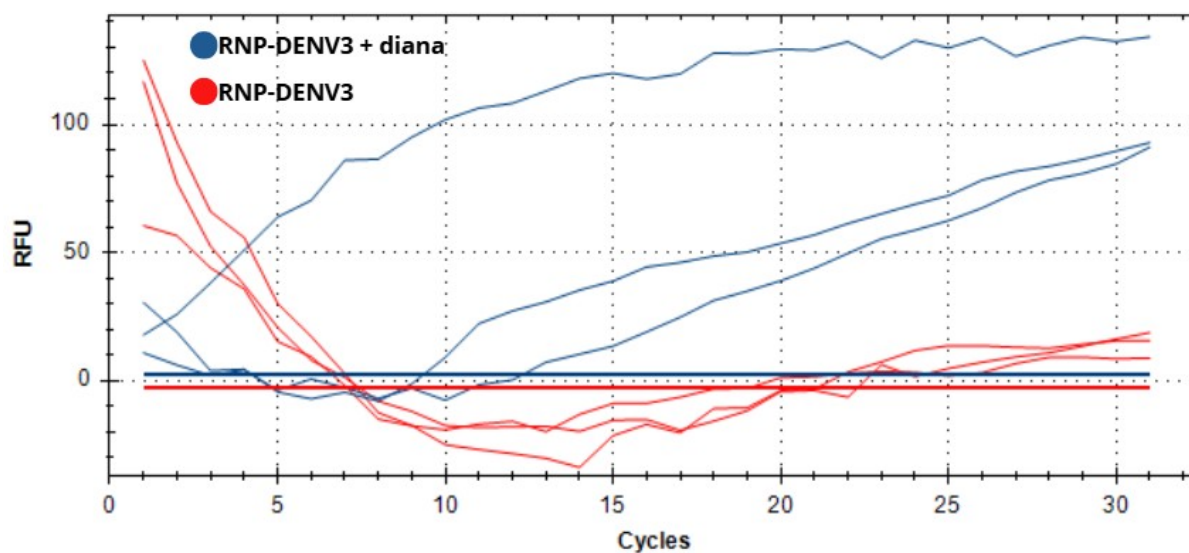
negativo, pero sí al inicio de la unión del complejo. Al igual, una de las muestras del control positivo presenta una curva fuera del padrón observado.

Figura 24. RNP 50 nM para detección de DENV-2 con buffer 10X complejo



Fuente: autoría propia. Software Bio-Rad CFX Maestro.

Figura 25. RNP 50 nM para detección de DENV-3 con buffer 10X complejo



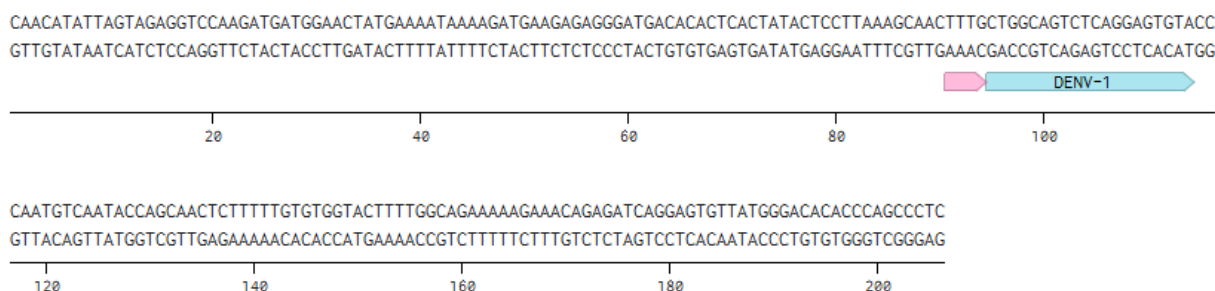
Fuente: autoría propia. Software Bio-Rad CFX Maestro.

4.4 Complejo ribonucleoproteico *in vivo*

Al analizar las secuencias conservadas de un mismo serotipo y entre ellos, fueron seleccionadas regiones de aproximadamente 200 nt. Aumentando la probabilidad de

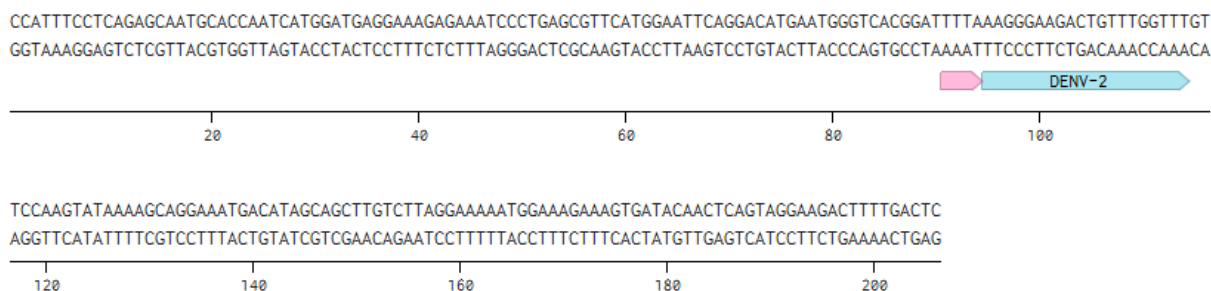
detección de RNA del DENV en muestras de aguas residuales. A la vez, se adicionaron secuencias en común entre los serotipos. Los tamaños de las secuencias seleccionadas fueron para DENV-1 206 nt. (Figura 26), DENV-2 206 nt. (Figura 27), DENV-3 163 nt. (Figura 28), DENV-4 160 nt. (Figura 29), DENV-1,2,4 206 nt. (Figura 30) y DENV-2,3 218 nt. (Figura 31).

Figura 26. Secuencia DENV-1 en el diseño de *locus* CRISPR



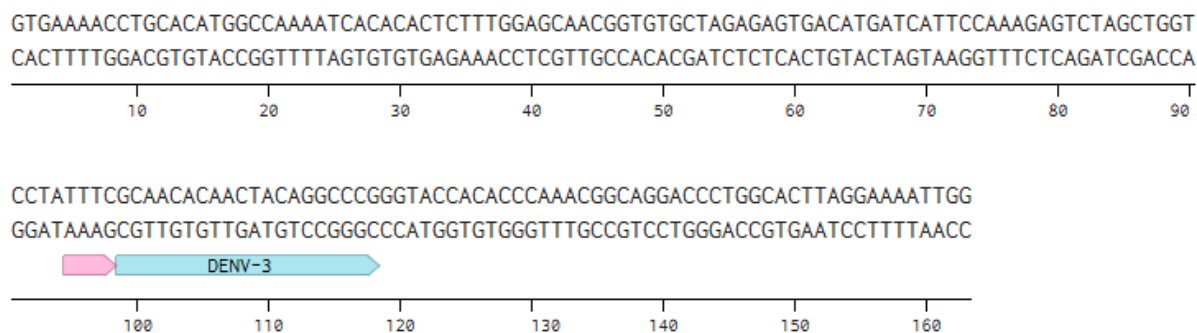
Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

Figura 27. Secuencia DENV-2 en el diseño de *locus* CRISPR

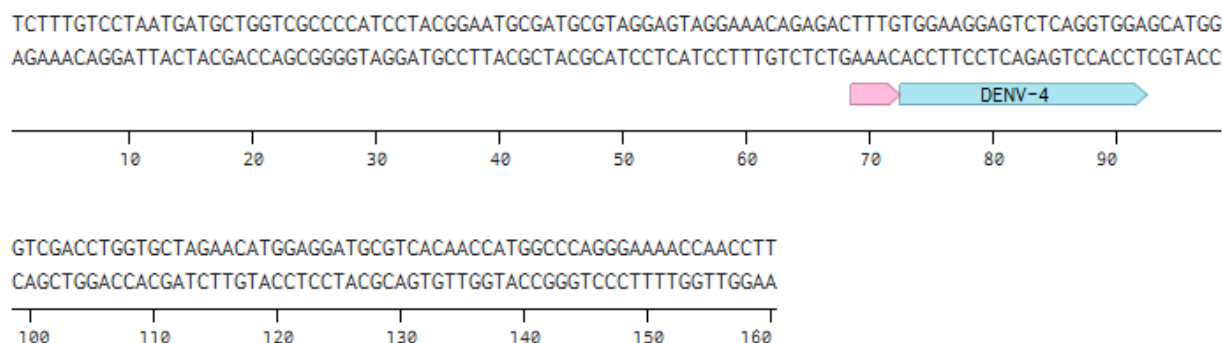


Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

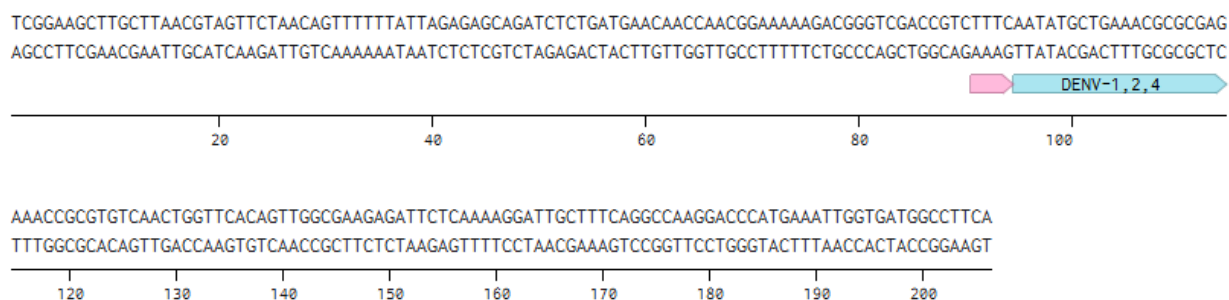
Figura 28. Secuencia DENV-3 en el diseño de *locus* CRISPR



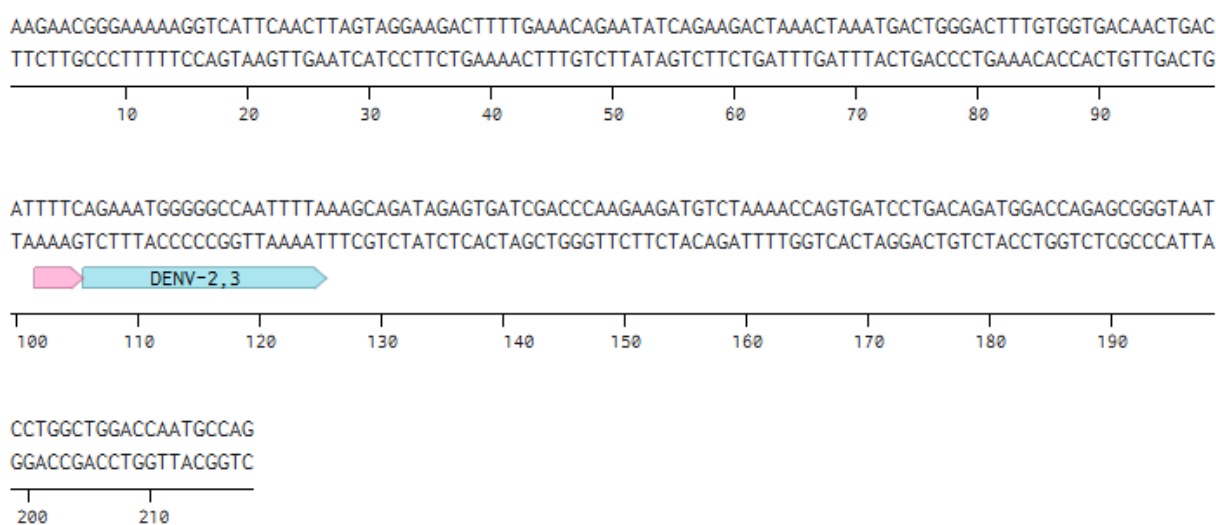
Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

Figura 29. Secuencia DENV-4 en el diseño de *locus* CRISPR

Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

Figura 30. Secuencia DENV-1,2,4 en el diseño de *locus* CRISPR

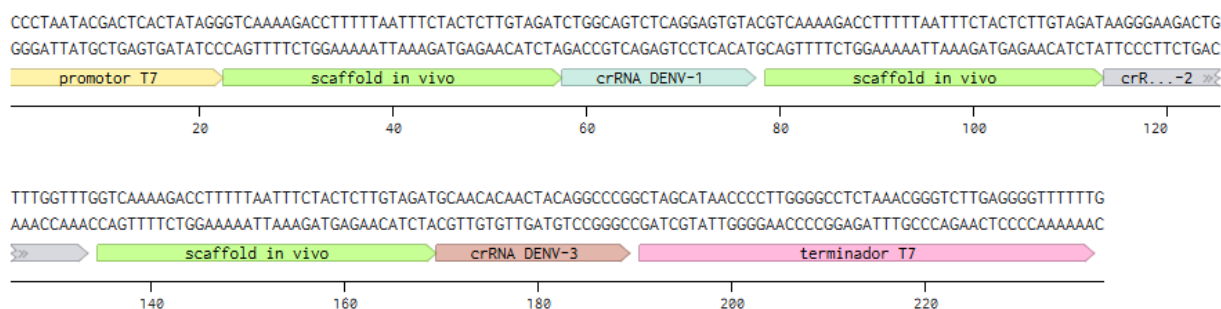
Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

Figura 31. Secuencia DENV-2,3 en el diseño de *locus* CRISPR

Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

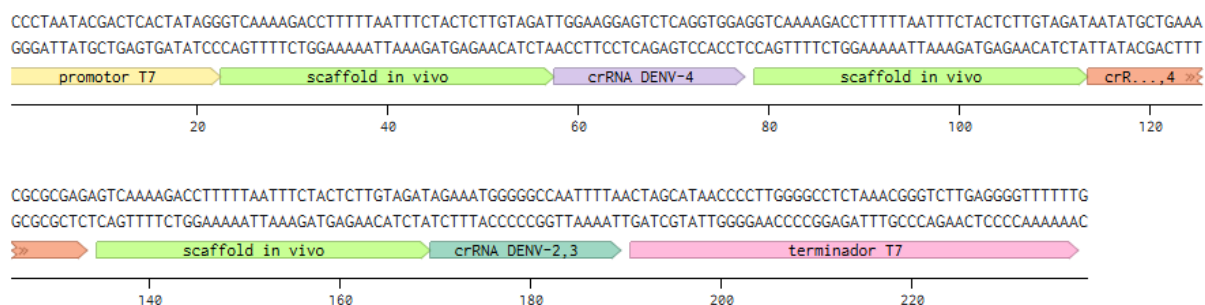
A diferencia del sitio de repetición o scaffold utilizado in vitro, se encontró una región mayor en *Acidaminococcus intestini*. Esta región es la que permite la unión del crRNA a la proteína, por ello, la síntesis de *locus* CRISPR (multiplex-crRNA) fue incluida al inicio, entre regiones de detección y al final. Debido a secuencias múltiples, se diseñados dos plásmidos para crRNAs siendo *locus* I (Figura 32) y *locus* II (Figura 33). La diana por otro lado, integra todas las secuencias conservadas con un tamaño de 1159 pb.

Figura 32. Diseño *locus* I



Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

Figura 33. Diseño *locus* II



Fuente: autoría propia. Plataforma Benchling.

5 DISCUSIÓN

El DENV se caracteriza por su rápida propagación (PRESCOTT *et al.*, 2025), donde factores como el crecimiento urbano y demográfico se atribuyen a la propagación del mosquito *Aedes aegypti* en nuevas zonas geográficas (GOLDING *et al.*, 2023). Metodologías como la vigilancia por medio de aguas residuales permite comprender la dinámica de transmisión de un determinado virus o patógeno en una población (LI *et al.*, 2024). A pesar de ello, en la actualidad existen pocos estudios de detección del DENV en aguas residuales, esto se debería a la baja carga de arbovirus en comparación a otros virus (HERNANDEZ *et al.*, 2025). Entre los casos registrados, fueron monitoreadas 2,5 millones de personas en la ciudad de Miami, USA, donde se informaron 165 casos. Fueron confirmados los serotipos DENV-2 y DENV-3, donde DENV-3 fue asociado a viajes (71%) (WOLFE *et al.*, 2023).

El presente estudio demuestra la factibilidad técnica de utilizar el sistema DETECTR basado en AsCas12a para la detección del virus del dengue (DENV) en matrices de alta complejidad como las aguas residuales (WOLFE *et al.*, 2023). La expresión recombinante de AsCas12a en *E. coli* BL21 (DE3) y su purificación posterior permitieron obtener una proteína catalíticamente activa, como lo evidenciaron tanto el análisis por SDS-PAGE. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que AsCas12a expresada en bacterias ha mostrado una actividad robusta y adecuada para aplicaciones diagnósticas (QUINTERO *et al.*, 2025), permitiendo además la reducción de costos en comparación con la importación de proteínas comerciales.

La formación del complejo ribonucleoproteico (RNP) reveló una marcada dependencia de las condiciones de reacción, particularmente de la composición del buffer y de la proporción proteína:crRNA. Esta observación es consistente con estudios recientes que destacan que entre los componentes críticos en ajustes de Cas12a se encuentran el crRNA, la proporción y la concentración óptima de la proteína (HE *et al.*, 2024). De hecho, la mínima variación en la concentración de sal o en la disponibilidad iónica del buffer resultó en fluctuaciones significativas en la intensidad fluorescente, lo cual coincide con lo descrito por JANG *et al.* (2025) y VILLAVICENCIO, 2022, quienes señalan que la actividad trans-cleavage de Cas12a es altamente sensible al entorno químico, especialmente en sistemas one-pot o sin preamplificación. Los ensayos de detección utilizando dianas sintéticas de DENV-2 y DENV-3 mostraron que la eficacia de corte no es homogénea entre serotipos, lo que puede atribuirse a diferencias en

accesibilidad estructural de las regiones seleccionadas o a variaciones en el plegamiento del crRNA. Esta variabilidad refuerza lo propuesto por NIMSAMER *et al.* (2021), quienes recomiendan utilizar dianas de múltiples genes estructurales para mejorar la robustez diagnóstica, especialmente en virus con genomas altamente variables como DENV.

La aplicación del sistema en muestras reales de aguas residuales constituye uno de los resultados más relevantes del trabajo. A pesar de las limitaciones inherentes a esta matriz (presencia de inhibidores, fragmentación del material genético y baja concentración viral) se detectó señal asociada a muestras con valores de Ct cercanos a 35. Este hallazgo se alinea con informes previos de vigilancia ambiental donde tecnologías CRISPR han demostrado sensibilidad suficiente para detectar cargas virales bajas, comparables al límite de detección de RT-qPCR, aun en muestras no ideadas para ensayos isotérmicos (QUINTERO, 2024). La detección, aunque heterogénea, muestra el potencial de utilizar DETECTR como una herramienta complementaria en la epidemiología basada en aguas residuales, un enfoque particularmente valioso considerando las tasas de subdiagnóstico de dengue reportadas en la región (DA SILVA *et al.*, 2024; SECRETARIA DA SAÚDE, 2025).

La presencia de escisión inespecífica en algunos ensayos subraya la necesidad de optimizar la estequiometría del complejo RNP y las condiciones del buffer, así como de reducir la actividad basal de Cas12a. Aquí cobra relevancia la propuesta de un sistema multiplex-crRNA que apunte a la misma secuencia, el cual aumentaría la eficiencia de corte sin la necesidad de preamplificación y permitiría incluso la detección cuantitativa (ZHANG *et al.*, 2023). En este trabajo se avanzó hacia dicho enfoque mediante el diseño conceptual de un *locus* CRISPR multiespaciador para expresión *in vivo*, lo que podría mejorar considerablemente la sensibilidad y reducir la variabilidad entre replicados. Además, producir complejos RNP directamente en células bacterianas se alinea con iniciativas recientes orientadas a democratizar el acceso a diagnósticos CRISPR de bajo costo, aumentando la escalabilidad y reduciendo la dependencia de insumos importados (RANANAWARE *et al.*, 2025).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que AsCas12a y el sistema DETECTR representan una plataforma prometedora para la detección de DENV en contextos de vigilancia ambiental. No obstante, antes de considerar su implementación en rutina es necesario profundizar en la optimización de las condiciones de reacción, evaluar sistemáticamente la inhibición por matriz y estandarizar la preparación de muestras, posiblemente mediante un pretratamiento basado en RT-PCR con primers randómicos

para garantizar reproducibilidad y disminuir falsos negativos. A pesar de estas limitaciones, el presente trabajo constituye un avance significativo hacia el desarrollo de metodologías diagnósticas sensibles, adaptables y económicamente viables para la vigilancia epidemiológica de arbovirus en la región, y abre el camino para futuras mejoras basadas en multiplexación, uso de nuevas dianas y optimización operativa del sistema CRISPR-Cas12a.

6 CONCLUSIONES

Se diseñaron y sintetizaron crRNAs dirigidos a regiones genómicas conservadas del virus del dengue para los serotipos DENV-2 y DENV-3. Al igual, se realizó una producción y purificación de la proteína AsCas12a funcional de manera eficiente.

Fue validada la unión del complejo ribonucleoproteico, demostrando que el sistema DETECTR es funcional, pero su actividad depende de las condiciones estequiométricas y composición del buffer de reacción.

Fue desarrollada la metodología de extracción de RNA de aguas residuales en la ciudad de Foz do Iguaçu. Siendo evaluada la síntesis de primers randómicos específicos para la previa amplificación y evaluación de las muestras.

Aunque el sistema DETECTR representa una alternativa prometedora y sensible para la vigilancia ambiental del DENV, la implementación de esta herramienta en rutina laboratorial requiere de una optimización de reacción y amplitud de detección.

Fue diseñado un sistema in vivo para la producción de RNP *locus* múltiples. Esta optimización permitiría la reducción de costos y adaptabilidad a un sistema cuantitativo.

7 REFERENCIAS

AGUILAR, Gabriel *et al.*. 2024. *Arboviroses comuns e o rim: uma revisão*. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 46, n. 03, p. e20230168. Disponible en: <<https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2023-0168pt>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

AHMED, Madeeha *et al.*. 2022. *Rapid molecular assays for the detection of the four dengue viruses in infected mosquitoes*. **Gates Open Research**, v. 06, n. 81, p. 01-20. Disponible en: <<https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13534.2>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

ARAUJO, Juliana *et al.*. 2024. *Detection of multiple human viruses, including Mpox, using a wastewater surveillance approach in Brazil*. **Pathogens**, v. 13, n. 589. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/pathogens13070589>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

AGARWAL, Chiti. 2023. *A review: CRISPR/Cas12-mediated genome editing in fungal cells: advancements, mechanisms and future directions in plant-fungal pathology*. **Science Open Research**, p. e20230001. Disponible en: <<https://doi.org/10.14293/s2199-1006.1.sor.2023.0001.v1>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

BHATT, Puneet *et al.*. 2020. *Current understanding of the pathogenesis of dengue virus infection*. **Current Microbiology**, v. 78, p. 17-32. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

BOROVIKOVA, Sofia *et al.*. 2024. *Efficient genome editing using 'NanoMEDIC' AsCas12a-VLPs Transcribed crRNA*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12768. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/ijms252312768>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

BRASIL. ESTADO DO PARANÁ. SECRETARIA DA SAÚDE. 2025. **Com a circulação do sorotipo 3 do vírus da dengue, Paraná alerta para casos e cuidados**. Curitiba: Sesa-PR. Disponible en: <<https://www.saude.pr.gov.br/Noticia/Com-circulacao-do-sorotipo-3-do-virus-da-dengue-Parana-alerta-para-casos-e-cuidados>>. Acceso en: 27 nov. 2025.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. 2025. **Monitoramento das arboviroses**. Brasília: MS. Disponible en: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>>. Acceso en: 22 nov. 2025.

CAMARA, Tamara. 2024. *A dengue é produto do meio: uma abordagem sobre os impactos do ambiente no mosquito Aedes aegypti e nos casos da doença*. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 27. Disponible en: <<https://doi.org/10.1590/1980-549720240048.2>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

CARABALI, Mabel *et al.*. 2021. *Assessing the reporting of dengue, chikungunya and zika to the National Surveillance System in Colombia from 2014–2017: a capture-recapture analysis accounting for misclassification of arboviral diagnostics*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 02. Disponible en: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009014>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

CECCHETELLI, Alyssa. 2020. *Finding nucleic acids with SHERLOCK and DETECTR*. **Addgene Blog**. Disponible en: <<https://blog.addgene.org/finding-nucleic-acids-with-sherlock-and-detectr>>. Acceso en: 22 nov. 2025.

CHENG, Zhou *et al.*. 2025. *Tunable control of Cas12 activity promotes universal and fast one-pot nucleic acid detection*. **Nature Communications**, v. 16, n. 1166. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41467-025-56516-3>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

CRONE, Michael *et al.*. 2020. *A role for Biofoundries in rapid development and validation of automated SARS-CoV-2 clinical diagnostics*. **Nature Communications**, v. 11, n. 4462. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18130-3>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

CUMPLIDO, Serrano *et al.*. 2021. *Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) del PCR en la COVID-19*. **Medicina de Familia**. v. 47, n. 05, p. 337-341. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.semerng.2021.05.003>>. Acceso en: 28 nov. 2025.

CURTI, Lucia *et al.*. 2020. *CRISPR-based platform for carbapenemases and emerging viruses detection using Cas12a (Cpf1) effector nuclease*. **Emerging Microbes &**

Infections, v. 09, p. 1140-1148. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1763857>. Acceso en: 18 nov. 2025

FREITAS, Rafael *et al.*. 2024. *Wolbachia* strains wMel and wAlbB differentially affect *Aedes aegypti* traits related to fecundity. **Host-microbial Interactions**, v. 12, n. 04. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00128-24>. Acceso en: 19 nov. 2025.

GARRIGOS, Ana *et al.*. 2025. *Colorimetric CRISPR Biosensor: A Case Srtudy with Salmonella Typhi*. **ACS Sensors**, v. 10, v. 02, p. 717-724. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c02029>. Acceso en: 19 nov. 2025.

GENG, Yi *et al.*. 2020. *Efficient genome editing in populus using CRISPR/Cas12a*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.593938>. Acceso en: 19 nov. 2025.

GOLDING, Mario *et al.*. 2023. *Natural vertical transmission of dengue virus in Latin America and the Caribbean: highlighting its detection limitations and potential significance*. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 442. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06043-1>. Acceso en: 19 nov. 2025.

GONG, Shaohua *et al.*. 2021. *CRISPR/Cas-Based in vitro diagnostic platforms for cancer biomarker detection*. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 35, p. 11899-11909. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02533>. Acceso en: 19 nov. 2025.

GOOTENBERG, Jonathan *et al.*. 2018. *Multiplex and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6*. **Science**, v. 360, n. 6387, p. 439-444. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5961727>. Acceso en: 18 nov. 2025.

GRONOWSKI, Ann. 2018. *Who or what is SHERLOCK?. The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 29, n. 03, p. 201-204. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30479604/v>. Acceso en: 21 nov. 2025.

HAN, Jing *et al.*. 2024. *Re-evaluating challenges and solutions in wastewater surveillance*. **Engineering**, v. 43, p. 22-24. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.eng.2024.07.023>>. Acceso en: 21 nov. 2025.

HARAPAN, Harapan *et al.*. 2020. *Dengue: a minireview*. **Viruses**, v. 12, n. 08, p. 829. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/v12080829>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

HE, Wei *et al.*. 2024. *Development of a CRISPR/Cas12a-based fluorescent detection method of Senecavirus A*. **VMC Veterinary Research**, v. 20, n. 258. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s12917-024-04116-6>>. Acceso en: 28 nov. 2025.

HERNANDEZ, Laura; OOST, Camila and BOEHM, Alexandria. 2025. *Solid-liquid partitioning of dengue, West Nile, Zika, hepatitis A, influenza A, and SARS-CoV-2 viruses in wastewater from across the USA*. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 11, n. 01, p. 88-99. Disponible en: <<https://doi.org/10.1039/D4EW00225C>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA ETES SUSTENTÁVEIS. 2024. **Rede de Monitoramento de Esgoto**. Belo Horizonte: UFMG. Disponible en: <<https://etes-sustentaveis.org/project/rede-monitoramento-covid-esgotos>>. Acceso en: 18 nov. 2015.

ISLAM, Arshi *et al.*. 2023. *Global and local evolutionary dynamics of Dengue virus serotypes 1, 3, and 4*. **Epidemiology and Infection**, v. 151, n. 127, p. 01-18. Disponible en: <<https://doi.org/10.1017/S0950268823000924>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

ITTIPRASERT, Wannaporn *et al.*. 2022. *RNA-Guided AsCas12a- and SpCas9-Catalyzed Knockout and Homology Directed Repair of the Omega-1 Locus of the Human Blood Fluke, Schistosoma mansoni*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 02, p. 631. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/ijms23020631>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

JANG, Hyowon *et al.*. 2025. *CRISPR/Cas12a2 enables ultra-sensitive amplification-free RNA detection*. **Nucleic Acid Research**, v. 53, n. 21. Disponible en: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1293>>. Acceso en: 26 nov. 2025.

KADAM, Ulhas *et al.*. 2023. *Aptamer-based CRISPR-Cas powered diagnostics of diverse biomarker and small molecule targets*. **Applied Biological Chemistry**, n. 13, v. 66. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s13765-023-00771-9>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

KELLNER, Max *et al.*. 2019. *SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases*. **Nature Protocols**, v. 14, p. 2986-3012. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

KULARATNE, Senanayake; DALUGAMA, Chamara. 2022. *Dengue infection: global importance, immunopathology and management*. **Clinical Medicine**, v. 22, n. 01, p. 09-13. Disponible en: <<https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0791>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

KURIHARA, Nina *et al.*. 2022. *Structure of the type V-C CRISPR-Cas effector enzyme*. **Molecular Cell**, v. 82, n. 10, p. 1865-1877. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.006>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

LA VERDAD. 2018. **Dengue**: transmisión, síntomas y áreas con riesgo. Murcia, España: La Verdad. Disponible en: <<https://www.laverdad.es/murcia/dengue-transmision-sintomas-areas-riesgo-20181010002033-in.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.laverdad.es%2Fmurcia%2Fdengue-transmision-sintomas-areas-riesgo-20181010002033-in.html>>. Acceso en: 28 nov. 2025.

LI, Xiaoping *et al.*. 2023. *Advances in the CRISPR-Cas technology in rapid detection of pathogen nucleic acid*. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1260883>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

LI, Yabing *et al.*. 2024. *A broad wastewater screening and clinical data surveillance for virus-related diseases in the metropolitan Detroit area in Michigan*. **Human Genomics**, v. 18, n. 14. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s40246-024-00581-0>>. Acceso en: 19 nov. 2015.

MADHRY, Deeksha *et al.*. 2023. *Synergistic correlation between host angiogenin and dengue virus replication*. **RNA Biology**, v. 20, n. 01, p. 805-816. Disponible en: <<https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2264003>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

MAKAROVA, Kira *et al.*. 2011. *Evolution and classification of the CRISPR-cas systems*. **Nature Review Microbiology**, v. 09, p. 467-477. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>>. Acceso en: 23 nov. 2025.

MAKAROVA, Kira *et al.*. 2025. *An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems including rare variants*. **Nature Microbiology**, v. 10, p. 3346-3361. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41564-025-02180-8>>. Acceso en: 23 nov. 2025.

MANARINO, Eduardo. 2021. *Nova ferramenta do sistema CRISPR/Cas: Nuclease AsCas12a Ultra facilita a rápida geração de células*. **MartinLab**. Disponible en: <<https://www.martinlab.net/post/nova-ferramenta-do-sistema-crispr-cas-nuclease-ascas12a-ultra-facilita-a-rápida-geração-de-células>>. Acceso en: 25 nov. 2025.

MANN, James; PITTS, Jason. 2022. *PrimedSherlock: a tool for rapid design of highly specific CRISPR-Cas12 crRNAs*. **BMC Bioinformatic**, v. 23, n. 428. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s12859-022-04968-5>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

MEDEIROS, Eduardo Alexandrino. 2024. *Desafios en el control de la epidemia de dengue en Brasil*. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 37. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.37689/acta-ape/2024EDT012>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

MOHANRAJU, Prarthana *et al.*. 2022. *Alternative functions of CRISPR-Cas systems in the evolutionary arms race*. **Nature Review Microbiology**, v. 10, p. 351-364. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00663-z>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

MUSTAFA, Mujahed; MAKHAWI, Abdelrafie. 2021. *SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 59, v. 10. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

NALEFSKI, Eric *et al.*. 2021. *Kinetic analysis of Cas12a and Cas13a RNA-Guided nucleases for development of improved CRISPR-Based diagnostics*. **A Cell Press**

Journal, v. 24, n. 09. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102996>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

NIMSAMER, Pattaraporn *et al.*. 2021. *Comparative performance of CRISPR-Cas12a assays for SARS-CoV-2 detection tested with RNA extracted from clinical specimens*. **Journal of Virological Methods**, v. 290. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114092>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

OMURA, Satoshi *et al.*. 2025. *Structural basis for target DNA cleavage and guide RNA processing by CRISPR-Cas12*. **Communications Biology**, v. 08, n. 876. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s42003-025-08300-8>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2021. Criterios de interpretación, cálculo y expresión de los resultados. *In*: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales**. Washington, D.C., EUA: PAHO. p. 27-29. Disponible en: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/54698>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. 2022. Síntesis de evidencia: directrices para el diagnóstico y tratamiento del dengue, el chikunguña y el zika en la región de las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 46, n. 82. Disponible en: <<https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.82>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

PARACCHINI, Valentina *et al.*. 2024. *EU surveys insights: analytical tools, future directions, and the essential requirement for reference materials in wastewater monitoring of SARS-CoV-2, antimicrobial resistance and beyond*. **Human Genomics**. v. 18, n. 72. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s40246-024-00641-5>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

PARK, Bum *et al.*. 2021. *Specific detection of influenza A and B viruses by CRISPR/Cas12a-based assay*. **Biosensors**, v. 11, n. 88. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/bios11030088>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

PERVEEN, Nighat *et al.*. 2023. *Host-pathogen interaction in arthropod vectors: Lessons from viral infections*. **Frontiers in Immunology**, v. 14. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1061899>>. Acceso en: 27 nov. 2025.

PRADO, Tatiana *et al.*. 2023. *Wastewater-based epidemiology for preventing outbreaks and epidemics in Latin America - Lessons from the past and look to the future*. **Science of the Total Environment**, v. 865, v. 20. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161210>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

PRESCOTT, Meagan; KOESDJOJO, Myra; MANDRELL, David. 2025. *Development of a rapid point-of-care dengue virus type 2 infection diagnostic assay using recombinase polymerase amplification and lateral flow device*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1578549>>. Acceso en: 19 nov. 2025

QUINTERO, Orlando. 2024. **Optimización de la biosíntesis de la proteína Cas12a proveniente de *Acidaminococcus sp* para su aplicación en CRISPR-Cas**. Orientadores: MUÑOZ, Hugo (orientador); HERNANDEZ, Daniel (coorientador). 56 h.. Tesis (Graduación) - Licenciatura en Biología, UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), Ciudad de México, México. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000854204>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

QUINTERO, Orlando *et al.*. 2025. *Enhanced production of functional CRISPR-AsCas12a protein in Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 232. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.pep.2025.106722>>. Acceso en 20 nov. 2025.

RAMYASOMA, Hewawasan *et al.*. 2020. *Multiple dengue virus serotypes resistant transgenic Aedes aegypti fitness evaluated under laboratory conditions*. **RNA Biology**, v. 17, n. 07, p. 918-929. Disponible en: <<https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1735210>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

RANANAWARE; Santosh *et al.*. 2025. *AsCas12a tolerates insertions in target DNA*. **Nucleic Acid Research**, v. 53, n. 17. Disponible en: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaf887>>. Acceso en: 27 nov. 2025.

RATNER, Hannah; WEISS, David. 2021. *crRNA complementary shifts endogenous CRISPR-Cas systems between transcriptional repression and DNA defense*. **RNA Biology**, v. 18, n. 11, p. 1560-1573. Disponible en: <<https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1878335>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

ROY, Sudipta; BHATTACHARJEE, Soumen. 2021. *Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 09, p. 687-702. Disponible en: <<https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>>. Acceso en: 20 jul. 2025.

SILVA, Antônio da; GRIEBELER, Jeverson; MARTINS, Wesley. 2024. Perfil epidemiológico dos casos de dengue em Foz do Iguaçu-PR de 2020 a 2021. **RECIMA21**, v. 05, n. 01. Disponible en: <<https://doi.org/10.47820/recima21.v5i1.4642>>. Acceso en: 27 nov. 2025.

SINGER, Andrew *et al.*. 2023. *A world of wastewater-based epidemiology*. **Viewpoint**, v. 01, p. 408-415. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s44221-023-00083-8>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

SOZZA, Nicole Fernanda. **Brasil Escola: animais: invertebrados: Aedes aegypti**. São Paulo: UOL. Disponível em: <<https://brasilescola.uol.com.br/animais/aedes-aegypti.htm>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

STONY BROOK UNIVERSITY. 2025. **Wastewater-based epidemiology**. New York, EUA: Center of Clean Water Technology. Disponible en: <<https://www.stonybrook.edu/commcms/cleanwater/research/wastewaterepidemiology.php>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

STROHKENDL, Isabel *et al.*. 2024. *Cas12a domain flexibility guides R-loop formation and forces RuvC resetting*. **Molecular Cell**, v. 84, n. 14, p. 2717-2731. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.06.007>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

SU, Wenzhe *et al.*. 2022. *A serotype-specific and multiplex PCR method for whole-genome sequencing of dengue virus directly from clinical samples*. **Microbiology**

Spectrum, v. 10, n. 05. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/spectrum.01210-22>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

SWARTS, Daan; OOST, John; JINEK, Martin. 2017. *Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a*. **Molecular Cell**, v. 66, n. 02, p. 221-233. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.016>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

TCHIBOZO, Carine *et al.*. 2022. *Surveillance of arthropod-borne viruses in Benin, West Africa 2020-2021: detection of dengue virus 3 in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. **Military Medical Research**, v. 09, n. 64. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s40779-022-00425-9>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

THAKALI, Ocean *et al.*. 2022. *Pilot study wastewater surveillance of dengue virus RNA: lessons, challenges, and implications for future research*. **Environmental Challenges**, v. 09, n. 100614. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100614>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

TREML, Maria *et al.*. 2024. *Análise epidemiológica da dengue no sul do Brasil: 2014 a 2024*. **Health Residencies Journal**, v. 05, n. 26, p. 19-29. Disponible en: <<https://doi.org/10.51723/hrj.v5i26.1127>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

TRUJILLO, María *et al.*. 2022. *Recent molecular techniques for the diagnosis of Zika and Chikungunya infections: a systematic review*. **Heliyon**, v. 08, n. 08. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10225>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

VANGAH, Somayeh *et al.*. 2020. *CRISPR-based diagnosis of infectious and noninfectious diseases*. **Biological Procedures Online**, v. 22, n. 22. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s12575-020-00135-3>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

VICENTE, Creuza; *et al.*. 2021. *Impact of concurrent epidemics of dengue, chikungunya, zika, and COVID-19*. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 54. Disponible en: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0837-2020>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

VILLAVICENCIO, Eva. 2022. **Detección molecular de *Leishmania* spp. subgénero *Viannia* basada en el sistema CRISPR-Cas12a utilizando como biomarcador el ADN de minicírculos del kinetoplasto (ADNk).** Orientadores: SICHERI, Vanessa (orientador); ZELADA, Jorge (coorientador). 163 h.. Disertación (Maestría) – Programa de Posgrado en Bioquímica y Biología Molecular, UPCH (Universidad Peruana Cayetano Heredia). Lima, Perú. Disponible en: <<https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/13026>>. Acceso en: 18 nov. 2025.

WANG, Joy; PAUSCH, Patrick; DOUDNA, Jennifer. 2022. *Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes.* **Nature Review Microbiology**, v. 20, p. 641-656. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00739-4>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

WOLFE, Marlene K. *et al.*. 2023. *Wastewater detection of emerging arbovirus infections: case study of dengue in the United States.* **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 09, p. 09-15. Disponible en: <<https://doi.org/10.1021/acs.estlett.3c00769>>. Acceso en: 20 nov. 2025.

YASEN. 2024. **The reasonable range of Ct values in qPCR experiments.** Gaithersburg, MD, USA: Yeasen. Disponible en: <<https://www.yeasenbio.com/blogs/molecular-biology/the-reasonable-range-of-ct-values-in-qpcr-experiments>>. Acceso en: 28 nov. 2025.

YUAN, Changjung *et al.*. 2022. *One-step isothermal amplification strategy for microRNA specific and ultrasensitive detection based on nicking-assisted entropy-driven DNA circuit triggered exponential amplification reaction.* **Analytica Chimica Acta**, v. 1203, n. 339706. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339706>>. Acceso en: 19 nov. 2025.

ZAKIYYAH, Salma *et al.*. 2022. *Detection of tropical diseases caused by mosquitoes using CRISPR-based biosensors.* **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 07, n. 309. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7100309>>. Acceso en: 20 jul. 2025.

ZHANG, Huarui *et al.*. 2023. *Harnessing multiplex crRNA enables an amplification-free/CRISPR-Cas12a-based diagnostic methodology for *Nosema bombycis*.*

Microbiology Spectrum, v. 12, n. 01. Disponibile en:
<<https://doi.org/10.1128/spectrum.03014-23>>. Accesso en: 20 nov. 2025.

ZHANG, Yunkai *et al.*. 2025. *A one-pot method for universal dengue virus detection by combining RT-RPA amplification and CRISPR/Cas12a assay*. **BMC Microbiology**, v. 25, n. 163. Disponibile en: <<https://doi.org/10.1186/s12866-025-03882-z>>. Accesso en: 20 nov. 2025.