

Estudio y Recreación de un Análisis Filogenético de la Proteína de Envoltura (Domino III) de Variantes del Dengue-4

Susana Suárez Mendoza¹
Ricardo Cárdenes Pérez¹

¹Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Escuela de Ingeniería Informática

19 de enero de 2025

Resumen

En este estudio, llevamos a cabo una reconstrucción filogenética exhaustiva del virus del dengue serotipo 4 (DENV-4), enfocándonos en el dominio III de la proteína de envoltura. Utilizando metodologías filogenéticas contemporáneas, analizamos secuencias de diversas variantes de DENV-4. Nuestros hallazgos corroboran la existencia de dos genotipos principales, alineándose con los resultados de Mota et al., 2002. Además, al incorporar secuencias de los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3, observamos una diferenciación clara entre los serotipos, lo que subraya la eficacia del dominio III como un marcador filogenético robusto. El árbol filogenético se construyó utilizando herramientas bioinformáticas especializadas, asegurando una alineación precisa de las secuencias y una representación exacta de las relaciones evolutivas entre las variantes analizadas. Este enfoque no solo validó los genotipos previamente identificados, sino que también ofreció una visión más detallada de las relaciones entre los diferentes serotipos del virus del dengue.

1. Introducción

Este informe se basa en el artículo titulado *Análisis filogenético del dominio III de la proteína de envoltura del virus dengue 4* de Mota et al. (2002), publicado en la revista *Salud Pública de México*. El objetivo de este informe es resumir y analizar los aspectos relacionados con la construcción y presentación de los árboles filogenéticos incluidos en el estudio, destacando la metodología utilizada y los hallazgos obtenidos.

El artículo aborda la epidemiología del dengue, una enfermedad viral transmitida por mosquitos que causa epidemias significativas de fiebre del dengue (DF) y fiebre hemorrágica del dengue (DHF). En particular, se enfoca en el serotipo Den-4, que fue introducido en las Américas en 1981 y se ha asociado con casos graves de DHF, e incluso se ha detectado en tejidos cerebrales en casos fatales. Además, se describe cómo la variabilidad genética y filogenética de los virus del dengue refleja su evolución y adaptación, lo que puede influir en la severidad de la enfermedad y es clave para mejorar la vigilancia epidemiológica y desarrollar vacunas más efectivas.

Un aspecto central del estudio es el análisis del dominio III de la proteína de envoltura (E) del Den-4, una región esencial para la interacción del virus con los receptores celulares y su entrada en las células huésped. Este dominio presenta una alta variabilidad genética y ha sido identificado como un marcador útil para estudios filogenéticos, permitiendo correlacionar genotipos virales con la severidad de la enfermedad. Para este propósito, se aplicaron herramientas moleculares rápidas, como el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), lo que permitió clasificar eficientemente los genotipos del Den-4.

A medida que el virus del dengue evoluciona, se observa un incremento en la complejidad estructural del dominio III de la proteína de envoltura (E), como se ilustra en las imágenes 2, 3 y 4. Estas estructuras, predichas con AlphaFold2, Deepmind, 2022, destacan cómo las variaciones en la secuencia genética afectan la configuración tridimensional de este dominio clave. En el caso del Dengue-4 (Figura 1), la estructura refleja adaptaciones

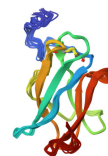


Figura 1: Dominio III de la proteína de envoltura (E) del virus Dengue-4.

específicas que optimizan su interacción con receptores celulares en ciertas regiones geográficas, lo que podría estar vinculado a su mayor potencial de virulencia.



Figura 2: Estructura predicha por AlphaFold2 del dominio III de la proteína de envoltura (E) del virus Dengue-1



Figura 3: Estructura predicha por AlphaFold2 del dominio III de la proteína de envoltura (E) del virus Dengue-4

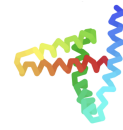


Figura 4: Estructura predicha por AlphaFold2 del dominio III de la proteína de envoltura (E) del virus Dengue-3

Por otro lado, el Dengue-3 (Figura 4) muestra una configuración más compleja en comparación con el Dengue-1 (Figura 1) y con el Dengue-2 (Figura 2), lo que sugiere una acumulación de cambios evolutivos que podrían estar relacionados con la capacidad del virus para evadir respuestas inmunitarias del huésped. Estos hallazgos refuerzan la importancia de los estudios filogenéticos y estructurales para comprender cómo la evolución del virus influye en su patogenicidad y su éxito en la colonización de nuevos nichos epidemiológicos.

2. Materiales y Métodos

En el artículo mencionado previamente (*Mota et al., 2002*), se detalla de manera exhaustiva la metodología empleada para el análisis filogenético del dominio III de la proteína de envoltura del virus del dengue serotipo 4 (Den-4). A continuación, se resumen los principales procedimientos y técnicas descritos en el estudio:

2.1. Recolección de virus

Los aislamientos de virus del dengue fueron obtenidos a partir de muestras de suero humano y cultivados en la línea celular de mosquitos C6/36, la cual es ampliamente reconocida por su capacidad para soportar la replicación de virus transmitidos por vectores. Posteriormente, los virus fueron tipificados utilizando inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales. En este análisis se incluyeron aislamientos de Den-4 provenientes de distintas regiones de México (Guerrero, Puebla y San Luis Potosí) y de otros países como Senegal, Venezuela, China, Malasia, República Dominicana e India, además de la cepa prototipo H241.

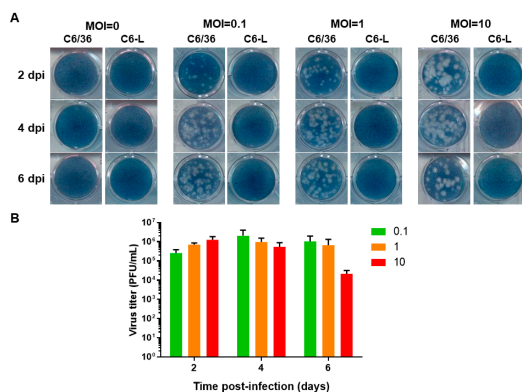


Figura 5: Cultivo Celular C6/36.

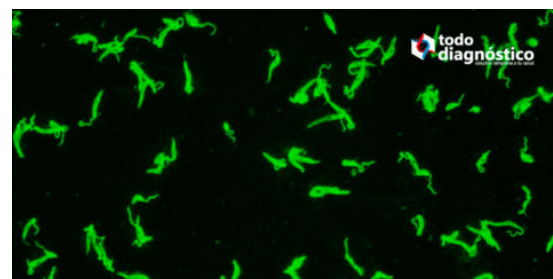


Figura 6: Inmunofluorescencia Indirecta

2.2. Ensayo de RT-PCR

Se emplearon oligonucleótidos específicos diseñados con el software Oligo 4.0, basados en la secuencia del Den-4 (cepa 814669) disponible en la base de datos GenBank. Estos oligonucleótidos fueron seleccionados cuidadosamente para garantizar la especificidad y eficiencia en la amplificación del dominio III de la proteína de envoltura (E), una región clave del genoma viral debido a su papel en la interacción con receptores celulares. El ARN total se extrajo de las células infectadas mediante un protocolo basado en tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo, un método ampliamente utilizado por su capacidad para preservar la integridad del ARN al eliminar contaminantes como proteínas y lípidos celulares. Este paso fue fundamental para garantizar la pureza y calidad del ARN, permitiendo su uso en las etapas posteriores del proceso.

Posteriormente, el ARN extraído se sometió a una reacción de transcriptasa inversa, donde fue convertido en ADN complementario (cDNA). Esta conversión fue esencial, ya que las técnicas de amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requieren una plantilla de ADN para funcionar. Una vez generado el cDNA, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos previamente diseñados. Este proceso permitió obtener un fragmento de 404 pares de bases (pb), que corresponde al dominio III de la proteína de envoltura. Este fragmento se caracteriza por su alta variabilidad genética, lo que lo convierte en un marcador ideal para estudios filogenéticos y análisis evolutivos del virus del dengue.

2.3. Secuenciación y análisis filogenético

El fragmento amplificado de 404 pb fue purificado y posteriormente secuenciado utilizando el sistema de secuenciación fmol. Las secuencias nucleotídicas y las correspondientes aminoácidas deducidas se alinearon con 15 secuencias adicionales obtenidas de la base de datos GenBank. Para generar los árboles filogenéticos, se utilizó el programa PAUP, aplicando métodos de parsimonia y el método bootstrap con 100 réplicas para evaluar la confiabilidad de las inferencias filogenéticas.

2.4. Análisis de enzimas de restricción

Se utilizó la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para clasificar los genotipos de Den-4 de manera eficiente. Para ello, se digirieron los productos de PCR con seis enzimas de restricción (Mae III, Alu I, Sac I, Nla III, Dde I y Cfo I). Los fragmentos resultantes fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Este enfoque permitió agrupar los aislamientos virales en dos genotipos principales, en concordancia con estudios previos.

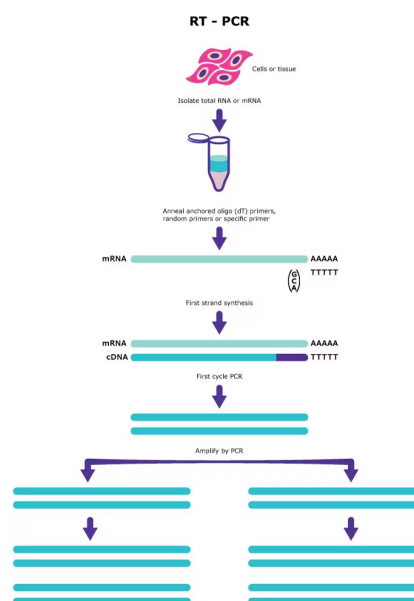


Figura 7: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa.

3. Reconstrucción de los Resultados

Con el objetivo de demostrar la veracidad de los resultados presentados, se llevó a cabo un esfuerzo por reconstruir el árbol filogenético reportado por Mota et al., 2002 en el artículo analizado. Este proceso inició con la obtención de las secuencias genéticas necesarias para la construcción del árbol, un paso crucial para replicar las conclusiones del estudio original.

La secuencia de referencia utilizada fue la correspondiente a la variante Guerrero, México, 1987 (gro87), que sirve como base para identificar las variaciones genéticas presentes en otras cepas del virus del dengue-4. A partir de esta secuencia, se analizaron las diferencias nucleotídicas reportadas para 22

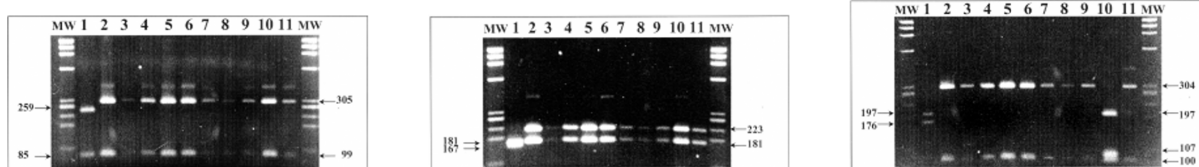


Figura 8: Análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) de Virus Representativos del Den-4 de México y Otras Regiones del Mundo con las Enzimas de Restricción, Mota et al., 2002.

variantes adicionales, permitiendo recrear con precisión las secuencias de cada una de ellas. Estas variaciones incluyen sustituciones específicas en posiciones clave del dominio III de la proteína de envoltura, una región crítica tanto para la funcionalidad del virus como para los estudios filogenéticos.

3.1. Recreación de secuencias

Para obtener las secuencias originales utilizadas en el análisis, se partió de la secuencia de referencia Guerrero, México, 1987 (gro87) y se compararon las variaciones reportadas para cada variante del virus del dengue-4. Estas variaciones, como se ilustra en la Figura 9, especifican los cambios nucleotídicos en posiciones particulares del dominio III de la proteína de envoltura (E). Cada fila de la figura representa una variante, mientras que las columnas corresponden a posiciones específicas en la secuencia. Los colores indican los nucleótidos que difieren respecto a la secuencia de referencia: rojo para adenina (A), naranja para timina (T), azul para citosina (C) y verde para guanina (G). Las posiciones en blanco indican que no hubo cambios.

El proceso de recreación de las secuencias consiste en aplicar estas variaciones a la secuencia de referencia. Cada variante conserva las posiciones donde no hay modificaciones, y las sustituciones se realizan exclusivamente en los sitios indicados en la figura. De esta manera, se reconstruyen las secuencias completas para cada variante del virus, preservando la información genética esencial y reflejando las adaptaciones evolutivas reportadas en el estudio.

Este enfoque asegura que las secuencias recreadas correspondan fielmente a las variantes originales utilizadas en el análisis. Además, las modificaciones observadas en la Figura 9 revelan regiones altamente conservadas, esenciales para la funcionalidad del virus, y otras con mayor variabilidad, que reflejan adaptaciones evolutivas. Estas secuencias reconstruidas son fundamentales para el análisis filogenético, proporcionando una base sólida para interpretar la relación evolutiva entre las distintas variantes del virus del dengue-4.

Todas las secuencias reconstruidas están disponibles públicamente en un repositorio de GitHub, DeepAmino, 2025, para garantizar la transparencia y la reproducibilidad de este análisis. Los archivos en formato FASTA incluyen tanto la secuencia de referencia como las variantes reconstruidas, facilitando su uso en estudios futuros. Este esfuerzo busca fomentar la colaboración científica y la validación independiente de los resultados presentados.

3.2. Búsqueda de variantes antiguas

Tal y como hacen los autores en el artículo original, hemos buscado tres variantes adicionales que nos permitan comprobar realmente ha habido una evolución del virus. Esto es, buscamos otras variaciones, de los virus dengue tipo 1, dengue tipo 2 y dengue tipo 3 que nos sirvan para corroborar que existe, o no, una diferencia con respecto a las variaciones del dengue tipo 4.

Anteriormente ya hemos mostrado, en las figuras 1, 2, 3 y 4, cómo existen ciertas diferencias estructurales en los distintos virus, observando cómo ha aumentado la complejidad estructural de la proteína de envoltura a medida que estos han evolucionado. Además, se mostrará en la sección **Comparación de resultados** cómo estas antiguas variedades divergen claramente en el árbol filogenético, formando clados bien definidos que reflejan tanto su distancia genética como las adaptaciones evolutivas específicas que han adquirido. Este patrón filogenético evidencia no solo la divergencia entre serotipos como dengue-1, dengue-2, dengue-3 y dengue-4, sino también la agrupación de variantes dentro de cada serotipo en subgrupos relacionados, lo que refuerza la importancia de los cambios estructurales en la evolución del virus.

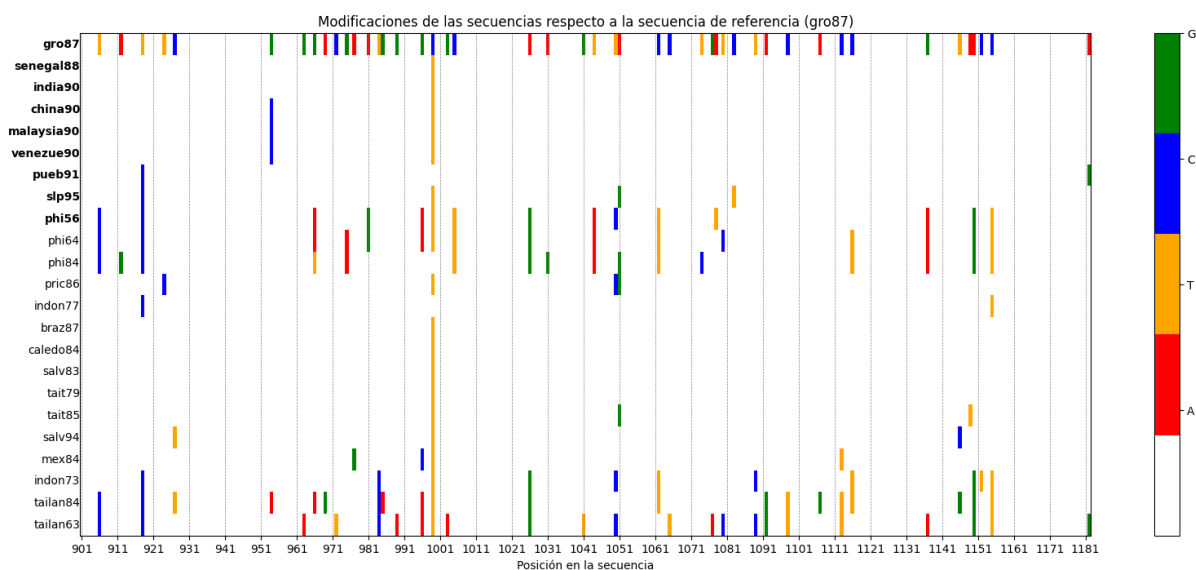


Figura 9: Modificaciones de las secuencias de nucleótidos codificadoras del dominio III de la proteína de envoltura en las distintas variantes del virus del dengue-4 con respecto a la secuencia de referencia de la variante de Guerrero, México, 1987. En la gráfica, la primera tira de nucleótidos, correspondiente a la secuencia Gro87, no muestran modificaciones, sino aquellas posiciones en las que las bases originales de la secuencia de referencia fueron modificadas.

Los serotipos adicionales incluidos han sido los siguientes:

- **Dengue-1 (D1):** Representado por la variante *Nauru74*, que ocupa una posición basal en el árbol filogenético, reflejando su divergencia temprana respecto a los demás serotipos.
- **Dengue-2 (D2):** Representado por la variante *NewGuinea44*, que también muestra una posición basal en el árbol, pero con mayor cercanía evolutiva al dengue-3 y dengue-4.
- **Dengue-3 (D3):** Representado por la variante *Philipp56*, situada en una rama intermedia entre el dengue-2 y el clado que agrupa las variantes del dengue-4.

Para obtener las secuencias de los diferentes serotipos del virus del dengue, comenzamos accediendo a la base de datos de taxonomía del NCBI, que proporciona una clasificación detallada de los cuatro serotipos principales del virus del dengue. Esta fuente nos permitió identificar y seleccionar variantes representativas para cada serotipo, asegurando una base sólida para nuestro análisis filogenético.

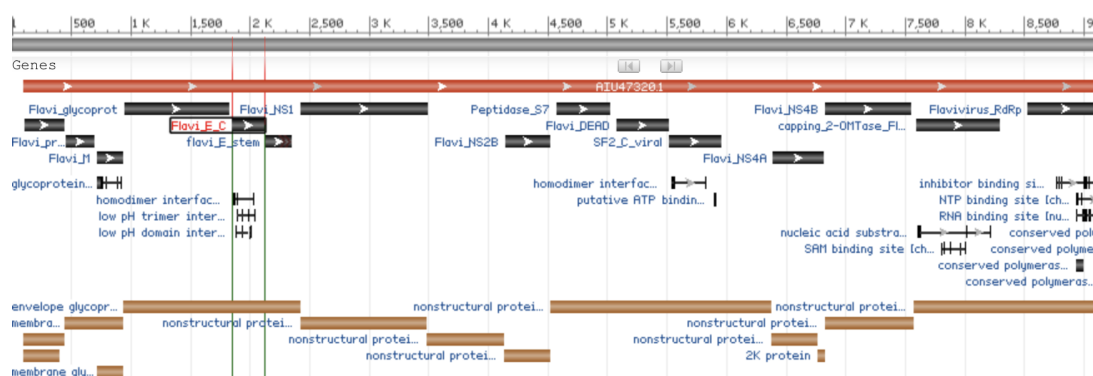


Figura 10: Aislamiento del dominio III de la proteína de envoltura de la variante del virus Dengue-4 de Nauro, 1974. Este proceso tuvo que repetirse para las otras dos variantes, dado que no se incluía ningún tipo de información de estas secuencias en el artículo original.

Procedimos a descargar las secuencias genómicas completas de las variantes seleccionadas desde la base de datos GenBank del NCBI. Estas secuencias incluyen información detallada sobre la organización

genética de cada variante, lo que es esencial para estudios comparativos. Para cada secuencia, aislamos la región correspondiente al dominio III de la proteína de envoltura (E), una región clave para la interacción del virus con los receptores celulares y, por tanto, crucial para los estudios filogenéticos. Este proceso se muestra en la Figura 10.

Utilizando herramientas bioinformáticas especializadas, realizamos un alineamiento múltiple de las secuencias del dominio III, lo que nos permitió identificar similitudes y diferencias entre los serotipos y variantes. Posteriormente, construimos un árbol filogenético empleando métodos estadísticos apropiados, reflejando las relaciones evolutivas entre las variantes y serotipos del virus del dengue. Este enfoque sistemático nos facilitó analizar comparativamente las secuencias, proporcionando una base sólida para interpretar sus relaciones filogenéticas y comprender mejor su evolución.

3.3. Recreación del árbol filogenético

En esta sección se presentan las comparaciones entre los árboles filogenéticos obtenidos en este análisis y el árbol reportado en el artículo original de Mota et al. (2002). Los árboles fueron reconstruidos utilizando las secuencias del dominio III de la proteína de envoltura (E) del virus del dengue tipo 4, empleando métodos de parsimonia y herramientas modernas como BioPython.

Árbol Filogenético del Virus Dengue-4 El árbol filogenético reconstruido incluye únicamente las variantes de dengue tipo 4 analizadas en este trabajo. Las variantes se agrupan en dos clados principales, que corresponden a los genotipos 1 y 2, de manera consistente con lo reportado por Mota et al. En este árbol, las variantes del sudeste asiático, como Thailand63, Thailand84, Philipp56, Philipp64 y Philipp84, forman un grupo claramente diferenciado (genotipo 1), mientras que las variantes de América y otras regiones (por ejemplo, Guerrero87, SanLuisPotosi95 y Salvador94) se agrupan en el genotipo 2.

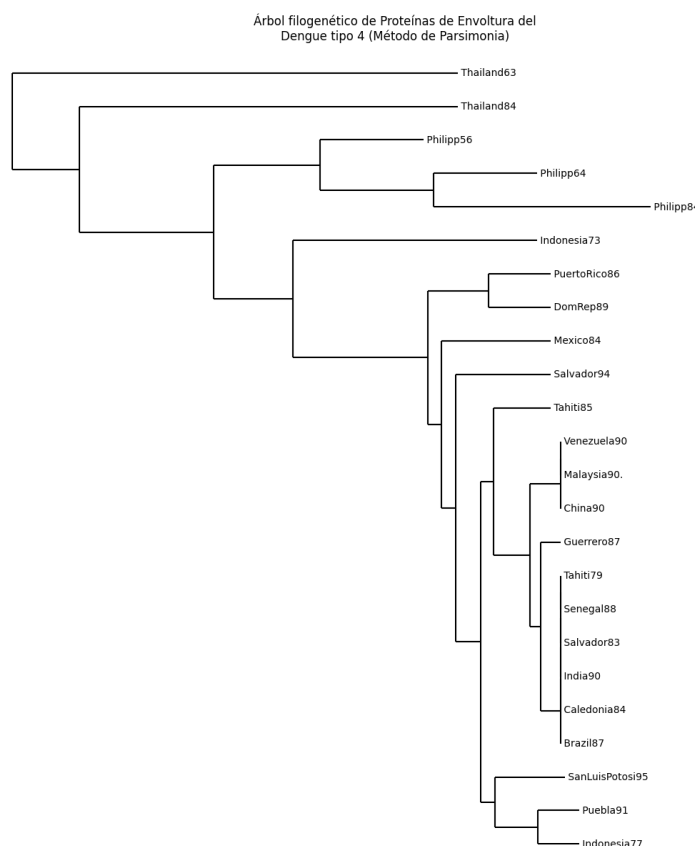


Figura 11: Árbol filogenético reconstruido utilizando el método de parsimonia para las secuencias obtenidas a partir del mapa de calor mostrado en la Figura 9.

El uso de herramientas modernas como BioPython y métodos de parsimonia ha permitido una representación más clara y detallada de las relaciones entre las variantes. La estructura general es congruente

con el árbol original, pero ofrece mayor resolución en los niveles internos, permitiendo identificar con precisión las relaciones cercanas entre variantes específicas.

Árbol Filogenético con Variantes Adicionales El segundo árbol (Figura 12) amplía significativamente la comparación filogenética al incorporar variantes de los serotipos dengue-1, dengue-2 y dengue-3, además del dengue-4. En esta representación, la clara diferenciación entre los serotipos destaca la robustez del dominio III de la proteína de envoltura como un marcador molecular capaz de distinguir no solo variantes dentro del dengue-4, sino también entre los diferentes serotipos del virus.

El análisis filogenético evidencia que las variantes de dengue-2 y dengue-3 están más estrechamente relacionadas entre sí, compartiendo ramas más cercanas en el árbol. Esto se alinea con estudios evolutivos previos que han señalado una relación filogenética más próxima entre estos dos serotipos. Por otro lado, la variante de dengue-1 es la variante que más aislada se encuentra, lo que refuerza su divergencia en el contexto evolutivo del complejo de virus del dengue. Además, las variantes de dengue-4 conservan la agrupación en los genotipos 1 y 2, como se aprecia también en el árbol de Mota et al. (2002), como ya ocurría en el árbol presentado en la Figura 11.

3.4. Comparación de resultados

La Figura 13 muestra el árbol original presentado en el artículo de Mota et al., 2002. Comparado con los árboles reconstruidos, se puede observar que los patrones filogenéticos generales son consistentes: los genotipos parecen estar conformados por las mismas variantes del virus. Parece ser, no obstante, que en el genotipo 2 existe una desordenación frente al original, pero creemos que esto se debe a la baja calidad de representación del mismo.

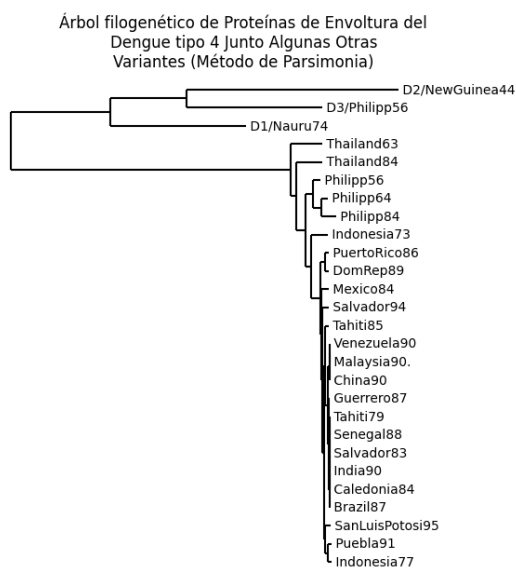


Figura 12: Árbol filogenético reconstruido utilizando el método de parsimonia para las secuencias obtenidas a partir del mapa de calor mostrado en la Figura 9, además de secuencias de otras variantes adicionales para contrastar la evolución del virus.

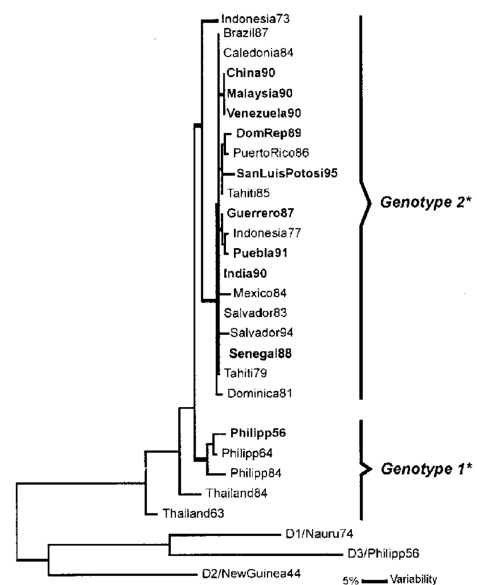


Figura 13: Árbol filogenético original propuesto por Mota et al., 2002 para estudiar la taxonomía del virus del Dengue, especialmente de la variante del tipo 4, en distintos países.

4. Estado actual del virus

Para profundizar en la evolución del virus del dengue en las últimas décadas, hemos llevado a cabo una reconstrucción detallada del árbol filogenético del serotipo 4 (Den-4), siguiendo la metodología propuesta por Mota et al. (2002). En esta ocasión, incorporamos secuencias de cepas más recientes para

evaluar posibles divergencias evolutivas. Utilizamos la herramienta BLAST, específicamente la variante BLASTx, para identificar proteínas homólogas a partir de las secuencias obtenidas previamente. Una vez identificadas las proteínas correspondientes, accedimos a la base de datos del NCBI para aislar la región Flavi_E_C (Dominio III) de cada una, como se ilustra en la Figura 10.

Posteriormente, construimos un árbol filogenético empleando el método de parsimonia, que permite inferir relaciones evolutivas minimizando el número de cambios necesarios. El resultado, presentado en la Figura 14, revela una clara divergencia evolutiva en las variantes más actuales del virus. Observamos la formación de nuevos clados que reflejan adaptaciones específicas y una mayor diversidad genética en comparación con las cepas analizadas en estudios anteriores. Estos hallazgos subrayan la importancia de continuar monitoreando la evolución genética del virus del dengue para mejorar las estrategias de control y prevención.

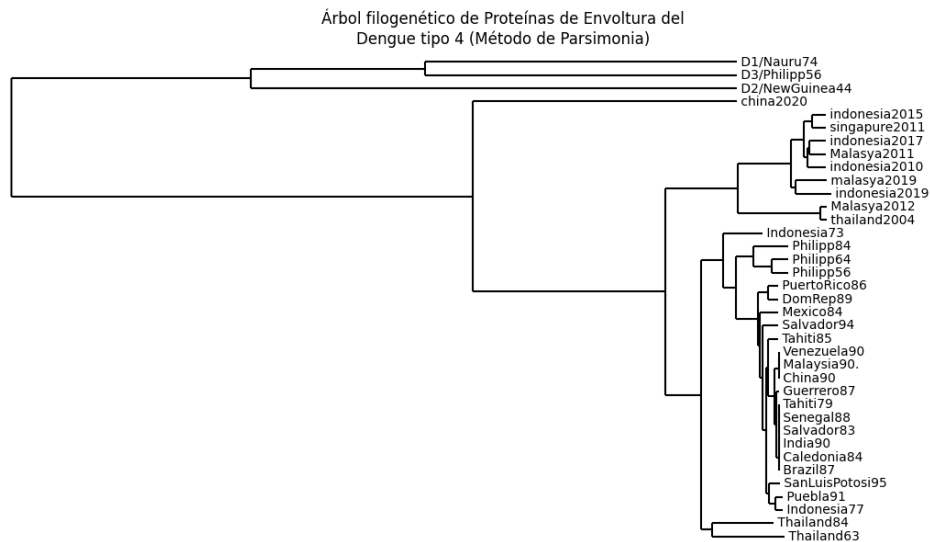


Figura 14: Árbol filogenético reconstruido mediante el método de máxima parsimonia, incorporando secuencias de variantes actuales del virus del dengue. Este análisis revela una divergencia evolutiva significativa en las cepas contemporáneas, destacando la aparición de nuevos linajes y la complejidad genética emergente en las últimas décadas.

Ahora bien, esta tendencia del virus no es casualidad. Tras usar AlphaFold2, Deepmind, 2022, para recrear la estructura tridimensional de la proteína, vemos como esta presenta una estructura que, es a simple vista, más compleja que todas las mostradas para variantes antiguas (véase la sección 1), además de mostrar ligeras diferencias frente a variantes ya introducidas por Mota et al., 2002 (véase Figura 16), al mostrarse más compacta.

5. Conclusiones

La coherencia entre nuestro árbol filogenético y el presentado por Mota et al. (2002) valida la metodología empleada y subraya la importancia del dominio III de la proteína de envoltura en estudios filogenéticos del virus del dengue. Estos hallazgos son fundamentales para mejorar la comprensión de la evolución y dispersión del virus, contribuyendo al desarrollo de estrategias más efectivas de vigilancia epidemiológica y control de la enfermedad.

En los últimos años, investigaciones adicionales han profundizado en el papel del dominio III de la proteína E en la interacción del virus dengue con proteínas del plasma humano. Por ejemplo, un estudio realizado por Huerta et al. identificó interacciones novedosas entre el dominio III del serotipo 2 del virus dengue y proteínas plasmáticas humanas, lo que podría influir en la patogénesis y severidad de la enfermedad. Estos descubrimientos resaltan la importancia continua del dominio III de la proteína de envoltura en la biología del virus dengue, tanto en términos de su variabilidad genética como de su papel en la interacción con el huésped humano. La comprensión detallada de estas interacciones es crucial para el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento más efectivas contra el dengue.

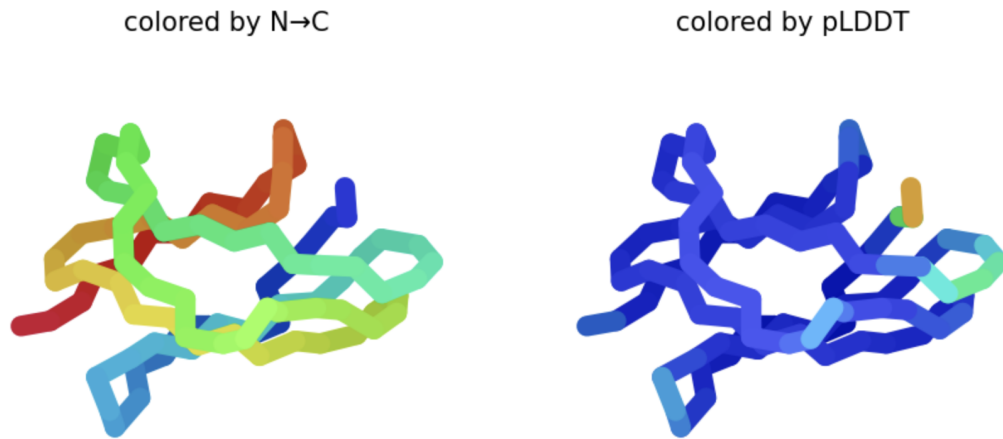


Figura 15: Estructura tridimensional predicha por AlphaFold2 para la varainte del virus Dengue-4 encontrada en China en el año 2020.

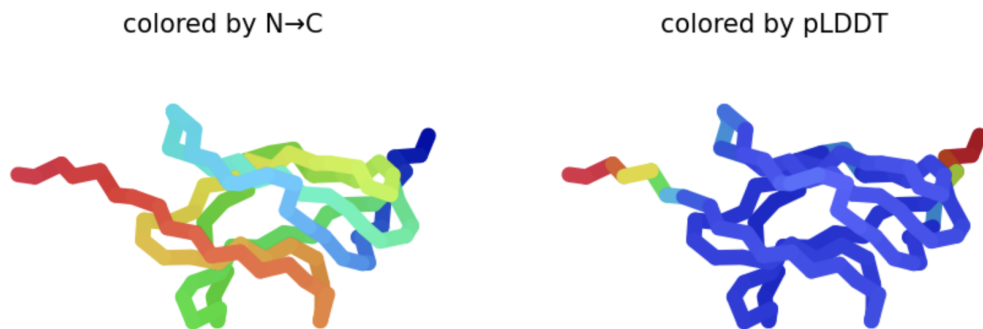


Figura 16: Estructura tridimensional predicha por AlphaFold2 para la varainte del virus Dengue-4 encontrada en Guerrero en el año 1987.

6. Bibliografía

Referencias

- DeepAmino. (2025). Repositorio de Github. <https://github.com/deepamino/dengue>.
- Deepmind. (2022). AlphaFold2 Notebook. *Google Colab*.
- Mota, J., Ramos-Castañeda, J., Rico-Hesse, R., & Ramos, C. (2002). Análisis filogenético del dominio III de la proteína de envoltura del virus dengue 4. *Salud Pública Mex*, 44(3), 228-236.