

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DE LOS CUATRO TIPOS DEL  
VIRUS DEL DENGUE EN AMÉRICA.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN:

**CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA:

**PAULINA LIZETH MÉNDEZ PÉREZ**

DIRECTORA DE TESIS

**Dra. Claudia Selene Zárate Guerra**

CODIRECTORA

**Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy**

**POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS**

Ciudad de México, abril de 2025.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Jesús Miguel Torres Flores  
Secretario: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra  
Vocal: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

### **DIRECTOR**

---

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra  
UACM del Valle

### **CODIRECTOR**

---

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy  
UACM del Valle

# Índice

<b>1. Índice General</b> .....	0
<b>1.1 Índice de Figuras</b> .....	4
<b>1.2 Índice de tablas</b> .....	6
<b>1.3 Abreviaturas</b> .....	7
<b>2. Agradecimientos</b> .....	10
<b>3. Resumen</b> .....	12
<b>4. Introducción</b> .....	13
4.1 Fiebre por Dengue .....	13
4.2 Transmisión .....	15
4.3 Epidemiología .....	18
4.4 Clasificación de DENV .....	20
4.5 Proteínas estructurales y No-estructurales.....	21
4.6 Ciclo Replicativo del DENV .....	23
<b>5. Antecedentes Particulares</b> .....	25
5.1 Efecto fundador y cuello de Botella .....	25
<b>5.2 Tipos de Selección</b> .....	27
5.2.1 Selección Positiva-Diversificadora .....	28
5.2.2 Selección Negativa-Purificadora .....	29
<b>5.3 Evolución del DENV</b> .....	29
5.3.1 Diversidad del DENV en América.....	31
5.3.2 Diversidad del DENV en México .....	31
<b>5.4 Vacunas contra el Dengue</b> .....	32
<b>6. Justificación</b> .....	34
<b>7. Hipótesis</b> .....	34
<b>8. Objetivos</b> .....	35
8.1 Objetivo General: .....	35
8.2 Objetivos Específicos:.....	35
<b>9. Estrategia Experimental</b> .....	36
<b>10. Metodología</b> .....	37
10.1 Obtención de Secuencias .....	37
10.2 Alineamiento de Secuencias .....	37

<b>10.3</b>	Análisis Filogeográfico .....	38
<b>10.4</b>	Reconstrucción de Estados Ancestrales .....	38
<b>10.5</b>	Red de Haplotipos .....	38
<b>10.6</b>	Análisis de Selección Natural.....	39
<b>11. Resultados</b>	.....	40
<b>11.1</b>	Reconstrucción Filogeografía.....	42
<b>11.2</b>	Reconstrucción de estados ancestrales ( <i>PastML</i> ).....	47
<b>11.3</b>	Red de haplotipos .....	51
<b>11.4</b>	Análisis de Selección Natural (FEL).....	58
<b>12. Discusión</b>	.....	63
<b>13. Conclusiones y Perspectivas</b>	.....	68
<b>14. Bibliografía</b>	.....	69
<b>15. Anexos</b>	.....	74

## Índice de Figuras

**Figura 1. Clasificación de la gravedad del dengue por la OPS/OMS.**

**Figura 2. Mapa mundial de las frecuencias de riesgo de infección por Dengue.**

**Figura 3. Ciclos de transmisión de los arbovirus.**

**Figura 4. Etapas de la infección por arbovirus en el mosquito.**

**Figura 5. Casos de Dengue en América.**

**Figura 6. A) Virión del dengue envuelto y esférico con diferentes proteínas estructurales y B) Estructura criomicroscópica del virus del dengue (DENV-4).**

**Figura 7. Estructura y distribución de la poliproteína del DENV.**

**Figura 8. Ciclo de vida de los *Flavivirus*.**

**Figura 9. Impactos de los efectos fundadores y los cuellos de botella poblacionales en la evolución de los virus transmitidos por artrópodos y amplificados por humanos.**

**Figura 10. Tipos y Genotipos del virus Dengue.**

**Figura 11. Diseño molecular de las vacunas anti-virus del Dengue en desarrollo clínico avanzado.**

**Figura 12. Estrategia Experimental.**

**Figura 13. Alineamiento de secuencias de genoma completo de DENV-3, base de datos completa y visualizada mediante Aliview.**

**Figura 14. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo V de DENV-1 usando el genoma completo.**

**Figura 15. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo III del DENV-2 usando el genoma completo.**

**Figura 16. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo III del DENV-3 usando el genoma completo.**

**Figura 17. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo II del DENV-4 usando el genoma completo.**

**Figura 18. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-1.**

**Figura 19. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-2.**

**Figura 20. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-3.**

**Figura 21. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-4.**

**Figura 22. Red de Haplotipos generada en PopArt mediante el método de Minimum Spanning Network para DENV-1.**

**Figura 23. Red de Haplotipos generada en PopArt mediante el método de Minimum Spanning Network para DENV-2.**

**Figura 24. Red de Haplotipos generada en PopArt mediante el método de Minimum Spanning Network para DENV-3.**

**Figura 25. Red de Haplotipos generada en PopArt mediante el método de Minimum Spanning Network para DENV-4.**

## Índice de tablas

**Tabla 1. Funciones de las proteínas virales del DENV.**

**Tabla 2. Secuencias para base de datos DENV.**

**Tabla 3. Secuencias para FEL.**

**Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural en FEL para DENV-1.**

**Tabla 5. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural en FEL para DENV-2.**

**Tabla 6. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural en FEL para DENV-3.**

**Tabla 7. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural en FEL para DENV-4.**

## Abreviaturas

**Ae:** *Aedes*

**Asn:** Asparagina

**Arg:** Arginina

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention (Centro de control y prevención de enfermedades)

**CDS:** Coding Sequence (Secuencia Codificante)

**CHIKV:** Virus chikungunya

**DENV:** Virus del dengue

**DGE:** Dirección General de Epidemiología

**dN:** Sustituciones no sinónimas

**dS:** Sustituciones sinónimas

**FEL:** Fixed Effects Likelihood (Probabilidad de Efectos Fijos)

**kDa:** KiloDalton

**Lys:** Lisina

**MAFFT:** Multi Alignment using Fast Fourier Transform (Alineamiento múltiple utilizando la transformada rápida de Fourier)

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

**NS:** No estructural

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**ORF:** Open reading frame (Marco de lectura abierto)

**PastML:** Reconstrucción de eventos pasados mediante máxima verosimilitud

**RNA:** Ácido ribonucleico

**SNV:** Variantes de un solo nucleótido

**UTR:** Untranslated region (Región no traducida)

**VEEV:** Virus de la encefalitis equina venezolana

**WEEV: Virus de la encefalitis equina occidental**

**WNV: Virus del Nilo Occidental**

**YFV: Virus de la fiebre amarilla**

**ZIKV: Virus del zika**

A **mi vida**, por permitirme llegar hasta este momento y aunque hubo tropiezos me dio la fortaleza para seguir adelante, vamos por mucho más.

A mis abuelos **Cata** y **Fito**, mi madre **Maribel** y tía **Sol** por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes incluyendo esta tesis y me motivan constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mis hermanos **Emmanuel** y **Anya** porque ustedes me motivan a seguir avanzando, su amor es incondicional.

Los amo, gracias.

## Agradecimientos

A la **UACM** por ser mi casa de estudios durante estos años, brindarme excelentes profesores que fueron incrementando mi amor e interés por esta área.

A mi directora la **Dra. Selene Zárate** por su enseñanza y conocimientos transmitidos, siempre ha sabido motivarme a lo largo de mi licenciatura, gracias por irme atrapando cada vez más en la bioinformática.

A mi codirectora la **Dra. Martha Yocupicio** por su enseñanza y motivación y confianza, el permitirme desarrollarme en lab.3 fue parte de mi crecimiento.

A las **Dras. Jacqui y Olguita** que estuvieron para brindarme conocimiento y siempre me apoyaron en el laboratorio, aparte de brindarme su amistad.

A mis **compañeros** y **amigos** de la licenciatura, gracias por vivir conmigo esta etapa, espero que todos vivamos el futuro que nos propongamos.

A **Caty, Danna** y **Vivi** que me motivaron a avanzar y me brindaron asistencia durante todos los procesos de mi licenciatura.

A mis compañeros **Yessica, Daniel** y especialmente a mi mejor amigo **Jesús** con los que compartí y conviví a lo largo de toda mi licenciatura, y a pesar de que nuestros caminos se han ido alejando siempre nos recordare con las "bacterias den acción", ustedes son parte de que yo haya llegado hasta aquí.

A mis amigas **Brenda, Cecilia** y **Danna** con las que compartí magníficos momentos a lo largo de toda la carrera y que a pesar de ir en diferentes semestres siempre estuvieron para motivarme y compartirme su conocimiento y su amistad.

A mis grandes amigos **Kevin** y **Óscar** a quienes conocí en la última parte de este proceso, gracias por su apoyo incondicional y compartirme sus conocimientos, son unos excelentes investigadores y espero la vida me permita seguir trabajando con ustedes.

A mi mejor amiga **Karina** y su bello bebé, tu sabes como nos entendemos, gracias por llegar a mi vida y ser mi compañera en este proceso, tu amistad me ha llenado en muchos aspectos, siempre estaré para ustedes como tú lo has estado para mí.

A mi **familia** por apoyarme en todo momento durante este largo camino de mi vida y por siempre apoyar mis anhelos, les debo muchos y todo será bien remunerado.

A mi **tía Sol** y **Sandy**, mis primas **Eli**, **Sofi** y **Amis** y mi sobrina **Vale** que a pesar de estar experimentando diferentes etapas y ser de otras áreas de estudio siempre han sabido apoyarme y compartirme sus conocimientos, me hacen sentir orgullosa de ustedes y agradezco tenerlas en mi vida y poder compartir con ustedes este proceso, son mujeres que valen mucho.

A mi **Erik**, hace tan poco tiempo llegaste a mi vida y para mi parece que ya es bastante, desde el momento uno me brindaste tu apoyo, conocimiento y pasión por tu área, pero sobre todo amor, espero la vida me permita seguir compartido contigo mucho más, te quiero.

A mis **perrhijos** que son tantos, pero los amo por igual, unos llegaron cuando estaba iniciando esta etapa y estuvieron conmigo en mis desvelos y otros llegaron en este proceso final pero su amor es incondicional y el que hayan llegado a mi vida es oro, los amo sigan conmigo mucho más.

## Resumen

El DENV es un virus del género *Orthoflavivirus* transmitido por un artrópodo hembra del género *Aedes*. Se clasifica en cuatro tipos antigénicamente distintos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 los cuales a su vez se dividen en genotipos con una divergencia en su secuencia de nucleótidos menor al 6% y generalmente muestran distribución geográfica distinta. DENV es un virus reemergente que se presenta de forma asintomática y sintomática con manifestaciones clínicas que incluyen fiebre acompañada de dolor intenso de cabeza, dolor detrás de los ojos, dolor en músculos y articulaciones, así como manifestaciones cutáneas. La enfermedad puede progresar a formas graves, caracterizada principalmente por choque que se caracteriza por Aumento de la permeabilidad vascular, Disfunción miocárdica, Deshidratación, Falla multiorgánica, dificultad respiratoria y/o daño grave de órganos y muerte. En el presente estudio se reconstruyó un árbol filogenético escalado por fecha de colecta y una red de haplotipos para inferir las relaciones evolutivas y de dispersión de secuencias de DENV, se determinaron los patrones de dispersión y se identificaron a nivel de genoma completo los codones que evolucionaron bajo selección natural para los cuatro tipos del virus. Los resultados mostraron que las cepas DENV-1 y DENV-2 del virus DENV son los que presentan mayor diversidad genética y una mayor cantidad de sitios bajo selección natural positiva, lo que podría indicar que tuvieron más eventos de introducción al país, sin embargo, también se observan señales de selección natural negativa. La actual reemergencia de DENV-3 se ve reflejada en los resultados de nodos ancestrales, donde se observan muestras provenientes del continente asiático formando un nodo ancestral del que se origina, y a muestras de la región sur del continente americano como un nodo ancestral cercano. En cuanto al tipo DENV-4 se observa que presenta una diversidad genética y geográfica menor ya que se asocia mayormente a su ciclo selvático. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la vigilancia epidemiológica, comprensión de los mecanismos de evolución del virus que puede seguir contribuyendo en el desarrollo de vacunas y trabajar en mejores estrategias de control del DENV en México.

## Introducción

Los arbovirus son virus transmitidos por un vector artrópodo hematófago infectado, lo que provoca brotes de estas enfermedades principalmente en las regiones tropicales del mundo (Wallau, 2023). Entre los arbovirus más importantes actualmente se encuentran los virus de la familia *Flaviviridae* y pertenecientes al género *Orthoflavivirus*, los cuales son virus de ARN monocatenario de sentido positivo. A esta familia pertenecen algunos de los patógenos humanos más importantes, como los virus del dengue (DENV1-4), la fiebre amarilla (YFV), Nilo Occidental (WNV) y el virus Zika (ZIKV) (van Leur et al., 2021).

Aunque los ciclos de transmisión de estas enfermedades ocurren principalmente en ambientes selváticos, la amplia distribución geográfica de los vectores artrópodos facilita su contacto con las poblaciones humanas lo que contribuye a la amenaza global de las infecciones por *Orthoflavivirus* (van Leur et al., 2021).

El DENV es un *Orthoflavivirus* conocido por ser el causante de una enfermedad febril que lleva el nombre de fiebre por dengue, la palabra "dengue" proviene de la frase en suajili ka-dinga pepo, que describe esa enfermedad como "ataque repentino (calambre o estremecimiento) provocado por un "espíritu malo". Uno de los primeros reportes de esta enfermedad data de enciclopedias chinas (265-420 D.C) en donde se conocía como "agua venenosa", ya que se pensaba que la enfermedad se relacionaba con insectos voladores asociados al agua (iO, 2023). Coloquialmente se le ha llamado "fiebre quebrantahuesos", término acuñado por Benjamin Rush ya que una de sus principales sintomatologías es el fuerte dolor articular y muscular.

### Fiebre por Dengue

La infección por alguno de los cuatro tipos del virus del dengue (DENV1-4) puede ser asintomática o sintomática, y sus manifestaciones clínicas incluyen fiebre, que se puede presentar junto a un fuerte malestar en la cabeza, molestias detrás de los ojos, dolores musculares y articulares, así como enrojecimiento cutáneo. La afección puede evolucionar hacia etapas más severas, las cuales se identifican principalmente por

colapso circulatorio, problemas respiratorios y/o daño significativo a órganos (OPS, 2018). Las formas en que se puede presentar la enfermedad son las siguientes: dengue sin signos de alarma, con signos de alarma y dengue grave. Las diferencias entre estos cuadros clínicos se muestran en la Figura 1.

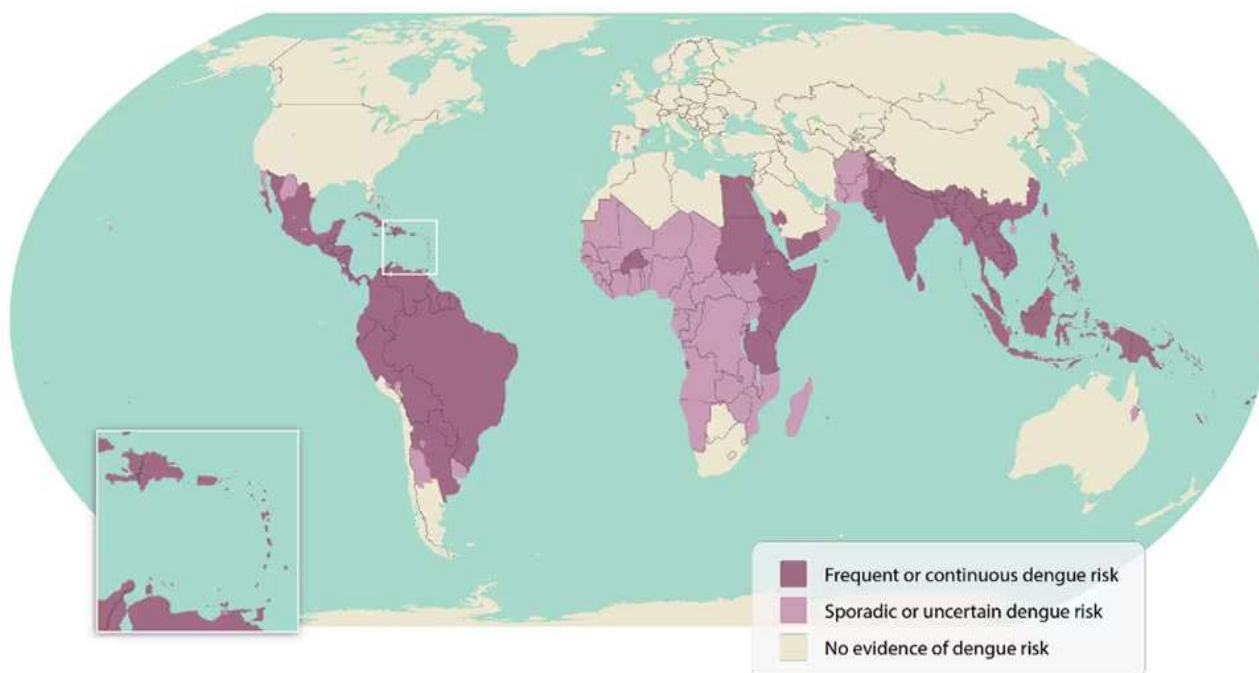
Dengue sin signos de alarma - DSSA	Dengue con signos de alarma - DCSA	Dengue grave - DG
<p>Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Náuseas / vómitos</li> <li>2. Exantema</li> <li>3. Cefalea / dolor retroorbitario</li> <li>4. Mialgia / artralgia</li> <li>5. Petequias o prueba del torniquete (+)</li> <li>6. Leucopenia</li> </ol> <p>También puede considerarse caso todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente.</p>	<p>Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen</li> <li>2. Vómitos persistentes</li> <li>3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico)</li> <li>4. Sangrado de mucosas</li> <li>5. Letargo / irritabilidad</li> <li>6. Hipotensión postural (lipotimia)</li> <li>7. Hepatomegalia &gt;2 cm</li> <li>8. Aumento progresivo del hematocrito</li> </ol>	<p>Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar &gt;2 segundos, presión de pulso <math>\leq 20</math> mmHg; hipotensión en fase tardía.</li> <li>2. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central (SNC))</li> <li>3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT <math>\geq 1000</math> UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos.</li> </ol>
<p>Requieren observación estricta e intervención médica inmediata.</p>		

**Figura 1. Clasificación de la gravedad del dengue por la OPS/OMS.** Imagen tomada de OPS,2018.

Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/diagrama-clasificacion-modificada-gravedad-dengue-jpg>

En la actualidad no existe un tratamiento específico para la infección por dengue, de tal manera que el monitoreo médico es muy útil durante la etapa de infección para controlar la sintomatología y ayudar con la recuperación del paciente.

La infección con un tipo de dengue no produce inmunidad de por vida contra la reinfección por parte de los otros tipos de este virus, pero proporciona inmunidad temporal y parcial contra éstos. La mayoría de las reinfecciones subsecuentes se reportan en regiones hiperendémicas como Asia Sudoriental, el Pacífico Occidental y América Centro y Sur, donde circulan los cuatro tipos del virus, estas zonas se caracterizan por tener temporadas de lluvias y ambientes cálidos que le permiten al vector reproducirse ampliamente (Fig.2) (CDC, 2024).

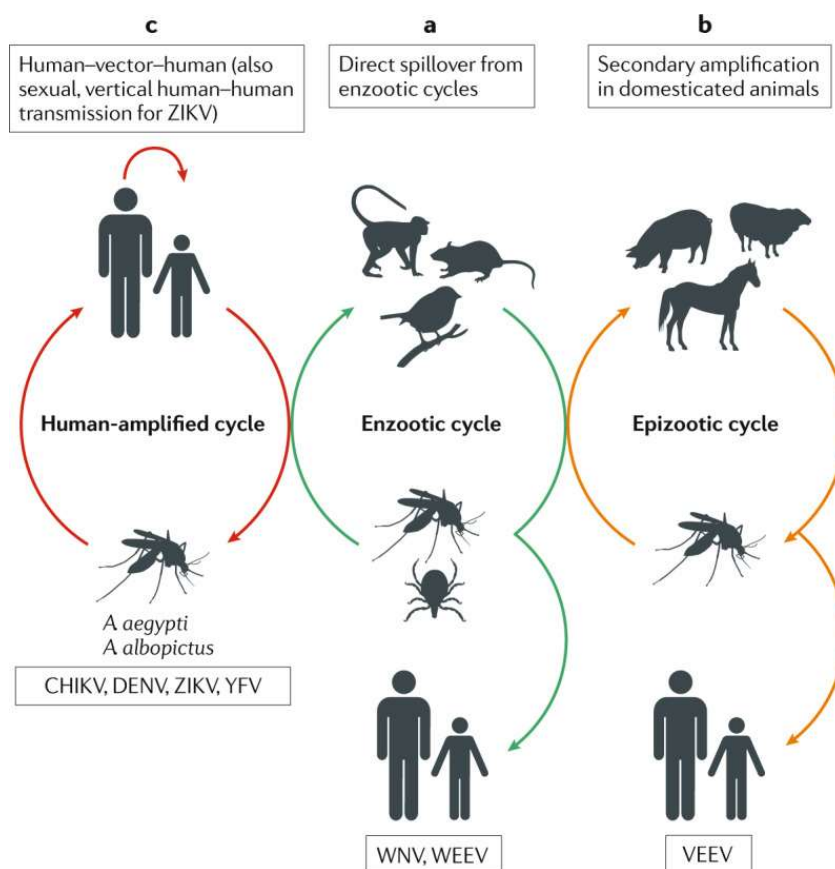


**Figura 2. Mapa mundial de las frecuencias de riesgo de infección por Dengue.** Imagen tomada de CDC,2024. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/es/areas-with-risk/areas-con-riesgo-de-dengue.html>

## Transmisión

Los arbovirus se caracterizan por circular en dos ciclos; el ciclo selvático, en el cual el virus es transmitido entre primates no humanos, mosquitos selváticos, aves, roedores y otros mamíferos no primates, este ciclo de transmisión es el origen a partir del cual se establece el ciclo de transmisión urbano en el que participan los humanos y los mosquitos

que habitan en regiones rurales o urbanas. En condiciones apropiadas, puede ocurrir una transición del ciclo enzoótico (permanece presente la enfermedad en una población animal de forma constante) o epizoótico, en los que pueden ocurrir transmisiones esporádicas a los humanos, al establecimiento de un ciclo humano-mosquito-humano que se ha observado en virus como el DENV, CHIKV y ZIKV, la relación entre estos ciclos de transmisión se muestra en la Figura 3 (Weaver et al., 2021).



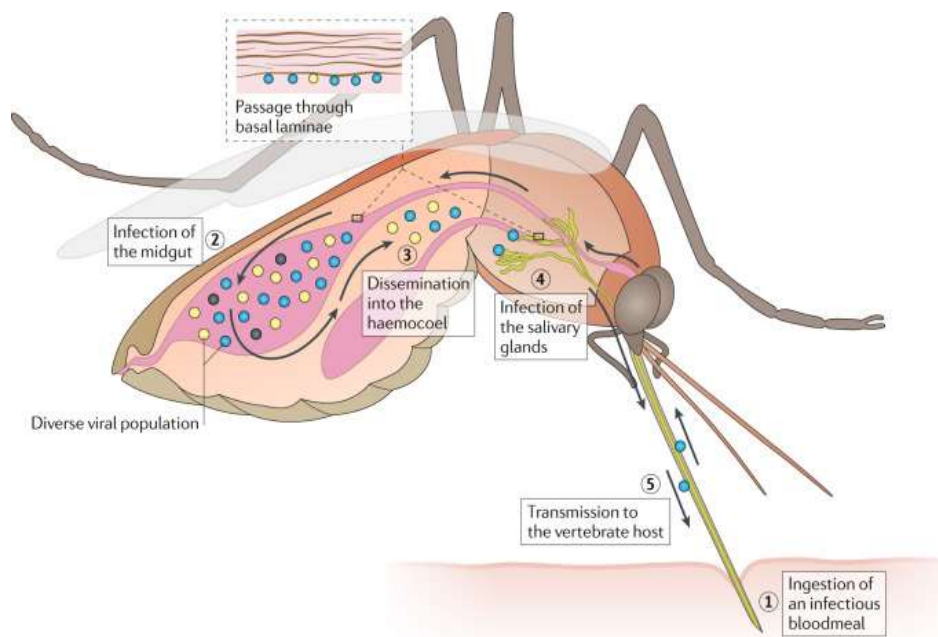
**Figura 3. Ciclos de transmisión de los arbovirus.** Imagen tomada de Weaver et al., 2021.

El ciclo de transmisión selvática para el DENV tiene lugar en los entornos selváticos del sudeste asiático y África occidental donde los principales vectores son *Aedes (Ae.) luteocephalus*, *Ae. furcifer* y *Ae. taylori*, mientras que en el ciclo de transmisión urbano los vectores más comunes son *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.

El virus DENV se transmite al humano por la picadura de un mosquito hembra infectado. La transmisión transovárica que ocurre verticalmente de los mosquitos a su descendencia es esencial para mantener los ciclos de transmisión humana y selvática durante las

estaciones secas o los períodos interepidémicos. Por consiguiente, eliminar el DENV representa un reto por la complejidad en su forma de propagación. Se han mencionado métodos de transmisión que no dependen de vectores, tales como la transfusión sanguínea, el trasplante de médula y la propagación durante el parto y en el periodo perinatal; no existen pruebas que indiquen que el DENV se transmite por el semen, a diferencia del ZIKV (Harapan et al., 2020).

El proceso de infección de los arbovirus en los mosquitos se puede dividir en tres partes: adquisición, diseminación y transmisión, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4. Etapas de la infección por arbovirus en el mosquito.** Imagen tomada de S. C. Weaver et al., 2021.

La infección de las células epiteliales del intestino medio del mosquito ocurre tras la ingestión de sangre infectada de un vertebrado virémico, después de la infección y replicación en las células del intestino medio, el arbovirus se disemina al hemocele, accediendo a diversos órganos y tejidos diana secundarios, como el cuerpo graso, las neuronas y los músculos, que favorecen la replicación y pueden potenciar la infección de las glándulas salivales. Después de la replicación en las células acinares de las glándulas salivales y la diseminación hacia las cavidades apicales, la transmisión puede ocurrir posteriormente durante una ingestión de sangre cuando se inyecta saliva durante el sondeo y la alimentación del mosquito en los vasos sanguíneos. Estas diseminaciones son vistas como cuellos de botella que sufre el virus durante su replicación y van a

depender del título de la infección inicial y de la diversidad genética de la población del virus (Weaver et al., 2021).

## Epidemiología

En la literatura, uno de los registros más antiguos del dengue proviene de una enciclopedia médica china que data del año 992 a. C en la cual mencionan una enfermedad con sintomatología parecida a la de dengue. En 1789, Benjamin Rush presentó el primer informe de caso y acuñó el término "fiebre rompehuesos" para los síntomas de dolor de huesos y músculos; además, existe la hipótesis de que entre los siglos XIX y XX, el virus probablemente se propagó por los trópicos y subtrópicos (Salles et al., 2018).

En Asia, se tienen reportes de que los cuatro tipos de dengue circulaban de manera endémica desde la década de los 60's, siendo las regiones de India, Sri Lanka, Pakistán, Tailandia, Malasia, Taiwán, Vietnam, China e Indonesia las más afectadas. En Sri Lanka se notificó en 1989 el primer brote importante de dengue asociado con el tipo 3 y actualmente sigue siendo el tipo predominante en esa región. En China y Tailandia el tipo 2 es el más predominante, mientras que los tipos 1 y 3 cocirculan intermitentemente.

En la región de América, la introducción del virus de dengue se estima fue aproximadamente de 1600 a 1946 (Brathwaite Dick et al., 2012), siendo el brote epidémico de dengue hemorrágico en 1981 en Cuba, y el ocurrido entre 1989 y 1990 en Venezuela los que detonaron la permanencia del virus en esta área geográfica.

Salles y colaboradores mencionan en su investigación que durante el periodo 2011-2017, se observó un nuevo brote causado por el gran movimiento de personas provocado por cuatro eventos deportivos mundiales suscitados en ese periodo, los Juegos Panamericanos de 2011 en Guadalajara (México), la Copa Confederaciones de 2013, el Mundial de Fútbol de 2014 y los Juegos Olímpicos de 2016, todos ellos en Brasil.

El 2019 fue un año crucial ya que se registró el mayor número de infecciones por dengue en todo el mundo, más de 3,1 millones de casos en América y, por primera vez, también se registraron casos de dengue en Afganistán. Sin embargo, el impacto de estas

infecciones en el año siguiente, 2020, no ha sido bien documentado debido a la pandemia de COVID-19 (N Sirisena et al., 2021).

En 2022 también hubo un repunte en el número de casos de dengue tipo 2, notificándose 2,811,433 personas infectadas. A finales del año 2023 y principios del 2024 se dio la reaparición del DENV-3, el cual no había circulado en la última década, junto con el aumento de la población vulnerable (Niños menores de 7 años, embarazadas y adultos mayores con alguna enfermedad crónica degenerativa) surgió un aumento en los casos notificándose 13,034,758, de los cuales solamente 22,724 fueron clasificados como graves, lo que representa el 0.17% del total. 8,244 de estos casos derivaron en la muerte estableciendo una tasa de letalidad del 0.063%. En lo que va del año 2025, 23 países y territorios de la región de América reportaron un total de 238,659 casos, la mayoría concentrados en Brasil (87%), Colombia (5,6%), Nicaragua (2,5%), Perú (2,5%) y México (2,5%). De estos casos, 263 fueron graves y se registraron 23 muertes (Naciones Unidas,2025).



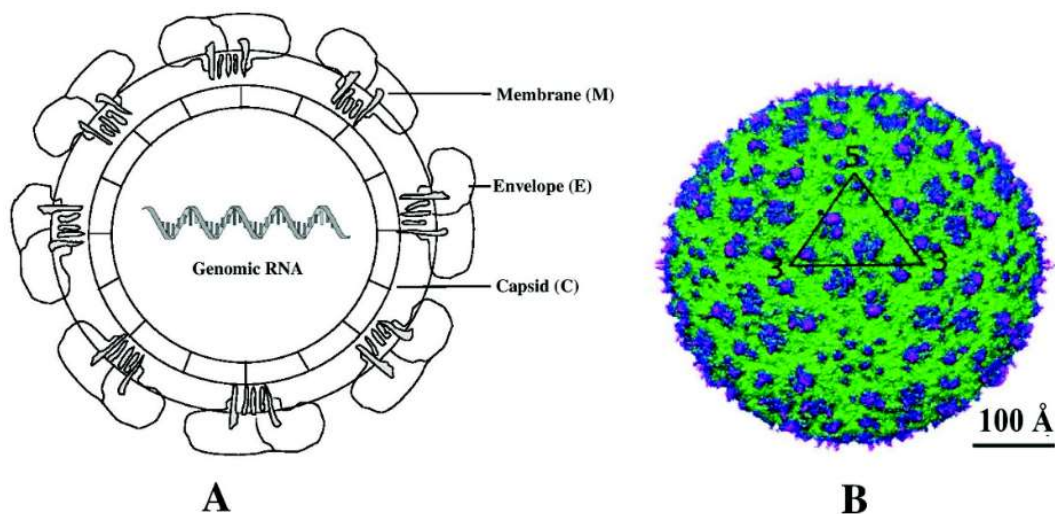
**Figura 5. Casos de Dengue en América. Adaptado de la Organización Panamericana de la Salud. PLISA Plataforma de Información de Salud para las Américas, Portal de Indicadores de dengue.** Washington, D.C.: OPS; 2024. Citada el 12 de febrero de 2025. Disponible en: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue.html>

## Clasificación de DENV

El virus del Dengue se clasifica en cuatro serotipos antigénicamente distintos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 los cuales a su vez se dividen en genotipos con una divergencia en su secuencia de nucleótidos menor al 6% y generalmente muestran distribución geográfica distinta (Abeygoonawardena et al., 2024). Se piensa que cada uno de los cuatro serotipos de DENV se originó a partir de su propio ciclo selvático y por lo tanto se originaron a partir de eventos zoonóticos independientes (Yu & Cheng, 2022).

## Estructura del DENV

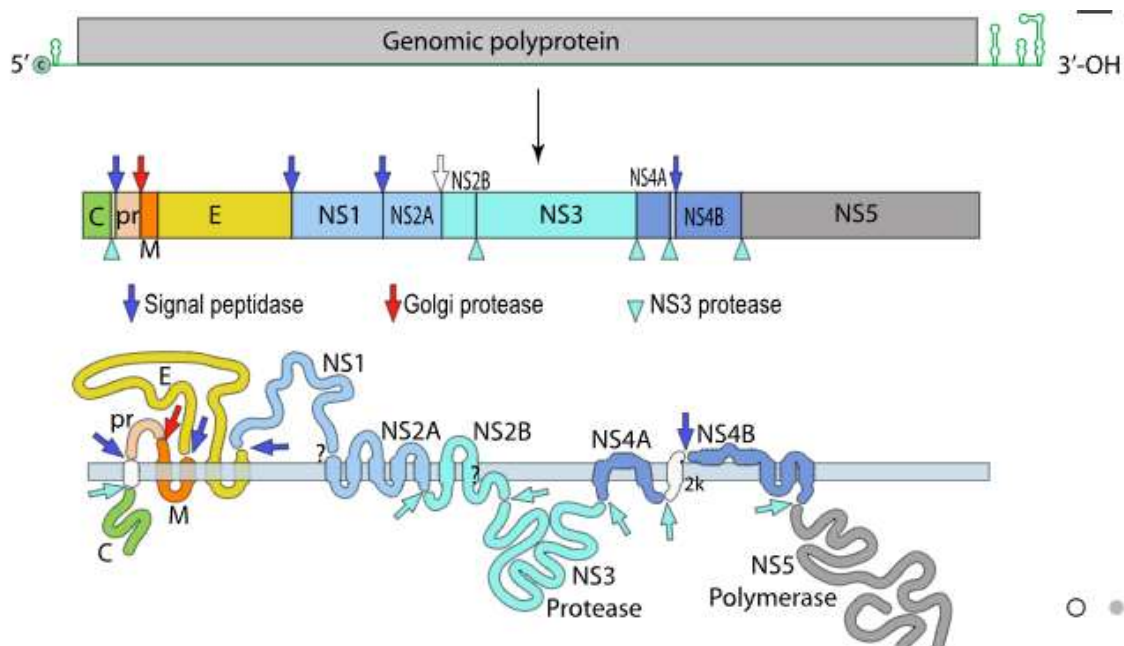
Los viriones del dengue son esféricos y se caracterizan por una superficie relativamente lisa, con un diámetro de aproximadamente 50 nm, una capa externa de proteína bien organizada en la superficie de una bicapa lipídica y un núcleo interno de nucleocápside (Kuhn et al., 2002). Estos virus tienen un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva de 10.7kb, el cual consta de un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína. El virión se caracteriza por estar conformado por una membrana lipídica (obtenida de las células del huésped), sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura. El interior del virus contiene el complejo riboproteico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral (Velandia & Castellanos, 2011).



**Figura 6. A) Virión del dengue envuelto y esférico con diferentes proteínas estructurales y B) Estructura criomicroscópica del DENV-4.** Imagen tomada de Roy & Bhattacharjee, 2021.

## Proteínas estructurales y No-estructurales

La traducción del genoma viral produce una poliproteína que es procesada y da lugar a diez proteínas (Fig. 7). Tres de estas corresponden a proteínas estructurales, llamadas cápside (C), premembrana o membrana (prM/M) y envoltura (E), que permiten la unión, entrada, ensamblaje y secreción del virus. Las otras siete son proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) las cuales son responsables de la replicación del RNA viral, así como de otros eventos relacionados con la infección viral (Mo et al., 2018).



**Figura 7. Estructura y distribución de la poliproteína del DENV.** Imagen obtenida de <https://viralzone.expasy.org/24>.

Las funciones y características de cada una de las proteínas del DENV se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Funciones de las proteínas virales del DENV (Harapan et al., 2020) y (Velandia & Castellanos, 2011)**

Proteína de la Cápside (C)	Proteína homodímera de 100 residuos de aa, que contiene cuatro regiones $\alpha$ -helicoidales y un dominio N-terminal intrínsecamente desordenado. Su función principal es estar involucrado en la encapsidación del genoma.
Proteína prM/M	La proteína prM consta de 166 residuos aa, mientras que la proteína M consta de 75 residuos aa. Funciona como una estructura similar a una tapa que protege al péptido de fusión E de sufrir una fusión prematura antes de la liberación del virus.
Proteína de Envoltura (E)	Proteína de fusión de membrana dimérica N-glicosilada de clase II con 493–495 residuos aa (53 kDa). En el DENV maduro, la E se encuentra en forma de 90 homodímeros que se apoyan sobre la superficie del DENV formando una capa proteica "lisa". Cada una de las subunidades monoméricas está compuesta por tres dominios distintos (I, II y III). Su función es mediar la unión y fusión del virus a la membrana de la célula huésped (dominio III) y es responsable de la determinación del rango de huésped, el tropismo y la virulencia (dominio III).
NS1	Proteína anclada en glicosilfosfatidilinositol (GPI) dimérica de 46 kDa, 354 aa que existe tanto en forma intra como extracelular. Se caracteriza por encontrarse en el citoplasma en forma de dímero y hexámero asociada a las membranas intracelulares o de forma soluble para participar en el proceso replicativos y puede estimular el sistema inmunitario inhibiendo la activación del complemento.
NS2A	Proteína de 218 residuos de aa, 22 kDa. Se caracteriza por tener 5 dominios transmembrana y es importante porque participa en la coordinación del cambio entre el empaquetamiento y la replicación del ARN y el antagonismo del interferón (IFN).
NS2B	proteína con un residuo de 130 aa (14 kDa) y es una proteína asociada a la membrana. Su función es unirse a NS3 para formar el complejo de proteasa DENV y actúa como cofactor en la activación estructural de la serina proteasa DENV de NS3.

NS3	Proteína de 618 aa (70 kDa). El dominio de la proteasa se encuentra en el extremo N (residuos 1 a 180), mientras que el dominio de la helicasa se encuentra en los residuos 180 a 618. Proteína multifuncional con actividad enzimática de serina proteasa similar a la quimotripsina, helicasa de ARN y trifosfatasa de ARN (RTP/NTPasa). La NS3 participa en la escisión de la poliproteína DENV, así como en la replicación del ARN.
NS4A	Proteína hidrofóbica que consta de 150 aa (16 kDa). Induce alteraciones de la membrana que son importantes para la replicación del virus.
Péptido 2K	Consta de 23 aa. Fundamental para la regulación de NS4A en las membranas del RE
NS4B	Proteína hidrofóbica que consta de 245–249 aa (27 kDa). Ayuda a la replicación del ARN viral a través de su interacción directa con la NS3 y bloquea la transducción de señales inducida por IFN.
NS5	Proteína de 900 residuos de aa (104 kDa) y la proteína DENV más conservada. El dominio de la metiltransferasa se encuentra en los residuos 1 a 269, mientras que la ARN polimerasa dependiente de ARN se encuentra en los residuos 270 a 900. Actividad de Metiltransferasa y RNA polimerasa dependiente de RNA.

## Ciclo Replicativo del DENV

El ciclo replicativo del DENV comienza con la interacción del virión y sus receptores específicos. El virión ingresa a la célula mediante un proceso denominado “endocitosis dependiente de clatrina” y transportado a través de endosomas. Los cambios de pH dentro del endosoma provocan modificaciones en la estructura que facilitan la fusión de la envoltura lipídica del virión con la membrana del endosoma, permitiendo así la decapsidación de la nucleocápside y la liberación del material genético en el citoplasma. Este material genético se traduce en el retículo endoplasmático rugoso. La replicación del genoma y el ensamblaje se producen en vesículas dentro del retículo endoplasmático.

Los viriones aún no maduros son trasladados a través de la vía de secreción constitutiva, pasando por el aparato de Golgi hasta llegar al espacio extracelular, donde se lleva a cabo la maduración final de las partículas virales gracias a la furina. Los viriones completamente maduros son enviados mediante exosomas hacia el exterior de la célula junto a la proteína hexamérica NS1 (Viettri et al., 2022) o, alternativamente, en forma de autofagosomas, envolviendo una bicapa lipídica que proviene del huésped, formando cuasiespecies (van Leur et al., 2021). Un diagrama ilustrativo del ciclo de replicación se presenta en la figura 8.

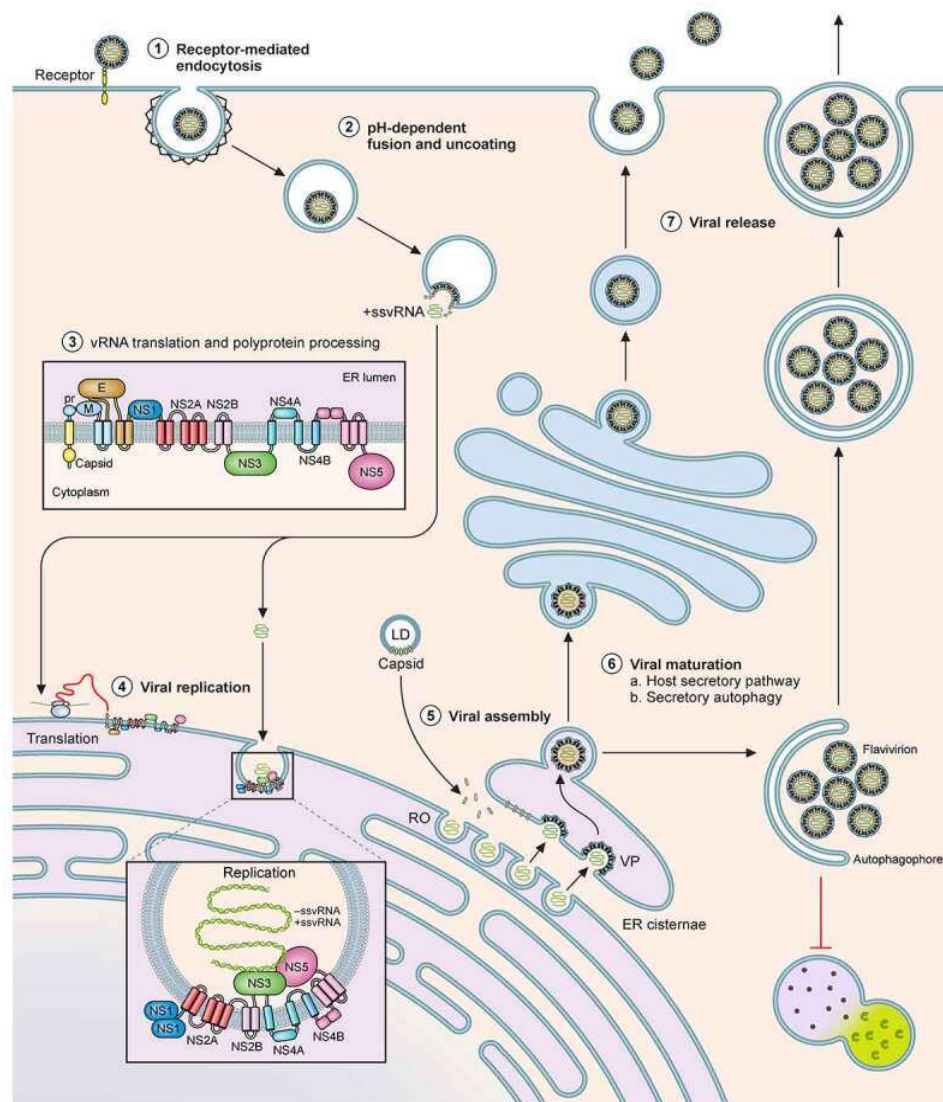


Figura 8. Ciclo de vida de los *Flavivirus*. Imagen tomada de Van Leur et al., 2021.

## Antecedentes Particulares

Debido a la baja precisión de las RNA polimerasas que son indispensables para los procesos de diversidad y variabilidad genética de los virus de RNA como el DENV, uno de los procesos clave en estos procesos evolutivos es la selección natural que permite seleccionar las mejores combinaciones genéticas en relación con el entorno donde se desarrolla el organismo, debe existir variabilidad genética que permita la generación de genotipos diferentes y que ningún organismo sea igual al otro. Igualmente, la deriva genética puede aleatoriamente cambiar la frecuencia de ciertas variantes

La alta tasa de error en la replicación del virus origina variantes de un solo nucleótido (SNV) en las secuencias virales, dando lugar a un aumento en la diversidad genómica intra-hospedero. La diversidad genómica de las poblaciones virales permite la acción de los mecanismos de selección positiva, negativa, efectos fundadores y de cuello de botella (Solís Vidal, 2022).

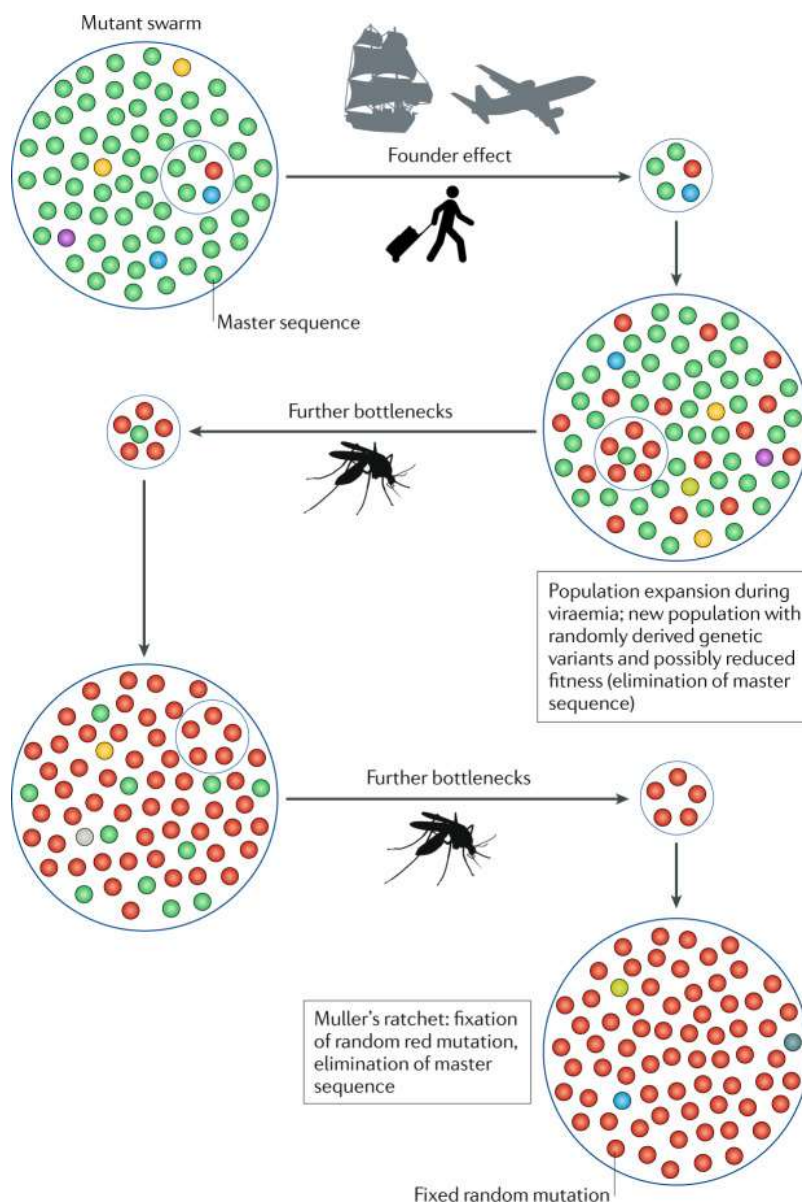
Algunos factores que aumentan la variabilidad genética, son:

- **Mutaciones:** errores azarosos en la secuencia del DNA que se producen al momento de la replicación de las células germinales o somáticas. Entre algunos tipos de mutaciones se encuentran las inserciones, deleciones, sustituciones, o mutaciones con cambio de sentido.
- **Recombinación genética:** evento mayoritariamente aleatorio de segmentación y reconformación de los cromosomas en la generación de células gaméticas durante la meiosis.
- **Flujo genético:** intercambio de genes entre poblaciones diferentes.
- **Migración:** intercambio de individuos en poblaciones naturales.

### Efecto fundador y cuello de Botella

Un desafío crítico para la supervivencia de los arbovirus está representado por las barreras anatómicas que se encuentran especialmente en el vector y participan en la diseminación viral las cuales resultan en cuellos de botella poblacionales repetidos, que

reducen fuertemente el número de partículas virales disponibles para mantener la infección y permitir la transmisión. Los efectos fundadores suelen ocurrir posterior a un cuello de botella poblacional, por ende, son una forma de deriva genética ya que el cambio en las frecuencias de genotipos no está moldeada por la selección natural sino por cambios aleatorios como por ejemplo las altas tasas de mutaciones que pueden dejar vulnerables a los arbovirus a la deriva genética (Weaver et al., 2021).



**Figura 9. Impactos de los efectos fundadores y los cuellos de botella poblacionales en la evolución de los virus transmitidos por artrópodos amplificadas por humanos.** Imagen tomada de S. C. Weaver et al., 2021.

## Tipos de Selección

Los tipos de selección natural a nivel genómico pueden inferirse utilizando valores dN/dS (sustituciones no sinónimas/sinónimas) de los datos de secuencia. Un valor dN/dS promedio de 1 indica que las mutaciones sinónimas son tan selectivamente neutrales como las mutaciones no sinónimas. Un valor dN/dS >1,0 es consistente con la selección positiva en la mayoría de las mutaciones. Un valor dN/dS <1,0 indica una selección purificadora en la mayoría de las mutaciones no sinónimas (Costa et al., 2012).

En el caso del DENV, los valores de dN/dS son de aproximadamente 0,06 a 0,07 y el patrón de selección natural es similar entre los virus del dengue selváticos y los endémicos urbanos, sugiriendo la ocurrencia de selección positiva a nivel de su genoma. Amir y colaboradores en el 2021 llevaron a cabo un estudio en el que compararon las filogenias basadas tanto en nucleótidos como en aminoácidos del genoma de DENV-3 y se percataron que las regiones de los genes *PrM/M*, *NS1*, *NS2B* y genes *NS3* presentaban una alta variabilidad, aunque algunos de los genes como *NS4A*, *NS4B* y *NS5* no mostraron una variación significativa.

En un análisis realizado en México, enfocado solamente a los tipos 1 y 2 de Dengue (Rodríguez-Aguilar et al., 2022), en el que se estudiaron los genomas reportados entre 2012-2013 y en que se centraron únicamente en las secuencias de los genes *E*, *NS2A* y *NS5* determinaron que en DENV-1 había 107 mutaciones, de las cuales el gen *E* presentó 28 mutaciones sinónimas, *NS2A* presentó 24 mutaciones sinónimas y 4 no sinónimas y en el gen *NS5* se detectaron 37 mutaciones sinónimas y 14 no sinónimas. De estas mutaciones, 18 dieron como resultado cambios de aminoácido: cuatro en *NS2A* (L91I, F93L, N118S, Q141H) y 14 en *NS5* (D554E, I555F, V577L, V603G, E615D, V616I, G626E, P630S, S631N, E640G, L643F, D644N, T678I, V686I). Las secuencias de DENV-2 mostraron 72 mutaciones que se distribuyeron de la siguiente manera, en la región del gen *E* hubo 15 mutaciones sinónimas y 7 no sinónimas, en *NS2A* se encontraron 20 mutaciones sinónimas y 4 no sinónimas y en *NS5* detectaron 19 mutaciones sinónimas y 7 no sinónimas. De estas mutaciones, 18 dieron como resultado cambios de aminoácido, siete en el gen *E* (T115A, V129I, A150V, K163R, S169P, T176I, E184K), cuatro en *NS2A* (V38A, T45S, T63A, I108T) y siete en *NS5* (Y516H, E520D, G522D, M551K, V552I, M556V, R595K).

Las mutaciones en las proteínas de los genes NS2A y NS5 se encontraban en muestras de todo el país permitiendo identificar huellas de selección, sin embargo, aún se desconoce la posible importancia biológica de muchas de estas mutaciones.

## Selección Positiva-Diversificadora

La selección positiva no parece ser un factor importante en la evolución del virus de dengue dado que las tasas de sustitución de nucleótidos son homogéneas entre los tipos, en caso de ocurrencia de selección positiva se esperaría que estas tasas se diferenciaron entre los diferentes tipos del virus. Una serie de estudios ejemplifican la idea de que la selección positiva era responsable de la aparición de un linaje epidémico de DENV en Puerto Rico. Así como la asociación de una mutación (A811V) en la proteína del gen *NS5* de DENV en el clado II de los genotipos asiático-americanos de DENV-2 de una epidemia en Perú, pero no estuvo acompañada por un aumento de la replicación “*in vitro*”. Estos son ejemplos de selección positiva ya que dichos sitios pueden estar involucrados en mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero o en sitios de interacción proteína-proteína (Yu & Cheng, 2022).

Igualmente, se ha identificado que la proteína del gen *NS1* se ha encontrado bajo selección positiva durante los procesos involucrados en mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero o en sitios de interacción proteína-proteína, como menciona (Farooq et al., 2023) en los resultados obtenidos *NS1* presenta 430 interacciones con las proteínas humanas como HBA1 y UBE2I, además se encontró asociación con 7 proteínas virales, y se encontró que 3 proteínas humanas (CSNK2A1, RRP12 y HSP90AB1) interactúan con 6 proteínas virales.

Por otro lado, Mo y colaboradores en el 2018 encontraron mutaciones en aminoácidos en regiones conservadas de la proteína E como E 383: K (Lys) → N (Asn) y E 391 R (Arg) → K (Lys), los cuales podrían estar relacionados con la gravedad de la enfermedad de DENV-3.

## Selección Negativa-Purificadora

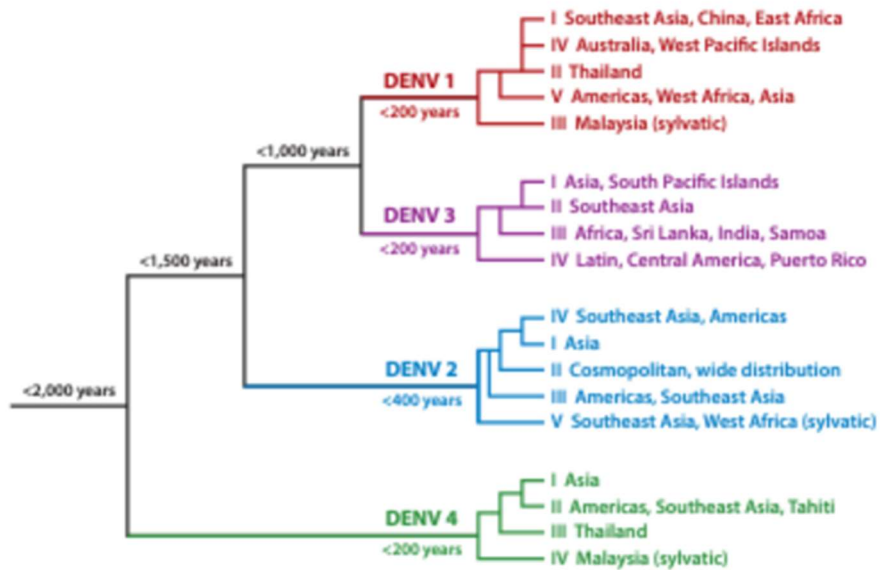
La selección purificadora garantiza que las mutaciones deletéreas no puedan apoderarse de una población y que cualquier estructura mejorada, una vez fijada en una población, se mantenga mientras sea necesaria., asegurando la viabilidad del virus y conservando funciones esenciales por ende la diversidad genética presente en DENV revela que la dinámica evolutiva a corto plazo se caracteriza por una rápida renovación de los genotipos y linajes que puede estar asociado a nuevos brotes y manifestaciones más graves de la infección por el virus.

El DENV está sujeto a una selección purificadora constante a medida que cambia entre vectores y huéspedes vertebrados de ahí el gran número de brotes (Yu & Cheng, 2022).

## Evolución del DENV

La evolución del DENV está impulsada por una fuerte presión de selección negativa, con un papel menor desempeñado por la presión de selección positiva. Varios estudios han estimado la tasa de sustitución de nucleótidos del gen *E* del DENV, y si bien esta tasa es variable entre los serotipos, los cuatro evolucionan a aproximadamente  $7,6 \times 10^{-4}$  sustituciones/sitio/año, más lento que otros virus de ARN (Stica et al., 2022). Como se mencionó anteriormente, el virus está igualmente clasificado en genotipos que tienen una divergencia no mayor al 6% dentro una región genómica y se con distribución geográfica diferenciada como se muestra en la figura 10.

La teoría principal sobre la aparición del DENV menciona que se originó en Asia por ciclos de replicación selvática involucrando uno de los vectores con mayor competencia como lo es *Ae. albopictus*. Según Tabachnick en 2016, el origen del DENV ocurrió hace aproximadamente 1000 años, la transferencia zoonótica a los humanos hace 125 a 320 años y la diversidad dentro de los cuatro tipos en el siglo pasado. La diversificación de los aislados de virus dentro de los tipos probablemente ocurrió en los últimos 100 a 300 años, dependiendo del tipo.



**Figura 10. Tipos y genotipos del virus Dengue.** Imagen tomada de Tabachnick, 2016.

Katzelnick y colaboradores en 2021 mencionaron que los análisis filogenéticos indican que los eventos de reemplazo de genotipo, definidos como la desaparición de un linaje viral previamente común en una ubicación dada y el aumento en la presencia de un linaje relacionado a este, pueden ser impulsados por la selección natural, aunque los cuellos de botella poblacionales son una explicación alternativa ya que al reducir fuertemente el número de partículas virales disponibles para mantener la infección y permitir la transmisión pueden dar paso a mutaciones ventajosas para el nuevo linaje.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes al recambio de genotipo/linaje de DENV siguen siendo poco comprendidos ya que se han centrado mayormente en el papel fundamental de la selección natural. Algunos estudios han sugerido que estas dinámicas son el resultado de eventos aleatorios, como la deriva génica. Por el contrario, otros estudios proponen que este recambio surge de diferencias en la aptitud viral, como una mayor viremia en humanos o una mayor transmisibilidad en mosquitos. El aumento del título viral (mayor cantidad de partículas virales) en el intestino medio del mosquito se asocia con una mayor eficiencia de diseminación, lo que sugiere una mayor tasa de transmisión viral y/o un período de incubación extrínseca más corto. A pesar del complejo patrón epidemiológico del dengue, el recambio de genotipos y linajes DENV se observa en todas las regiones afectadas independientemente de su estado epidémico, endémico o incluso hiperendémico (O'Connor et al., 2021).

## Diversidad del DENV en América

Los cuatro tipos de dengue circulan a lo largo de las Américas y en algunos casos cocirculan simultáneamente pero el tipo de virus predominante ha ido variando a lo largo del tiempo.

Hernández-García y colaboradores en una publicación del 2020 mencionan que los diferentes tipos del virus del dengue surgieron en América a partir del DENV-1 aproximadamente en 1977. En 1981, aparecieron el DENV-2 y el DENV-4, y en 1994, surgió un nuevo genotipo DENV-3. Estos avances dieron lugar a un cambio de la no endemidad o hipoendemidad a la hiperendemidad y, en última instancia, al brote más agudo de dengue, reportado entre 1981 y 1997 en 24 países americanos.

Brathwaite Dick y colaboradores en 2012 describieron una historia de brotes de DENV desde 1600 hasta 2010, también mencionan que entre 1947 a 1970 se generó un plan continental para la erradicación de *Ae. aegypti* con lo cual se logró la erradicación exitosa del mosquito en 18 países continentales, sin embargo, posteriormente se registró reinfestación por *Ae. aegypti* (1971-1999) así como un aumento en la dispersión de este mosquito y por ende, la circulación del DENV (2000-2010) caracterizada por un marcado aumento en el número de brotes.

## Diversidad del DENV en México

Rodríguez-Aguilar y colaboradores mencionan que uno de los registros más antiguos de DENV en México fue un brote de DENV-1, el cual apareció en 1978 en la costa oriental de México. DENV-2 se introdujo en 1981, seguido por DENV-4 en 1982 y DENV-3 en 1995. DENV-2 predominó del 2000-2005, posteriormente fue DENV-1 de 2006-2010, en los años siguientes hubo mayor cantidad de casos de DENV-2, pero en el final del 2023 se identificó un aumento en los casos de DENV-3.

Los estudios filogenéticos han permitido establecer que los genotipos I y III del DENV-3 son los causantes de la mayoría de las infecciones por este tipo viral, además se ha sugerido que pueden llegar a ser brotes de dengue hemorrágico (Amir et al., 2021).

Araújo y colaboradores basándose en secuencias del gen de la proteína E determinaron que los genotipos I, II y III han evolucionado de forma independiente en Indonesia, Tailandia y Sri Lanka, respectivamente, durante los últimos 30 a 40 años y éstos se volvieron ancestros de linajes de dengue que posteriormente se extendieron por todo el mundo. La expansión del genotipo III de DENV-3 probablemente proveniente de Sri Lanka a América parece haber llegado a México y este se volvió el lugar desde donde se diseminó este genotipo a otros países como Venezuela, Perú, Ecuador, Bolivia, Brasil y Paraguay. Los genotipos IV y V no se asociaron con epidemias de dengue hemorrágico y sólo están representados por unas pocas secuencias tempranas de América, el Pacífico Sur y Asia.

Hay muy pocos estudios enfocados en DENV-4 ya que es un tipo con prevalencia baja en todo el mundo y se propaga con menor rapidez, aunque se menciona que puede ser que su prevalencia sea todavía mayormente en el ciclo selvático.

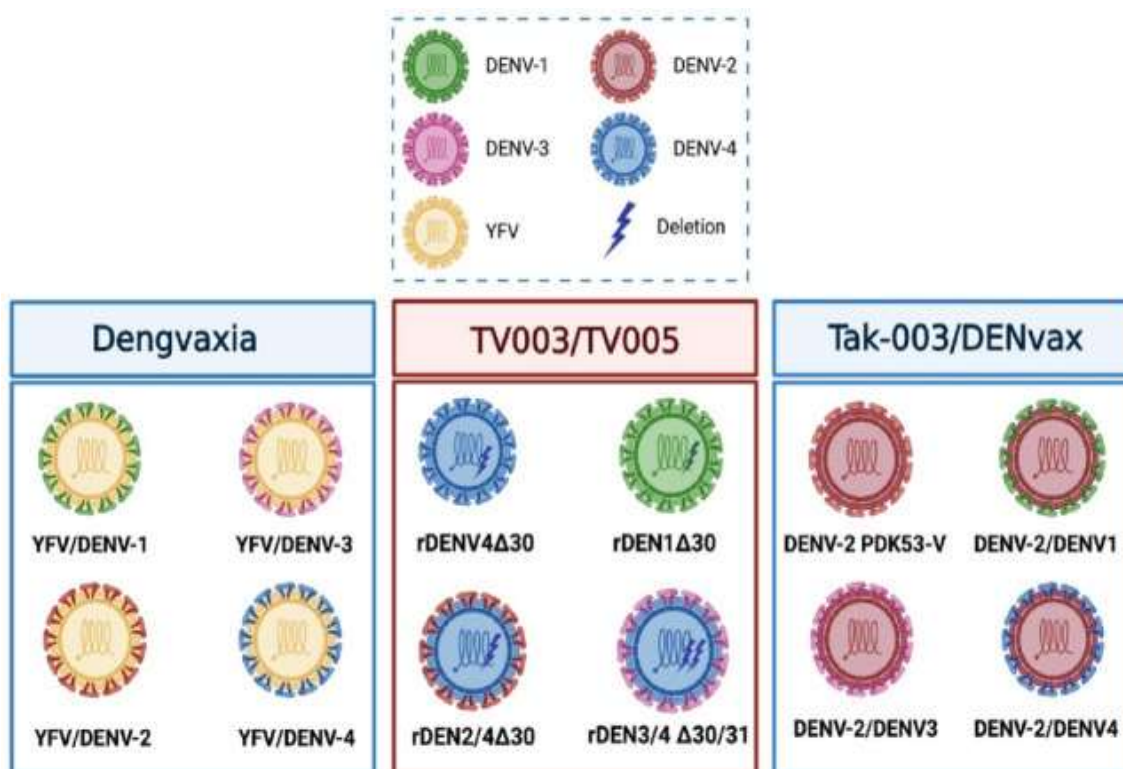
## **Vacunas contra el Dengue**

Si bien no existen tratamientos específicos para curar la enfermedad más que el soporte médico y control de los síntomas, las vacunas son un área de investigación importante ya que es un desafío el poder brindar protección para los cuatro tipos del virus del dengue. Existen actualmente tres vacunas diseñadas contra las infecciones por este virus, Dengvaxia (CYD-TDV), DENvax (TAK003) y TV003/TV005 recientemente autorizadas para su uso clínico, pero con ciertas limitaciones.

CYD-TDV/Dengvaxia es una vacuna basada en una cepa vacunal (17D) del virus de la fiebre amarilla (YFV) en la que los genes de la premembrana (prM) y la envoltura (E) del YFV han sido reemplazados por los genes homólogos de cada uno de los cuatro tipos del DENV. Esta vacuna es altamente eficaz en niños de 9 años o más que han tenido una infección previa por DENV debido al alto riesgo de enfermedad grave en niños seronegativos de 2 a 5 años en regiones endémicas (Torres-Flores et al., 2022; Kariyawasam et al., 2023)

Mientras tanto, la vacuna TAK003/DENVax se basa en una cepa DENV-2 viva atenuada (PDK-53-V) en la que los genes de premembrana (prM) y envoltura (E) de YFV han sido reemplazados por los genes homólogos de cada uno de los cuatro serotipos DENV, esta vacuna ha demostrado una eficacia del 97,7% contra DENV-2 y del 73,7% contra DENV-1, en ensayos clínicos de fase III en América Latina y Asia en niños sanos de 4 a 16 años con dengue confirmado virológicamente (Torres-Flores et al., 2022).

Por último, la vacuna TV003/TV005 consiste en una delección de 30 nucleótidos (172–143) en el tallo-bucle TL2 del 3'-UTR de DENV-4 y DENV-1, los componentes DENV-2 y DENV-3 fueron contruidos a partir de la estructura principal rDEN4 $\Delta$ 30, siendo así una vacuna viva atenuada y tetravalente de dosis única que se encuentra en ensayo clínico fase III (Francelino & Puccioni-Sohler, 2024; Torres-Flores et al., 2022).



**Figura 11. Diseño molecular de las vacunas anti-virus del Dengue en desarrollo clínico avanzado.** Imagen tomada de Torres-Flores et al., 2022.

## **Justificación**

Los *Orthoflavivirus* son virus que actualmente tienen un alto impacto mundial ya que se ha registrado un alza en el índice de mortalidad por su continua emergencia y reemergencia. Siendo el DENV miembro de esta familia, el presente estudio es resulta relevante ya que los análisis filogenético y filogeográfico de la diversidad que predomina en los cuatro tipos del virus del Dengue permitirá aportar información para identificar los tipos que están circulando principalmente en México y proponer su posible vía de entrada a México, asimismo esta información permitirá comprender si variantes particulares en las secuencias de los diferentes tipos de virus de dengue han estado bajo selección natural, modificando la adaptabilidad del virus y por último, identificar las variantes genéticas que se han mantenido en dichas secuencias.

## **Hipótesis**

Los cuatro tipos del virus del Dengue en América presentan variabilidad genética similar y relacionada con su geografía.

# Objetivos

## Objetivo General:

Determinar la filogeografía de los cuatro tipos del virus del dengue en América.

## Objetivos Específicos:

1. Obtener los alineamientos de las secuencias de genomas completos para los cuatro tipos del virus del dengue.
2. Reconstruir las relaciones filogenéticas e inferir los caracteres ancestrales de los cuatro tipos del virus del dengue en América.
3. Determinar los patrones de dispersión y distribución geográfica por haplotipo de los cuatro tipos del virus del dengue.
4. Identificar los sitios que han evolucionan bajo selección natural positiva y negativa.

# Estrategia Experimental

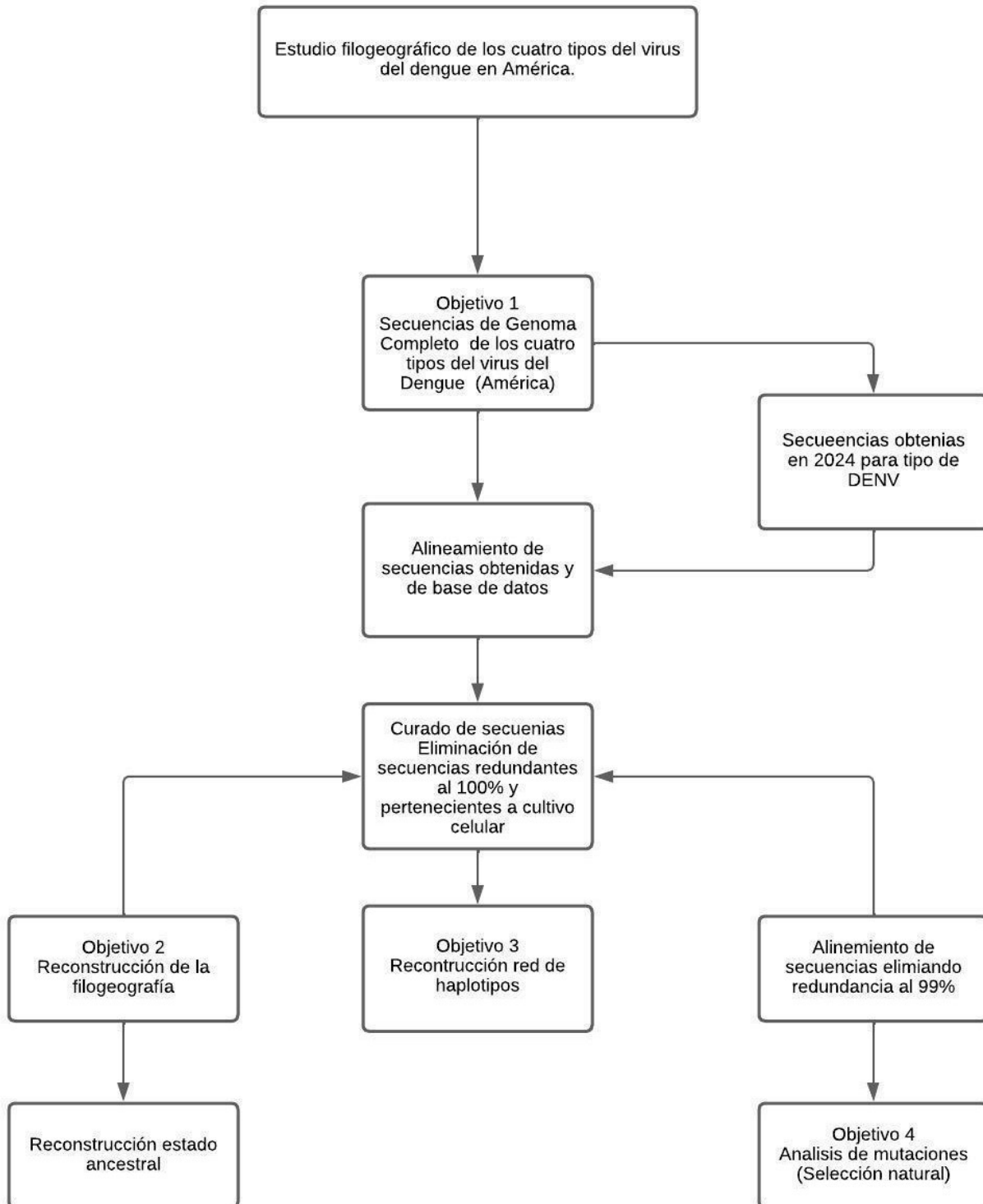


Figura.12 Estrategia Experimental.

# Metodología

## Obtención de Secuencias

Las secuencias de genoma completo de cada uno de los cuatro tipos del virus del dengue se obtuvieron de la base de datos EpiArbo del servidor GISAID (<https://gisaid.org/>) y se descargaron por separado. Los criterios que se consideraron para la inclusión de secuencias en este estudio fueron los siguientes: secuencias de genoma completo, genotipo con mayor cantidad de secuencias en la base de datos para cada uno de los cuatro tipos de dengue, CDS completo, alta cobertura, datos de colecta completos, hospedero humano, temporalidad del 2000-2024 y región del continente americano para DENV-1,2 y 4, en el caso de DENV-3 la región seleccionada fue mundial por su actual reemergencia después de no circular por más de una década. Las secuencias que cumplían con todos los criterios seleccionados se descargaron en marzo de 2024.

Adicionalmente, este análisis consideró 4 secuencias de genoma completo de DENV-1, 5 secuencias de DEV-2, 5 secuencias de DENV-3 y 3 secuencias de DENV-4 las cuales fueron obtenidas de pacientes mexicanos a finales de 2023 y principios de 2024.

## Alineamiento de Secuencias

Para cada tipo de DENV se construyeron alineamientos utilizando el programa MAFFTv.7 con la opción `—add` (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). El alineamiento se realizó contra las secuencias de referencia para cada tipo de DENV reportadas por NCBI virus para DENV-1 (NC\_001474.2), DENV-2 (NC\_001477.1), DENV-3 (NC\_001475.2) y DENV-4 (NC\_002640.1), se añadió como filtro eliminar las secuencias que contuviera mayor al 1% de posiciones ambiguas y finalmente se eliminó la redundancia de secuencias idénticas mediante CD-HIT en el mismo programa.

Los alineamientos se visualizaron y editaron manualmente en el programa Aliview (Larsson, 2014), eliminando las regiones UTR, codones de paro y *gaps* que generan ruido en el alineamiento.

## Análisis Filogeográfico

El análisis filogeográfico se realizó con la finalidad de identificar el patrón de dispersión del virus en la temporalidad del 2000-2024. Para hacer la reconstrucción filogenética se utilizó el programa IQTREE (Minh et al., 2020), el cual es uno de los softwares de código abierto que se usa con más frecuencia para la inferencia filogenética utilizando el criterio de máxima verosimilitud, este software selecciona el modelo de sustitución más adecuado para los alineamientos. Adicionalmente el árbol resultante se escaló por fecha de colecta y se visualizó con *ggtree* (Yu et al., 2017) en *R* versión 4.2.1 (R Core Team, 2021), las hojas se colorearon por país de colecta, el *script* se encuentra en el anexo. IQTREE se ejecutó mediante el comando:

```
$iqtree -s archivo.fasta -m MF --date TAXNAME
```

## Reconstrucción de Estados Ancestrales

El lugar de origen más probable de cada secuencia se infirió mediante una reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra usando el software *PastML* (Ishikawa et al., 2019) y el formato proporcionado por *IQTREE* (.nwk) además de una tabla en formato (.csv) con los nombres de los países y/o regiones de muestreo.

## Red de Haplotipos

Con los mismos alineamientos de secuencias procedimos a crear una red de haplotipos con el propósito de obtener una representación visual de las relaciones genéticas entre las secuencias analizadas y el patrón de dispersión del virus, así como identificar la agrupación geográfica. Para realizar este análisis, utilizamos el software *PopART* (Leigh et al., 2015) con el algoritmo *Minimum Spanning Network*, en los gráficos resultantes los nodos de la red se colorearon de acuerdo al país de colecta. El formato del alineamiento se cambió de .fasta a .py (phylip), por lo que fue necesario reducir el nombre de las secuencias a 10 caracteres para ajustarse a los requerimientos del software *Phylip*. Para

automatizar este proceso se utilizó un *script* de *Python*, dicho *script* se encuentra en el anexo. El *script* se ejecutó el mediante el comando:

```
$python modificar_fasta.py
```

## Análisis de Selección Natural

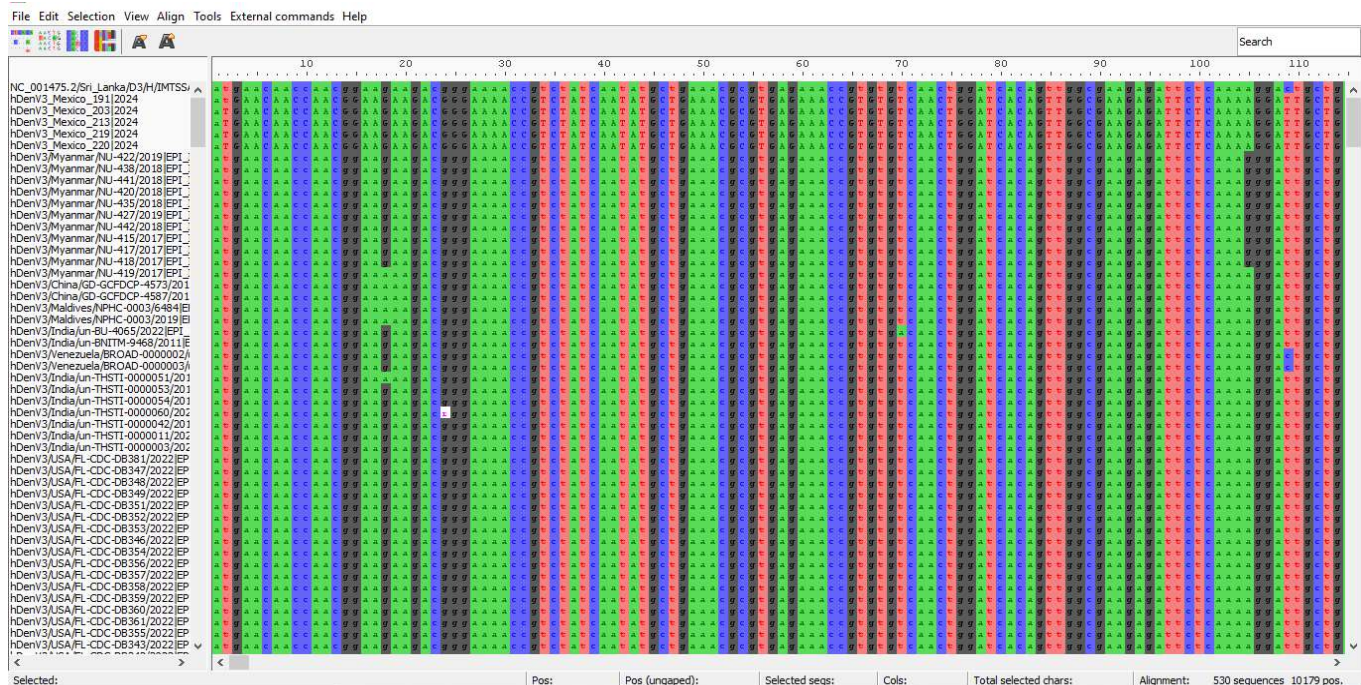
La identificación de los sitios que han evolucionado bajo selección natural positiva-diversificadora o negativa-purificadora se utilizó la herramienta FEL (Kosakovsky Pond & Frost, 2005) que se ubica dentro del servidor *Datamonkey* (<https://www.datamonkey.org/>) (S. Weaver et al., 2018). Debido a las restricciones en el tamaño de los archivos que tiene el programa FEL se utilizó nuevamente *CD-HIT* aplicando un filtro de 99% de identidad y así obtener un alineamiento con menos de 500 secuencias, lo cual es un requerimiento del programa FEL.

## Resultados

En primer lugar, se descargaron las secuencias de la base de datos *GISAID* para los cuatro tipos de DENV y se realizó el alineamiento de las mismas en *MAFFT* –add eliminando redundancia del 100% mediante *CD-HIT* y secuencias que contuviera >1% de letras ambiguas, alineando con las secuencias de referencia para cada uno de los tipos del virus del dengue con los números de acceso en GENBANK reportados en NCBI (Ver Tabla 2). Los alineamientos se visualizaron en Aliview (Fig. 13).

**Tabla 2. Secuencias para base de datos DENV.**

	Número de Acceso	Secuencias Base de datos	Secuencias alineadas y reducidas en CD-HIT al 100%	Secuencias al eliminar baja calidad y cultivo celular
DENV-1	NC_001474.2	3,637	2806	1720
DENV-2	NC_001477.1	845	765	727
DENV-3	NC_001475.2	941	726	525
DENV-4	NC_001475.2	254	232	213



**Figura 13. Alineamiento de secuencias de genoma completo de DENV-3, base de datos completa y visualizada mediante Aliview.**

Las secuencias se curaron al eliminar aquellas que de acuerdo con los metadatos indicaron ser procedentes de cultivo celular (células VERO, C6/36, HUH-7, etc.) y posteriormente se excluyeron las regiones UTR y los codones de paro.

A partir de este procesamiento se obtuvieron cuatro alineamientos correspondientes a DENV-1 con 1,724 secuencias, DENV-2 con 732 secuencias, DENV-3 con 530 secuencias y DENV-4 con 216 secuencias pertenecientes al continente americano a excepción del DENV-3 para el cual se consideraron un conjunto de secuencias a nivel mundial ya que este tipo viral actualmente presenta una reemergencia y se ha asociado a cuadros más severos de la infección. Dichos alineamientos consideran las secuencias que fueron obtenidas de pacientes mexicanos a finales de 2023 y principios de 2024; estas incluyen cuatro secuencias de genoma completo de DENV-1, cinco secuencias de DEV-2, cinco secuencias de DENV-3 y tres secuencias de DENV-4.

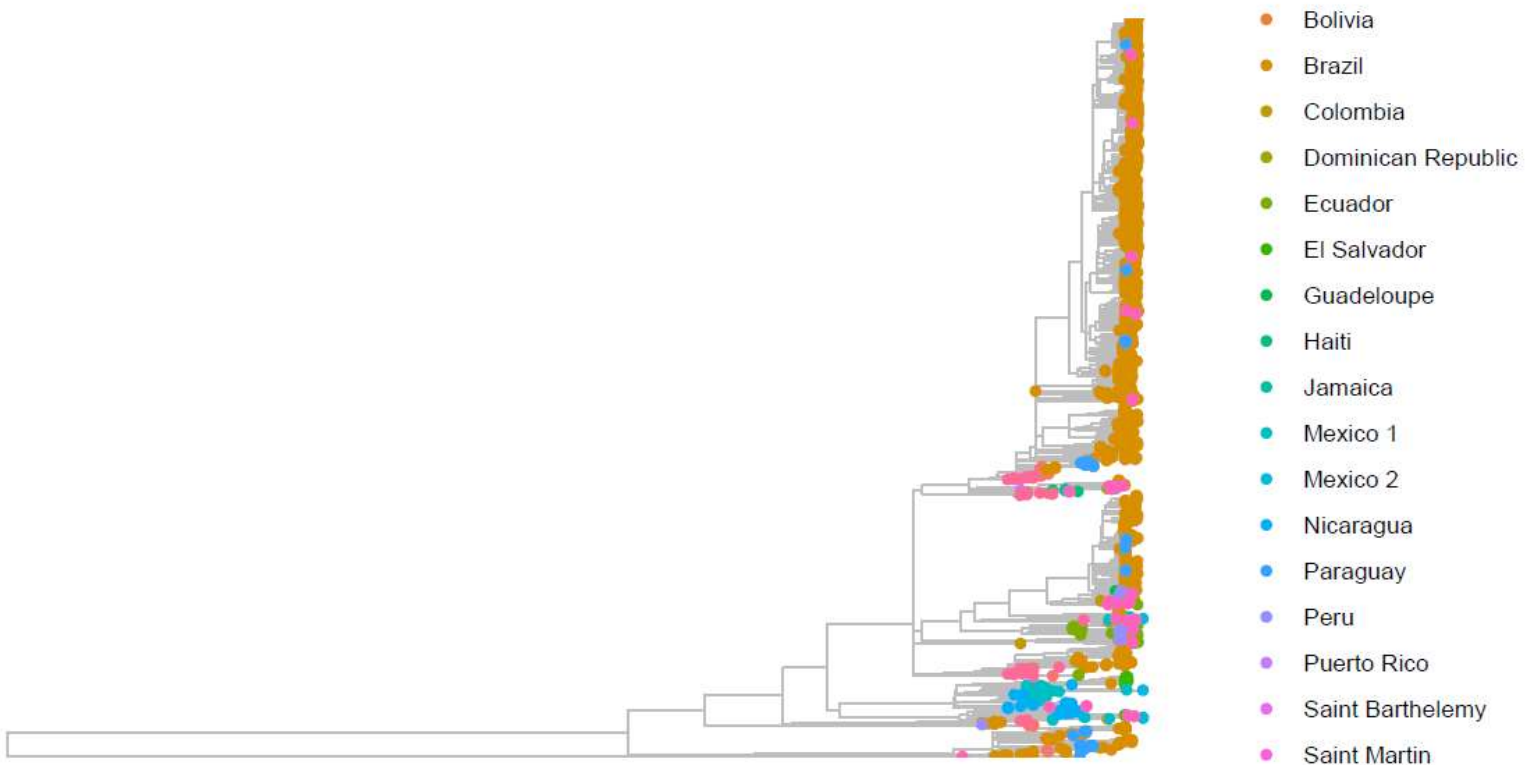
Dado que cada uno de los cuatro tipos de dengue tiene diversos genotipos, en este trabajo decidimos realizar los análisis utilizando las secuencias de los genotipos más

abundantes en cada caso: el genotipo V con 1,720 secuencias para DENV-1, genotipo III 727 secuencias para DENV-2, genotipo III 525 secuencias para DENV-3 y genotipo II 213 secuencias para DENV-4.

## Reconstrucción Filogeografía

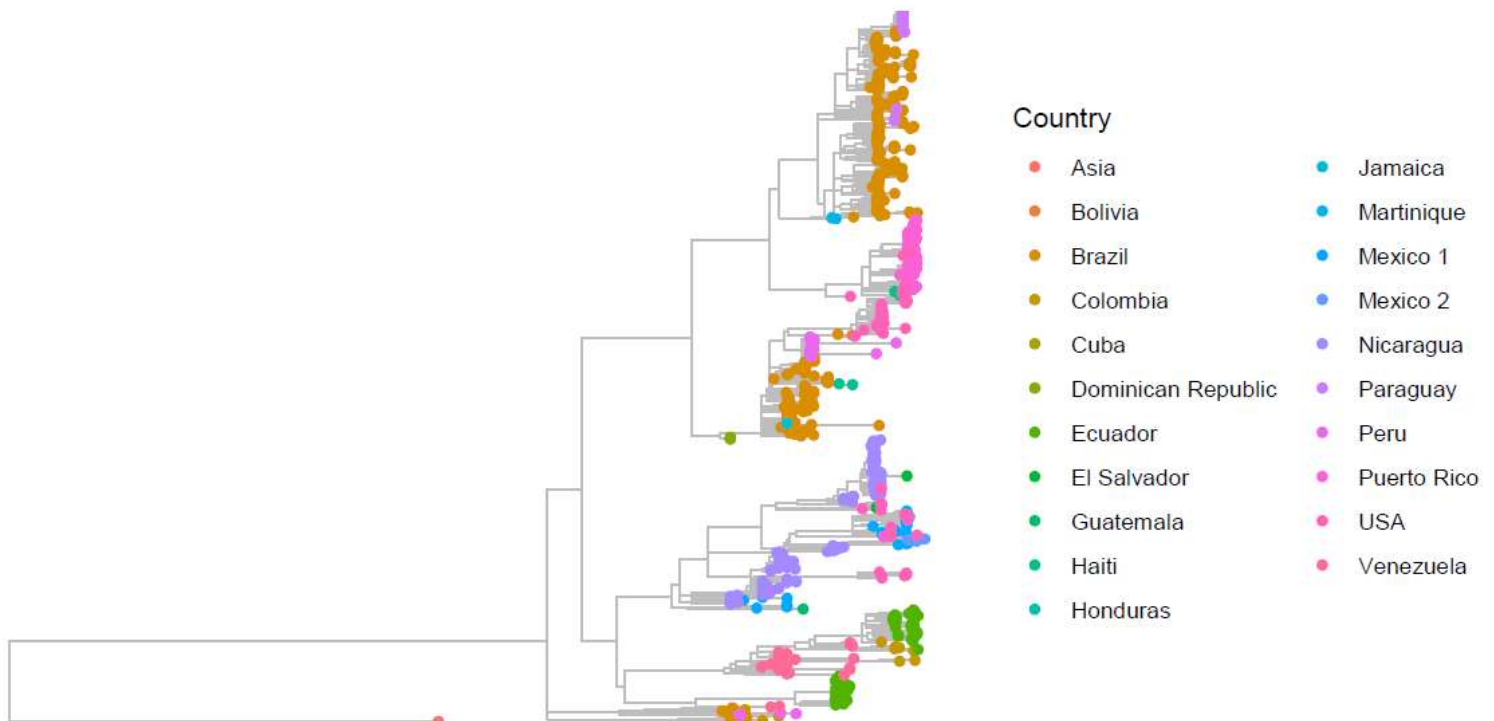
La reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud obtenida mediante *IQTREE* considerando la fecha de colecta se realizó con cada uno de los alineamientos obtenidos, los árboles resultantes fueron visualizados en *R* versión 4.1.2 (R Core Team, 2021) usando la librería *ggtree* (Yu et al., 2017), donde las hojas fueron coloreadas por país de colecta.

Cabe mencionar que las secuencias denominadas México 1 corresponden a las obtenidas por la base de datos *GISAID* para cada uno de los tipos de DENV y las secuencias denominadas México 2 corresponden a las obtenidas recientemente a partir de pacientes mexicanos positivos a DENV en 2024.



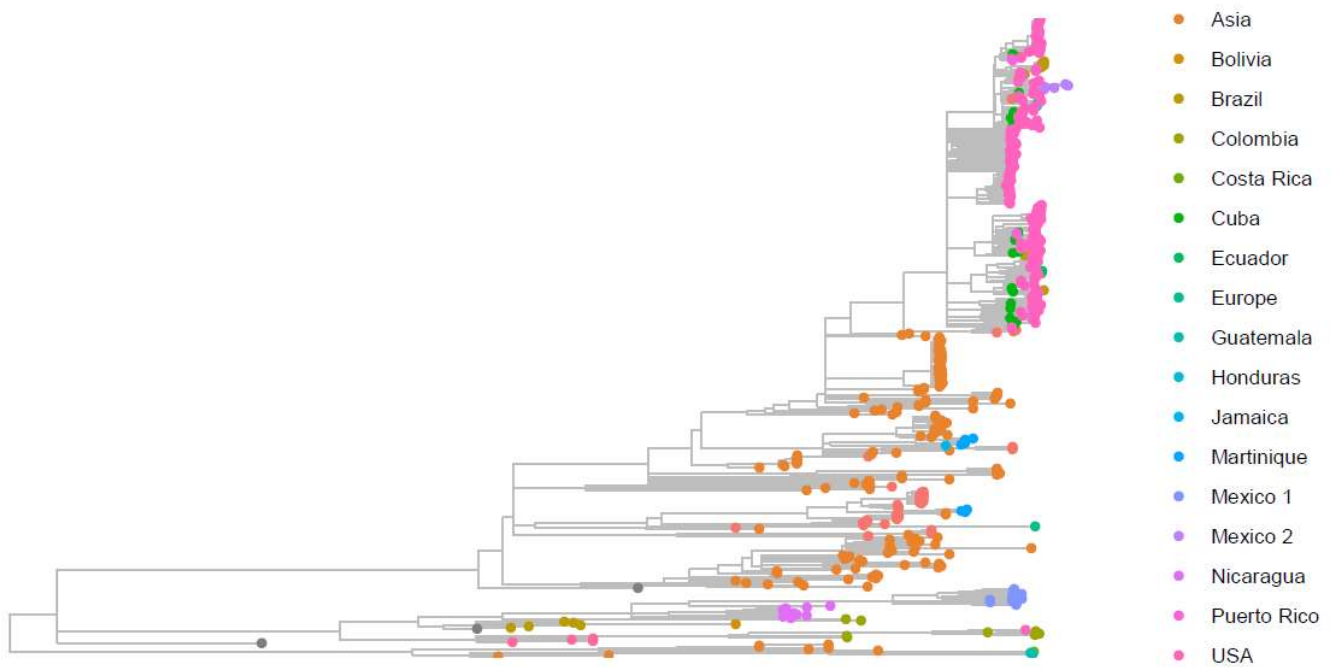
**Figura 14. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo V de DENV-1 usando el genoma completo. La figura muestra una filogenia construida con iqtree2 utilizando el modelo de sustitución GTR+F+I+R9 escalado por fecha de colecta. Los colores de las hojas del árbol indican el sitio de toma de muestra.**

En la figura 14 se observa en la parte superior del árbol a las secuencias de DENV-1 de México 2 pertenecientes al genotipo V, estas son las más recientes y como se aprecia en el gráfico tienen una relación con las secuencias de Brasil, lo cual nos podría indicar la introducción de este linaje de DENV al país al igual que una relación cercana y un posible ancestro en común entre dichas secuencias que nos ejemplifica cómo este genotipo del DENV-1 es el que circula principalmente en América en la actualidad.



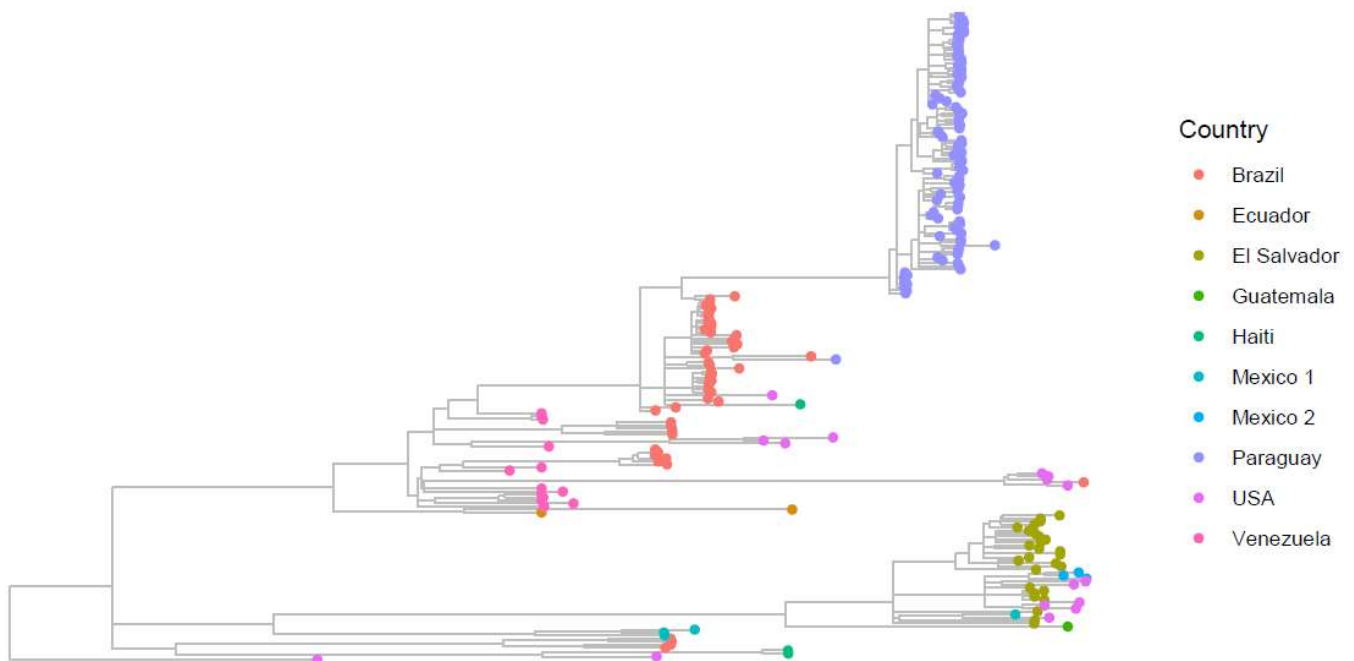
**Figura 15. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo II del DENV-2 usando el genoma completo. La figura muestra una filogenia construida con iqtree2 utilizando el modelo de sustitución GTR+F+R5 escalado por fecha de colecta. Los colores de las hojas del árbol indican el sitio de toma de muestra.**

La figura 15 nos muestra la división del genotipo II del DENV-2 en múltiples clados de los cuales podemos identificar en la parte superior a las cinco secuencias de México 2 pertenecientes a este genotipo de DENV, que se agrupan junto con secuencias de Brasil y Paraguay. Igualmente, las secuencias de México 1, en la parte inferior del árbol, muestran una relación con las secuencias de Nicaragua, lo cual nos podría indicar que en este caso la vía de introducción de este linaje de DENV-2 al país fue distinta, sin embargo, no se puede descartar que sea efecto de sesgo en el muestreo.



**Figura 16. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo III del DENV-3 usando el genoma completo. La figura muestra una filogenia construida con iqtree2 utilizando el modelo de sustitución GTR+F+I+R4 escalado por fecha de colecta. Los colores de las hojas del árbol indican el sitio de toma de muestra.**

En la figura 16 se observa que las cinco secuencias de México 2 pertenecientes al genotipo III de DENV-3 tienen una relación con secuencias de Estados Unidos, lo cual nos podría indicar la ruta de introducción al país desde el norte del continente. Estas secuencias forman un clado separado de las variantes previamente circulantes en América, lo que sugiere un evento de reintroducción reciente.

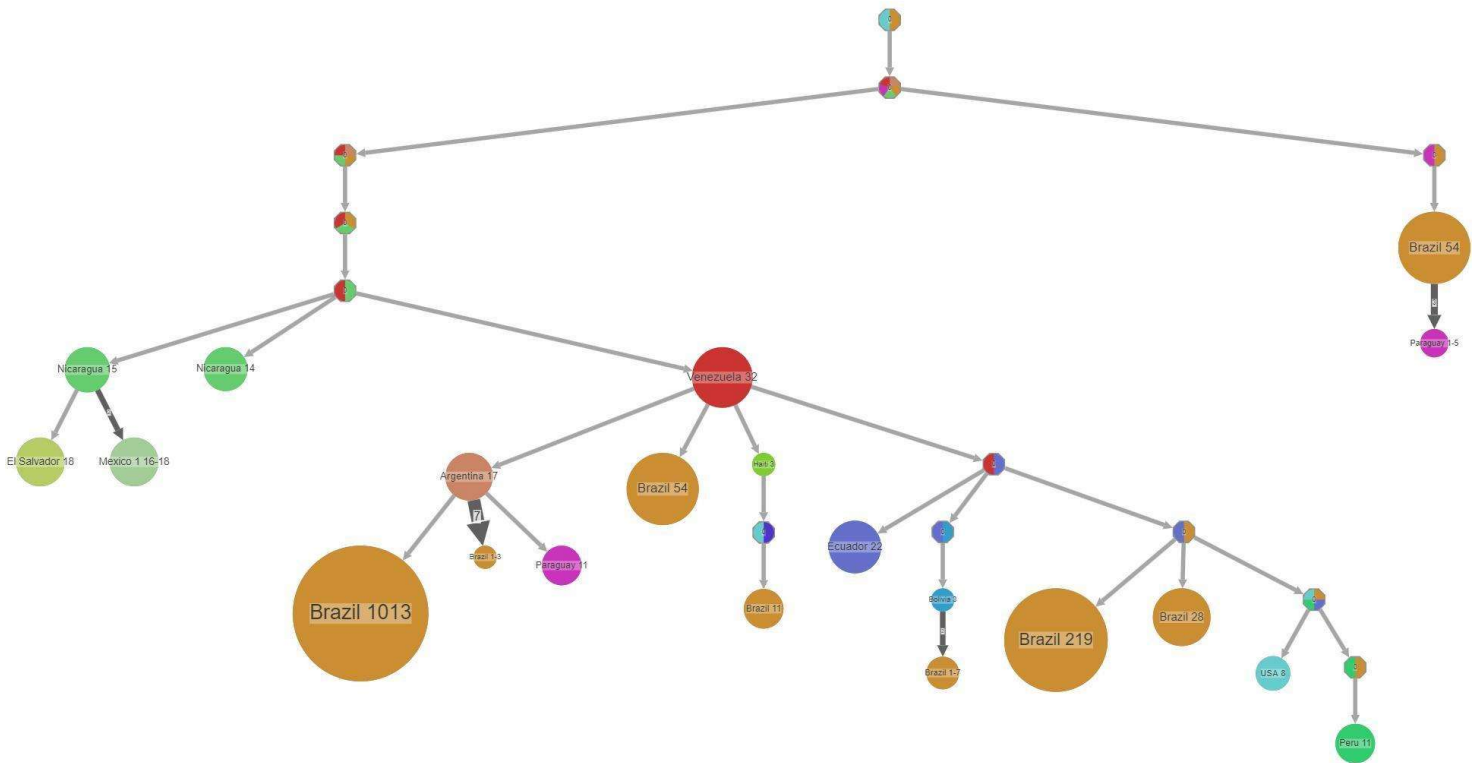


**Figura 17. Filogenia de máxima verosimilitud del genotipo II del DENV-4 usando el genoma completo. La figura muestra una filogenia construida con iqtree2 utilizando el modelo de sustitución TIM+F+I+G4 escalado por fecha de colecta. Los colores de las hojas del árbol indican el sitio de toma de muestra.**

En la figura 17 se puede identificar una mayor diversidad en las secuencias de DENV-4 en comparación con los otros tipos de DENV. Las secuencias de México 1 y 2 pertenecientes al genotipo II de DENV-4 están relacionadas con muestras de El Salvador, Paraguay y Brasil, indicando múltiples posibles rutas de entrada al país. La amplia dispersión de este tipo podría estar asociada con su ciclo selvático persistente.

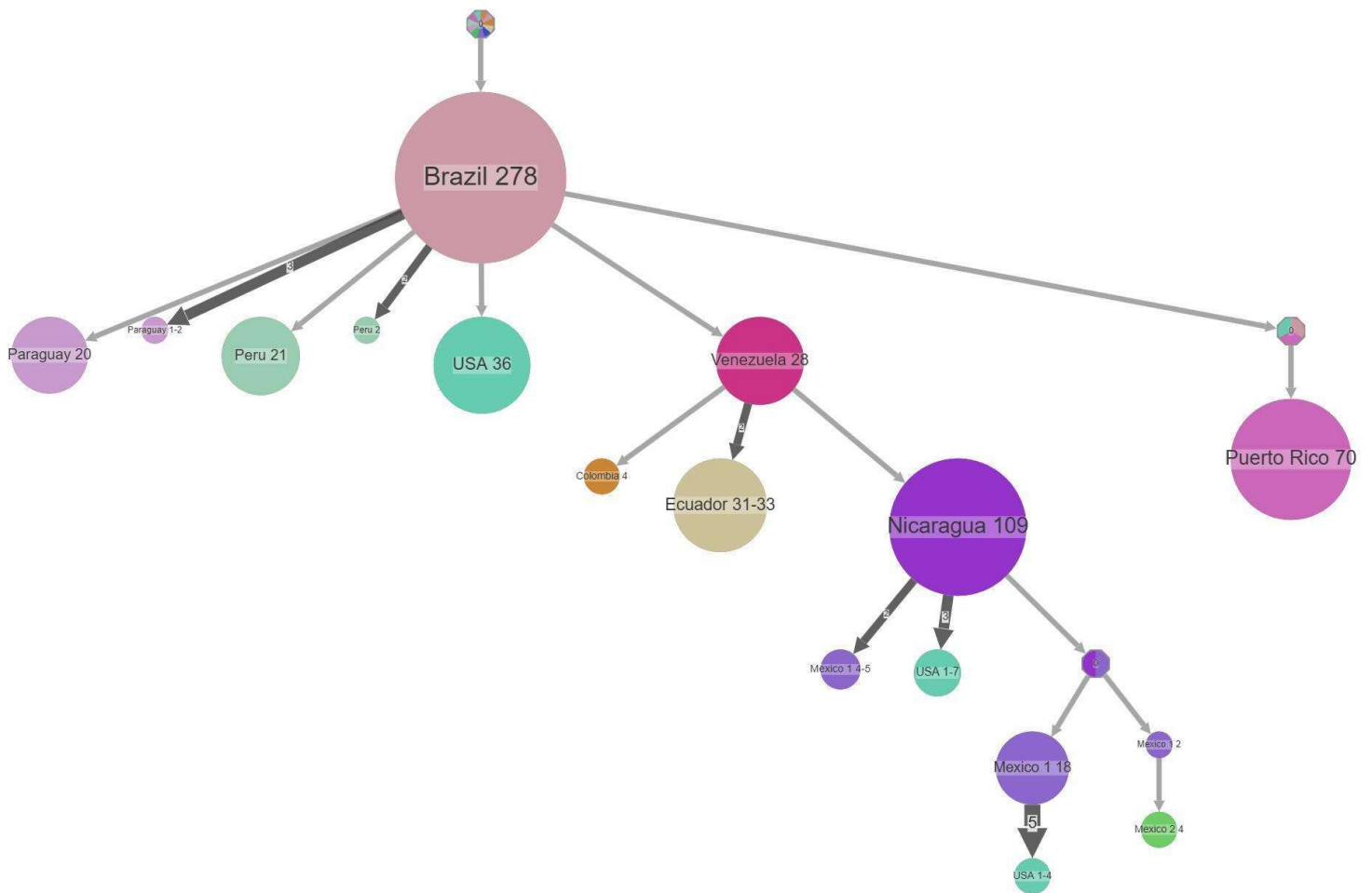
## Reconstrucción de estados ancestrales (*PastML*)

Con el objetivo de conocer los ancestros en común de las secuencias de DENV, se realizó un análisis en el programa *PastML* usando la topología generada en *IQ-TREE* y una tabla que indica el sitio de muestreo de cada secuencia. Los resultados se muestran a continuación en la Fig. 18.



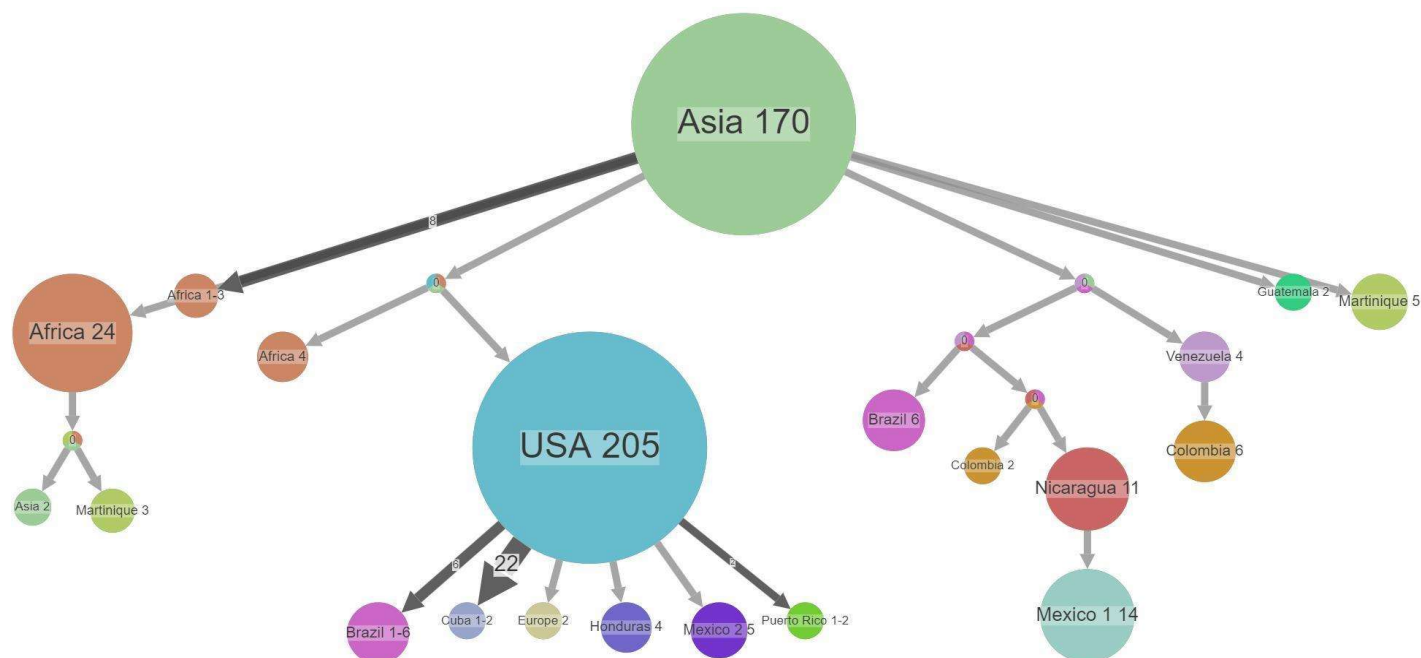
**Figura 18. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante *PastML* para DENV-1.**

En la figura 18 se muestra el origen inferido de las secuencias del genotipo V de DENV-1 en la cual se muestran tres introducciones importantes procedentes de Brasil, Venezuela y Nicaragua en la cual se agrupan las secuencias de México 1 dando a entender que es su posible ancestro común más cercano y su posible vía de introducción.



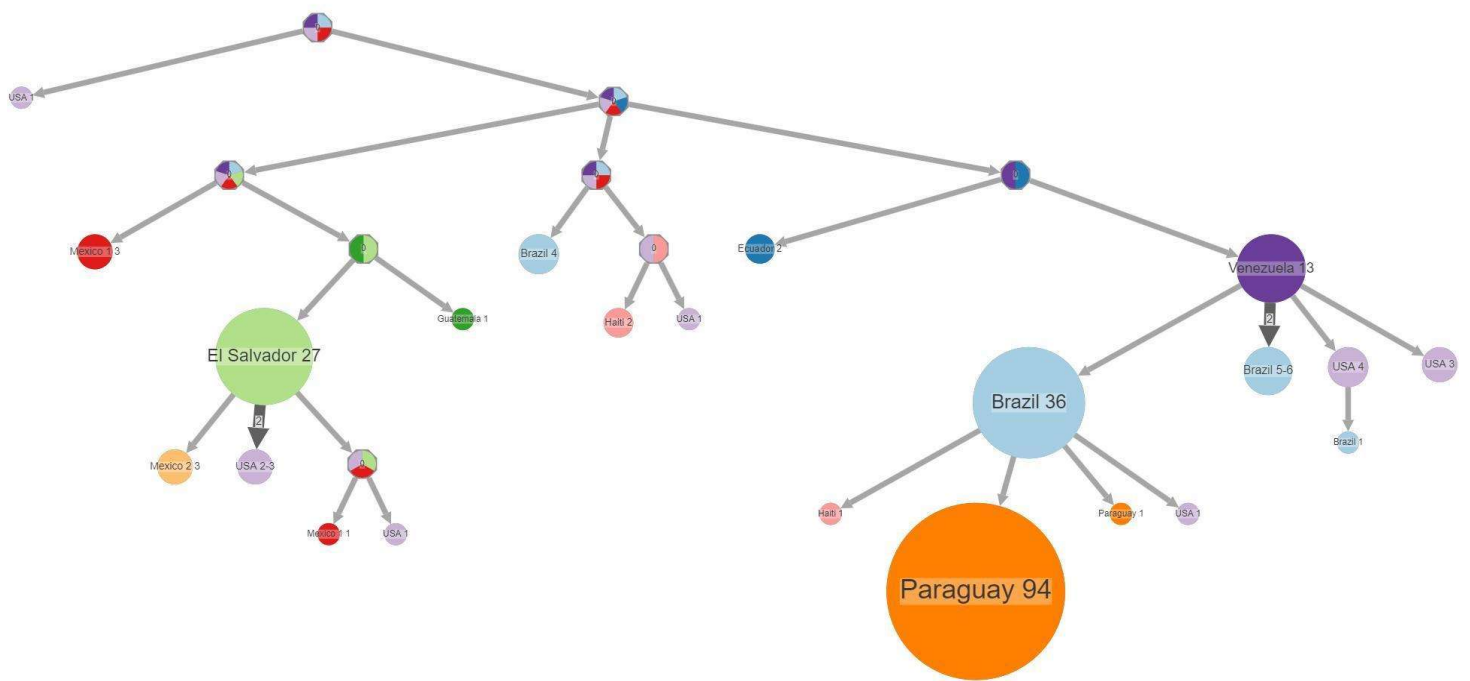
**Figura 19. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-2.**

En la figura 19 se puede identificar una introducción del genotipo II del DENV-2 general procedente de Brasil del cual surgen las demás introducciones hacia países centroamericanos y sudamericanos. Nicaragua se puede identificar como el ancestro común más cercano para las secuencias pertenecientes a México 1 y México 2.



**Figura 20. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-3.**

La figura 20 nos muestra el origen inferido de las secuencias disponibles del genotipo III de DENV-3 en donde se observan dos introducciones independientes de Asia al continente americano. En esta misma figura se pueden observar secuencias mexicanas en ambos grupos, las cuales tienen a Estados Unidos y Nicaragua como posibles vías de introducción al país y ancestro en común más cercano para las secuencias de México 1 y México 2. Estas introducciones independientes refuerzan la idea de que el DENV-3 está experimentando una reemergencia global.

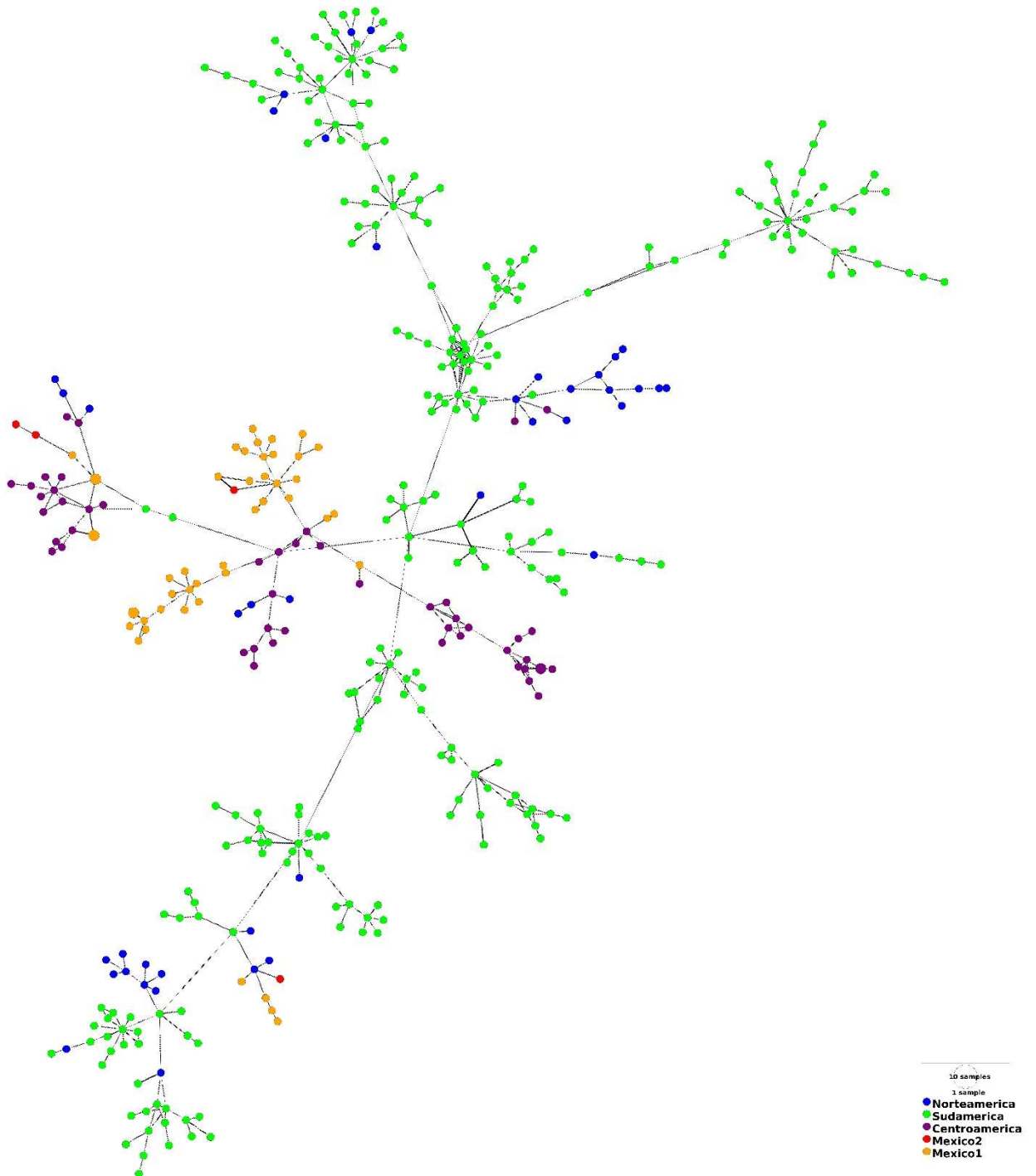


**Figura 21. Reconstrucción de estados ancestrales del sitio de toma de muestra mediante PastML para DENV-4.**

En la figura 21 se puede visualizar una distribución muy diversa en la que las secuencias de México 1 están relacionadas con secuencias de Estados Unidos y El Salvador siendo estos países su posible vía de introducción al país. Esto podría sugerir que el genotipo II de DENV-4 ha seguido rutas múltiples y complejas para llegar a México, posiblemente influenciado por interacciones entre los ciclos selvático y urbano.

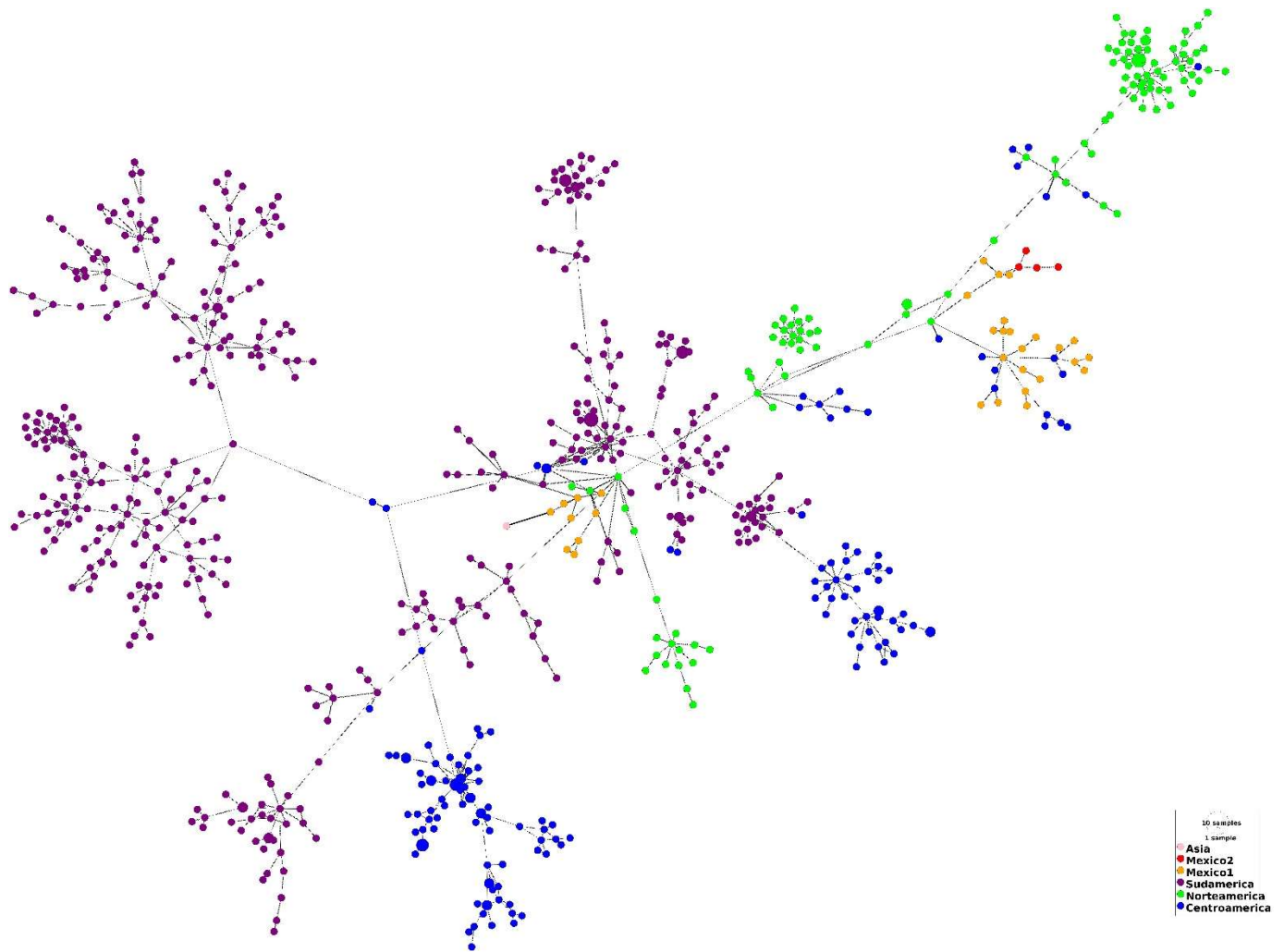
## Red de haplotipos

Con el objetivo de conocer las variantes genéticas que se han ido heredando, son compartidas y están relacionadas geográficamente, se utilizaron alineamientos reducidos considerando todas las secuencias de genomas completos para cada uno de los tipos de DENV con el cual se generó una red de haplotipos en la que se utilizó el software *PopArt* para inferir los patrones de dispersión de dichas secuencias, usando el método de *Minimum Spanning Network*.



**Figura 22. Red de Haplotipos de DENV-1 generada en *PopArt* mediante el método de *Minimum Spanning Network*. La red contiene 400 secuencias de genoma completo para el genotipo V del DENV-1 pertenecientes a países del continente americano, cada uno de los círculos en el gráfico representa un haplotipo único, y su tamaño refleja el número de secuencias asociadas a cada haplotipo. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos se muestran a través de marcas de sombreado que atraviesan las líneas que conectan los haplotipos, donde cada marca de sombreado indica una variación de un nucleótido particular. Los círculos más oscuros y/o centrales sin etiquetar se utilizan para representar nodos ancestrales que se han inferido en el análisis. Además, se utiliza un código de colores para identificar el origen de cada haplotipo.**

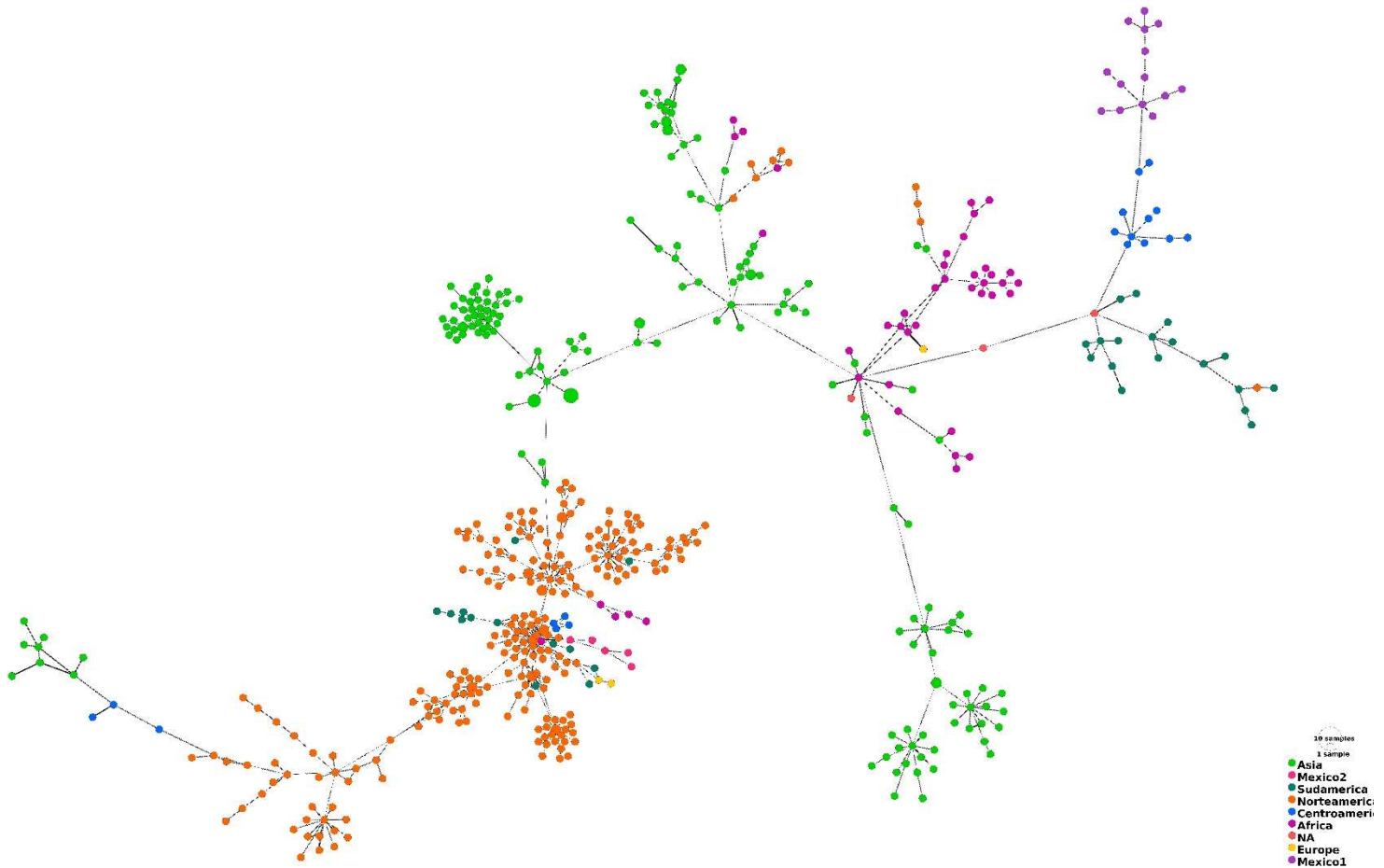
En la figura 22 se puede visualizar que los haplotipos más frecuentes están compuestos mayormente de secuencias sudamericanas (verde) distribuidas a lo largo de toda la red. Los resultados indican que estas secuencias pueden ser el ancestro común y origen de las distribuciones de los demás haplotipos para las secuencias de Centroamérica, Norteamérica y las secuencias de México 1 y 2. En el gráfico se puede visualizar a lo largo de la red una alta variación en la cantidad de mutaciones presentes en cada haplotipo sugiriendo múltiples eventos de dispersión.



**Figura 23. Red de Haplotipos para DENV-2 generada en *PopArt* mediante el método de *Minimum Spanning Network*. La red contiene 732 secuencias de genoma completo para el genotipo II del DENV-2 pertenecientes a países del continente americano, cada uno de los círculos en el gráfico representa un haplotipo único, y el tamaño de estos círculos refleja cuántas secuencias están asociadas a cada haplotipo. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos se muestran a través de marcas de sombreado que atraviesan las líneas que conectan los haplotipos, donde cada marca de sombreado indica una variación de un nucleótido particular. Los círculos más oscuros y/o centrales sin etiquetar se utilizan para representar nodos ancestrales que se han inferido en el análisis. Además, se utiliza un código de colores para identificar el origen de cada haplotipo.**

En la figura 23 se puede visualizar la división de los haplotipos del genotipo II de DEV-2 en cuatro ramas diferentes, aunque el haplotipo más representativo está compuesto mayormente de secuencias sudamericanas, estas predominan a lo largo de toda la red y

comparten haplotipos con pocas secuencias de México 1, pero también se aprecia una agrupación de las secuencias de México 1 y las más recientes correspondientes a México 2 con los haplotipos de las secuencias norteamericanas y centroamericanas, pero se puede identificar una alta cantidad de mutaciones entre haplotipos.



**Figura 24.** Red de Haplotipos para DENV-3 generada en *PopArt* mediante el método de *Minimum Spanning Network*. La red contiene 530 secuencias de genoma completo para el genotipo III del DENV-3 de cuatro continentes, cada uno de los círculos en el gráfico representa un haplotipo único, y el tamaño de estos círculos refleja cuántas secuencias están asociadas a cada haplotipo. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos se muestran a través de marcas de sombreado que atraviesan las líneas que conectan los haplotipos, donde cada marca de sombreado indica una variación de un nucleótido particular. Los círculos más oscuros y/o centrales sin etiquetar se código de colores para identificar el país de origen de cada haplotipo.

En la figura 24 se pueden visualizar tres grandes grupos de haplotipos, uno que contiene la mayoría de las secuencias norteamericanas en el cual también se encuentran un pequeño grupo de haplotipos de secuencias de Asia en los cuales la cantidad de mutaciones que los separa es muy elevada lo cual nos sugiere introducciones múltiples desde Asia. En este mismo grupo podemos ubicar las secuencias mexicanas más recientes perteneciente a México 2, secuencias sudamericanas, africanas y europeas en las cuales la cantidad de mutaciones es visiblemente menor, lo que indica una introducción más reciente, aunque con una diversidad genética mayor.

El segundo grupo contiene la mayor cantidad de haplotipos de las secuencias de Asia, incluyendo las restantes secuencias de África, igualmente en este grupo se observa una alta variación en la cantidad de mutaciones que las separan.

El tercer y último grupo se aleja del segundo grupo, ya que éste contiene los haplotipos de las secuencias sudamericanas, el cual posteriormente se une a un grupo de haplotipos de las secuencias centroamericanas y luego a todas las secuencias de México 1, las cuales quedan como un grupo aislado.

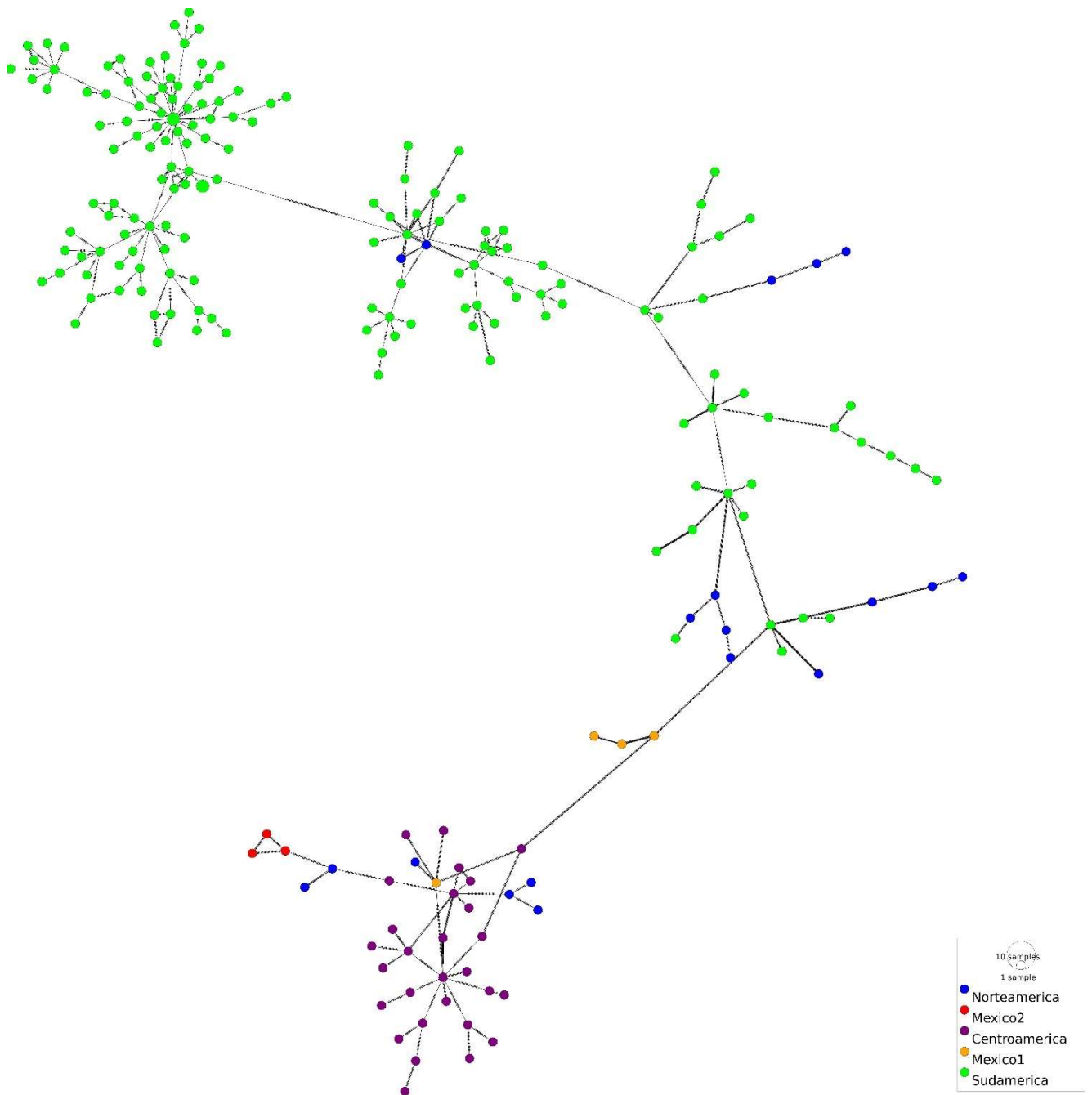


Figura 25. Red de Haplotipos para DENV-4 generada en *PopArt* mediante el método de *Minimum Spanning Network*. La red contiene 216 secuencias de genoma completo para el genotipo II del DENV-4, cada uno de los círculos en el gráfico representa un haplotipo único, y el tamaño de estos círculos refleja cuántas secuencias están asociadas a cada haplotipo. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos se muestran a través de marcas de sombreado que atraviesan las líneas que conectan los haplotipos, donde cada marca de sombreado indica una variación de un nucleótido particular. Los círculos más oscuros y sin etiquetar se utilizan para representar nodos

**ancestrales que se han inferido en el análisis. Además, se utiliza un código de colores para identificar el país de origen de cada haplotipo.**

En la figura 25 se pueden visualizar los dos grupos que se forman con las secuencias de DENV-4 observando que el haplotipo más representativo está compuesto mayormente de secuencias sudamericanas (verde) ubicadas a lo largo de toda la red. Se pueden ver haplotipos únicos pertenecientes a cada región y se puede visualizar igualmente diferente cantidad de mutaciones entre haplotipos.

Los haplotipos únicos de México 1 y México 2 muestran conexiones con secuencias centroamericanas y norteamericanas, reflejando una dispersión geográfica limitada, pero con algunos puntos de entrada claros.

## Análisis de Selección Natural (FEL)

Se utilizaron los alineamientos de genoma completo para cada uno de los cuatro tipos de DENV a los cuales se les aplicó mediante *MAFFT*, *CD-HIT* al 99% para obtener alineamientos con menor cantidad de secuencias cuyos resultados se muestran en la tabla 3 en donde se observa la cantidad de secuencias resultantes.

**Tabla 3. Secuencias para FEL.**

	Alineamientos	Reducidos al 99% mediante <i>CD-HIT</i>
DENV-1	1724	186
DENV-2	732	260
DENV-3	530	500
DENV-4	216	216

Los resultados obtenidos del análisis de selección natural para cada uno de los tipos de DENV se encuentran en las siguientes tablas:

**Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural en FEL para DENV-1.**

Codón	Alpha	Beta	Alpha=Beta	LRT	p-value	Longitud total de la rama	Clase
10	0.000	2.104	1.128	4.962	0.0259	2.926	Diversificadora
70	0.000	0.985	0.608	3.877	0.0489	1.472	Diversificadora
335	0.000	0.697	0.446	3.532	0.0602	1.157	Diversificadora
674	0.718	3.826	2.950	3.767	0.0523	7.656	Diversificadora
921	0.342	1.835	1.196	3.542	0.0598	3.103	Diversificadora
950	0.000	1.038	0.665	4.460	0.0347	1.727	Diversificadora
1159	0.000	0.454	0.197	3.308	0.0689	0.512	Diversificadora
1178	0.000	0.663	0.423	3.223	0.0726	1.099	Diversificadora
1590	0.000	0.617	0.411	3.241	0.0718	1.068	Diversificadora
1992	0.000	0.882	0.526	4.123	0.0423	1.366	Diversificadora
2183	0.000	1.129	0.907	2.786	0.0951	2.353	Diversificadora
2193	0.000	0.885	0.526	4.172	0.0411	1.365	Diversificadora
2857	0.000	2.394	1.746	5.647	0.0175	4.532	Diversificadora
2919	0.000	1.444	1.055	3.125	0.0771	2.737	Diversificadora
3137	0.000	1.294	0.764	5.283	0.0215	1.982	Diversificadora
3140	0.000	1.708	1.253	3.737	0.0532	3.253	Diversificadora
3277	0.000	0.887	0.529	5.033	0.0249	1.373	Diversificadora

LRT: Estadística de prueba de razón de verosimilitud para comparar modelos nulos y alternativos para probar la selección.

Los resultados del análisis para DENV-1 representados en la tabla 4, arrojaron 17 posiciones que evolucionan bajo selección positiva diversificadora, encontrado solamente cuatro sitios con valor de  $p$  más significativo (color verde) condón 10, 2857, 3137 y 3277 los cuales al multiplicarse por tres se indica la posición en la que se encuentra a nivel nucleotídico identificando así que las posiciones en las que se

encuentran estos cuatro codones corresponden a la proteína de Cápside y a la secuencia de NS5 lo que indica que esta proteína puede ser clave en la adaptación del virus a diferentes entornos.

Igualmente se identificaron 1,602 posiciones que evolucionaron bajo selección negativa purificadora.

**Tabla 5. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural (FEL) para DENV-2.**

Codón	alpha	beta	alpha=beta	LRT	p-value	Longitud total de la rama	Clase
<b>102</b>	0.000	1.197	0.949	3.196	0.0738	2.256	<b>Diversificadora</b>
<b>639</b>	0.000	1.267	1.017	3.063	0.0801	2.418	<b>Diversificadora</b>
<b>939</b>	0.000	2.480	1.645	11.221	<b>0.0008</b>	3.912	<b>Diversificadora</b>
<b>1489</b>	0.000	5.102	3.621	11.459	<b>0.0007</b>	8.612	<b>Diversificadora</b>
<b>2036</b>	0.000	0.875	0.553	2.751	0.0972	1.314	<b>Diversificadora</b>
<b>2762</b>	0.000	2.249	1.995	2.977	0.0845	4.745	<b>Diversificadora</b>
<b>2866</b>	0.000	1.479	1.091	3.038	0.0813	2.594	<b>Diversificadora</b>
<b>2879</b>	0.000	1.754	1.304	3.544	0.0597	3.101	<b>Diversificadora</b>
<b>3049</b>	0.000	1.475	1.096	2.962	0.0852	2.607	<b>Diversificadora</b>

Los resultados del análisis para DENV-2 visualizados en la tabla 4, arrojaron nueve posiciones que evolucionan bajo selección positiva diversificadora pero solamente dos cuentan un valor de  $p$  significativo siendo los codones 939 correspondiente a la secuencia de NS1 y 1489 correspondiente a la secuencia de NS2B. Estas se encuentran relacionadas con funciones críticas como la evasión inmune y la replicación viral.

Igualmente, se identificaron 1,670 posiciones que evolucionan bajo selección negativa purificadora.

Tabla 6. Resultados obtenidos en el análisis de selección natural (FEL) para DENV-3.

Codón	Alpha	Beta	Alpha=Beta	LRT	p-value	Longitud total de la rama	Clase
2	0.000	0.753	0.452	3.054	0.0806	1.211	Diversificadora
412	0.000	1.242	0.755	5.950	0.0147	2.022	Diversificadora
660	0.000	1.088	0.688	6.402	0.0114	1.844	Diversificadora
825	0.000	0.665	0.394	3.137	0.0765	1.057	Diversificadora
1029	0.000	1.436	0.912	6.323	0.0119	2.443	Diversificadora
1166	0.645	2.782	2.367	3.151	0.0759	6.343	Diversificadora
1504	0.000	1.033	0.698	6.190	0.0128	1.870	Diversificadora
2399	0.000	0.606	0.412	3.845	0.0499	1.104	Diversificadora
2764	0.000	2.310	1.386	6.061	0.0138	3.715	Diversificadora
2937	0.000	1.029	0.699	3.087	0.0789	1.872	Diversificadora
3129	0.000	1.208	0.934	4.620	0.0316	2.503	Diversificadora
3354	0.000	1.391	0.988	6.055	0.0139	2.647	Diversificadora

Los resultados obtenidos para DENV-3 visualizados en la tabla 6, mostró doce posiciones que evolucionaron bajo selección diversificadora. Los sitios con los valores de  $p$  más significativos son: el codón 412, 660 y 1029 correspondientes a la secuencia de E, así como el codón 1504 correspondiente a la secuencia NS2A, 2764 y 3354 correspondientes a la secuencia de NS5. Estas regiones podrían influir en la capacidad del virus para infectar nuevos huéspedes y evadir respuestas inmunitarias.

Asimismo, se encontraron 1,611 codones que evolucionan bajo selección negativa purificadora.

Tabla 7. Resultados obtenidos del análisis de selección natural (FEL) para DENV-4.

Codón	Alpha	Beta	Alpha=Beta	LRT	p-value	Longitud total de la rama	Clase
<b>512</b>	0.000	2.542	1.691	4.055	<b>0.0440</b>	1.855	<b>Diversificadora</b>
<b>3140</b>	0.000	1.672	1.099	3.330	0.0680	1.205	<b>Diversificadora</b>
<b>3163</b>	0.000	1.519	0.937	2.901	0.0885	1.028	<b>Diversificadora</b>

Los resultados obtenidos DENV-4 se visualizan en la tabla 7, en ésta se observan solamente tres sitios bajo selección positiva diversificadora de los que solamente el codón 512 correspondiente a la secuencia de E tuvo un valor de  $p$  significativo, lo que resalta la importancia de esta región en la interacción con los receptores del huésped.

Igualmente, se identificaron 882 sitios que evolucionan bajo selección negativa-purificadora.

## Discusión

El equilibrio entre los procesos de evolución como la selección natural, la deriva génica y la mutación determinan la diversidad que presentan las poblaciones virales. La diversidad de los virus les permite, al igual que en cualquier entidad biológica, adaptarse a cambios ambientales y sobrevivir.

El dengue es una enfermedad que está resurgiendo en todo el mundo y actualmente representa la amenaza arboviral más importante para los seres humanos. La creciente incidencia y distribución geográfica del dengue, así como la transmisión de este virus ha mostrado una periodicidad sorprendente lo cual ha generado brotes graves en casi todas las poblaciones endémicas e hiperendémicas (Bennett et al., 2010).

En el presente estudio se reconstruyeron cuatro filogenias correspondientes a secuencias de genoma completo para cada uno de los cuatro tipos de virus del dengue (DENV), utilizando secuencias reportadas en la base de datos *GISAID* y secuencias de muestras colectadas en México a finales del 2023 e inicios del 2024.

Se realizaron alineamientos complementarios para generar una base de datos específica para cada uno de los cuatro tipos del virus del dengue, en los cuales se eliminaron secuencias redundantes, *gaps*, codones de paro erróneos y secuencias obtenidas a partir de cultivo celular.

Nuestros análisis filogenéticos y los obtenidos en las redes de haplotipos en *PopArt* revelaron que los serotipos DENV-1 y DENV-2 presentan múltiples eventos de introducción en México, con rutas principales provenientes de Brasil, Nicaragua y, en menor medida, de Estados Unidos. En el caso de DENV-3 los clados separados de las variantes previamente circulantes en América y las actuales sugiere un evento de reintroducción reciente lo que concuerda con la reemergencia actual que se presentó en 2024 y sigue presente en este 2025. Estos resultados coinciden con investigaciones anteriores (Hernández-García et al., 2020) que sugieren una reintroducción constante de este tipo DENV-3 en regiones hiperendémicas de América Latina. Sin embargo, la identificación de rutas adicionales, como la conexión con Estados Unidos, aporta nueva evidencia sobre el impacto del comercio y la migración en la dispersión del dengue.

En el caso de DENV-4 se identifican rutas de propagación principalmente desde Brasil, Paraguay, Venezuela, El Salvador y Guatemala, los cuales se caracterizan por ser países con climas mayormente tropicales, lo cual puede permitirle al virus permanecer mayormente en su ciclo selvático, pero teniendo presencia de casos en ciclo urbano y siendo el punto de origen de múltiples eventos de introducción como es el caso de México, Estados Unidos, Haití, etc., en donde cada vez los casos van en aumento.

Estos estudios nos permitirán seguir obteniendo datos epidemiológicos para identificar las rutas de introducción y dispersión de los tipos y genotipos del virus de dengue, y así orientar los esfuerzos de vigilancia en puntos críticos, como fronteras y aeropuertos o implementar estrategias como control de vector y seguir trabajando en nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas.

En cuanto a la reconstrucción de estados ancestrales realizada en este trabajo podemos inferir que los estados ancestrales más probables para DENV-1 y DENV-2 apuntan a Brasil y Nicaragua como los principales orígenes de las variantes circulantes en México y en los últimos años posibles variantes originarias de Estados Unidos, esto concuerda con la hiperendemia de estos tipos de DENV que se vive en América Latina. El DENV-4 presenta una mayor diversidad en los orígenes ancestrales, destacando la influencia combinada de Sudamérica y Centroamérica en áreas que son tropicales y subtropicales, lo cual podría confirmar las hipótesis acerca de una mayor prevalencia de este tipo de DENV en el ciclo selvático.

DENV-3 se encuentra en actual reemergencia, la identificación de la introducción del linaje actual proveniente de Estados Unidos como ancestro más cercano y su fuerte asociación con las secuencias provenientes de Asia sugiere que Estados Unidos fue el origen de toda la distribución de este linaje lo cual se refleja en lo mencionado por Sacchetto y cols., 2025, el brote de DENV-3 en la región del Caribe y Florida probablemente contribuyó a la propagación del virus a Brasil y a los demás países de América.

En este proyecto se describen las redes de haplotipos de genomas completos para los cuatro tipos del DENV, los resultados muestran que el DENV-1 presenta múltiples haplotipos conectados lo cual nos indica que ha sufrido una expansión y diversificación continua que se ve fuertemente relacionada con las secuencias de Sudamérica y

Centroamérica en los cuales el genotipo V es el predominante. DENV-2 muestra cuatro ramas principales, lo cual sugiere que hay múltiples linajes circulando en América provenientes del genotipo II-cosmopolita. El linaje más antiguo de DENV-2 en México provino de Sudamérica, pero las introducciones recientes pueden venir de Norteamérica y Centroamérica.

En el caso de DENV-3 se visualiza una distribución en tres grandes grupos lo cual sugiere que, en el caso de México, el virus ha llegado por múltiples rutas. Las variantes recientes de DENV-3 en México están más relacionadas con linajes de Estados Unidos y Sudamérica, mientras que el linaje previo (México 1) parece haber tenido una historia evolutiva más independiente en la región probablemente circuló de manera más localizada en la década pasada. DENV-4 por su parte, muestra conexiones con variantes de Sudamérica y Centroamérica, aunque la cantidad de haplotipos identificados es menor y esto puede deberse a su baja circulación y por ende muestreos insuficientes.

Esto nos sugiere que la diversidad genética de los cuatro tipos del DENV no es uniforme en México y se ve fuertemente influenciada por las introducciones del virus a nuestro territorio y posteriormente por el área de propagación del linaje en cuestión en el país. Por ejemplo, las zonas en México en donde se encuentran mayor cantidad de infecciones por DENV es en las costas de Guerrero, Tabasco, Veracruz y Chiapas, en este sentido se puede decir que la introducción es mediante el comercio que llega a los puertos de nuestro país y la alta distribución del mosquito en esas zonas (Rodríguez-Aguilar et al., 2022).

Como ocurre con casi todos los arbovirus y otros tipos de virus, la identificación de mutaciones en las que predominan los cambios sinónimos durante la evolución natural, específicamente, en el caso del DENV es la selección purificadora (selección contra la mayoría de las mutaciones, especialmente las que codifican cambios de aminoácidos) (Weaver & Vasilakis, 2009).

Se ha establecido que los arbovirus poseen altas tasas de evolución que se ven influenciada por su alta tasa de mutación, tiempos cortos de generación y alta cantidad de población viral que suelen mantener altos niveles de diversidad genética durante la transmisión por sus vectores artrópodos a pesar de las barreras anatómicas en el

mosquito que a menudo resultan en caídas severas de la población (cuellos de botella poblacionales). La necesidad de replicar exitosamente en dos hospederos tan diferentes como los mamíferos y los artrópodos impediría la fijación de mutaciones que, si bien podrían conferir ventajas en la replicación en uno de los hospederos, podrían resultar deletéreas en el otro. Esta selección negativa, también llamada purificadora, eliminaría las nuevas variantes de la población viral que tuvieran menor aptitud y mantendría estable la secuencia de su genoma (Lequime et al., 2016; del Angel R & Zárata S, 2020).

Yu & Cheng, 2022 mencionan que el DENV está sujeto a una selección purificadora masiva a medida que cambia entre vectores y huéspedes vertebrados por la alta cantidad de cuellos de botella que experimenta por la alta cantidad de brotes reemergentes.

La alta proporción de sitios bajo selección purificadora para todos los tipos de DENV en nuestros resultados refleja la importancia de conservar funciones esenciales en las proteínas virales, asegurando la viabilidad del virus y por ende se puede decir que esta diversidad genética presente en DENV ha revelado que la dinámica evolutiva a corto plazo se caracteriza por una rápida renovación de los genotipos y linajes que puede estar asociado a brotes sin precedentes y se ha asociado con manifestaciones más graves de dengue.

Gularte y cols. en 2023 reportaron un estudio enfocado en el DENV-1 genotipo V en Brasil en el cual identificaron 19 mutaciones no sinónimas exclusivas de este genotipo en donde se identificaron dos de las mutaciones detectadas en nuestro análisis, cuyas posiciones son N921G y K3140E, éstas podrían ser mutaciones conservadas entre cambios de linaje.

En el caso de DENV-2 no pudimos encontrar alguna posición que estuviera previamente asociada a diversificación, pero pudimos detectar que algunas de las secuencias pertenecientes al genotipo II-Cosmopolita, en este estudio, provienen de un linaje que presenta la mutación NS5 E520D en la posición nucleotídica 9035, la cual fue detectada en muestras de Veracruz en año 2012, lo cual podría ser un nuevo linaje que circuló en ese periodo y se ha convertido en una mutación diversificadora (Rodríguez-Aguilar et al., 2022). En dicho artículo se menciona que las mutaciones en las proteínas NS2A y NS5 se han asociado con un curso clínico severo de la enfermedad.

Tan y cols. En 2018 realizaron un estudio enfocado en la diversidad presente en cepas de DENV-3 genotipo III recuperadas en Malasia y de todo el mundo. En su análisis identificaron cinco variaciones de aminoácidos comunes en la que identificamos solamente a la posición NS5–820E en la posición nucleotídica 8292 que podría ser perteneciente a cepas ancestrales que circulaban hace 30 años. Dicha mutación la identificamos en algunas de nuestras secuencias pertenecientes a países de Asia y a secuencias de México 1 al igual que en nuestro análisis de FEL como una posición diversificadora.

Para DENV-4 varios investigadores mencionan mutaciones localizadas en la proteína E y NS5 en secuencias pertenecientes a Brasil (Ferreira et al., 2025; Cunha et al., 2022) pero ninguna de estas se asoció a nuestros resultados obtenidos en FEL o las pudimos identificar en nuestros alineamientos.

Las mutaciones en las regiones E y NS5, son las predominantes en nuestros resultados y podrían ser mutaciones silenciosas o estén relacionadas con una mayor eficiencia en la replicación viral o la evasión del sistema inmune al igual que un incremento en la virulencia. Sin embargo, es necesario considerar que NS5 es una polimerasa viral que está sometida a una enorme presión de selección, pero a diferencia de muchas proteínas estructurales, las enzimas no pueden cambiar demasiado para no comprometer sus funciones (Amir et al., 2021).

## Conclusiones y Perspectivas

Este estudio se centró en el análisis de secuencias de genoma completo para cada uno de los cuatro tipos del DENV mediante estudio filogeográfico, se determinaron patrones de dispersión del virus y sitios que se encuentran bajo selección natural.

Nuestros resultados respaldan el hecho de que las reemergencias de los cuatro tipos del DENV han sido mayormente de los tipos DENV-1 y DENV-2 lo que nos permite observar patrones de dispersión más diversos al igual que mayor cantidad de mutaciones que están asociadas a estos eventos de reemergencia subsecuentes, lo cual ha permitido que estos tipos del virus presenten gran diversidad genética por su presencia mundial y alta distribución igualmente encontrando mayor conexión entre haplotipos. La actual reemergencia de DENV-3 denota la introducción de un nuevo linaje circulante, el cual es el causante del brote actual, aunque su diversidad genética sea menor. El DENV-4 sigue siendo un caso difícil por su baja dispersión geográfica y su asociación principalmente al ciclo de transmisión selvático. Los resultados en conjunto nos demuestran que la evolución y dispersión del virus del dengue en México están influenciadas por múltiples factores, incluyendo eventos de introducción recurrentes como en el caso del DENV-1 y DENV-2, presiones de selección natural purificadora y la conectividad global como los viajes al extranjero, las importaciones-exportaciones, etc.; así como factores ambientales como el cambio climático, la sobrepoblación del vector portador.

Nuestros hallazgos resaltan procesos de diversificación del virus dentro de México, lo que indica la adaptación continua del virus a nuevas condiciones locales. Por todo lo anterior, es importante tomar en cuenta las recomendaciones de la OPS en las cuales se subraya la necesidad de adoptar un enfoque interdisciplinario para seguir comprendiendo y mitigando el impacto del dengue, integrando herramientas genómicas que permitan tener una mejora en la capacidad diagnóstica de los sistemas de salud, vigilancia epidemiológica, estrategias de control vectorial, desarrollo de posibles vacunas y asegurar la atención temprana y adecuada a los pacientes para prevenir complicaciones graves.

## Bibliografía

- Abeygoonawardena, H., Dassanayake, K., Kariyawasam, J., Chathuranga, T., Sundralingam, T., Gunasekara, H., Wevita, S., Premawansa, G., Premawansa, S., Wijewickrama, A., Wijesinghe, N., Navaratne, V., Weiskopf, D., Sette, A., Punchihewa, C., & De Silva, A. D. (2024). Identifying the strains of dengue circulating in the western province of Sri Lanka during 2019–2022. *PLOS Global Public Health*, 4(7), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0003150>
- Amir, M., Hussain, A., Asif, M., Ahmed, S., Alam, H., Moga, M. A., Cocuz, M. E., Marceanu, L., & Blidaru, A. (2021). Full-Length Genome and Partial Viral Genes Phylogenetic and Geographical Analysis of Dengue Serotype 3 Isolates. *Microorganisms*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020323>
- Bennett, S. N., Drummond, A. J., Kapan, D. D., Suchard, M. A., Muñoz-Jordán, J. L., Pybus, O. G., Holmes, E. C., & Gubler, D. J. (2010). Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 27(4), 811-818. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp285>
- Brathwaite Dick, O., San Martín, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584-593. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>
- CDC. (2024, octubre 1). *DENGUE- Areas con riesgo*. <https://www.cdc.gov/dengue/es/areas-with-risk/areas-con-riesgo-de-dengue.html>
- Cheng, D., Huang, S.-W., Chin, W.-X., Hung, S.-J., Tsai, H.-P., Chu, J. J. H., Chao, C.-H., & Wang, J.-R. (2022). Impact of Intrahost NS5 Nucleotide Variations on Dengue Virus Replication. *Frontiers in Microbiology*, 13, 894200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.894200>
- Cunha, M. S., de Moura Coletti, T., Guerra, J. M., Ponce, C. C., Fernandes, N. C. C. A., Rézio, R. A., Claro, I. M., Salles, F., Lima Neto, D. F., & Sabino, E. (2022). A fatal case of dengue hemorrhagic fever associated with dengue virus 4 (DENV-4) in Brazil: Genomic and histopathological findings. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 53(3), 1305-1312. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00784-4>

- del Angel, R. M., & Zárate, S. (2020, marzo). *Ciclo replicativo y evolución de los arbovirus*. 71(1), 16-23.
- Farooq, Q. U. A., Aiman, S., Ali, Y., Shaukat, Z., Ali, Y., Khan, A., Samad, A., Wadood, A., & Li, C. (2023). A comprehensive protein interaction map and druggability investigation prioritized dengue virus NS1 protein as promising therapeutic candidate. *PloS One*, 18(7), e0287905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287905>
- Ferreira, P. F., Machado, L. F. A., Cardoso, J. F., Filho, L. C. F., Lima, A. R. J., Santos, M. A. M. dos, Pereira, J. S., & Nunes, M. R. T. (2025). Reassessing the dengue virus type 4 in Brazil: Genomic sequencing and dispersion dynamics, 2011–2017. *Infection, Genetics and Evolution*, 129, 105731. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2025.105731>
- Francelino, E. de O., & Puccioni-Sohler, M. (2024). Dengue and severe dengue with neurological complications: A challenge for prevention and control. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 82(12), 1-6. <https://doi.org/10.1055/s-0044-1792091>
- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/v12080829>
- Hernández-García, E., Muñoz, M. de L., David, R. E., Pérez-Ramírez, G., Navarrete-Espinosa, J., Díaz-Badillo, Á., Domínguez-de-la-Cruz, E., Moreno-Galeana, M., & Brito-Carreón, C. A. (2020). Epidemiological implications of the genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104391. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104391>
- iO, F. (2023, diciembre). *Dengue*. <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/virus/dengue/>
- Ishikawa, S. A., Zhukova, A., Iwasaki, W., & Gascuel, O. (2019). A Fast Likelihood Method to Reconstruct and Visualize Ancestral Scenarios. *Molecular Biology and Evolution*, 36(9), 2069-2085. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz131>
- Kosakovsky Pond, S. L., & Frost, S. D. W. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1208-1222. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi105>

- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717-725. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8)
- Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, *30*(22), 3276-3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Leigh, JW, & Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*, *6*(9), 1110-1116.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Mo, L., Shi, J., Guo, X., Zeng, Z., Hu, N., Sun, J., Wu, M., Zhou, H., & Hu, Y. (2018). Molecular characterization and phylogenetic analysis of a dengue virus serotype 3 isolated from a Chinese traveler returned from Laos. *Virology Journal*, *15*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1016-5>
- N Sirisena, P. D. N., Mahilkar, S., Sharma, C., Jain, J., & Sunil, S. (2021). Concurrent dengue infections: Epidemiology & clinical implications. *The Indian Journal of Medical Research*, *154*(5), 669-679. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1219\\_18](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1219_18)
- Nunes, M. R. T., Faria, N. R., Vasconcelos, H. B., Medeiros, D. B. de A., Silva de Lima, C. P., Carvalho, V. L., Pinto da Silva, E. V., Cardoso, J. F., Sousa, E. C. J., Nunes, K. N. B., Rodrigues, S. G., Abecasis, A. B., Suchard, M. A., Lemey, P., & Vasconcelos, P. F. da C. (2012). Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(11), 1858-1864. <https://doi.org/10.3201/eid1811.120217>
- O'Connor, O., Ou, T. P., Aubry, F., Dabo, S., Russet, S., Girault, D., In, S., Minier, M., Lequime, S., Hoem, T., Boyer, S., Dussart, P., Pocquet, N., Burtet-Sarramegna, V., Lambrechts, L., Duong, V., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2021). Potential role of vector-mediated natural selection in dengue virus

genotype/lineage replacements in two epidemiologically contrasted settings. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 1346-1357. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1944789>

- OPS. (2018). *Dengue*. Dengue. <https://www.paho.org/es/temas/dengue#:~:text=Es%20una%20enfermedad%20f%20ebral%20que,en%20las%20articulaciones%2C%20y%20sarpullidos>.
- Rodríguez-Aguilar, E. D., Martínez-Barnetche, J., Juárez-Palma, L., Alvarado-Delgado, A., González-Bonilla, C. R., & Rodríguez, M. H. (2022). Genetic diversity and spatiotemporal dynamics of DENV-1 and DENV-2 infections during the 2012–2013 outbreak in Mexico. *Virology*, 573, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.06.011>
- Sacchetto, L., Bernardi, V., Brancini, M. L., Marques, B. de C., Negri, A., Vasilakis, N., Estofolete, C. F., & Nogueira, M. L. (2025). Early insights of dengue virus serotype 3 (DENV-3) re-emergence in São Paulo, Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 176, 105763. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2025.105763>
- Salles, T. S., da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E. S. L., Guimarães-Ribeiro, V., de Meneses, M. D. F., de Castro-Salles, P. F., Dos Santos, C. R., do Amaral Melo, A. C., Soares, M. R., Ferreira, D. F., & Moreira, M. F. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. *Parasites & Vectors*, 11(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2830-8>
- Solís Vidal, S. (2022). *CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS VIRUS ZIKA Y DENGUE OBTENIDAS DE MOSQUITOS AEDES AEDGYPTI*. UACM.
- Stica, C. J., Barrero, R. A., Murray, R. Z., Devine, G. J., Phillips, M. J., & Frentiu, F. D. (2022). Global Evolutionary History and Dynamics of Dengue Viruses Inferred from Whole Genome Sequences. *Viruses*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/v14040703>
- Tabachnick, W. J. (2016). Climate Change and the Arboviruses: Lessons from the Evolution of the Dengue and Yellow Fever Viruses. *Annual Review of Virology*, 3(1), 125-145. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-035630>

- Tan, K.-K., Zulkifle, N.-I., Sulaiman, S., Pang, S.-P., NorAmdan, N., MatRahim, N., Abd-Jamil, J., Shu, M.-H., Mahadi, N. M., & AbuBakar, S. (2018). Emergence of the Asian lineage dengue virus type 3 genotype III in Malaysia. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1175-4>
- van Leur, S. W., Heunis, T., Munnur, D., & Sanyal, S. (2021). Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, 12(1), 2814-2838. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: Estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15, 33-43.
- Wallau, G. L. (2023). Arbovirus researchers unite: Expanding genomic surveillance for an urgent global need. *The Lancet. Global Health*, 11(10), e1501-e1502. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00325-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00325-X)
- Weaver, S. C., Forrester, N. L., Liu, J., & Vasilakis, N. (2021). Population bottlenecks and founder effects: Implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), 184-195. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00482-8>
- Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(4), 523-540. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>
- Weaver, S., Shank, S. D., Spielman, S. J., Li, M., Muse, S. V., & Kosakovsky Pond, S. L. (2018). Datamonkey 2.0: A Modern Web Application for Characterizing Selective and Other Evolutionary Processes. *Molecular Biology and Evolution*, 35(3), 773-777. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx335>
- Yu, X., & Cheng, G. (2022). Contribution of phylogenetics to understanding the evolution and epidemiology of dengue virus. *Animal Models and Experimental Medicine*, 5(5), 410-417. <https://doi.org/10.1002/ame2.12283>

## Anexos

### Anexo. Script para la visualización del árbol filogenético en el software R con el paquete ggtree.

```
library(ggtree)

library(treeio)

library(ggplot2)

library(ggpubr)

library(ggnewscale)

addSmallLegend <- function(myPlot, pointSize = 1, textSize =8, spaceLegend = 0.5) { myPlot +
guides(shape = guide_legend(override.aes = list(size = pointSize)), color = guide_legend(override.aes =
list(size = pointSize))) + theme(legend.title = element_text(size = textSize), legend.text = element_text(size
= textSize), legend.key.size = unit(spaceLegend, "lines"))}

tree<-read.tree("archivo.fasta.timetree.nwk")

state<- read.csv('continent.tsv', sep ='\t', head = T)

state$Continent<- as.factor(state$Continent)

p1 <- ggtree(tree, size =0.5, color= "grey", as.Date=TRUE) + theme_tree2()

p1 <- p1%<+%state + geom_tippoint(aes(color=Continent))

p1
```

## Anexo. Script para el cambio de nombres a solamente 10 caracteres

```
import csv

def leer_tsv(nombre_archivo):
    nombres = {}

    with open(nombre_archivo, mode='r', newline="", encoding='utf-8') as archivo:
        lector = csv.reader(archivo, delimiter='\t')
        for fila in lector:
            if len(fila) == 2:
                nombre_completo, nombre_reducido = fila
                nombres[nombre_completo] = nombre_reducido

    return nombres

def reemplazar_nombres_fasta(nombre_archivo_fasta, nombres, nombre_archivo_salida):
    with open(nombre_archivo_fasta, 'r', encoding='utf-8') as archivo_fasta, \
        open(nombre_archivo_salida, 'w', encoding='utf-8') as archivo_salida:
        for linea in archivo_fasta:
            if linea.startswith('>'):
                nombre_completo = linea[1:].strip()
                nombre_reducido = nombres.get(nombre_completo, nombre_completo)
                archivo_salida.write(f'>{nombre_reducido}\n')
            else:
                archivo_salida.write(linea)

nombre_archivo_tsv = 'nombres.tsv'
nombre_archivo_fasta = 'secuencias.fasta'
nombre_archivo_salida = 'secuencias_modificadas.fasta'
nombres = leer_tsv(nombre_archivo_tsv)
reemplazar_nombres_fasta(nombre_archivo_fasta, nombres, nombre_archivo_salida)
print("Reemplazo de nombres completado.")
```

### Anexo. Script para visualizar por color y continente la red de haplotipos.

```
import sys
import string
state_list = []
seq_loc={}
infh = open(sys.argv[1])
line = infh.readline()
line= infh.readline()
while line:
    a = line[:-1].split('\t')
    seq_loc[a[7]] =a[1]
    if a[1] not in state_list:
        state_list.append(a[1])
    line =infh.readline()
infh.close()
out =""
for elem in state_list:
    out += ',' + elem
out += '\n'
for seq in seq_loc.keys():
    out += seq
    for elem in state_list:
        if elem == seq_loc[seq]:
            out += ',1'
        else:
            out += ',0'
    out += '\n'
outfh = open(sys.argv[2], 'w')
outfh.write(out)
outfh.close()
```