



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**GENOTIPIFICACIÓN CON LA PROTEÍNA DE
ENVOLTURA DEL DENV-1 Y 2 EN EL 2012 Y
2013, EN MÉXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

BYRON GALINDO ORNELAS



Asesor de Tesis:

M. en C. Daniel Duran Ayala



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. Introducción.

- Descripción de los serotipos (Historia).
- Sintomatología.
- Estructura, genoma y factores de virulencia.
- Patogénesis.
- Reinfecciones y cuadros graves.
- Genotipos DENV.
- Filogenia del virus.
- Casos reportados en el país.

2. Antecedentes.

3. Justificación.

4. Objetivos.

5. Material y Métodos.

- I) Selección de muestras.
- II) Tipificación de serotipo (RT-qPCR Fourplex).
- III) Obtención del fragmento a secuenciar (RT-PCR).
- IV) Secuenciación por técnica capilar (Método de Sanger).
- V) Genotipificación.

6. Resultados.

- I) Selección de muestras para RT-PCR y secuenciación (2012 y 2013).
- II) Verificación de serotipos.
- III) Productos de secuenciación (DENV-1 y 2).
- IV) Genotipificación.

7. Discusión.

8. Conclusiones.

9. Perspectivas.

10. Bibliografía.

11. Anexo

- Mapas de representatividad en la República Mexicana (DENV-1 y 2).
- Secuencias de referencia GenBank (Genotipificación).
- Filogenias realizadas con plataforma *Genome Detective*.

1. Introducción

Descripción de los serotipos (Historia)

El virus del dengue (DENV, acrónimo oficial), del género Flavivirus, familia Flaviviridae, está conformado por cuatro serotipos denominados DENV-1 a DENV-4. La descripción de estos como serotipos se originó a partir de la observación de la respuesta inmune del humano en infecciones secundarias, que responde totalmente contra la exposición a virus del mismo serotipo (virus homólogo), pero solo de forma parcial y transitoria contra la exposición a otro serotipo (virus de tipo heterólogo) (Sabin. 1952). Este hallazgo fue respaldado por experimentos de neutralización in vitro observando que cada tipo de DENV fue en promedio mejor neutralizado por antisueros homólogos de infección que por DENV heterólogos (Hammon. 1960). A pesar de que las causas de la diversificación de los cuatro serotipos de DENV aún no es clara (Twiddy et al. 2002a), se ha sugerido que los cuatro serotipos se originaron de pasos zoonóticos independientes hacia los humanos (Vasilakis et al. 2011). Lo cual ha generado la teoría de que los serotipos han logrado adaptarse al hospedero y, consecuentemente, han dejado pistas de un proceso evolutivo en su propio genoma, específicamente por una selección purificadora (Holmes, 2003, Zhang et al. 2006).

A pesar de que desde hace siglos se han reportado brotes con enfermedades clínicamente consistentes con DENV, no fue hasta 1943 en Japón y en 1945 en Hawái que se aislaron por primera vez los dos primeros virus dengue, nombrados DENV-1 y DENV-2 respectivamente (Hotta 1952). Hasta ese punto las epidemias de DENV se reportaron desde la India hasta las islas del pacífico. Posteriormente la transmisión de DENV siguió la distribución de su principal vector, el mosquito *Aedes aegypti* (Mousson et al. 2005), y fue rápidamente acelerada por la urbanización y la globalización (Weaver 2013).

El antecedente más antiguo de una enfermedad clínicamente parecida a la causada por DENV data de la dinastía Chin en China, entre el siglo III y V (Gubler. 1998). Estudios más recientes han comprobado lo anterior ya que el tiempo para el ancestro común más reciente (TMRCA) de los cuatro serotipos se estimó hace 1672 años, en el siglo IV (Costa et al. 2012). En cuanto al origen de los serotipos, se reconstruyó su punto geográfico ancestral y se determinó que todos comparten un origen asiático, sin embargo, para DENV-3 un posible origen americano es igual de parsimonioso que un origen asiático y a pesar de un supuesto origen africano del DENV, en ese continente solo se tiene el registro de ciclos selváticos de DENV-2, por otra parte, en Asia existen registros de ciclos selváticos para los cuatro serotipos (Vasilakis et al. 2011).

Sintomatología

Los cuatro serotipos circulan periódicamente en áreas endémicas ocasionando una sintomatología clínica variada que se puede presentar como dengue no grave (DNG), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG) (Gubler, 1998). Los principales síntomas de la enfermedad suelen aparecer alrededor de los 4 a 7 días después de la picadura de culícidos infectados pertenecientes al género *Aedes*, especies *aegypti* y *albopictus*, distribuidos actualmente en todos los países tropicales y subtropicales del mundo, lo que permite que circulen, cada vez con menos restricciones ecológicas (Tolle, 2009).

La infección puede cursar de forma asintomática (OMS. 2009) aunque la mayor parte cursa la infección con manifestaciones leves y solo un bajo porcentaje llega a presentar clínicas graves. El comienzo de las manifestaciones clínicas comienza con un cuadro febril que puede durar hasta 7 días, acompañado generalmente de malestar general, cefalea, dolor retro-ocular y mialgias, con menor frecuencia se presentan polialtralgias, y exantema pruriginoso. Los casos que evolucionan a formas graves presentan manifestaciones hemorrágicas, incremento del hematocrito causado por pérdida de plasma secundaria a un aumento de la permeabilidad vascular, presencia de derrames en serosas y shock hipovolémico (Dalrymple & Mackow 2012).

Por sus características clínicas la enfermedad puede dividirse en 3 diferentes etapas, la primera de ellas es la etapa febril (Figura 1) la cual dura aproximadamente 3 días y donde se encuentra el periodo de viremia (en el cual existe una alta posibilidad de transmisión de la enfermedad si la persona es picada por el vector) y es caracterizada por el aumento de fiebre la cual puede estar acompañada de dolor muscular, dolor articular, cefalea y astenia, y en menor frecuencia discreto dolor abdominal, náuseas, vomito, y diarrea (OPS. 2010). Posterior a esta etapa la mayoría de los pacientes mejoran, mientras que algunos de ellos pasan a una etapa crítica sintomática (Jaenisch et al. 2016).

La etapa crítica (Figura 1) se encuentra entre el 3er y 5to día, se produce principalmente la extravasación de plasma que puede llevar al shock hipovolémico, que generalmente es de rápida instalación y corta duración, sin embargo, también puede ser prolongado o recurrente. En estos casos la extravasación sanguínea mantenida lleva a una falla multiorgánica, con acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada que puede determinar hemorragias graves que empeoren el shock (Alexander et al. 2011). Sin diagnóstico oportuno y tratamiento óptimo, esta etapa puede tener una alta mortalidad.

La última etapa es la de recuperación o de convalecencia (Figura 1), generalmente se hace evidente la mejoría del paciente, sin embargo, pueden existir complicaciones que están dadas por un estado de sobrecarga de volumen (reposición intempestiva y reabsorción de líquidos)

así como por infección bacteriana agregada. También puede aparecer un exantema tardío que con frecuencia afecta las palmas y plantas asociado a un intenso prurito. Con menos frecuencia se puede presentar complicaciones neurológicas como meningitis linfomonocítica, síndrome de Guillain-Barré u otras polineuropatías (OPS. 2010).

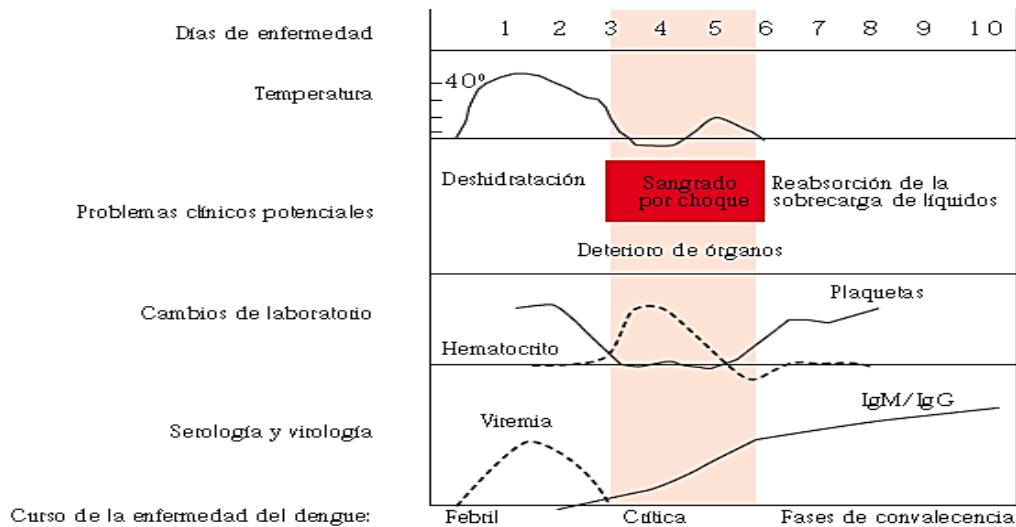


Figura 1. Curso de la enfermedad del dengue (Dengue, Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, OMS, 2009)

Estructura, genoma y factores de virulencia

A nivel estructural el virus presenta una cápside icosaédrica de 50 nm, la cual se encuentra envuelta por una membrana lipídica (obtenida de las células del huésped), sobre la cual se insertan las proteínas de membrana (*prM* y *M*) y de envoltura (*E*) (Figura 2).

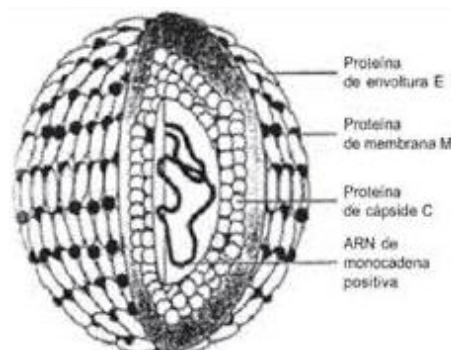


Figura 2. Representación de la estructura viral de DENV

En el interior del virus presenta un genoma viral (9-12 kb), el cual consiste en una única hebra de RNA de sentido positivo (+ssRNA), que codifica para un polipéptido único con 3 proteínas estructurales (C, prM y E) que harán parte de la partícula viral, 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) involucradas en el ensamblaje y replicación del RNA genómico. En ambos extremos se encuentran 2 regiones no codificantes (UTR) que están involucradas en procesos como síntesis de RNA, y presentan factores de virulencia que intervienen en la replicación del virus (Figura 3) (Lindenbach et al., 2007).

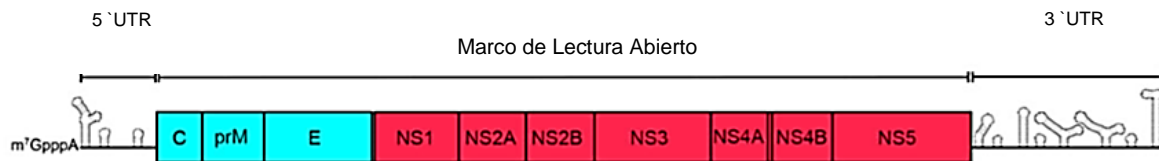


Figura 3. Esquematización del Genoma del DENV. Imagen tomada de (Barrows et al., 2018.)

UTR-5': En el extremo 5' se encuentra una región no codificante (UTR) constituida por aproximadamente 100 nucleótidos, esta secuencia se encuentra casi completamente conservada en los cuatro serotipos de DENV (Markoff 2003). Los elementos identificados en dicha región incluyen el bucle largo 5' A (5' SLA) y el bucle corto 5' B (5' SLB) en cual termina con el codón de inicio AUG (Brinton & Dispoto. 1988, Cahour et al. 19995). Estos elementos han sido involucrados en importantes procesos de replicación, traducción y patogénesis del virus, por ejemplo, el fragmento 5' SLA es necesario para el correcto posicionamiento de la RNA polimerasa antes de iniciar la síntesis de RNA (Filomatori et al. 2006).

Previos estudios de mutaciones de la región 5' UTR han demostrado que una simple mutación en la posición nucleotídica 69 de adenina a uracilo (correspondiente al punto medio entre las regiones 5' SLA y 5' SLB) contribuye a una menor tasa de mortalidad en ratones (Sirigulpanit et al. 2007), incluso se ha demostrado que exactamente la misma mutación es uno de los cambios que distingue el genotipo más virulento del sudeste asiático del genotipo americano (Leitmeyer et al. 1999), esto debido a los cambios estructurales en la estructura secundaria que dicha mutación ocasiona.

C: La proteína de la cápside contiene un dominio hidrofóbico interno altamente conservado entre los Flavivirus, el cual ha sido asociado al anclaje a la membrana del retículo endoplasmático. Esta interacción es esencial para el virus ya que facilita el ensamblaje y entrada al lumen del retículo endoplasmático del hospedero en forma de viriones (Zhu et al. 2007).

Su estructura secundaria consiste en cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 conforman el dominio mencionado anteriormente cuya función es el anclaje, la hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína se encuentra orientada hacia el citoplasma, los aminoácidos que la conforman son de carácter básico y se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboproteico o nucleocapside que protege al RNA viral de la degradación y promueve la organización viral del RNA en el interior de la partícula viral en formación (Schneemann 2006), finalmente la hélice 2 posee una naturaleza sumamente hidrofóbica, esta interviene en el ensamblaje de la ribonucleoproteína ya que actúa como una bisagra que favorece el acercamiento del RNA viral al resto de la proteína de la cápside anclada en la membrana del retículo endoplásmico (Samsa et al. 2005).

Dentro la región codificante para la proteína de la cápside se encuentra un bucle conocido como elemento de horquilla de la región codificante de la cápside (cHP), el cual mejora la selección de codones de inicio de traducción (Clyde et al. 2006). Estudios han demostrado que mutaciones en dicha región son salvadas por mutaciones espontáneas compensatorias que re estabilizan la estructura de la cHP. Una de estas mutaciones se encuentra en la posición nucleotídica 204, en esta posición, una Adenina se sustituye por una Guanina sin ningún cambio en la secuencia de aminoácidos resultante. Aunque se rescató la estructura de cHP, el clon infeccioso A204G retuvo un defecto en la replicación viral (Clyde et al. 2008).

prM/M: La proteína precursora de membrana (prM, presente en viriones inmaduros) y la proteína de membrana (M), participan fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. La prM es procesada después de la transducción por la proteína celular Furina, que la divide en dos y genera, por un lado, el péptido pr, y por otro, la proteína M (Lindenbach et al. 2007).

Después de que las proteínas requeridas para el ensamblaje del virus son traducidas, la prM forma heterodímeros intracelularmente con la proteína de Envoltura (E), esto antes de que las partículas virales inmaduras sean liberadas (Wang et al. 1999). El extremo C de la prM consiste en un dominio alfa hélice denominado (MH), seguido de dos dominios transmembranales (MT1 y MT2) (Hsieh et al. 2011). El papel de los residuos constitutivos de MH radica en el procesamiento de prM y M por parte de la Furina, en virus mutantes específicamente en esta región se ha encontrado que producen partículas semejantes al virus las cuales no son infecciosas (VLP's) (Zybert et al. 2008).

Estudios en la proteína M revelaron un aminoácido polar en la posición 39 de histidina, el cual es altamente conservado en la familia Flaviviridae, y que algunas variantes de DENV pueden generar sustituciones en esta posición, por arginina o glutamina, dando como resultado una

reducción de título viral y con ello la disminución de la replicación viral (Pryor et al. 2004), (Guirakhoo et al. 2001). Presenta un ectodominio de 40 aminoácidos (Lindenbach et al. 2007), en el cual se ha descrito la capacidad de inducir apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales, debido a los residuos 32 al 40 del dominio externo como causantes de la inducción apoptótica (este péptido se le conoce como ApoptoM) y su señal se induce solamente cuando este dominio es transportado por la ruta secretoria de la célula. Esto sugiere que ApoptoM podría estar involucrado en la muerte celular y el daño tisular sufrido durante una infección por DENV (Catteau et al. 2003).

E: Una de las proteínas estructurales de mayor importancia, tanto en la replicación del virus como en la interacción con el huésped, es la proteína de envoltura. Su importancia radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen la endocitosis del virus. Por lo tanto, las mutaciones y modificaciones posteriores a la transducción que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, pueden afectar directamente la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo del DENV, al igual que puede regular el establecimiento y el control de la infección por parte del sistema inmunitario (Stiasny & Heinz, 2006).

Diversos estudios enfocados en dicha proteína demuestran que está constituida de tres dominios (I, II y III) (Figura 4). El dominio I tiene la función de unir a los dominios II y III y está constituido principalmente de epitopes (porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario) no neutralizantes (Crill & Chang, 2005). Como unidad central, el dominio I estabiliza la orientación de la proteína de envoltura, de esta manera participa en los cambios conformacionales que esta sufre a lo largo de todo el proceso replicativo del virus (Tang et al., 2015). Además de esto, se ha demostrado en DENV y otros flavivirus que dicho dominio está implicado en la unión, virulencia y sensibilidad al pH (Hanna et al., 2005), ya que presenta glucosilaciones específicas (Asn67 y Asn153) (Cox et al., 2016).

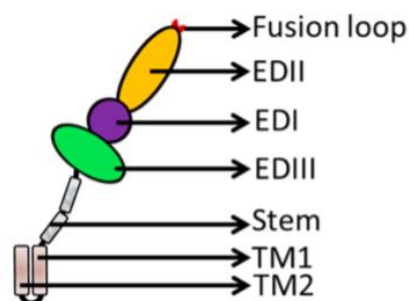


Figura 4. Estructura de la proteína E. Se conforma de: (EDI, morado; EDII, anaranjado; y EDIII, verde), dominios transmembranales (TMDs, café), los cuales están unidos al resto de la proteína por una región tipo tallo (gris). Imagen tomada de (Zhang et al. 2017)

El dominio II juega un papel fundamental en la fusión del virus, ya que contiene un péptido de fusión interno (FP) altamente conservado, este tiene interacciones directas con la membrana celular del huésped y es expuesto después de la eliminación del péptido pr de la forma inmadura de M (prM) (Fritz et al., 2011). Justamente en formas inmaduras del virus, prM bloquea el péptido de fusión durante el transporte celular, promoviendo una mayor internalización del virus (Roby et al., 2015).

El dominio III está constituido principalmente de epitopes neutralizantes, estos son los principales sitios de unión al receptor que asisten la entrada del virus a la célula hospedera (Roehrig et al., 2013). Las mutaciones en este dominio afectan el tropismo celular y la virulencia, ya que se ha demostrado que permiten al virus escapar de la neutralización del sistema inmune. Esto demuestra que el dominio III es de suma importancia en el ciclo replicativo del virus (Williams et al., 2012). Como se observa en la Figura 4, posterior a los tres dominios se encuentra una estructura tipo tallo que contiene dos dominios catiónicos anfipáticos transmembranales en forma de hélice denominados TM1 y TM2 (Chakraborty, 2016). Estos últimos son pieza clave en la estructura general de la proteína E del DENV y el general de los Flavivirus, ya que conforman la única estructura dentro de las diferentes clases de proteínas de fusión, que tiene un doble anclaje C-terminal a la membrana del virus derivado de una combinación especial de secuencias de señal de transferencia interna y de parada, necesarias para la clasificación y el procesamiento intracelular de la poliproteína flaviviral (Lindenbach et al. 2007).

Una vez que el virus ha entrado a la célula mediante endocitosis mediada por receptor, el bajo pH endosómico causa la exposición de los FP y posteriormente su inserción en la membrana del endosoma. Aunado a esto, ocurren cambios que implican la trimerización de E y la formación de su estructura “post-fusión”, que se caracteriza por adquirir una forma de horquilla, donde los FP y los dominios TM (TMD) migran hacia el mismo lado (Figura 5). Estos reordenamientos moleculares y las interacciones finalmente dan como resultado la apertura de un poro de fusión (Harrison. 2008, Kaufmann & Rossmann 2010) (Fritz et al. 2011).

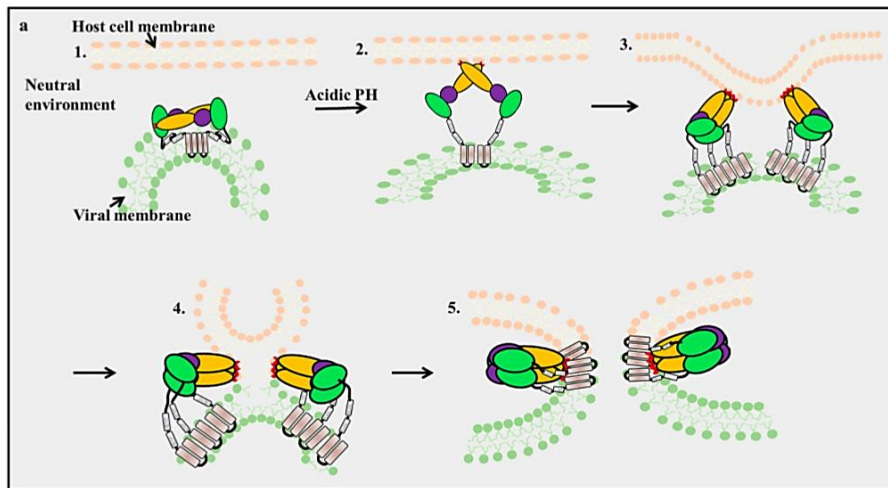


Figura 5. Cambios conformacionales de la proteína E durante el proceso de fusión. 1. En un ambiente neutro, los monómeros de la proteína E se dimerizan entre sí y se anclan a través del dominio transmembranal; 2. El loop de fusión (en rojo) es expuesto bajo condiciones de pH bajo y se une a la membrana del endosoma; 3. La proteína E se trimeriza; 4. La membrana viral y la membrana del endosoma se fusionan; 5. La proteína E adquiere su forma post-fusión. Imagen tomada de (Zhang et al. 2017)

NS1: Es una glicoproteína compuesta de cinco dominios transmembranales que se posicionan en el retículo endoplásmico (Winkler et al. 1988), también se encuentra en forma de dímeros o hexámeros en balsas lipídicas de la membrana plasmática (Noisakran et al. 2008), incluso se puede encontrar soluble en el citoplasma y espacio extracelular, ayudando de esta manera en procesos de evasión del sistema inmune (Xie et al. 2013). NS1 juega un papel fundamental en la replicación, localización del RNA viral y producción eficiente de partículas virales infectivas (Mackenzie et al. 1996).

En células infectadas, NS1 se une a la membrana de vesículas del retículo endoplásmico, en el lado interno de este se dimeriza, y se le unen carbohidratos con alto contenido de manosa, esto ayuda a anclar el complejo de replicación viral. El dímero NS1 contiene tres dominios; un pequeño dominio llamado *β-roll*, un dominio *Wing* y un dominio *β-ladder* (Akey et al. 2014). Se ha demostrado que sustituciones de alanina en estos dominios, alteran la producción de virus infecciosos, reducen la replicación de RNA, y disminuye la infectividad intra y extracelular. De esta manera se comprueba que NS1 es determinante en el ensamblaje del virus (Scaturro et al. 2015).

NS2A: Proteína no estructural que coordina de cierta forma no muy bien definida, si el RNA genómico se utiliza como plantilla para las formas replicativas o, se asocia dentro de la nucleocapside durante el ensamblaje viral (Lindenbach et al. 2007). De igual manera a la

proteína NS1, sustituciones de alanina en NS2A, implican afectaciones en: síntesis de RNA viral y reducción en el rendimiento del virus (Wu et al. 2017).

NS2B: Por otra parte, la proteína NS2B posee una región hidrofóbica que funciona como ancla, ya que une a la membrana del retículo endoplásmico al complejo NS2B/NS3 y otros componentes del complejo de replicación viral (dsRNA, NS1, y NS5). Un proceso proteolítico en dicho complejo da lugar a que se libere un pequeño dominio hidrofílico de NS2B, este, interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3, siendo así cofactor de esta (Bollati et al. 2010).

NS3: Posee dos dominios: la actividad proteasa (*tripsina like*) se encuentra en el extremo N-terminal y requiere la unión de NS2B ya que le confiere estabilidad durante su actividad proteolítica (Li et al. 2015), mientras que el dominio C-terminal de la NS3 posee diferentes actividades enzimáticas; la primera es una actividad de helicasa que presumiblemente desenrolla el dsRNA. La segunda es una actividad de trifosfatasa de nucleótidos, involucrada en el *capping* del RNA genómico recién sintetizado (Luo et al. 2015).

NS4A & NS4B: Se piensa que estas proteínas funcionan como un *scaffold* o proteína de andamiaje, esto en el complejo de replicación, y se propone que induce alteraciones en la membrana del retículo endoplasmático (Lee et al. 2015). Particularmente NS4A interactúa con la proteína celular Vimentina (proteína fibrosa que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular), regulando la formación de complejos replicativos (Teo & Chu 2014). NS4B interactúa directamente con el dominio con actividad helicasa de la proteína NS3, teniendo la capacidad de disociar a NS3 de la hebra de RNA, NS4B tiene un papel fundamental en la replicación viral (Umareddy et al. 2006). Por último, pero no menos importante, se sabe que ambas NS4A y NS4B pueden inducir la respuesta a proteínas desplegadas (*Unfolded Protein Response, UPR*) e inhibir la señalización de interferones (Ambrose & Mackenzie 2011).

NS5: La proteína más conservada en todos los Flavivirus, en su extremo N-terminal contiene un dominio metil-transferasa involucrado en la metilación del extremo 5' del RNA genómico (Liu et al. 2010). Este proceso es vital en la traducción a proteínas virales por parte de los ribosomas celulares (Ferron et al. 2012). Por otra parte, en su extremo C-terminal se encuentra la RNA polimerasa dependiente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*), RdRp. Estudios previos han demostrado que la ciclación del genoma en DENV es necesario para reubicar el complejo promotor-NS5 con la RdRp que está ubicada en el extremo 5' hacia el sitio de iniciación en el extremo 3' (Filomatori et al. 2006).

UTR-3': Esta región consta de alrededor 400 nucleótidos y carece de cola polyA (McMinn 1997). Mutaciones dentro de su estructura están relacionadas con una marcada reducción de

la traducción viral (Manzano et al. 2011). Referente a lo anterior, se ha relacionado el tamaño de las deleciones en su secuencia, con la propia infectividad del virus (Proutski et al. 1999).

En este punto es importante señalar que las secuencias no codificantes (UTR 3') de DENV y otros Flavivirus, tienen la tendencia de acumularse durante la infección, estas se conocen como RNA's subgenómicos de Flavivirus (sfRNAs), básicamente son el producto de una degradación incompleta de genoma viral por parte de exonucleasas propias del hospedero (Clarke et al. 2015). Se han podido identificar variantes de sfRNAs que se asocian preferentemente a líneas celulares del vector o del humano, lo interesante de esto es que dichas variantes pueden tener un papel importante en el *fitness* del virus, ya sea para mejorar su infectividad, virulencia, evasión inmune, etc. Incluso se puede hablar de competencia entre virus, dependiendo la variedad de sfRNA que expresen (Filomatori et al. 2017).

Patogénesis

Son distintos los factores involucrados en la patogénesis de infecciones por DENV, el tropismo celular y tisular probablemente tengan un mayor impacto sobre las infecciones, datos *in vitro* y autopsias sugieren que son tres sistemas/órganos los que juegan un papel importante en la patogénesis de los casos graves: el sistema inmune, el hígado, y las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos (Martina et al. 2009).

Durante el piquete de un mosquito infectado, el virus es inyectado directamente en el flujo sanguíneo e invariablemente en la epidermis y dermis dando como resultado la infección de células de Langerhans inmaduras y queratinocitos (Limon-Flores et al. 2005). Posteriormente las células infectadas migran del sitio de infección hacia los nódulos linfáticos, donde los monocitos y macrófagos han sido reclutados y se vuelven blancos de infección. Por consiguiente, la infección se amplifica y el virus se disemina por todo el sistema linfático, dando como resultado una viremia inicial principalmente en distintas células del linaje mononuclear, y en otras células como dendríticas mieloides (Boonnak et al 2008. Ho et al. 2004. Libraty et al. 2002), o macrófagos del vaso e hígado (Blackley et al. 2007. Jessie et al. 2004).

Siguiendo con la infección, las células mononucleares que han sido infectadas mueren predominantemente por apoptosis (Palmer et al. 2005), mientras que las Células dendríticas (DC) son estimuladas para producir la mayor parte de los mediadores inflamatorios (Bosch et al. 2002. Chen & Wang 2002) y hemostático (Choi et al. 2006. Esmon 2005. Huerta-Zepeda et al. 2008). En este aspecto, los factores que influyen la cantidad de células infectadas, y consecuentemente los niveles de viremia, pueden determinar la proporción de diferentes citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias, quimosinas, y otros mediadores, así como la forma en la que estas afectan el sistema hemostático (Durbin et al. 2008). Una vez establecida

la infección, las células expresan como primera defensa el IFN de tipo I (α y β), que busca inhibir la replicación viral. Posterior a la presentación de antígenos, células como las NK (natural killer) y linfocitos T liberan el IFN tipo II (γ), este fenómeno es responsable del control de la infección, ya que se establece un estado antiviral mediado por IFN que evita la replicación del virus en las células infectadas o la infección a nuevas células. Además, esta señalización puede inducir la apoptosis de células infectadas (Pang et al. 2007).

En pacientes con diagnóstico de dengue grave o no grave se detectan perfiles de citocinas tipo Th1 y Th2, en este último las citocinas IL-10 e IL-8 tienen un papel fundamental en el desarrollo de cuadros graves (Houghton et al. 2010). La IL-10 tiene propiedades reguladoras de citocinas pro-inflamatorias, y en los últimos años ha generado particular interés ya que su expresión en macrófagos juega un rol importante en la supresión inmune, debido a que inhibe la expresión de moléculas de superficie celular como MHC, resultando en una menor presentación de antígenos (Palmer et al. 2005). Por otra parte, la IL-8 se presenta en grandes concentraciones en suero y, en algunos casos, este incremento se asocia con el aumento de la permeabilidad vascular, la efusión pleural y la muerte de los pacientes (Srikiatkhachorn 2009).

Otro grupo de moléculas que se expresa en exceso, son ICAM-1 (moléculas de adhesión intercelulares), VCAM-1 (moléculas de adhesión vasculares), selectinas (P, E, y L), entre otras. Estas facilitan el reconocimiento, la unión y la posterior diapédesis de monocitos hacia los espacios intersticiales, esto permite, por un lado, la propagación del virus a otras células y tejidos y, por otro lado, el paso de líquido y mediadores solubles que estimulan procesos inflamatorios (Kou et al. 2008).

Es interesante remarcar que cuando una infección alcanza grados de severidad, el virus no se detecta más en sangre y, por lo tanto, las respuestas del hospedero podrían desempeñar un papel clave en la patogénesis (Mongkolsapaya et al. 2006). Estudios han evidenciado que la replicación de DENV ocurre en algunos órganos específicos, cuando la viremia ya no es detectable (Rosen et al. 1999). Dichos órganos en orden de frecuencia son hígado (Balsitis et al. 2009, de Macedo et al. 2006), bazo, riñón (Basilio-de-Oliveira et al. 2005, Jessie et al. 2004), pulmón (Guzmán et al. 1999), y cerebro (Miagostovich et al. 1997).

El hígado es comúnmente involucrado en infecciones por DENV y a pesar de que el daño hepático severo es poco común, se han asociado altos niveles de enzimas hepáticas con tendencias espontáneas de sangrado (de Souza et al. 2007, Kyle et al. 2007). Durante la infección, DENV se encuentra en proporciones significativas dentro de hepatocitos y células de Kupffer, lo interesante es que existe poca inflamación, indicando que la apoptosis y necrosis observada en estas células es inducida directamente por el virus, esto se observa de

igual manera con fiebre amarilla (Quaresma et al. 2007). Se ha propuesto que el daño hepático severo causado por este Arbovirus y otros virus hemorrágicos como el Ebola virus resulta en un decremento en la función hepática que se caracteriza por una disminución en la síntesis de factores de coagulación y el desarrollo de coagulopatías (Zampieri et al. 2007).

Las células endoteliales (EC) juegan un papel importante en la respuesta de coagulación en casos de inflamación sistémica severa. La integridad de las EC es regulada fisiológicamente por diversos factores, uno de ellos es el tropismo de DENV por EC, *in vivo* aún se mantiene controversial, sin embargo, estudios con biopsias de piel indican que la microvasculatura que se localiza en la zona dermal, es uno de principales sitios afectados en una infección (Sahaphong et al. 1980). Estudios *in vitro* han demostrado que los cuatro serotipos de DENV pueden replicarse activamente en EC (Huang et al. 2000), y la infección resulta en daños funcionales más que daños morfológicos, es por esto que, en los casos graves, el aumento de permeabilidad en la microvasculatura periférica se ve aumentada (Bethell et al. 2001). Es interesante mencionar que en casos de DG existe una apoptosis selectiva en la microvasculatura de tejidos pulmonares e intestinales, lo que provee una posible explicación a la profunda fuga de plasma en cavidades plurales y peritoneales (Limonta et al. 2007). En contraste a las células mononucleares, las EC no tienen en su superficie receptores Fc, esto es interesante ya que, por esta simple diferencia, la presencia de RNA viral en estas células se explica más por mecanismos de pinocitosis (Jessie et al. 2004), esto se debe a que la proteína NS1 del DENV se une preferentemente a EC de pulmones e hígado (Avirutnan et al. 2007), respecto a esto, también se ha propuesto que las respuestas de coagulación en cada órgano son diferentes (Rosenberg. 2001.).

Reinfecciones y cuadros graves.

El desarrollo de cuadros graves ha sido explicado por varias teorías, una de las más aceptadas y polémica, se denomina ADE (Antibody-dependent enhancement). Dicha teoría establece que los anticuerpos producidos y dirigidos contra el serotipo de DENV que causó la infección por primera vez, reconocen y forman complejos con un serotipo diferente causante de una segunda infección. Estos complejos virus-anticuerpo se unen a los monocitos y macrófagos mediante sus receptores Fc, de esta manera se favorece la penetración del virus e incrementa la proporción de células infectadas, así como la viremia (Oishi et al. 2007).

Halstead (principal autor de la teoría) y colaboradores observaron que las incidencias de los casos graves alcanzaron sus puntos máximos en dos poblaciones de niños; un punto ocurría en infantes (6 a 9 meses) que fueron infectados por un serotipo de DENV diferente al que había infectado a sus madres, aquí, la observación clave fue que se produjo una enfermedad grave en bebés para quienes los anticuerpos maternos habían disminuido a niveles bajos y

subneutralizantes (Halstead 1970). El otro punto máximo de incidencia ocurrió en niños que anteriormente experimentaron medianamente o subclínicamente una infección por DENV, y que posteriormente fueron infectados por un serotipo distinto. Estas observaciones abrieron paso a las conclusiones de Halstead y colaboradores, quienes postularon que infecciones subsecuentes en individuos previamente inmunizados con algún serotipo diferente podía exacerbar en lugar de mitigar la enfermedad (Halstead 1970). Sin embargo, la hipótesis que se establece con ADE no explica del todo la dinámica epidemiológica del DENV, por ejemplo, existen reportes de casos graves con manifestaciones hemorrágicas en pacientes infectados por primera vez. Esto implica que el desarrollo de dichas manifestaciones puede tener causas adicionales, como la edad de los pacientes (Hongsiriwon 2002), el sexo (Thomas et al. 2003), factores genéticos del individuo (Chao et al. 2008), incluso las diferencias genéticas dentro de cada serotipo y genotipo están relacionadas con la gravedad de la enfermedad (Kyle & Harris 2008).

Otro mecanismo que se ha asociado al desarrollo de dengue grave, es la lisis de las células endoteliales, mediada por complemento y dependiente de anticuerpos, especialmente aquellos dirigidos contra NS1, la activación del complemento altera la permeabilidad vascular, induce la disfunción del tejido y lisis de las células endoteliales (Noisakran et al. 2008). En pacientes con cuadros graves de la enfermedad cuando la fuga de plasma puede ser aparente, los niveles de los productos de activación C3a y C5a en el plasma son altos, lo cual está asociado a NS1 (Kurosu et al. 2007). La producción del complejo C5b-C9 podría desencadenar reacciones celulares y estimular la producción de citocinas inflamatorias que están asociadas con el desarrollo de dengue grave. Alternativamente, el complejo C5b-C9 podría desencadenar independientemente otros efectos locales y sistémicos, que pueden estar implicados en la coagulación intravascular. Esto es importante ya que algunas enzimas implicadas en la coagulación también pueden activar el sistema del complemento, ilustrando la interacción extensa que existe entre el complemento y el sistema de coagulación (Avirutnan et al. 2006).

Genotipos DENV

La primera evidencia de las diferencias genéticas dentro de un mismo serotipo se obtuvo de estudios con RNA "fingerprinting". Este método usa una enzima para degradar el RNA viral en segmentos, con el número y tamaño de los segmentos que varían según la secuencia viral completa, esta es una técnica topográfica relativamente cruda que no da resultados que sean directamente comparables entre las cepas. Los grupos resultantes de muestras virales se denominaron "topotipos", lo que refleja la topología bidimensional de los patrones de electroforesis de la cadena de RNA (Repik et al. 1983. Vezza et al. 1980).

Otro método, que utiliza un enfoque similar para degradar una copia de cDNA de la plantilla de RNA viral con endonucleasas, dio algo más de resolución, pero tampoco logró identificar las regiones del genoma en las que las secuencias diferían entre los virus. No fue hasta mediados de la década de 1980 que la secuenciación directa de regiones específicas del genoma hizo posible el estudio de muchos virus diferentes (Kerschner et al. 1986). Lo que ha quedado claro es que entre más información de secuencia exista, la información será de mayor calidad. A partir de la secuenciación de genomas completos la comprensión de la evolución y la virulencia del DENV ha aumentado dramáticamente, con ello controversias actuales se centran en cómo interpretar esta información en lugar de si los virus del dengue difieren en su potencial para causar enfermedades. La clasificación de los virus en grupos genéticos ("genotipos") (Figura 6) dentro de los serotipos cambia constantemente, a medida que mejoran los métodos de secuenciación y análisis evolutivo y se expande la base de datos disponible (Rico-Hesse 2003).

Los métodos para obtener secuencias de DENV ya no requieren un aislado de virus; de hecho, toda la secuencia del genoma se puede obtener mediante la amplificación enzimática de la plantilla de RNA viral en la muestra de sangre del paciente (Leitmeyer et al., 1999). Por lo tanto, la mayoría de las secuencias disponibles desde la década de 1990 hasta la fecha se generaron con la reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa (RT-PCR), que ha mejorado sustancialmente la calidad o la fidelidad de las secuencias disponibles en muchos laboratorios de todo el mundo. Desafortunadamente, no existe un enfoque uniforme para determinar qué secuencias se compararán entre las cepas; esto ha llevado a una gran cantidad de información disponible en la base de datos de secuencias (GenBank) para la cual no ha habido una interpretación sistemática (Rico-Hesse 2003).

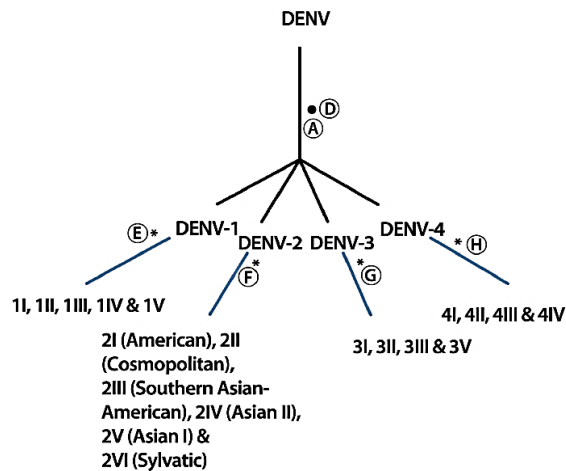


Figura 6. Evolutivamente se han agrupado de distinta manera a los cuatro serotipos del DENV, las filogenias varían dependiendo la proteína con la que se realizan y el método filogenético que se utilice. Imagen tomada de (Fonseca et al., 2019.)

De manera general se han descrito 19 genotipos de DENV (i.e. 1I, 1II, 1III, 1IV, 1V, 2I, 2II, 2III, 2IV, 2V, 2VI, 3I, 3II, 3III, 3V, 4I, 4II, 4III and 4IV) de acuerdo a la actual clasificación de DENV (Rico-Hesse, 1990. Klungthong et al., 2004). Las diferencias evolutivas se han descrito de manera similar, usando mapas de diferencias de aminoácidos entre las proteínas E, donde los cuatro serotipos se muestran compactos y segregados, ya que el número de sustituciones de aminoácidos entre tipos heterólogos excede por mucho la diferencia máxima dentro de un tipo (Katzelnick et. al. 2015).

Las clasificaciones de genotipos en DENV-1 se han basado en las secuencias de 240 nucleótidos de la unión E/NS1 (Rico-Hesse 1990), 180 nucleótidos de la proteína E (reconociendo tres genotipos) (Chungue et al., 1995), y la más reciente donde se analizó todo el genoma de la envoltura (Goncalvez et al., 2002) permitió la corrección de estudios previos. Además, los genotipos en dicha clasificación se denotan por sus orígenes geográficos aparentes (tabla 1), y no necesariamente por donde se han extendido desde su primera identificación.

Genotipos	Distribución Geográfica
I	Japón, Hawái (cepa prototipo), China, Taiwán y Sudeste asiático.
II	Tailandia
III	Malasia (Selvas)
IV	Naruru, Australia, Indonesia y Filipinas.
V	África, Sudeste asiático y América

Tabla 1. Clasificación de genotipos del DENV-1 de acuerdo a Goncalvez et al., 2002.

En el caso de DENV-2 numerosos métodos han sido desarrollados con el fin de detectar diferencias genéticas, desde análisis de antígeno comparando epitopes específicos usando anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína E, el mapeo de enzimas de restricción de cDNA, fingerprinting de RNA, hasta la secuenciación. Subsecuentes análisis y comparaciones con E, permitieron la propuesta de una clasificación robusta (tabla 2) (Lewis et al. 1993. Twiddy et al. 2002).

Genotipos	Distribución Geográfica
I Americano	América latina, cepas antiguas de la India.
II Cosmopolita	Australia, Islas del Pacífico e Indico, Sudeste asiático, India, Oriente Medio y África.
III Asiático/Americano	China, Vietnam, Tailandia y América latina.
IV Asiático II	China, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Vietnam, Nueva Guinea (cepa prototipo).
V Asiático I	Tailandia, Myanmar y Malasia.
VI Selvático	En primates no humanos en África y Malasia.

Tabla 2. Clasificación de genotipos del DENV-2 de acuerdo a Twiddy et al. 2002.

La interpretación de las filogenias que dan lugar a la clasificación del DENV-3 son particularmente complejas, esto debido a que las tasas de fijación parecen ser más bajas, es decir, hay menos distancia o divergencia entre los grupos genotípicos (Rico-Hesse 2003). El primer análisis filogenético de este virus requirió la comparación de toda la secuencia del gen E (Lanciotti et al. 1994), y se distinguieron cuatro genotipos (tabla 3). Esta clasificación se ha mantenido sin cambios.

Genotipos	Distribución Geográfica
I	Indonesia, Malasia, Tailandia, Birmania, Vietnam, cepa prototipo H87.
II	Tailandia, Vietnam y Bangladesh.
III	Singapur, Indonesia, Islas del Pacífico, Sri Lanka, India, África.
IV	Puerto Rico y la Polinesia Francesa.

Tabla 3. Clasificación de genotipos del DENV-3 de acuerdo a Lanciotti et al. 1994.

Introducido a América a través de Nicaragua en 1994, el genotipo III ahora se encuentra ampliamente disperso en Centro y Sur América y es considerado el más virulento de los cuatro genotipos de DENV-3 (Balmaseda et al. 1999. Messer et al. 2003).

El DENV-4 se clasifica en cuatro genotipos (tabla 4). Primero se identificaron los genotipos I y II basados en los estudios de la secuencia completa del gen E (Lanciotti et al. 1997), posteriormente se describió el genotipo III que solo se encuentra en Bangkok, Tailandia (Klungthong et al. 2004), el ultimo genotipo (selvático) se encuentra en primates no humanos en Malasia.

Genotipos	Distribución Geográfica
I	Malasia, Tailandia, Filipinas, Sri Lanka, cepa prototipo H241.
II	Indonesia, Malasia, Tahití, Islas del Caribe y las Américas.
III	Tailandia (Bangkok).
IV	En primates no humanos en Malasia.

Tabla 4. Clasificación de genotipos del DENV-4 de acuerdo a Lanciotti et al. 1997 & Klungthong et al. 2004.

El monitoreo de la diversidad de genotipos en una región geográfica específica es crucial para el entender la aparición y propagación de brotes, ambos aspectos son vitales para el desarrollo de estrategias efectivas de prevención y tratamiento. El DENV, así como otros Arbovirus son asociados a tasas de mortalidad y morbilidad que suponen una carga económica significativa para las regiones afectadas (Shepard et al., 2016). Además, la vigilancia genómica de epidemias en la resolución adecuada y la clasificación sistemática de las secuencias genéticas notificadas, también permite la identificación de cepas asociadas con un mayor potencial epidémico o gravedad de la enfermedad (Manokaran et al., 2015. Katzelnick et al., 2015).

Ciertos genotipos y clados de DENV han mostrado ser mayormente asociados a brotes severos de la enfermedad (Rico-Hesse 2010), los virus con mejor fitness (habilidad para replicarse mejor en un ambiente determinado (Domingo et al. 1996)) se cree que son más patogénicos en el hospedero (Rico-Hesse 2010). De acuerdo con este modelo en el que los virus con mayor fitness son más virulentos, los virus DENV-2 de origen asiático son capaces de una replicación in vitro más robusta en relación con los virus genotipos americanos de DENV-2 que son menos virulentos (Vasilakis et al. 2007).

Además, los virus DENV-2 asiáticos que se asocian con mayor frecuencia con enfermedades graves son menos sensibles que los virus DENV-2 del genotipo americano a la neutralización mediada por anticuerpos de individuos previamente infectados con DENV-1, lo que sugiere que las mutaciones pueden alterar el perfil de neutralización de ciertos genotipos DENV lo que puede conducir a un mayor fitness en relación con otras cepas del mismo serotipo (Kochel et al. 2002).

Para el caso particular de México, la vigilancia de genotipos ha establecido ciertos patrones de distribución y tendencias epidemiológicas que muestran los cuatro serotipos circulantes en el país. Después de realizar una revisión sistémica (2000-2013) basada en boletines epidemiológicos, bases de datos de referencia internacional, como lo son la OMS, PubMed, y datos propios de laboratorios Nacionales, se han podido identificar los genotipos mayormente establecidos en México. Los genotipos III y V del DENV-1 son predominantes, para el caso de DENV-2 el genotipo asiático/americano es el de mayor incidencia. El genotipo III del DENV-3 se ha mantenido constante en el país, por último, los análisis filogenéticos del DENV-4 revelaron la introducción y establecimiento del genotipo II (Ramos-Castañeda et al. 2017).

Los genotipos que circulan en México tienen el mismo origen evolutivo que aquellos que circular predominantemente en otras regiones de América Latina, (particularmente de aquellos países con los que México comparte fronteras), esto indica una difusión entre países que debe tenerse en cuenta porque aunque las regiones vecinas al radio de origen de un brote, pueden estar protegidas por inmunidad colectiva o protección cruzada de otros serotipos, la reintroducción de un serotipo particular o el reemplazo de genotipos después de un período de ausencia prolongada expondría a la población sin inmunidad al DENV (Dussart et al. 2006).

Además de dicha difusión entre países, la comprensión de la dinámica espacial y temporal de la transmisión del dengue, (diferencias en la velocidad de transmisión y expansión de los distintos genotipos), se sumarán al conocimiento de los patrones propios de cada país. Por otra parte, la apreciación de los mecanismos que aumentan la diversidad de los genotipos del DENV y la patogenicidad asociada con la variación genética mejorará la comprensión de los mecanismos que rigen el desarrollo de epidemias (Aviles et al. 2003).

Filogenia del virus

A medida que la secuenciación se ha vuelto una técnica más accesible, ha habido un aumento notable en el número de cepas de DENV que se han analizado. Esto ha llevado a un refinamiento en los análisis de la evolución del virus (por lo tanto, ahora hablamos de "Microevolución" del DENV), sin embargo, este avance también depende del desarrollo de métodos estadísticos para determinar las relaciones entre las secuencias. En la última década, los algoritmos informáticos utilizados en la generación de árboles filogenéticos o evolutivos han aumentado en número y complejidad (Lemmon & Milinkovitch 2002).

Este es un campo de investigación que evoluciona por sí solo, y la mayoría de los investigadores tienden a aplicar algoritmos que son útiles, compatibles con su computadora o que utilizan colegas cercanos. Por lo tanto, es difícil decir qué método filogenético es mejor a menos que uno haga varias comparaciones bajo supuestos de conjuntos de datos específicos (número de taxones, caracteres, enraizamiento, etc.). El consenso es que un gran número de

taxones (secuencias de virus), con cadenas de secuencia largas (es decir, un gen o más) sean analizadas por el método de máxima verosimilitud (ML), y con el soporte bootstrap (estadístico) para los patrones de ramificación (Lemmon & Milinkovitch 2002).

La selección de dominios o regiones del genoma para la comparación de secuencias es muy importante con respecto al resultado del análisis y los límites de interpretación. Cuando se utiliza el método de máxima parsimonia, es común indicar cuántos sitios informativos de parsimonia se incluyeron en el conjunto de datos; sin embargo, este enfoque no está disponible en ML y no quedan valores de arranque para apoyar los grupos monofiléticos o genotípicos después de estimar numerosos árboles (Rico-Hesse 1990).

Ha quedado claro que diferentes áreas del genoma del DENV evolucionan o arreglan mutaciones a diferentes velocidades y a veces exhiben "hot spots" de mayores tasas de mutación dentro de una región (por ejemplo, el gen E o la región UTR-3'). En general, cuando se usan secuencias lo suficientemente largas, los árboles generados a partir de diferentes regiones del genoma generalmente corresponden o se superponen, y las discrepancias ocurren solo cuando se intenta interpretar las ramas menores de los árboles (es decir, las agrupaciones de genotipos generalmente permanecen iguales) (Rico-Hesse 2003).

Debido a que la secuenciación de genoma completo no es accesible para todos los estudios filogenéticos, se han estudiado diversas proteínas estructurales y no estructurales que soporten confiablemente las filogenias que se realizan con ellas. En el caso particular de DENV, la proteína de envoltura, NS1, NS3 y NS5 tienen buen soporte filogenético en los cuatro serotipos del virus. Incluso las clasificaciones a nivel de genotipos que se realizan con regiones sub genómicas de la proteína de envoltura son similares a las clasificaciones que se obtienen usando el genoma completo del virus. Además, esta región contiene el mayor número de secuencias en bases de datos públicas, lo que permite un mayor número de análisis comparativos (Fonseca et al., 2019.).

En este momento, no se han determinado los mecanismos reales que rigen la selección natural de mutantes del DENV, los estudios se limitan a inferencias estadísticas de selección positiva o negativa en regiones o aminoácidos específicos del genoma (Twiddy et al. 2002a 2002b). Basta decir que estos mecanismos parecen influir en el uso de codones (Jenkins et al. 2001), plegamiento de ARN (Brinton & Dispoto 1988. Leitmeyer et al. 1999. Shi et al. 1996), o estructuras de proteínas del DENV y otros Flavivirus; es decir, existen limitaciones estructurales y funcionales para la plasticidad del virus.

Aunque los mecanismos evolutivos que rigen al DENV no se han esclarecido del todo, se han podido estimar, utilizando genes de la proteína de envoltura, las tasas de evolución molecular de cada serotipo, estas influyen directamente en la dinámica poblacional y epidemiológica del

DENV. Los serotipos 1 y 2 presentan una tasa de 7.5×10^{-4} s/s/y (sustituciones por sitio y por año), mientras que los serotipos 3 y 4 presentan tasas de 8.2×10^{-4} s/s/y y 7.8×10^{-4} s/s/y respectivamente (Costa et al. 2012).

Dichos cambios en el genoma de los distintos serotipos de DENV son suficientes para generar diversidad genética dentro de ellos y con esto la aparición en los cladogramas de variantes que tienen la capacidad de producir emergencias epidémicas. A nivel filogenético esto podría pasar desapercibido, sin embargo, el intervalo de tiempo entre la introducción de una variante “peligrosa” en una región y su posterior detección, podría ocasionar que dichas nuevas variantes del virus permanezcan sin ser detectadas hasta que el número de infecciones y/o incidencia de enfermedades alcance un umbral de detección lo suficientemente alto como para ser detectado por el sistema de vigilancia local (de Souza et al. 2011).

Referente a lo anterior, la permanencia o no de variantes, se puede traducir como extinción y generación de nuevos genotipos y/o linajes. Esto se asocia con brotes periódicos del DENV y posiblemente también con la gravedad y la fatalidad de la enfermedad. La causa y el efecto exactos de la virulencia viral y los cambios de linaje aún no se han demostrado, aunque la extinción de cepas anteriores y la aparición de nuevas cepas epidémicas sugieren un cuello de botella genético como causa de reemplazo regional. Una hipótesis para explicar la posible virulencia de los clados emergentes en la región es una capacidad mejorada para evitar la neutralización por los anticuerpos de reacción cruzada de los serotipos (Kochel et al. 2002).

Otra hipótesis postulada para explicar la generación de nuevos genotipos y/o linajes, así como la virulencia del virus es la competencia vectorial. Esta se ha probado directamente con la evolución del DENV, sin embargo, no se ha demostrado interacción alguna (Fansiri et al. 2016). Los genotipos con tasas altas de replicación son transmitidos preferentemente por los mosquitos cuando están en co-infección (Cologna et al. 2005), sin embargo, la replicación del DENV en mosquito resulta en una menor diversidad que en los humanos. Esto refleja la necesidad de estudios adicionales para evaluar si la selección dirigida por vectores de mosquitos juega un papel importante en la microevolución del DENV (Vasilakis et al. 2009).

Finalmente, la urgencia con la que se dan nuevos brotes y el tiempo de respuesta que deben de tener los laboratorios de diagnóstico a nivel internacional, hacen que el estudio detallado de todas las tendencias evolutivas del DENV parezca una meta difícil de lograr, esto aunado a que cada país tiene sus propias limitaciones económicas, técnicas, etc. Sin embargo, la secuenciación (parcial o completa) del genoma DENV, es importante para una clasificación filogenética más precisa y la correlación con el resultado clínico y la gravedad de la enfermedad (Aviles et al. 2003)

Casos reportados en el país

En México, los primeros reportes de dengue se registraron en 1941, cuando se notificaron 6,955 casos en toda la república. Posteriormente se reportaron pocos casos, hasta su desaparición en 1963 gracias a la campaña intensiva de erradicación del agente transmisor de la fiebre amarilla, *Ae. aegypti*, dirigida por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la cual mantuvo al dengue ausente durante 12 años (OPS 1997). Sin embargo, en 1978 se reintrodujo en México (Figura 7), donde aumentaron los casos a partir de 1980, lo que convirtió el dengue en uno de los problemas actuales más importantes de salud pública (Kourí, 2008).

A partir de su reintroducción, el dengue ha causado cuatro brotes epidémicos: el primero en 1980, en el cual se reportaron 51,406 casos y se detectó la circulación de DENV-1; el segundo en 1997, con 53,541 casos, de los cuales 980 correspondieron a DG, y donde se observó la circulación predominante de DENV-3; el tercero en 2007, con 52,369 casos, 9,433 de los cuales correspondieron a DG, y el cuarto en 2009, con 55,961 casos, de los cuales 11,396 correspondieron a DG (Torres et al. 2014).

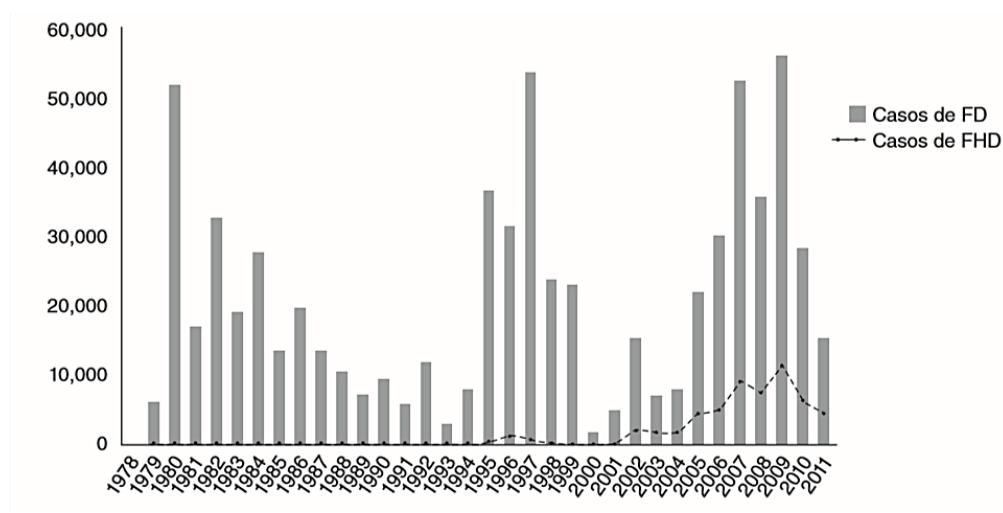


Figura 7. Total de casos de FD (DNG) y FHD (DG) en la República Mexicana reportados por la Secretaría de Salud del 1984-2011 (adaptado de Cenavece/Boletines Epidemiológicos 1984-2011). Imagen tomada de Torres et al. 2014.

La distribución del DENV en las dos décadas previas a los años de estudio del presente trabajo se mantuvo constante, observándose principalmente en las regiones del Pacífico y Golfo de México. En la década de 2000 a 2011 los estados con mayor incidencia fueron Colima, Nayarit, Guerrero, Veracruz, Campeche y Yucatán. Cabe resaltar que la década mencionada, la distribución de DENV por edades se desplazó hacia la población juvenil de 15

a 24 años, una década previa la tasa de incidencia más alta se encontraba en la población de 25 a 44 años (Torres et al. 2014).

Adicionalmente, durante la década (2000-2011) se detectaron tres cambios importantes en el patrón de la dinámica epidemiológica de DNG y DG en México: (i) un incremento en la incidencia de la enfermedad en la población juvenil y pediátrica, (ii) una mayor duración de los brotes durante el año y (iii) un aumento importante de la incidencia de DG a partir del año 2002 en niños y adultos (Torres et al. 2014).

2. Antecedentes

Una observación cada vez más común en estudios filogenéticos de DENV es la rotación de linaje. Esto toma dos formas. En primer lugar, la mayoría de los linajes virales muestreados desde un punto de tiempo particular no logran generar ningún linaje de descendencia, lo que da como resultado árboles filogenéticos con una fuerte topología temporal (tipo escalera) (Klungthong et al., 2004). Lo más probable es que estos linajes estén definidos por virus que contienen mutaciones deletéreas o levemente deletéreas que se eliminan mediante la selección purificadora (Holmes, 2003) y/o porque los virus completamente funcionales no se analizan en años posteriores debido a los cuellos de botella, tal vez debido a las fluctuaciones estacionales y espaciales en el tamaño y la densidad de la población de vectores (Scott et al., 2000).

Un segundo modo, más dramático de linaje, no coincide con el hecho de que una variante de virus que persistió en una localidad determinada durante varios años no es evidente en muestras posteriores, lo que indica que ha disminuido drásticamente en frecuencia, tal vez incluso que se haya extinguido, y en ocasiones es reemplazado por un nuevo clado de virus. Se han reportado varias ocurrencias de reemplazo de clado (una de las ramificaciones que se obtiene después de hacer un único corte en el árbol filogenético) tan dramático (Bennett et al., 2003), aunque los procesos evolutivos que controlan estos eventos siguen siendo inciertos. En particular, este patrón filogenético a gran escala podría reflejar la acción de cuellos de botella en la población o la selección natural, de tal manera que los clados con adecuación mejorada superan a los que son menos adecuados.

Twiddy y su grupo de trabajo, mostraron evidencia filogenética de evolución adaptativa en DENV, no se encontró evidencia de selección positiva en las posiciones de ciertos aminoácidos en DENV-1, sin embargo existe este tipo de selección en los otros serotipos, las presiones de selección que conducen a una adaptación evolutiva pueden ser muy variadas, sin embargo, los autores señalan que el complejo ciclo de vida del dengue (huéspedes vertebrados e invertebrados), influye enormemente en la fuerza de estas, lo que acelera los cambios a nivel genético en el virus dengue (Twiddy et al., 2002).

Por otra parte Nisalak y colaboradores, demostraron con un análisis retrospectivo de los años (1973-1999) en Tailandia, que los serotipos de DENV pueden diferir en virulencia intrínseca y capacidad epidémica, encontraron que DENV-3 estuvo asociado a los años con mayor número de casos de DG, sugiriendo que dicho serotipo puede poseer características virales diferentes, ocasionando una respuesta inmunológica diferente para cada cambio de serotipo, lo que resultan en grandes epidemias (Nisalak et al., 2003).

En 2005 Chunlin y su equipo, analizaron el intercambio de linajes de DENV en el periodo de 1974 a 2002 en Tailandia, encontraron que la diversidad genética dentro de DENV-1 alcanza su punto máximo en los momentos de alta prevalencia de este serotipo y que el reemplazo de clados se asocia con períodos de baja prevalencia. Por lo tanto, el pequeño pico en la prevalencia de DENV-1 durante la década de los 80`s se asocia con la co-circulación de los genotipos I y III y bajos niveles de DENV-4 (Chunlin et al., 2005).

Wearing y Rohani en 2006 estudiaron los factores inmunológicos que tienen influencia directa en la virulencia de genotipos de DENV y cómo es que pueden influir en los ciclos dinámicos de serotipos en una población, el efecto conocido como ADE (antibody dependent enhancement) presenta mayor interacción con dicha dinámica y se asumen dos posibles razones, la primera establece que el aumento en la susceptibilidad después de una infección primaria, puede incrementar la transmisión y prevalencia de serotipos, la segunda establece que la alta mortalidad por ADE en segundas infecciones, conduce a virulencias asimétricas para cada serotipo y las tasas de mortalidad que cada uno de ellos puede causar tendría un efecto directo en la dinámica de DENV (Wearing y Rohani, 2006).

Por su parte Harris y colaboradores, relacionaron la severidad de la enfermedad en niños causada por DENV-2, con la previa exposición a DENV-1, confirmando que la inmunidad a DENV-1 previa al cambio de serotipo a DENV-2 incremento la severidad de los casos en niños, esto mediante estudios retrospectivos en Nicaragua, además esto coincidió con el remplazo de linajes dentro del genotipo asiático americano en DENV-2, del linaje NI-1 al linaje NI-2B. Esto demuestra que la inmunidad específica para cada serotipo, así como la genética viral del virus dengue contribuyen en la dinámica y severidad de la enfermedad a lo largo del tiempo (Harris et al., 2011).

Una evidencia más de este intercambio de linajes fue descrita por Quiner, determinando el rol del mosquito en el intercambio de linajes de DENV-2 en Nicaragua, mediante cultivos celulares e infecciones directamente en el vector observaron que el linaje NI-2B presenta mayor tasa de replicación en *Ae. aegypti* en los primeros días de infección, además de un periodo extrínseco de incubación menor que el linaje co-circulante NI-1, lo que genera una ventaja evolutiva influenciada por diferencias genotípicas y aún más importante, se afirma con

mayor certeza, que el intercambio de genotipos en una población, puede ser factor causal de casos de enfermedad severa (Quiner et al., 2014).

VanBlargan en el 2013 y Wang en 2016, analizaron las diferencias genóticas de DENV-2 a nivel de la envoltura viral, encontraron que dichas diferencias alteran los epitopes expuestos en los viriones, lo que afecta su neutralización. Estos estudios dejan abierta la pregunta de porque las variantes genéticas de un virus como el dengue puede ocasionar un aumento en la fuerza de una epidemia y como es que esto deja a una población relativamente sin defensas (VanBlargan et al., 2013 y Wang et al., 2016).

Carrillo Valenzo y colaboradores en el 2010 examinaron algunos patrones evolutivos del DENV en México, de los cuales cabe resaltar la genotipificación retrospectiva (1980-2007), así como la introducción y desplazamiento de genotipos que da lugar al establecimiento de genotipos dominantes en el país. En su genotipificación, para el serotipo DENV-1 el genotipo predominante es el III, mientras que para DENV-2, el genotipo predominante es el Asiático/Americano. En ambos serotipos la introducción de genotipos esta escalonada en tiempo, por lo tanto, es indicativo de una tendencia evolutiva hacia el desplazamiento de genotipos (Carrillo-Valenzo et al. 2010).

Ramos Castañeda y colaboradores en el 2017 realizaron una revisión sistemática de tendencias epidemiológicas moleculares del DENV en Latino América, abarcaron el periodo del 2000 al 2013. En esta, describen para la región de México la circulación de los genotipos III y V del serotipo DENV-1, los cuales están cercanamente relacionados con cepas de El Salvador y Nicaragua. Por otra parte, para el serotipo DENV-2 el genotipo mayormente establecido en la región, es el Asiático/Americano, incluyendo por lo menos la co-circulación de dos linajes diferentes (Ramos-Castañeda et al. 2017).

Considerando la relación que tiene la diversidad antigénica en la proteína de envoltura del virus Dengue con la inmunología propia del ser humano, se ha descrito mediante análisis de incidencias en poblaciones endémicas, que las segundas infecciones con serotipos diferentes son una causa importante en los periodos de fluctuación entre cada serotipo e incluso modifican los patrones filogenéticos dentro de cada región geográfica a lo largo de un periodo de tiempo (OhAinle et al., 2011).

Un enfoque consistente para la genotipificación ayudaría a las comparaciones entre estudios. Una clara limitación se relaciona con la definición del "genotipo" dentro de los serotipos de DENV, esto debido a la dependencia de la región genómica seleccionada y la longitud del RNA analizado. Se sabe que la región genómica afecta la sensibilidad cuando se analiza una región parcial, generalmente corta, del genoma (por ejemplo, la proteína E, NS1 o algún dominio del gen de E), sin embargo, el número de genotipos es igual o ligeramente menor

que el resultado del análisis del gen total de E o la secuencia completa del genoma (Chen & Vasilkis 2011).

Con ello, en el año 2016, la Organización Panamericana de la Salud junto con CDC (centros para el control y prevención de enfermedades, sección de Dengue) generaron un protocolo para la genotipificación del DENV en las Américas, denominado proyecto ViGenDA, el cual consiste en la secuenciación de la región que codifica la proteína de envoltura para una posterior genotipificación haciendo uso de herramientas bioinformáticas (Muñoz-Jordán et al., 2016).

3. Justificación

La vigilancia de la circulación de diferentes serotipos, genotipos y linajes de DENV dentro de una misma zona, es de vital importancia ya que se ha demostrado evolutivamente, que los diferentes linajes dentro de un mismo serotipo, generalmente presentan estructuras geográficas características que reflejan la dinámica espacial de las epidemias (Holmes, 2008). En la última década, en México se han detectado brotes con potencial epidémico relevante, en el año 2012 el número de casos confirmados fue de 165,749 de los cuales un 10.7 % eran DG, en el 2013, aumentaron llegando a 231,498 casos confirmados y un 8.0 % eran DG, en ambos años circulaban predominantemente DENV-1 y 2 (Plataforma de Información en Salud para las Américas. PLISA, 2018).

4. Objetivos

El objetivo general del presente estudio es un análisis filogenético comparativo de los serotipos 1 y 2 del virus dengue en años previos a la introducción de nuevos Arbovirus en México, dada la existencia de características multifactoriales que sirven como modelos de análisis para explicar la dinámica epidemiológica del dengue enfocada al problema de severidad que se presenta cuando ocurre un cambio de serotipos (1 y 2), la diversidad genética es un marcador importante.

Para llegar a interpretar un marcador genético que sirva como un modelo de análisis, se realizaron los siguientes objetivos particulares:

- Identificación de muestras de los años 2012 y 2013 con resultado positivo a DENV-1 o DENV-2.
- Selección de muestras a partir de la técnica RT-qPCR para confirmación de serotipo, con resultados de Cq menores a 20.
- A partir de las muestras con características deseadas, amplificar la región de la proteína de Envoltura del DENV mediante RT-PCR (Protocolo ViGenDA).
- Secuenciar por técnica capilar los amplificadores obtenidos en la RT-PCR.

- Analizar y verificar las secuencias obtenidas para la obtención de un análisis filogenético comparativo.

5. Material y Métodos.

Diagrama de flujo

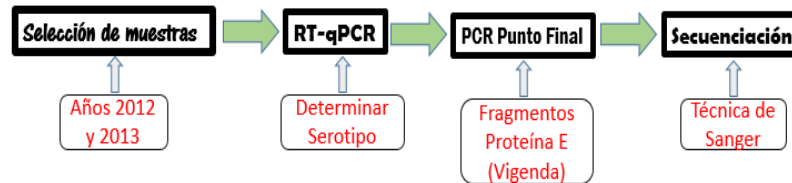


Figura 8. Diagrama de flujo general del proyecto.

I) Selección de muestras

Se analizaron muestras del banco de extractos de Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) de los años 2012 y 2013. Criterios de inclusión: se buscaron muestras positivas a DENV en fase aguda con un $cq < 20$ (valor derivado de datos de fluorescencia en la curva de amplificación en una RT-qPCR, es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra sobrepasa el umbral o línea base), sin contaminación, con volúmenes mayores a 20 μ l de extracto.

II) Tipificación de Serotipo

Para confirmar el serotipo de las muestras, se realizó RT-qPCR Fourplex bajo el protocolo de (Santiago et al., 2013) utilizando sondas TaqMan marcadas con los siguientes fluoróforos: 5'-FAM DENV-1 BHQ1-3', 5'-HEX DENV-2 BHQ1-3', 5'-TR DENV-3 BHQ2-3' y 5'-Cy5 DENV-4 BHQ3-3', en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.

III) Obtención del Fragmento a Secuenciar

Una vez seleccionadas las muestras, la región del genoma que codifica para la glicoproteína de envoltura "E" (1,485 pb) se amplificó mediante RT-PCR para cada serotipo con los primers señalados en el protocolo ViGenDA, en un C1000 Touch™ Thermal Cycler con cabezal para punto final. Las secuencias constaron de 8 fragmentos (prM, M, E y NS1), con una concentración de 20-40 ng/ μ l de producto de amplificación. Para verificar el tamaño de los productos de amplificación mediante RT-PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizó con gel RED, posteriormente se analizó la concentración con un bioanalizador AGILENT 2100.

IV) Secuenciación por técnica capilar

La secuenciación capilar se llevó a cabo en el departamento de Biología Molecular del InDRE, en donde utilizaron los primers señalados para los serotipos DENV-1 y 2 en el protocolo

ViGenDA. Las secuencias obtenidas se analizaron y ensamblaron con los programas BioEdit v7.1.3. y ClustalX 2.1.

V) Genotipificación

La construcción de los arboles filogenéticos se realizó con el programa MEGA 6. 06 bajo el método Maximum Likelihood, con 1000 repeticiones (bootstrap) como soporte filogenético. Con las secuencias obtenidas se invocaron BLAST (NCBI) para verificar que estas tuvieran homología con secuencias de referencia de los años del estudio.

6. Resultados.

I) Selección de muestras para RT-PCR y Secuenciación (2012 y 2013).

Con base en los criterios de inclusión, se seleccionaron 100 muestras correspondientes a DENV-1 y 2 de los años 2012 y 2013, de varios estados de la república mexicana, con un rango de temporalidad anual de febrero a noviembre (tabla 5).

II) Verificación de Serotipos

Una vez seleccionadas las muestras se realizó un RT-qPCR para determinación de serotipo y corroboración de material genético. Solo 12 muestras presentaron gráficos de amplificación correspondientes a DENV-1 y DENV-2 (Figura 9) con valores de cq menores a 20 (tabla 5)

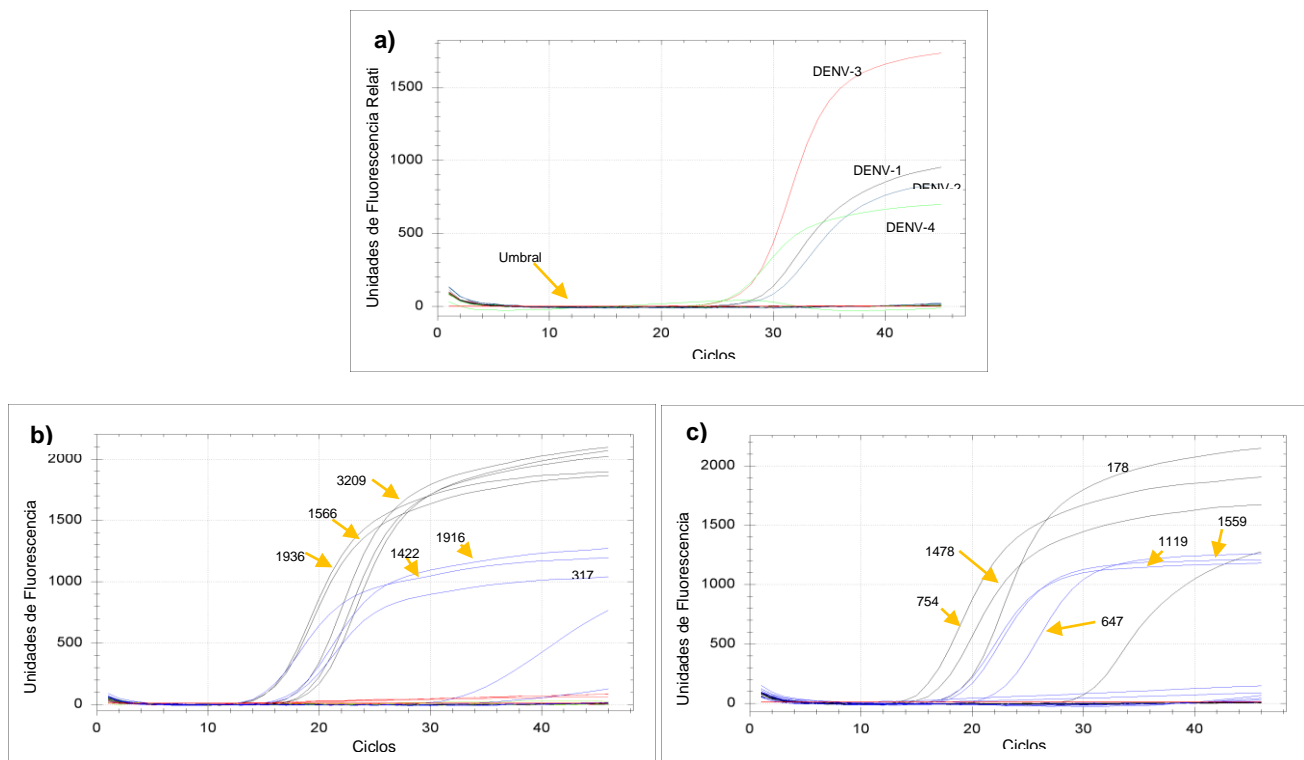


Figura 9. Curvas de amplificación RT-qPCR. **a)** controles positivos a DENV. El umbral de fluorescencia se ajustó en escala logarítmica a 10^{-1} . **b)** muestras 2012. **c)** muestras 2013.

#InDRE	Clave ViGenDA	F. toma	Estado	Localidad	Serotipo	Cq
1566	VIG-09/19	2.7.12	CAMP	Escárcega	DENV-1	12.79
1936	VIG-11/19	8.8.12	VER	Veracruz	DENV-1	11.83
3209	VIG-13/19	28.11.12	OAX	Fresnillo T.	DENV-1	17.62
178	VIG-14/19	11.2.13	QROO	Benito Juar.	DENV-1	17.70
754	VIG-16/19	29.7.13	VER	Panuco	DENV-1	14.33
1478	VIG-18/19	3.10.13	COAH	Acuña	DENV-1	13.80
1422	VIG-08/19	1.7.12	CHIS	Tapachula	DENV-2	14.94
1916	VIG-10/19	7.8.12	VER	Veracruz	DENV-2	15.13
3176	VIG-12/19	15.11.12	BCS	La Paz	DENV-2	17.53
647	VIG-15/19	4.7.13	TAB	Centro	DENV-2	19.70
1119	VIG-17/19	29.8.13	OAX	Oax.de Juar.	DENV-2	14.98
1559	VIG-19/19	7.10.13	JAL	Puerto Vall.	DENV-2	15.64

Tabla 5. Datos generales de las muestras seleccionadas para dicho estudio. La representatividad de las muestras en la república mexicana se puede observar en los mapas 1 y 2 del Anexo.

III) Productos de secuenciación (DENV-1 y 2).

Los productos obtenidos del protocolo ViGenDA se verificaron mediante un gel de agarosa al 2% (Figura 10a). El tamaño esperado para DENV-1 es 1743 pb y para DENV-2 es 1525 pb. Debido a que en el gel de agarosa todas las bandas son muy similares en intensidad y tamaño, se infirió que presentaban concentraciones similares a la muestra 1478 la cual fue cuantificada con un Bioanalizador AGILENT 2100 (Figura 10b), obteniendo valores de concentración y pureza idónea para secuenciar.

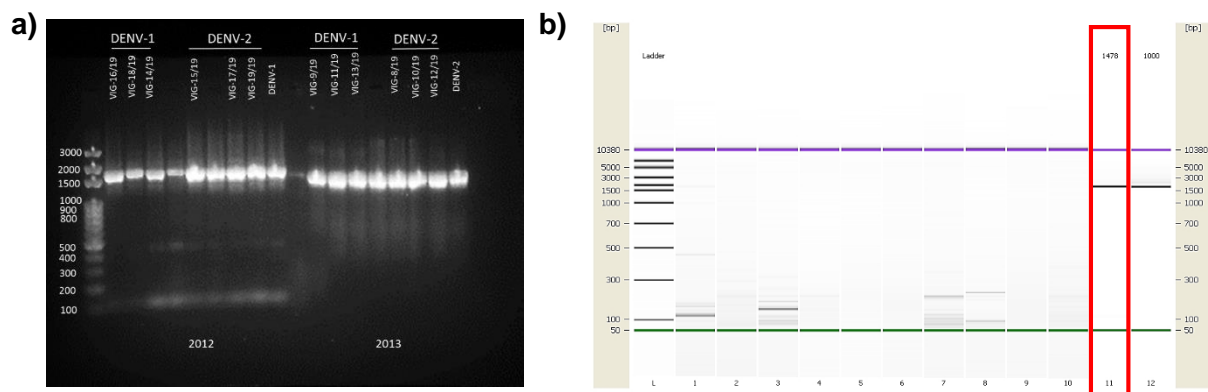


Figura 10. a) Gel de Agarosa al 2%. Muestras entre 1500 y 2000 pb. **b)** Muestra 1478 (VIG-18/19) con un tamaño de 1870 pb y una concentración de 43.62 ng/ μ l. La muestra 1000 corresponde al control positivo de DENV-1.

IV) Genotipificación

Una vez concluido el proceso de secuenciación capilar, se analizaron los electroferogramas de cada una de las muestras y posterior al ensamblaje de estas, se invocaron BLAST para la verificación de la homología con el gen de interés del DENV (Figura 11).

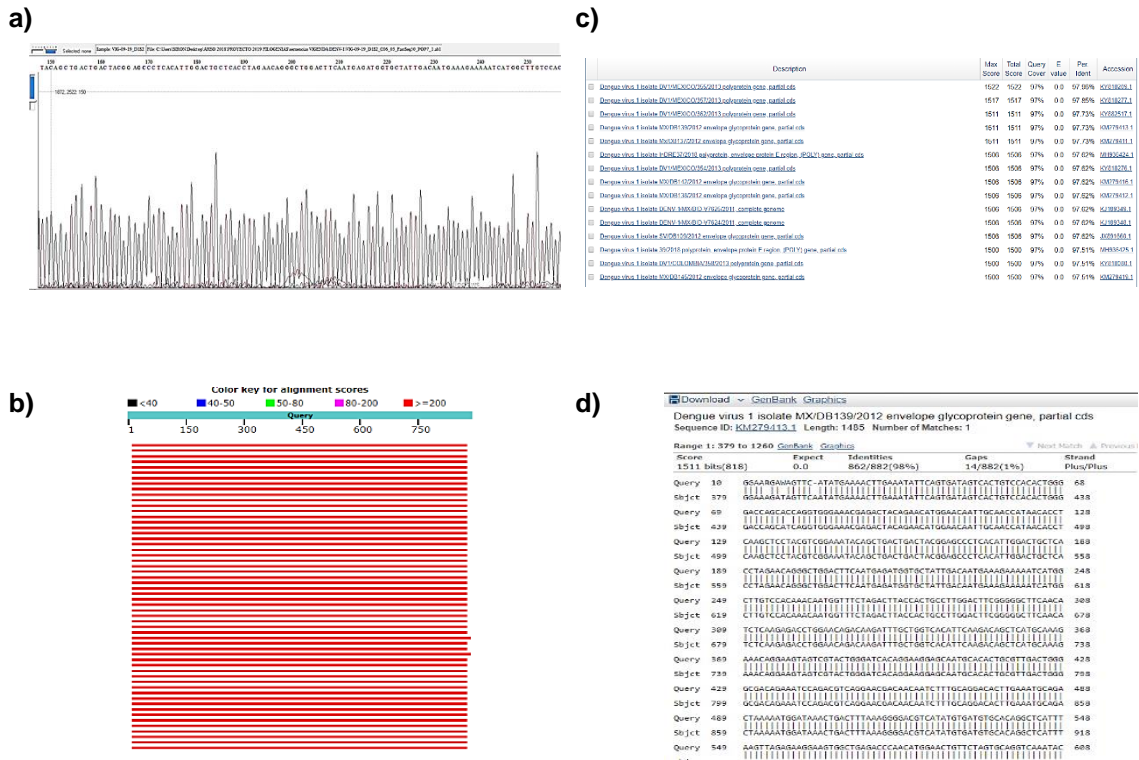


Figura 11. a) Interfaz de BioEdit (visualización y limpieza de secuencia ejemplo: VIG-09). Interfaces web BLAST/NCBI. **b)** Distribución de los 100 mejores éxitos de homologías, puntuaciones de alineamientos mayores a 200. **c)** Secuencias con las que la muestra ejemplo produce alineaciones significativas. **d)** Alineamiento con secuencia de envoltura DENV-1 (KM279413.1) identidad del 98%, gaps 1%.

La genotipificación para muestras DENV-1 (Figura 12) y DENV-2 (Figura 13) se llevó a cabo comparando las secuencias obtenidas con secuencias de referencia de diferentes años descargadas del GenBank (Anexo), las cuales ya se conocía su genotipo, por medio del programa MEGA 6. 06. Método Maximum Likelihood.

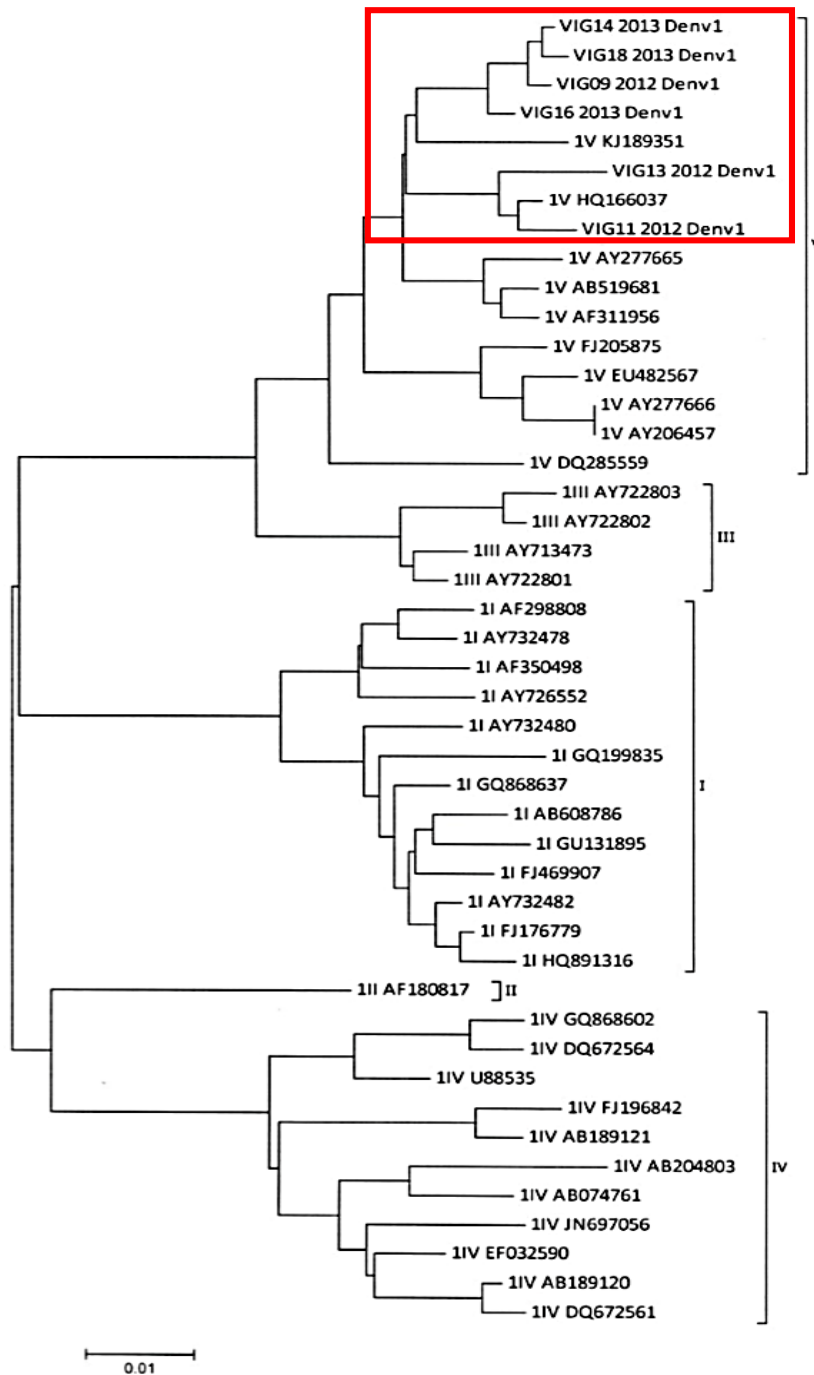


Figura 12. Árbol filogenético (proteína “E”-DENV-1). Las muestras del presente estudio están en el clado correspondiente al genotipo V. Las diferencias a nivel de envoltura corresponden a 0.01 cambios de nucleótido por posición.

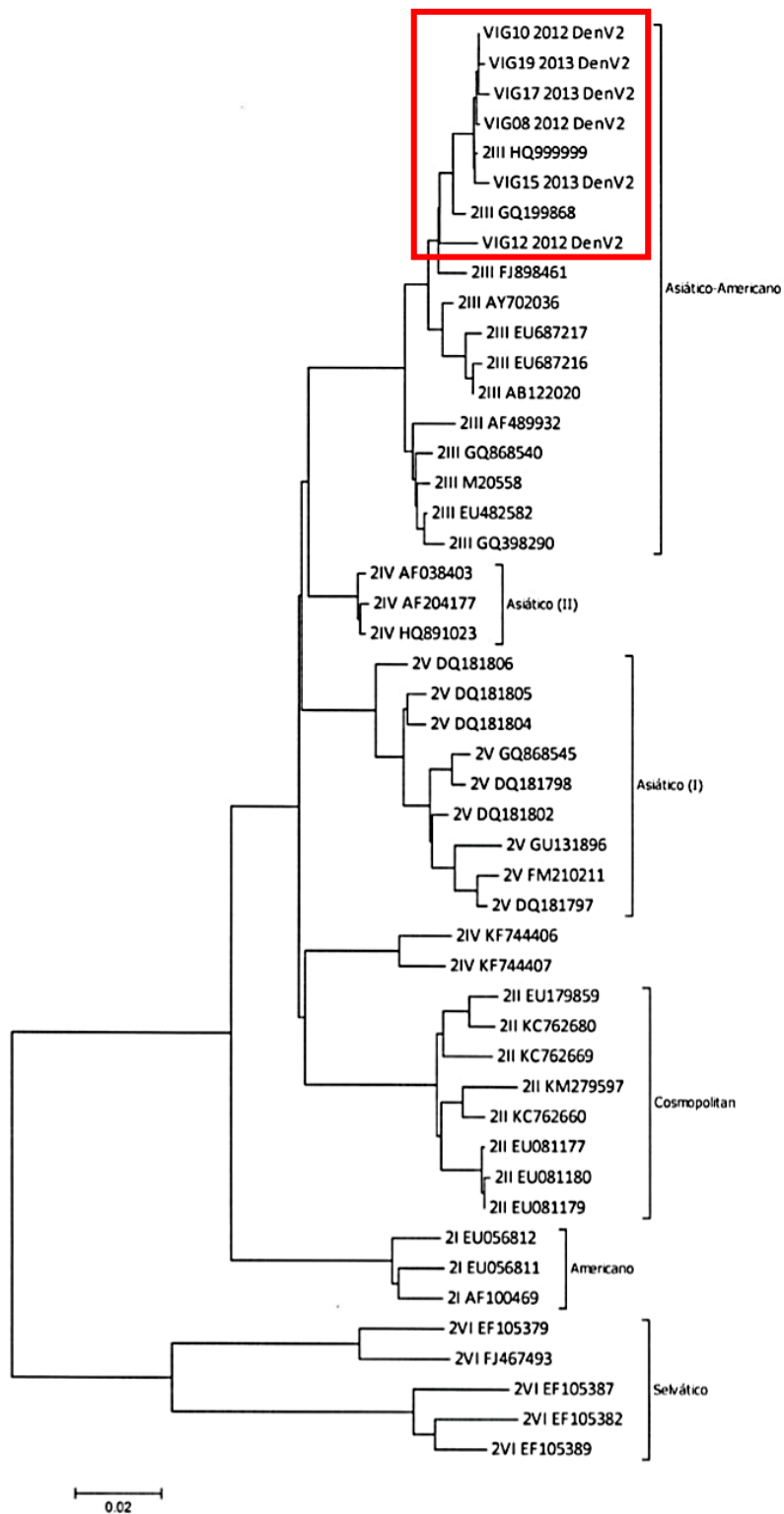


Figura 13. Árbol filogenético (proteína “E”-DENV-2). Las muestras del presente estudio están en el clado correspondiente al genotipo Asiático-Americano. Las diferencias a nivel de envoltura corresponden a 0.02 cambios de nucleótido por posición.

Con el objetivo de profundizar en la variación existente, se llevó a cabo una comparación del fragmento de secuenciación con mayor calidad obtenida (fragmento 2, primeras 500 pb) de cada una de las muestras, con secuencias de la proteína de envoltura descargada del GenBank (Anexo) exclusivas de los años de estudio para el DENV-1 genotipo V y DENV-2 genotipo asiático/americano, las cuales se fragmentaron en la misma posición y longitud que las muestras a estudiar con el programa BioEdit v7.1.3. Como resultado se generaron arboles consenso de 1000 repeticiones bootstrap como soporte filogenético (Figura 14 y Figura 15).

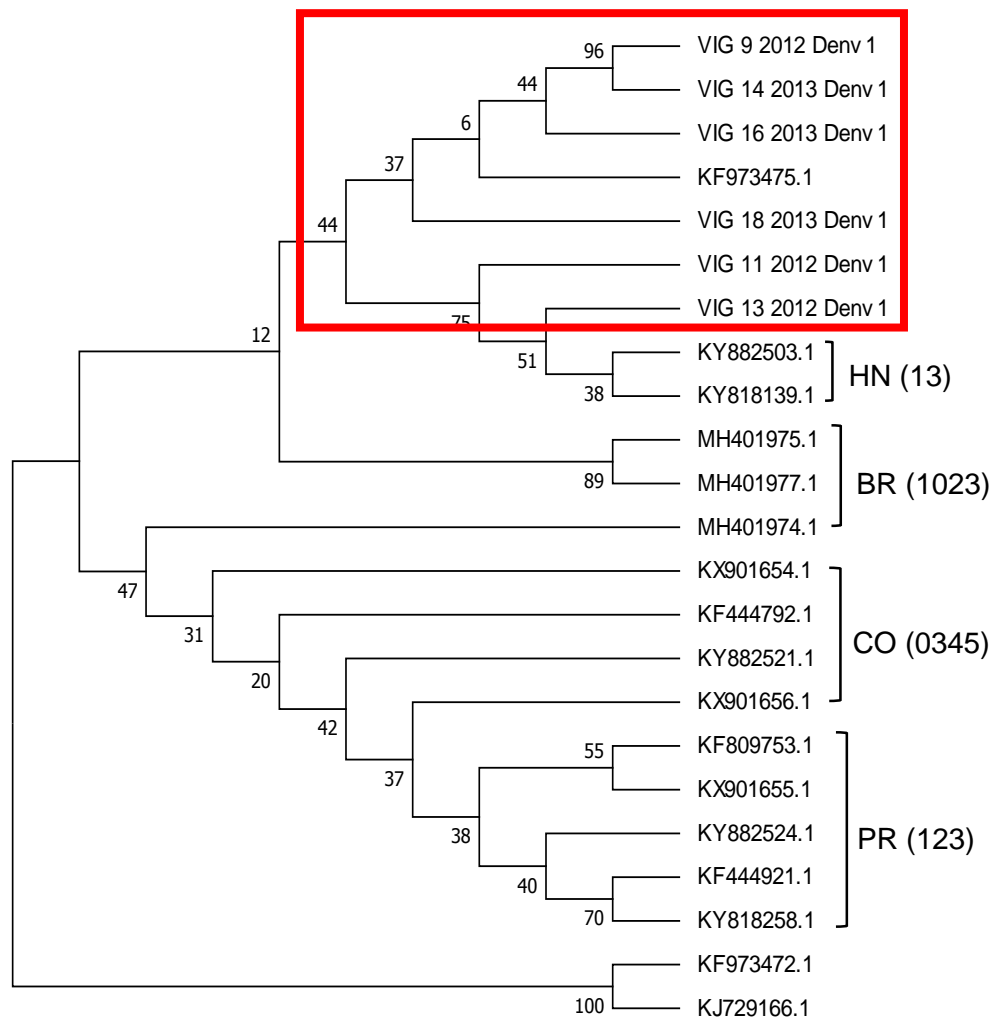


Figura 14. Árbol filogenético (consenso bootstrap) realizado con secuencias de la proteína de envoltura del DENV-1 Genotipo V. HN (Honduras), BR (Brasil), CO (Colombia), PR (Puerto Rico).

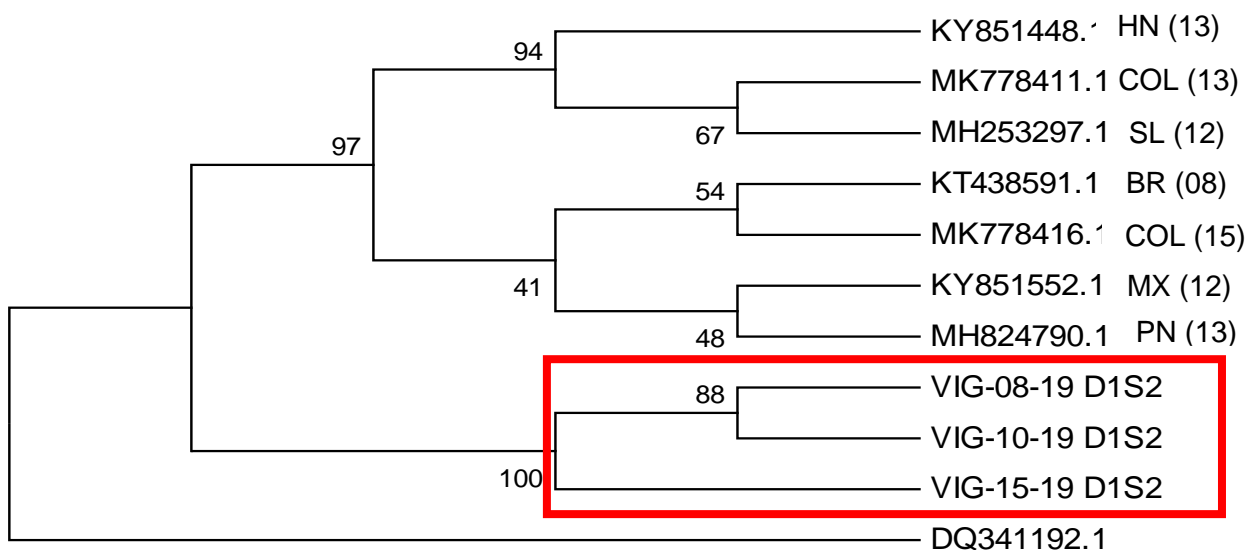


Figura 15. Árbol filogenético (consenso bootstrap) realizado con secuencias de la proteína de envoltura del DENV-2 Genotipo asiático/americano. HN (Honduras), BR (Brasil), COL (Colombia), SL (El Salvador), PN (Panamá).

7. Discusión

Del total de las muestras seleccionadas solo el 12% cumplió con las características necesarias para secuenciación, esto se pudo deber a varios factores extrínsecos tales como los procesos de descongelación propios de las muestras, el tiempo de almacenamiento o la posterior contaminación por un mal manejo de la muestra, lo cual termina afectando su viabilidad (principalmente la concentración de virus en muestra).

A través del enfoque filogenético, se comprobó que la diversidad genética del DENV no tuvo cambios significativos a nivel de genotipos en los años 2012 y 2013, los cuales se agruparon en el genotipo V para DENV-1 y genotipo Asiático/Americano para DENV-2. Tomando como referencia que la variación del genotipo es un factor determinante en la dinámica del dengue se puede decir que por lo menos hasta el final de estos años el virus, genéticamente se mantuvo casi igual. Lo cual, puede asociarse a los datos de incidencia de casos clínicos severos obtenidos en los años estudiados, con una disminución porcentual de 10.7% en el año 2012 a un 8% en el 2013 (PLISA, 2018).

La genotipificación del DENV-1 difiere con los resultados de Carrillo y colaboradores en el 2010, ya que ellos identificaron al genotipo III como el predominante hasta el 2007, sin embargo en la revisión realizada por Ramos y colaboradores en el 2017, la cual abarca más años (hasta el 2013), se corrobora la presencia del genotipo V. dicha diferencia puede

asociarse al patrón evolutivo de desplazamiento de genotipos descrito por el mismo Carrillo y colaboradores, es posible que ambos genotipos estuvieran circulando simultáneamente y en algún punto posterior al 2007 el genotipo V comenzara a desplazar al genotipo III. Para el caso de DENV-2, su genotipificación corresponde con ambos autores, donde el genotipo Asiático/Americano está establecido mayormente, incluso se identificaron dos linajes distintos circulando en México, de quienes su ancestro común apareció en la década de los 90`s.

Además de lo anterior, los resultados de genotipificación coincidieron con los resultados obtenidos de una herramienta bioinformática desarrollada recientemente en línea: *Genome Detective Dengue Virus Typing Tool* para genotipificación del DENV (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/dengue/introduction>) que alinea cualquier secuencia DENV-1 a DENV-4 con secuencias de referencia de genotipos preseleccionadas y genera un árbol filogenético (Anexo Figuras 16, 17 y 18).

Al realizar un análisis más detallado del fragmento de la proteína de Envoltura, correspondiente a la 2da reacción de protocolo ViGenDA (Fragmento 2), se demostró que la variación a nivel nucleotídico, sigue siendo baja. Los resultados obtenidos corroboran con lo descrito por Chunlin en el 2005 ya que como se muestra en la figura 14 y la figura 15, no hay diversidad genética significativa dentro del DENV-1 y DENV-2 respectivamente. Esto se debe a que la prevalencia en esos años del serotipo 1, compartió una distribución geográfica principalmente con el serotipo 2, la cual se mantuvo hasta el 2016 (Datos obtenidos por el Laboratorio de Arbovirus, InDRE). Se puede inferir que la genética se mantiene similar a la observada en el presente estudio, sin embargo, la introducción de nuevos Arbovirus en México (2014 y 2015) generó variaciones en la prevalencia de las enfermedades circulantes, teniendo como resultado un pico de prevalencia mayor a DENV-1 en el 2017.

A partir de los fragmentos obtenidos del protocolo de ViGenDA, se identificó que se puede definir el genotipo solo con el fragmento 2 del protocolo, sin la necesidad de amplificar toda la región de la proteína de envoltura, lo cual corresponde a lo descrito por Chen y Vasilkis en el 2011, ellos mencionan que los resultados de genotipificación varían ligeramente cuando se utiliza una región parcial o completa del genoma (Chen & Vasilkis 2011). La desventaja de no tener toda la proteína de envoltura es que no se alcanza a definir una profundidad a nivel de variación en los tres dominios, los cuales son altamente asociados a la parte más antigénica del virus dengue. Con base en lo anterior, y tomando en cuenta las necesidades del laboratorio, se propone usar solo el fragmento mencionado para la genotipificación de las muestras que así lo requieran.

Para poder observar un intercambio de linajes como el observado en Nicaragua por Harris en humanos en 2011 y Quiner en el vector en 2014, se propone analizar toda la proteína de

Envoltura del DENV con un número mayor de muestras humanas y del vector en un periodo de por lo menos 5 años, con el fin de describir a detalle si dicha variación de la diversidad genética podría afectar su estructura proteica como se describió previamente por VanBlargan en el 2013 y Wang en 2016, y con ello aportar información relevante al manejo integral de vectores en México y a su vez tratar de identificar si dicha diversidad entre linajes proporciona ventajas evolutivas en el DENV.

8. Conclusiones

- En los años estudiados solo el 12% de las muestras cumplieron con los criterios de inclusión para secuenciación capilar.
- Las muestras de DENV-1 se agruparon en el genotipo V.
- Las muestras de DENV-2 se agruparon en el genotipo Asiático/Americano.
- Dichos genotipos han circulado en México por menos desde una década atrás.
- No se encontró diversidad genética significativa en la proteína E del DENV-1.
- Se puede genotipificar a partir del fragmento 2 de protocolo ViGenDA, reduciendo así los costos de su implementación.

9. Perspectivas

- Definir un rango de valores de cq que ayuden a incrementar la sensibilidad del protocolo ViGenDA (Relación de cepas con concentración viral conocida & valores de cq).
- Ampliar el periodo de estudio e incrementar tamaño de secuencias para obtener una mayor profundidad en el análisis de variaciones dentro de cada genotipo (linajes).
- Un mayor número de muestras, así como incluir otras regiones del genoma viral (UTR's y NS5) del DENV que permitan realizar otros tipos de análisis filogenéticos (Diversidad genética – Factores de virulencia. Evolución viral).

10. Bibliografía

Akey D.L., Brown W.C., Dutta S., Konwerski J., Jose J., Jurkiw T.J., et al. 2014. Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*; 343: 881-885.

Alexander N., Balmaseda A., Coelho I.C., Dimaano E., Hien T.T., Hung N.T., et al. 2011. European Union, World Health Organization (WHO-TDR) supported DENCO Study Group. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health*; 16(8):936-48.

Ambrose R.L., Mackenzie J.M. 2011. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. *J Virol*; 85:2723–2732. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02050-10>.

Araujo, J.M.G., Nogueira, R.M.R., Schatzmayr, H.G., Zanotto, P.M.D., Bello G. 2009. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3 *Infection Genetics and Evolution*. pp. 716-725.

Aviles G., Meissner J., Mantovani R., St J.S. 2003. Complete coding sequences of dengue-1 viruses from Paraguay and Argentina. *Virus Res*; 98: 75–82. PMID: 14609632.

Avirutnan P., Punyadee N., Noisakran S., Komoltri C., Thiemmecca S., Auethavornanan K., Jairungsri A., Kanlaya R., Tangthawornchaikul N., Puttikhunt C., Pattanakitsakul S.N., Yenchitsomanus P.T., Mongkolsapaya J., Kasinrerak W., Sittisombut N., Husmann M., Blettner M., Vasanawathana S., Bhakdi S., Malasit P. 2006. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J. Infect. Dis.* 193:1078–1088.

Avirutnan P., Zhang L., Punyadee N., Manuyakorn A., Puttikhunt C., Kasinrerak W., Malasit P., Atkinson J.P., Diamond M.S. 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 3:e183.

Balmaseda A., Sandoval E., Pérez L., Gutiérrez C.M., Harris E. 1999. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua; *Am J Trop Med Hyg.* 61(6):893–897.

Balsitis S.J., Coloma J., Castro G., Alava A., Flores D., McKerrow J.H., Beatty P.R., Harris E. 2009. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:416–424.

Barrows, N.J., Campos, R.K., Liao, K.C., Prasanth, K.R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O.M., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A. 2018.

Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev*;118(8):4448-4482. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00719.

Basilio-de-Oliveira C.A., Aguiar G.R., Baldanza M.S., Barth O.M., Eyer-Silva W.A., Paes M. V. 2005. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 9:341–347.

Bennett, S. N., Holmes, E. C., M. Chirivella, D. M. Rodriguez, M. Beltran, V. Vorndam, D. J. Gubler, and W. O. McMillan. 2003. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* 20:1650–1658.

Bethell D.B., Gamble J., Pham P.L., Nguyen M.D., Tran T.H., Ha T.H., Tran T.N., Dong T.H., Gartside I.B., White N.J., Day N.P. 2001. Noninvasive measurement of microvascular leakage in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis.* 32:243–253.

Blackley S., Kou Z., Chen H., Quinn M., Rose R.C., Schlesinger J.J., Coppage M., X. Jin M. 2007. Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *J. Virol.* 81:13325–13334.

Bollati M., Álvarez K., Assenberg R., Baronti C., Canard B., Cook S., et al. 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res*; 87:125-48.

Boonnak K., Slike B.M., Burgess T.H., Mason R.M., Wu S.J., Sun P., Porter K., Rudiman I.F., Yuwono D., Puthavathana P., Marovich M.A. 2008. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Virol.* 82:3939–3951.

Bosch I., Xhaja K., Estevez L., Raines G., Melichar H., Warke R.V., Fournier M. V., Ennis F. A., Rothman A. L. 2002. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J. Virol.* 76:5588–5597.

Brinton M.A., Dispoto J.H. 1988. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*; 162: 290-299.

Brinton M.A., Dispoto J.H. 1988. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*; 162:290–299. (PubMed: 2829420).

Cahour A., Pletnev A., Vazielle-Falcoz M., Rosen L., Lai C.J. 1995. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology*; 207: 68-76.

Carrillo-Valenzo E., Danis-Lozano R., Velasco-Hernández J.X., Sánchez-Burgos G., Alpuche C., López I., Rosales C., Baronti C., de Lamballerie X., Holmes E.C., Ramos-Castañeda J.

2010. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol*; 155: 1401. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0721-1>

Catteau A., Kalinina O., Wagner M., Deubel V., Courageot M., Despres P. 2003. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol*; 84:2781-93.

Chakraborty, S. 2016. Computational analysis of perturbations in the post-fusion Dengue virus envelope protein highlights known epitopes and conserved residues in the Zika virus. *F1000Research*; 5, 1150.

Chao Y., Huang C., Lee C., Chang S., King C., Kao C. 2008. Higher infection of dengue virus serotype 2 in human monocytes of patients with G6PD deficiency. *Plos ONE*; 3:e1557.

Chen R., Vasilakis N. 2011. ¿Dengue—quo tu et quo vadis? *Viruses*; 3: 1562–1608. doi: 10.3390/v3091562 PMID: 21994796.

Chen Y.C., Wang S.Y. 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J. Virol.* 76:9877–9887.

Choi G., Schultz M.J., Levi M., van der Poll T. 2006. The relationship between inflammation and the coagulation system. *Swiss Med. Wkly.* 136: 139–144.

Chungue E., Cassar O., Drouet M.T., Guzman M.G., Laille M., Rosen L., Deubel V. 1995. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. *J. Gen. Virol*; 76:1877–1884. (PubMed: 9049396).

Chunlin, Z., Mammen, P., Mammen, Jr., Piyawan C., Chonticha K., Prinyada R., Patama M., Suchitra N., Siripen K., Holmes E. C. 2005. Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence. *J. of Vir*, Vol. 79, No. 24. P.15123–15130.

Clarke B.D., Roby J.A., Slonchak A., Khromykh A.A. 2015. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Res*; 206: 53-61.

Clyde K., Barrera J., Harris E. 2008. The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology*; 379: 314-323.

Clyde K., Kyle J.L., Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*; 80: 11418-11431.

Cologna R., Armstrong P.M., Rico-Hesse R. 2005. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*; 79: 853–859. doi: 10.1128/JVI.79.2.853-859.2005 PMID: 15613313.

Costa R.L., Voloch C.M., Schrago C. G. 2012. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infection Genetics and Evolution*. 12. 309-314.

Cox, B.D., Stanton, R.A., Schinazi, R.F. 2016. Predicting Zikavirus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antivir. Chem. Chemother.* 24, 118.

Crill, W.D., Chang, G.J. 2005. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J. Virol.* 78, 13975–13986.

Dalrymple N.A., Mackow E.R. 2012. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *J Virol*; 86(12):6408-15.

de Macedo F.C., Nicol A.F., Cooper L.D., Yearsley M., Pires A.R., Nuovo G.J. 2006. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn. Mol. Pathol.* 15:223–228.

de Souza R.P., Rocco I.M., Maeda A.Y., Spenassatto C., Bisordi I., Suzuki A., et al. 2011. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis*; 5: e1439. doi: 10.1371/journal.pntd.0001439 PMID: 22216365.

deSouza L.J., Nogueira R.M., Soares L.C., Soares C.E., Ribas B.F., Alves F.P., Vieira F.R., Pessanha F.E. 2007. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Braz. J. Infect. Dis.* 11: 407–410.

Domingo E., Escarmís C., Sevilla N., Moya A., Elena S.F., Quer J., Novella I.S., Holland J.J. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J*; 10:859–864. (PubMed: 8666162).

Durbin A.P., Vargas M.J., Wanionek K., Hammond S, N., Gordon A., Rocha C., Balmaseda A., Harris E. 2008. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376:429–435.

Dussart P., Lavergne A., Lagathu G., Lacoste V., Martial J., Morvan J., et al. 2006. Reemergence of dengue virus type 4, French Antilles and French Guiana, 2004–2005. *Emerg Infect Dis*; 12: 1748–1751. doi: 10.3201/eid1211.060339 PMID: 17283628.

Esmon C. T. 2005. The interactions between inflammation and coagulation. *Br. J. Haematol.* 131:417–430.

- Fansiri T., Pongsiri A., Klungthong C., Ponlawat A., Thaisomboonsuk B., Jarman R.G., et al. 2016. No evidence for local adaptation of dengue viruses to mosquito vector populations in Thailand. *Evol Appl*; 9: 608–618. doi: 10.1111/eva.12360 PMID: 27099625.
- Ferron F., Decroly E., Selisko B., Canard B. 2012. The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs. *Antiviral Res*; 96: 21-31.
- Filomatori C.V., Carballeda J.M., Villordo S.M., Aguirre S., Pallarés H.M., Maestre A.M., et al. 2017. Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathogens*; 13: e1006265-e1006265.
- Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E., Samsa M.M., Pietrasanta L., Gamarnik A.V. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*; 20: 2238-2249.
- Fonseca, V., Libin, P.J.K., Theys, K., Faria, N.R., Nunes, M.R.T., Restovic, M.I., et al. 2019. A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5): e0007231. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007231>.
- Fritz, R., Blazevic, J., Taucher, C., Pangerl, K., Heinz, F.X., Stiasny, K. 2011. The unique transmembrane hairpin of flavivirus fusion protein e is essential for membrane fusion. *J. Virol.* 85, 4377–4385.
- Goncalvez A.P., Escalante A.A., Pujol F.H., Ludert J.E., Tovar D., Salas R., Liprandi F. 2002. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*; 303:110–119. (PubMed: 12482662).
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Cin Microbiol Rev.* 11 (3):480.
- Guirakhoo F., Arroyo J., Pugachev K.V., Miller C., Zhang Z.X., Weltzin R., et al. 2001. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*; 75: 7290-7304.
- Guzmán M.G., Alvarez M., Rodriguez R., Rosario D., Vazquez S., Valds L., Cabrera M.V., Kouri G. 1999. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba. *Int. J. Infect. Dis.* 3:130–135.
- Halstead S.B. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J. Biol. Med.* 42:350– 362.
- Hammon W. M., Rudnick A., Sather G. E. 1960. *Science* 131, 1102–1103.

- Hanna, S.L., Pierson, T.C., Sanchez, M.D., Ahmed, A.A., Murtadha, M.M., Doms, R.W. 2005. N-linked glycosylation of West Nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *J. Virol.* 79, 13262–13274.
- Harrison S.C. 2008. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:690– 698.
- Ho L.J., Shaio M.F., Chang D.M., Liao C.L., Lai J. H. 2004. Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. *Immunol. Investig.* 33:423–437.
- Holmes, E. C. 2003. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. *J. Virol.* 77:11296– 11298.
- Holmes, E. C. 2008. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annual Review of Microbiology* 62, 307-328.
- Holmes, E. C., Twiddy, S. S. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* 3:19–28.
- Hongsiriwon S. 2002. Dengue hemorrhagic fever in infants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 33:49-55.
- Hotta S. 1952. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J. Infect. Dis.* 90, 1-9.
- Houghton-Triviño N., Salgado D., Rodríguez J., Bosch I., Castellanos J.E. 2010. Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumor necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol*; 91:697-06.
- Hsieh S.C., Zou G., Tsai W.Y., Qing M., Chang G.J., Shi P.Y., et al. 2011. The C-terminal helical domain of dengue virus precursor membrane protein is involved in virus assembly and entry. *Virology*; 410: 170-180.
- Huang Y.H., Lei H.Y., Liu H.S., Lin Y.S., Liu C.C., Yeh T.M. 2000. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63:71–75.
- Huerta-Zepeda A., Cabello-Gutierrez C., Cime-Castillo J., Monroy-Martinez V., Manjarrez-Zavala M. E., Gutierrez-Rodriguez M., Izaguirre R., Ruiz-Ordaz B. H. 2008. Crosstalk between coagulation and inflammation during dengue virus infection. *Thromb. Haemost.* 99:936–943.
- Jaenisch T., Tam D.T., Kieu N.T., Van Ngoc T., Nam N.T., Van Kinh N., et al. 2016. Clinical evaluation of dengue and identification of risk factors for severe disease: protocol for a multicentre study in 8 countries. *BMC Infect Dis*; 16(1):120.

Jenkins G.M., Pagel M., Gould E.A., de A. Zanotto P.M., Holmes E.C. 2001. Evolution of base composition and codon usage bias in the genus Flavivirus. *J. Mol. Evol*; 52:383–390. 8PubMed: 11343134).

Jessie K., Fong M.Y., Devi S., Lam S.K., Wong K.T. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* 189:1411–1418.

Jessie K., Fong M.Y., Devi S., Lam S.K., Wong K.T. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* 189:1411–1418.

Katzelnick J.C., Fonville J.M., Gromowski G.D., Bustos-Arriaga J., Green A., James S.L., Lau L., Montoya M., Wang C., VanBlargan L.A., Russell C.A., Thu H.M., Pierson T.C., Buchy P., Aaskov J.G., Muñoz-Jordán J.L., Vasilakis N., Gibbons R.V., Tesh R.B., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Durbin A., Simmons C.P., Holmes E.C., Harris E., Whitehead S.S., Smith D.J. 2015. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*; 349. (6254), 1338-1343. DOI: 10.1126/science.aac5017.

Kaufmann B., Rossmann M.G. 2010. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect*; 13:1–9.

Kerschner J.H., Vorndam A.V., Monath T.P., Trent D.W. 1986. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J. Gen. Virol*; 67:2645–2661. (PubMed: 3794663).

Klungthong C., Zhang C., Mammen M.P., Ubol S., Holmes E.C. 2004. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*; 329(1):168–179. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.003> PMID: 15476884.

Klungthong, C., C. Zhang, M. P. Mammen, Jr., S. Ubol., E. C. Holmes. 2004. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* 329:168–179.

Kochel T.J., Watts D.M., Halstead S.B., Hayes C.G., Espinoza A., Felices V., Caceda R., Bautista C.T., Montoya Y., Douglas S., Russell K.L. 2002. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*; 360:310–312. (PubMed: 12147378).

Kochel T.J., Watts D.M., Halstead S.B., Hayes C.G., Espinoza A., Felices V., et al. 2002. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*; 360: 310–312. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09522-3 PMID: 12147378.

- Kou Z., Quinn M., Chen H., Rodrigo W., Rose R., Schlesinger J., et al. 2008. Monocytes but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*; 80:134-46.
- Kourí, P. 2008. Dengue y fiebre hemorrágica del dengue, un problema de salud mundial. *Rev Cub Med Trop*; 60(1):5-16.
- Kurosu T., Chaichana V., Yamate M., Anantapreecha S., Ikuta K. 2007. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362: 1051–1056.
- Kyle J., Harris E. 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annual Rev Microbiol*; 62:71-92.
- Kyle J.L., Beatty P. R., Harris E. 2007. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J. Infect. Dis.* 195:1808–1817.
- Lanciotti R.S., Gubler D.J., Trent D.W. 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*; 78:2279–2286.
- Lanciotti R.S., Lewis J.G., Gubler D., Trent D.W. 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J. Gen. Virol*; 75:65–75. (PubMed: 8113741).
- Lee C.M., Xie X., Zou J., Li S.H., Lee M.Y., Dong H., et al. 2015. Determinants of dengue virus NS4A protein oligomerization. *J Virol*; 89: 6171-6183.
- Leitmeyer K.C., Vaughn D.W., Watts D.M., Salas R., Villalobos I, de C., et al. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*; 73: 4738-4747.
- Leitmeyer K.C., Vaughn D.W., Watts D.M., Salas R., Villalobos I., de Chacon., Ramos C., Rico-Hesse R. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol*; 73:4738–4747. (PubMed: 10233934).
- Leitmeyer K.C., Vaughn D.W., Watts D.M., Salas R., Villalobos I., de Chacon, Ramos C., Rico-Hesse R. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol*; 73:4738–4747. (PubMed: 10233934).
- Lemmon A.R., Milinkovitch M.C. 2002. The metapopulation genetic algorithm: An efficient solution for the problem of large phylogeny estimation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 99:10516–10521. (PubMed: 12142465).
- Lewis J.A., Chang G.J., Lanciotti R., Kinney R.M., Mayer L.W., Trent D.W. 1993. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*; 197:216–224.

- Li Y., Kim Y.M., Zou J., Wang Q.Y., Gayen S., Wong Y.L., et al. 2015. Secondary structure and membrane topology of dengue virus NS4B N-terminal 125 amino acids. *Biochim Biophys Acta*; 1848: 3150-3157.
- Limon-Flores A.Y., Perez-Tapia M., Estrada-Garcia I., Vaughan G., Escobar-Gutierrez A., Calderon-Amador J., Herrera-Rodriguez S.E., Brizuela-Garcia A., Heras-Chavarria M., Flores-Langarica A., Cedillo-Barron L., Flores-Romo L. 2005. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int. J. Exp. Pathol*; 86:323–334.
- Limonta D., Capo V., Torres G., Perez A.B., Guzman M.G. 2007. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J. Clin. Virol.* 40:50–54.
- Lindenbach B., Thiel H., Rice C. 2007. Flavivirus: The virus and their replication. In: Knipe D, Howley Peter. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1101-52.
- Lindenbach, B., Thiel, H., Rice, C. 2007. Flavivirus: The virus and their replication. In: Knipe D, Howley Peter. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1101-52.
- Liu L., Dong H., Chen H., Zhang J., Ling H., Li Z., et al. 2010. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front Biol*; 5: 286-303.
- Luo D., Vasudevan S.G., Lescar J. 2015. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res*; 118: 148-158.
- Mackenzie J.M., Jones M.K., Young P.R. 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*; 220: 232-240.
- Manokaran G., Finol E., Wang C., Gunaratne J., Bahl J., Ong E.Z., et al. 2015. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*; 350 (6257): 217–221. <https://doi.org/10.1126/science.aab3369> PMID: 26138103.
- Manzano M., Reichert E.D., Polo S., Falgout B., Kasprzak W., Shapiro B.A., et al. 2011. Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication. *J Biol Chem*; 286: 22521-22534.
- Markoff L. 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res*; 59: 177-228.
- Martina B.E.E., Koraka P., Osterhaus A.D.M.E. 2009. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*. p. 564–581
- McMinn P.C. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol*; 78 2711-2722.

- Messer W.B., Gubler D.J., Harris E., Sivananthan K., de Silva A. 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3; subtype III virus. *Emer. Infect. Dis*; 9; 800–809.
- Miagostovich M.P., Ramos R. G., Nicol A.F., Nogueira R. M., CuzziMaya T., Oliveira A.V., Marchevsky R.S., Mesquita R. P., Schatzmayr H. G. 1997. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin. Neuropathol.* 16:204–208.
- Mongkolsapaya J., Duangchinda T., Dejnirattisai W., Vasanawathana S., Avirutnan P., Jairungsri A., Khemnu N., Tangthawornchaikul N., Chotiyarnwong P., Sae-Jang K., Koch M., Jones Y., McMichael A., Xu X., Malasit P., and Screaton G. 2006. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J. Immunol.* 176:3821–3829.
- Mousson L. et al. 2005. Phylogeography of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res.* 86, 1-11.
- Muñoz-Jordán, J. L., Méndez-Rico, J., Franco, L., Santiago, G. A. 2016. Proyecto Vigilancia Genómica de Dengue en las Américas (ViGenDA). 1er Taller Internacional para la Secuenciación del virus Dengue. Protocolo de Trabajo.
- Nisalak, A., Timothy P. E., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S., Thisyakorn, U., Robert M., Scott, D. S., Burke, C. H., Hoke, B. L., Innis, Vaughn D. W. 2003. Serotype-Specific Dengue Virus Circulation and Dengue Disease In Bangkok, Thailand From 1973 To 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68(2), pp. 191–202.
- Noisakran S., Dechtawewat T., Avirutnan P., Kinoshita T., Siripanyaphinyo U., Puttikhunt C., et al. 2008. Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J Gen Virol*; 89:2492-500.
- Noisakran S., Dechtawewat T., Avirutnan P., Kinoshita T., Siripanyaphinyo U., Puttikhunt C., et al. 2008. Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J Gen Virol*; 89:2492-500.
- OhAinle, M., Balmaseda, A., Macalalad, A.R., Tellez, Y., Zody, M.C., Saborío, S., Nuñez, A., Lennon, N.J., Birren, B.W., Gordon, A., Henn, M.R., Harris, E. 2011. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med.* 3 (114):114ra128. doi: 10.1126/scitranslmed.3003084.
- Oishi K., Saito M., Mapua C., Natividad F. 2007. Dengue illness: Clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother*; 13:125-33.
- OMS. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3rd ed. Geneva. 2009.
- OMS.2017.<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

OPS. 2010. Dengue: guías de atención para enfermos en la región de las Américas. La Paz, Bolivia: 2010.

Organización Panamericana de la Salud. 1997. Resurgimiento del dengue en las Américas. Boletín Epidemiológico; 18:1-6.

PAHO.2018.https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493&Itemid=40232&lang=es

Palmer D.R., Sun P., Celluzzi C., Bisbing J., Pang S., Sun W., Marovich M.A., Burgess T. 2005. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J. Virol.* 79:2432–2439.

Pang T., Cardoso M., Guzmán M. 2007. Of cascades and perfect storms: The immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*; 85:42-5.

PLISA. Plataforma de Información en Salud de las Américas. 2018. <http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/9-plisa.html>.

Proutski V., Gritsun T.S., Gould E.A., Holmes E.C. 1999. Biological consequences of deletions within the 3'-untranslated region of flaviviruses may be due to rearrangements of RNA secondary structure. *Virus Res*; 64: 107-123.

Pryor M.J., Azzola L., Wright P.J., Davidson A.D. 2004. Histidine 39 in the dengue virus type 2 M protein has an important role in virus assembly. *J Gen Virol*; 85: 3627-3636.

Quaresma J.A., Barros V. L., Pagliari C., Fernandes E.R., Andrade Jr H.F., Vasconcelos P. F., Duarte M.I. 2007. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101:161–168.

Quiner, C. A., Parameswaran, P., Ciota, A. T., Ehrbar, D. J., Dodson, B. L., Schlesinger, S., Kramer, L. D., Harrisa, E. 2014. Increased Replicative Fitness of a Dengue Virus 2 Clade in Native Mosquitoes: Potential Contribution to a Clade Replacement Event in Nicaragua. *J. of Vir.* Vol. 88 No. 22. p. 13125–13134.

Ramos-Castañeda J., Barreto dos Santos F., Martinez-Vega R., Galvão de Araujo J.M. Joint G., Sarti E. 2017. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis* 11(1): e0005224.doi:10.1371/ journal.pntd.0005224.

Repik P.M., Dalrymple J.M., Brandt W.E., McCown J.M., Russell P.K. 1983. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 32:577–589. (PubMed: 6859403).

Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*; 174:479–493. (PubMed: 2129562).

Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*; 174:479–493. (PubMed: 2129562).

Rico-Hesse R. 2003. Microevolution and Virulence Of Dengue Viruses. *Adv Virus Res*; 59: 315–341.

Rico-Hesse R. 2010. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol*; 338:45–55. (PubMed: 19802577).

Roby, J.A., Setoh, Y.X., Hall, R.A., Khromykh, A.A. 2015. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 96 Pt 7, 1551.

Roehrig, J.T., Butrapet, S., Liss, N.M., Bennett, S.L., Luy, B.E., Childers, T., Boroughs, K.L., Stovall, J.L., Calvert, A.E., Blair, C.D., et al. 2013. Mutation of the Dengue virus type 2 envelope protein heparin sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. *Virology*. 441, 114–125.

Rosen L., Drouet M.T., Deubel V. 1999. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:720–724.

Rosenberg R.D. 2001. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states: clinical utility of activation peptide assays in predicting thrombotic events in different clinical populations. *Thromb. Haemost.* 86:41–50.

Sabin A. B. 1952. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1, 30 –50.

Sahaphong S., Riengrojpitak S., Bhamarapavati N., Chirachariyavej T. 1980. Electron microscopic study of the vascular endothelial cell in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 11:194–204.

Samsa M., Mondotte J., Iglesias N., Assunção I., Barbosa G., Da Poian A., et al. 2005. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*; 10: e1000632.

Santiago, G. A., Vergne, E., Quiles, Y., Cosme, J., Vazquez, J., Medina, J. F., Medina, F., Colón, C., Margolis, H., Muñoz, J. J. L. 2013. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* 7(7): e2311. Doi:10.1371/journal.pntd.0002311.

- Scaturro P., Cortese M., Chatel-Chaix L., Fischl W., Bartenschlager R. 2015. Dengue virus non-structural protein 1 modulates infectious particle production via interaction with the structural proteins. *PLoS Pathog*; 11: e1005277.
- Schneemann A. 2006. The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol*; 60:51-67.
- Scott, T. W., A. C. Morrison, L. H. Lorenz, G. G. Clark, D. Strickman, P. Kittayapong, H. Zhou, and J. D. Edman. 2000. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* in Thailand and Puerto Rico: population dynamics. *J. Med. Entomol.* 37:77–88.
- Shepard D.S., Undurraga E.A., Halasa Y.A., Stanaway J.D. 2016. The global economic burden of dengue: A systematic analysis. *Lancet Infect Dis*; 16 (8):935–941. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00146-8) PMID: 27091092.
- Shi P.Y., Brinton M.A., Veal J.M., Zhong Y.Y., Wilson W.D. 1996. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. *Biochemistry*; 35:4222–4230. (PubMed: 8672458).
- Sirigulpanit W., Kinney R.M., Leardkamolkarn V. 2007. Substitution or deletion mutations between nt 54 and 70 in the 5' non-coding region of dengue type 2 virus produce variable effects on virus viability. *J Gen Virol*; 88: 1748-1752.
- Srikiatkachorn A. 2009. Plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Haemost*; 102:1042-9.
- Stiasny, K., Heinz, F. 2006. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.*; 87:2755-66.
- Tang, C.T., Liao, M.Y., Chiu, C.Y., Shen, W.F., Chiu, C.Y., Cheng, P.C., Chang, G.J.J., Wu, H.C. 2015. Generation of monoclonal antibodies against Dengue virus type 4 and identification of enhancing epitopes on envelope protein. *PLoS ONE*, 10, e0136328.
- Teo C.S., Chu J.J. 2014. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *J Virol*; 88:1897–1913. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01249-13>.
- Thomas S., Strickman D., Vaughn D. 2003. Dengue epidemiology: Virus epidemiology, ecology and emergence. *Adv Virus Res*; 61:235-89.
- Tolle, M. 2009. Mosquito-borne diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*; 39:97-140.
- Torres, G.I., Cortés, P.D., Becker, I. 2014. Dengue en México: análisis de dos décadas. *Gac Med de Mx*; 150:122-7.

Twiddy S.S., Farrar J.J., Chau N.V., Wills B., Gould E.A., Gritsun T., Lloyd G., Holmes E.C. 2002. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 298, 63-72.

Twiddy S.S., Farrar J.J., Nguyen V.C., Wills B., Gould E.A., Gritsun T., Lloyd G., Holmes E.C. 2002. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*; 298:63–72.

Twiddy S.S., Farrar J.J., Vinh Chau N., Wills B., Gould E.A., Gritsun T., Lloyd G., Holmes E.C. 2002. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*; 298:63–72. (PubMed: 120931749).

Twiddy, S.S., Woelk, C. H., Holmes, E. C. 2002. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J. of Gen Vir.* 83, 1679–1689.

Umareddy I., Chao A., Sampath A., Gu F., Vasudevan S.G. 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*; 87:2605–2614. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.81844-0>.

VanBlargan, L.A., Mukherjee, S., Dowd, K.A., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Pierson, T.C. 2013. The type specific neutralizing antibody response elicited by a dengue vaccine candidate is focused on two amino acids of the envelope protein. *PLoS Pathog*; 9:e1003761.

Vasilakis N., Cardoso J., Hanley K.A., Holmes E.C., Weaver S.C. 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology* 9, 532-541.

Vasilakis N., Deardorff E.R., Kenney J.L., Rossi S.L., Hanley K.A., Weaver S.C. 2009. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog*; 5: e1000467. doi: 10.1371/journal.ppat.1000467 PMID: 19503824.

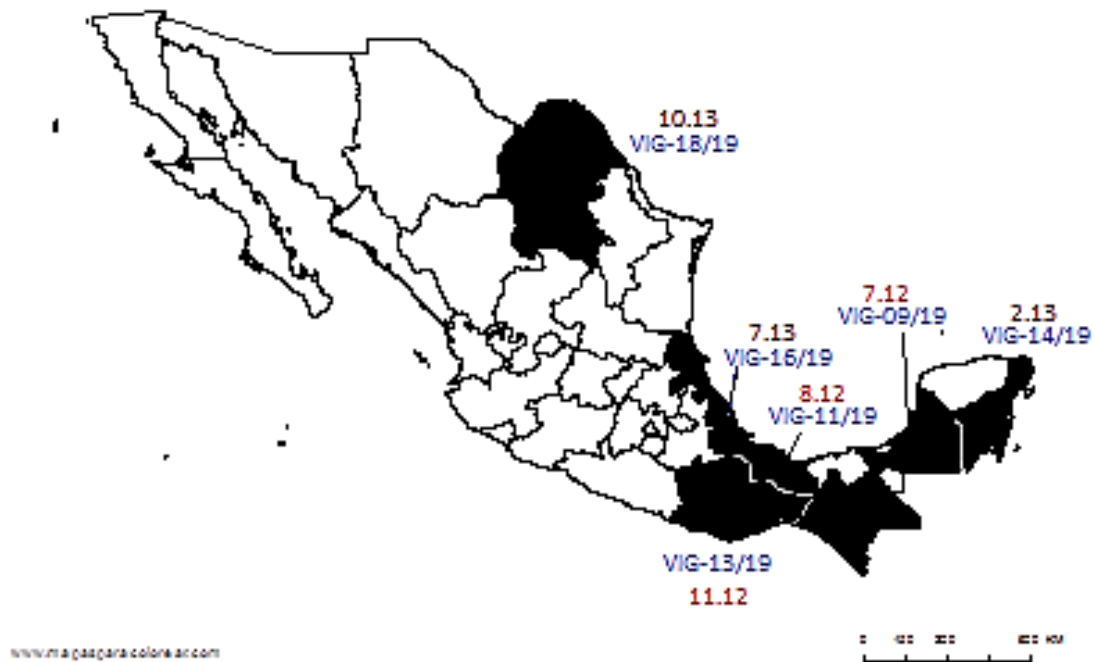
Vasilakis N., Shell E.J., Fokam E.B., Mason P.W., Hanley K.A., Estes D.M., Weaver S.C. 2007. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*; 358:402–412. (PubMed: 17014880).

Veza A.C., Rosen L., Repik P., Dalrymple J., Bishop D.H. 1980. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 29:643–652. (PubMed: 6773429).

Wang S., He R., Anderson R. 1999. prM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol*; 73: 2547-2551.

- Wang, C., Katzelnick, L.C., Montoya, M., Hue, K.D.T., Simmons, C.P., Harris, E. 2016. Evolutionarily successful asian 1 dengue virus 2 lineages contain one substitution in envelope that increases sensitivity to polyclonal antibody neutralization. *J Infect Dis*; 213:975–84.
- Wearing, H. J., Rohani, P. 2006. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. *The National Academy of Sciences of the USA. PNAS. Vol. 103 no. 31. pp: 11802–11807.*
- Weaver S. C. 2013. Urbanization and geographic expansion of zoonotic Arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol. 21, 360-363.*
- Williams, K.L., Wahala, W.M., Orozco, S., de Silva, A.M., Harris, E. 2012. Antibodies targeting Dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. *Virology. 429, 12–20.*
- Winkler G., Randolph V.B., Cleaves G.R., Ryan T.E., Stollar V. 1988. Evidence that the mature form of the Flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*; 162: 187-196.
- Wu R.H., Tsai M.H., Tsai K.N., Tian J.N., Wu J.S., Wu S.Y., et al. 2017. Mutagenesis of dengue virus protein NS2A revealed a novel domain responsible for virus-induced cytopathic effect and interactions between NS2A and NS2B transmembrane segments. *J Virol*; 91: e01836-01816.
- Xie X., Gayen S., Kang C., Yuan Z., Shi P.Y. 2013. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol*; 87: 4609-4622.
- Zampieri C.A., Sullivan N.J., Nabel G.J. 2007. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat.Immunol.8:1159– 1164.*
- Zhang C., Mammen Jr. M.P., Chinnawirotpisan P., Klungthong C., Rodpradit P., Nisalak A., Vaughn D. W., Nimmannitya S., Kalayanarooj S., Holmes E.C. 2006. Structure and age of genetic diversity of dengue virus type 2 in Thailand. *Journal of General Virology 87, 873-883.*
- Zhang X., Jia R., Shen H., Wang M., Yin Z., Cheng A. 2017. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses*; 9, 338; doi: 10.3390/v9110338.
- Zhu W., Qin C., Chen S., Jiang T., Yu M., Yu X., et al. 2007. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. *Virus Res*; 126: 226-232.
- Zybert I.A., van der Ende-Metselaar H., Wilschut J., Smit J.M. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol*; 89: 3047-3051.

11. Anexo



Mapa 1. Representatividad de DENV-1 en la república mexicana en los años del estudio.



Mapa 2. Representatividad de DENV-2 en la república mexicana en los años del estudio.

Secuencias de referencia GenBank (Genotipificación)

DENV-1

KJ189351, HQ166037, AY277665, AB519681, AF311956, FJ205875, EU482567, AY277666, AY206457, DQ285559, AY722803, AY722802, AY713473, AY722801, AF298808, AY732478, AF350498, AY726552, AY732480, GQ868637, GQ199835, AB608786, GU131895, FJ469907, AY732482, FJ176779, HQ891316, AF180817, GQ868602, DQ672564, U88535, FJ96842, AB189121, AB204803, AB074761, JN697056, EF032590, AB189120, DQ672561.

DENV-2

HQ999999, GQ199868, FJ898461, AY702036, EU687216, EU687216, AB122020, AF489932, GQ868540, M20558, EU482582, GQ398290, AF038403, AF204177, HQ891023, DQ181806, DQ181805, DQ181804, GQ868545, DQ181798, DQ181802, GU131896, FM210211, DQ181797, KF44406, KF44407, EU179859, KC762680, KC762669, KM279597, KC762660, EU081177, EU081180, EU081179, EU056812, EU056811, AF100469, EF105379, FJ467493, EF105387, EF105382, EF105389.

Secuencias de referencia GenBank (Variación genética (E) DENV-1 Genotipo V)

KF973475.1, KY882503.1, KY818139.1, MH401975.1, MH401977.1, MH401974.1, KX901654.1, KF444792.1, KY882521.1, KX901656.1, KF809753.1, KX901655.1, KY882524.1, KF444921.1, KY818258.1, KF973472.1, KJ729166.1.

Secuencias de referencia GenBank (Variación genética (E) DENV-2 Genotipo Asiático/Americano)

KY851448.1, MK778411.1, MH253297.1, KT438591.1, MK778416.1, KY851552.1, MH824790.1, DQ341192.1.

Resultado Genotipificación VIG-09, VIG-11, VIG-13. DENV-1 (Genome Detective)

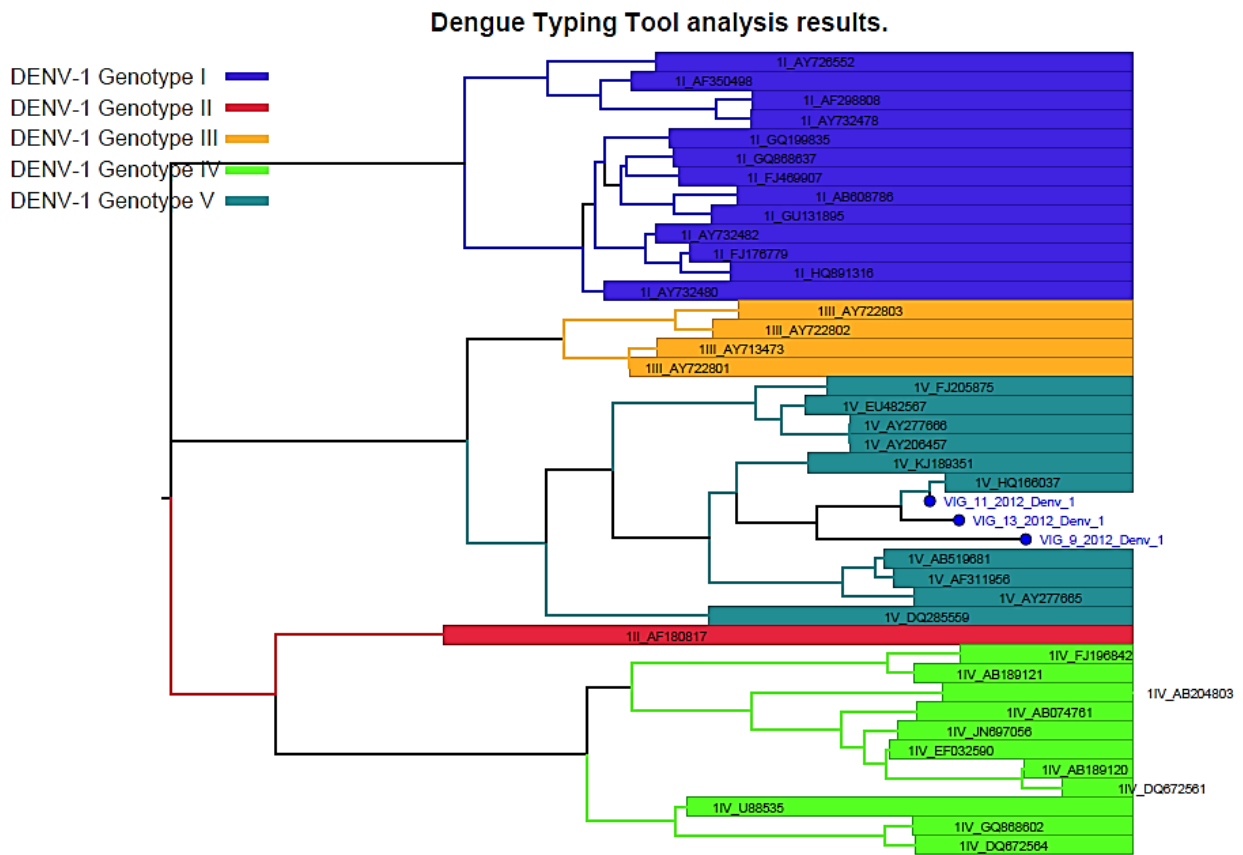


Figura 16. Árbol filogenético generado con Genome Detective. Las muestras se agruparon en el genotipo V.

Resultado Genotipificación VIG-14, VIG-16, VIG-18. DENV-1 (Genome Detective)

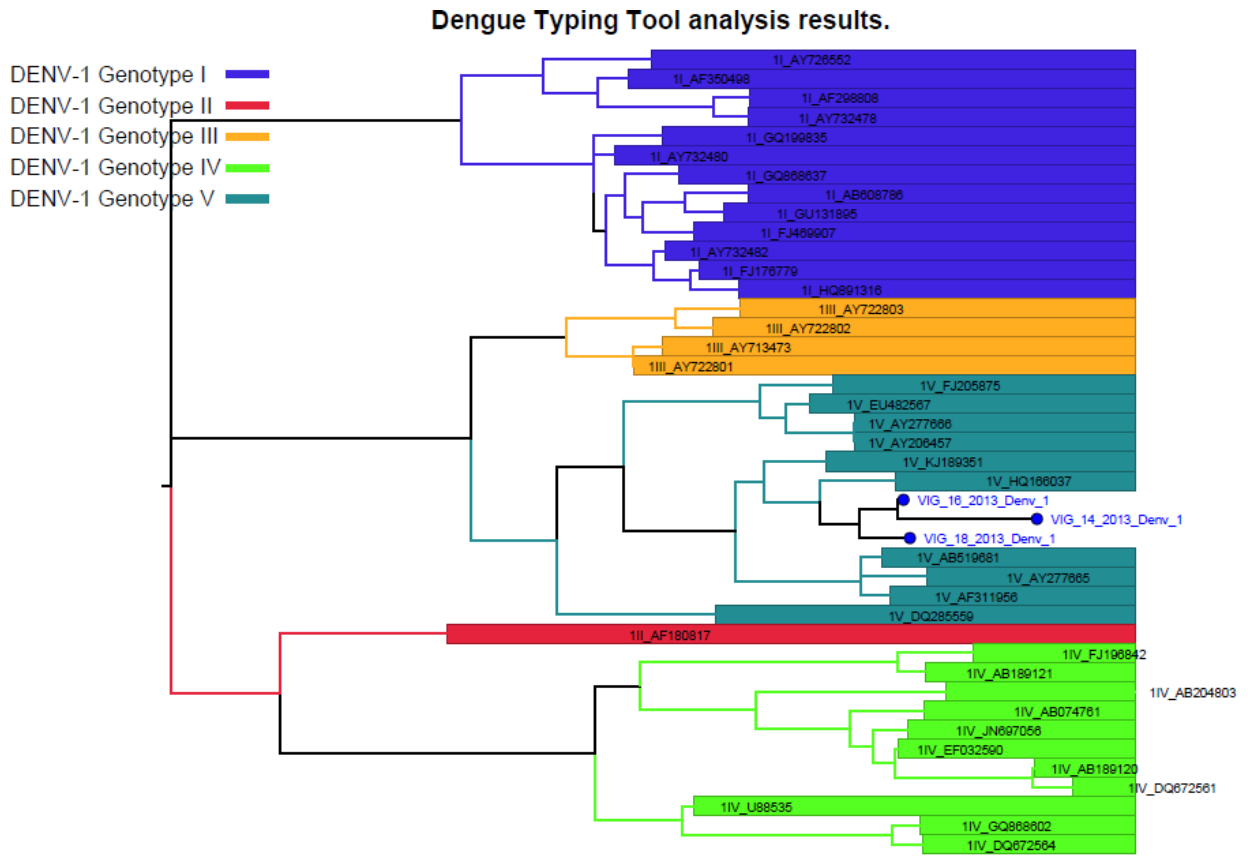


Figura 17. Árbol filogenético generado con Genome Detective. Las muestras se agruparon en el genotipo V.

Resultado Genotificación VIG-10, VIG-15, VIG-08. DENV-2 (Genome Detective)

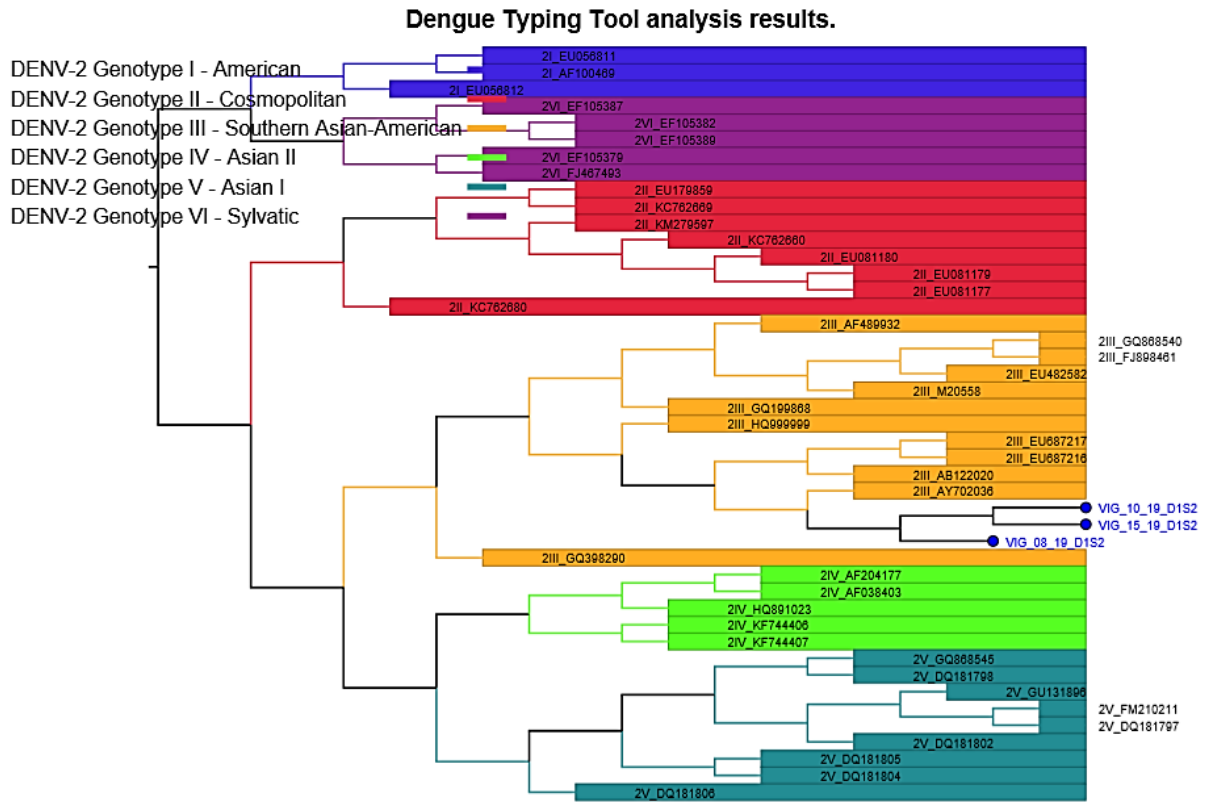


Figura 18. Árbol filogenético generado con Genome Detective. Las muestras se agruparon en el genotipo asiático/americano.