Variabilidad Genética del virus Dengue en la región sudamericana: Primeros abordajes epidemiológicos frente a una eventual re-emergencia del virus Dengue en el Uruguay

Álvaro Fajardo Rossi

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular, PEDECIBA

Laboratorio de Virología Molecular

Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Orientador: Dr. Juan Cristina

Montevideo, Febrero 2011

Índice

Abreviaturas 3
Resumen 5
1. Introducción 7
1.1. La enfermedad 7
1.2. Historia 8
1.3. Generalidades del virus Dengue 10
1.3.1. Variabilidad genética 11
1.4. Patogenia 11
1.5. Ciclo replicativo del virus Dengue 14
1.5.1. Unión y entrada 14
1.5.2. Síntesis proteica 15
1.5.3. Replicación 15
1.5.4. Ensamblaje y salida 19
1.6. Teoría de Coalescencia 19
2. Objetivos 21
2.1. Objetivo general 21
2.2. Objetivos específicos 21
3. Materiales y métodos 21
3.1. Muestras 21
3.2. Extracción de ARN 22
3.3. Transcripción Reversa 22
3.4. Determinación de serotipo 23
3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 25
3.6. Electroforésis en gel de agarosa 25
3.7. Purificación de productos de PCR 26
3.8. Secuenciación 26
3.9. Análisis de secuencias 27
3.9.1. Análisis Filogenéticos 27
3.9.2. Análisis de Coalescencia 28
3.9.1. Análisis de sustituciones aminoacídicas 29
4. Resultados 30
4.1. Variabilidad genética de cepas de DENV-3 aisladas en América Latina 30

4.2. Análisis Bayesiano de coalescencia de cepas de DENV-3 aisladas en la región Sudamericana 39
4.3. Mapeo de las sustituciones aminoacídicos en la proteína E de estirpes de DENV-3 que circulan en la región Sudamericana 41
5. Discusión 47
6. Conclusiones 52
7. Agradecimientos 53
8. Bibliografía 54
9. Publicaciones derivadas en el marco de esta tesis 69

Abreviaturas

ADE	Amplificación Dependiente de Anticuerpos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
aLRT	test de relación de verosimilitud aproximada
ARN	Ácido Ribonucleico
Cap	capuchón
CRV	Complejo de Replicasa Viral
CS	Secuencia de Ciclación
DENV	Virus Dengue
DF	Fiebre del Dengue
DHF	Fiebre Hemorrágica del Dengue
DNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DSS	Síndrome de Choque por Dengue
Ig	Inmunoglobulina
Kb	Kilobases
LT	Linfocitos T
M	Molar
MRCA	Ancestro Común Más Reciente
ml	mililitros
μL	Microlitros
NCR	Región no codificante
Nested PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada
nt	Nucleótidos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pb	Pares de bases

RT	Transcripción Reversa
SL	Horquilla estabilizante
s/s/a	sustituciones por sitio por año
UAR	Región corriente arriba de AUG

Resumen

El Dengue es la arbovirosis humana más importante desde el punto de vista de mortalidad y morbilidad, con más de la mitad de la población mundial en riesgo de contagio, y entre 50 y 100 millones de personas afectadas en el mundo. Esta enfermedad febril es causada por la infección con cualquiera de los 4 serotipos del virus Dengue (DENV-1 a DENV-4), clasificados en la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus,* que son transmitidos al humano principalmente por el mosquito *Aedes aegypti.* La infección por cualquiera de estos serotipos puede originar desde un cuadro subclínico, hasta síndromes severos con una elevada letalidad. Las manifestaciones usuales son la fiebre del Dengue o Dengue clásico, y la fiebre hemorrágica del Dengue o Dengue hemorrágico, que termina en ocasiones como síndrome de choque por dengue, y es la principal causa de hospitalización y muerte entre los niños en el Sudeste Asiático. El virus Dengue se ha vuelto endémico en muchos países de Latinoamérica en los últimos 25 años.

Numerosos estudios indican que la aparición del genotipo III de DENV-3 en las Américas, no sólo ha reemplazado a otros serotipos, sino que también está relacionado con el aumento de brotes de fiebre hemorrágica del Dengue. La primera gran epidemia de dengue hemorrágico ocurrió en Sri Lanka en 1989, y coincide con la emergencia de una variante del genotipo III de DENV-3, que se ha expandido desde el subcontinente indio hacia África y el Caribe, llegando finalmente a América Latina. Aunque estas variantes han sido asociadas a severas epidemias de Dengue en las Américas, existen escasos estudios del grado de variabilidad genética y modo de evolución de dichas estirpes. Estudios de estas características son de fundamental importancia para comprender la epidemiología molecular de esta variante en nuestra región Sudamericana.

En el presente trabajo estudiamos la variabilidad genética del genotipo III de DENV-3 a partir de muestras aisladas en la región Latinoamericana. Además utilizamos la aproximación Bayesiana Monte Carlo con Cadenas de Markov para analizar secuencias del gen de la envoltura viral de cepas Latinoamericanas, con el objetivo de evaluar las tasas de evolución, dispersión viral y dinámicas poblacionales de este genotipo en dicha región. Estos estudios fueron realizados en conjunto con el Instituto

Nacional de Higiene y Medicina Tropical de Guayaquil, Ecuador, y el Laboratorio Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

1. Introducción

1.1. La enfermedad

El virus Dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. DENV es un arbovirus (virus transmitidos por vectores artrópodos hematófogos) al igual que otros *Flavivirus* como los causantes de la fiebre amarilla y las encefalitis Japonesa, de San Luis y del Nilo Occidental (Lindenbach & Rice, 2003).

El genoma del DENV está compuesto por una cadena única, no segmentada, de ARN de polaridad positiva, con aproximadamente 10,7 kilobases (kb) de longitud (Rice, 1996). Comprende 4 serotipos relacionados antigénicamente, conocidos como Dengue 1 a Dengue 4 (DENV-1 a DENV-4), que son transmitidos al humano principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, aunque en el Sudeste Asiático también por el *Aedes albopictus* y el *Aedes polynesiensis* (Senanayake, 2006).

La infección por cualquiera de estos serotipos puede originar desde un cuadro subclínico, hasta síndromes severos con una elevada letalidad. Las manifestaciones usuales son la fiebre del Dengue (DF) o Dengue clásico, y la fiebre hemorrágica del Dengue (DHF) o Dengue hemorrágico, que evoluciona en ocasiones en el síndrome de choque por dengue (DSS), y es la principal causa de hospitalización y muerte entre los niños en el Sudeste Asiático (Henchal & Putnak, 1990; Clyde *et al.,* 2006).

El DENV es uno de los virus emergentes más importantes y se plantea como amenaza para más de la mitad de la población mundial (Dong *et al.,* 2007; Bennett *et al.,* 2003). Se estiman unos 50–100 milliones de casos de DF y de 250.000 a 500.000 casos de DHF/DSS por año alrededor del mundo (Fink *et al.,* 2007).

Más del 70% de la carga de morbilidad por esta enfermedad se concentra en Asia Sudoriental y en la zona de Pacífico Occidental. África y el Mediterráneo Oriental están mucho menos afectados. En América Latina y el Caribe, la incidencia y la gravedad de la enfermedad están aumentando rápidamente (WHO, 2007). En el período del 2001 al 2006 se notificaron 3.500.000 casos de DF, incluidos 80.000 casos de DHF y 1000 defunciones en las Américas, con una tasa de letalidad de 1.2% y la circulación de los cuatro serotipos (DENV-1 a DENV- 4), lo que aumenta el riesgo de aparición de

las formas más graves de la enfermedad (PAHO, 2007). Estudios epidemiológicos indican la asociación de determinados estados de la enfermedad con serotipos particulares (Watts *et al.,* 1999; Ricco-Hesse *et al.,* 2003; Messer *et al.,* 2003; Cologna *et al.,* 2005). Por ello es de considerable interés epidemiológico y clínico el establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas de DENV que circulan en una región dada.

1.2. Historia

La primera epidemia descripta de una enfermedad clínicamente compatible con Dengue, fue documentada por el Dr. Benjamin Rush en Filadelfia en 1780 (Carey, 1971). El termino "Dengue" proviene de la frase en swahili "*ka denga pepo"*, que describe un trastorno convulsivo o calambre fuerte causado por malos espíritus. La enfermedad habría cruzado desde el Este de África al Caribe en 1827, donde en Cuba se identificó popularmente como "Dengue" (Simpson & Weiner, 1989). Desde entonces y hasta principios del siglo XX, se registraron grandes epidemias de enfermedades similares al Dengue en América, Sur de Europa, Norte de África, Mediterráneo Oriental, Asia y Australia, y también en las islas de los océanos Índico y Pacífico y del mar Caribe (WHO, 2007).

Como resultado de la Segunda Guerra Mundial, la rápida urbanización en el Sudeste Asiático derivó en una pandemia de Dengue, donde se registró la primera gran epidemia de DHF. En los últimos 25 años del siglo XX se produjo una dramática expansión a nivel global de epidemias de DF/DHF, facilitada por la urbanización descontrolada en países tropicales subdesarrollados, la modernización del transporte, la globalización, la proliferación de criaderos de mosquitos y la falta de medidas efectivas para su control (Gubler, 2006; Gurugama *et al.,* 2010).

El más dramático aumento de Dengue como un gran problema de salud pública ha ocurrido en América. En 1946, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) inició un programa de control del mosquito *Aedes aegypti* con el objetivo de eliminar los focos de fiebre amarilla que aún quedaban en diversos países de la región (Monath, 1994; Gubler, 2002). A pesar del éxito logrado en su momento, con consecuencias positivas para el control de la fiebre amarilla y del Dengue, la erradicación del vector

fue difícil de mantener y a finales de la década de 1960 y principios de la de 1970 se constató la reinvasión del mosquito vector. Una epidemia de gran envergadura ocurrió en Cuba en 1981 y otra de DHF en Venezuela en 1989-1990. Desde entonces, epidemias han ocurrido en 14 países de Centro y Sudamérica, y brotes, casos confirmados, o ambos han sido reportados de casi todos los países tropicales y subtropicales de las Américas (PAHO, 2007).

Actualmente es una de las enfermedades infecciosas más importantes en áreas tropicales. Se estima que 100 millones de infecciones por Dengue ocurren por año, 500.000 casos de DHF que deben ser hospitalizados y entre 20.000 y 250.000 muertes, la mayoría niños. No se dispone de vacunas ni drogas antivirales para DENV por lo que la única forma de prevenir epidemias de DF/DHF es el control del *Aedes aegypti* (Umareddy *et al.,* 2007).

En el pasado, Uruguay permaneció en una situación de erradicación del vector *Aedes aegypti* en 1958 (Salvatella, 1996). En cuanto a la transmisión de Dengue, la enfermedad no se registra en Uruguay desde 1916, cuando se notificaron los últimos casos en el Departamento de Salto (Sosa, 1916), consecuencia de una epidemia que abarcó el cono Sur de América (Gratz & Knudsen, 1996). Lamentablemente, *Aedes aegypti* vuelve a ser hallado en Uruguay en 1997 (Salvatella, 1997) y desde entonces nuestro país permanece en situación de presencia del vector en el territorio nacional, (Salvatella & Rosa, 2003). Estos hechos han llevado al Gobierno Nacional a poner en marcha el Plan Nacional de Contingencia para una Epidemia de Dengue (MSP, 2006).

Numerosos estudios indican que la aparición del genotipo III de DENV-3 en las Américas, no sólo ha reemplazado a otros serotipos, sino que también está relacionado con el aumento de brotes de DHF (Messer *et al.,* 2003; Silva *et al.,* 2008). La primera gran epidemia de DHF ocurrió en Sri Lanka en 1989, y coincide con la emergencia de una variante del genotipo III de DENV-3, que se ha expandido desde el subcontinente indio hacia África y el Caribe, llegando finalmente a América Latina (Messer *et al.,* 2003; Aquino *et al.,* 2006). Estas variantes han sido asociadas a severas epidemias de DF en las Américas (Silva *et al.,* 2008).

1.3. Generalidades del virus Dengue

El DENV pertenece al género *Flavivirus* y comparte la familia *Flaviviridae* con los géneros *Pestivirus y Hepacivirus* (Henchal y Putnak, 1990; Popa, 2003). Su genoma está constituido por una cadena simple de 10,7 kb de ARN de polaridad positiva, que presenta un capuchón (cap) en el extremo 5' y carece de cola poli(A) en el extremo 3' terminal. Posee un único marco de lectura abierto que esta flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR), que codifica para una poliproteína que es clivada por proteasas virales y celulares, dando tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Linderbach y Rice, 2003).

Las proteínas estructurales son la proteína C, que compone la cápside que rodea y protege al ácido nucleico; la M, que deriva de la proteólisis de prM y forma la membrana viral; y la E, que conforma la envoltura y está involucrada en la penetración del virus en la célula (Chambers *et al.,* 1990; Rey, 2003; Hung *et al.,* 2004; Mondotte *et al.,* 2007).

Entre las proteínas no estructurales, las más caracterizadas son la NS5, que funciona como ARN polimerasa ARN dependiente (Nomaguchi *et al.,* 2003; Tan *et al.,* 1996) y la NS3, que posee funciones requeridas para la síntesis de ARN viral y para la formación del cap. Además la NS3 posee actividad proteasa cuando forma el complejo NS2B-NS3, siendo responsable del corte de NS2B, NS3, NS4A, NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C (Li *et al.,* 1999).

Existen 4 serotipos diferentes, conocidos como Dengue 1, 2, 3 y 4 (DENV-1 a DENV-4), que son transmitidos al humano principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. Estudios recientes indican que el DENV surgió hace aproximadamente 1000 años a partir de un virus de mono y que su transmisión al hombre ocurrió en el transcurso de los últimos 300 años (Weaver y Barret, 2004; Wang *et al.,* 2000).

1.3.1. Variabilidad genética

Los virus ARN se replican con una elevada tasa de error, debido a la ausencia de actividad correctora de errores de su ARN polimerasa, y se organizan en poblaciones de muy alta diversidad genética denominadas cuasiespecies, es decir como una nube de mutantes fuertemente relacionadas genéticamente (Domingo, 2002; Wang *et al.,* 2002). Estas características les confieren a los virus de ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios en las presiones selectivas. Además se ha comprobado la recombinación entre cepas de DENV, posiblemente debido a la circulación simultánea de genotipos diferentes de un serotipo en un mismo hospedero, lo que también es un importante mecanismo de generación de diversidad genética, pudiendo ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, mayor capacidad de transmisión o más virulentas (Twiddy & Holmes, 2003).

Por estas razones el DENV exhibe un alto grado de variabilidad genética. Utilizando secuencias completas correspondientes al gen E de DENV y utilizando un cut-off de 6% de divergencia, se puede dividir cada uno de los 4 serotipos en diferentes genotipos (Rico-Hesse, 1990). En particular, el DENV-3 se divide en 4 genotipos (I-IV) (Lanciotti *et al.,* 1994; Holmes & Twiddy, 2003; Messer *et al.,* 2003).

1.4. Patogenia

La primera infección con cualquiera de los cuatro serotipos se denomina infección primaria y puede resultar en la DF. En caso de producirse infecciones subsiguientes (con un nuevo serotipo), éstas reciben el nombre de infecciones secundarias y pueden ocasionar la DHF, que da lugar en ocasiones a DSS. (Rigau-Perez *et al.,* 1998). La forma severa de la enfermedad, DHF/DSS, se comporta inicialmente como una DF, pero después de tres días y luego de un descenso marcado de la temperatura, aparecen manifestaciones hemorrágicas que pueden llegar al choque severo en ausencia de tratamiento adecuado, con una elevada letalidad de hasta el 47% en las seis horas siguientes (Halstead, 1989, Gurugama *et al.,* 2010).

La mayoría de los casos de DHF suceden como resultado de una infección secundaria (Rothman y Ennis, 1999). Esto es explicado por un fenómeno denominado amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) (Morens, 1994). Cuando un individuo es infectado con un serotipo de DENV, genera anticuerpos específicos contra él, capaces de protegerlo por largo tiempo contra la reinfección con ese serotipo, pero solo durante dos o tres meses contra los otros serotipos. La posterior infección con un virus heterólogo produce la formación de complejos virus-anticuerpos que penetran en las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), gracias a la unión del fragmento constante de la inmunoglobulina G (IgG) a los receptores del tipo gamma. Como consecuencia se infecta un mayor número de células y se favorece la diseminación viral. Además, la replicación del virus induce a estas células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas típicas de la DHF (Morens y Halstead, 1990).

Además, en infecciones secundarias, la presencia de anticuerpos anti-Dengue aumenta la lisis celular por asesinas naturales (NK, *natural killers*) a través del mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Kurane *et al.,* 1984).

Por otro lado, la respuesta celular específica frente al DENV se inicia con la activación de linfocitos T (LT) CD4+ durante la viremia y posteriormente con la activación de LT CD8+. En individuos con DHF por infecciones secundarias, se ha demostrado la presencia de LT CD4+/CD8+ de memoria y LT CD4+/CD8+ citotóxicos (Berrios *et al.,* 1996; Zivny *et al.,* 1999), por lo que la activación de los LT y también la producción de citocinas son factores importantes en la patogenia de la DHF (Hober *et al.,* 1993).

Además de la respuesta inmune celular en los casos de DHF, se exacerba la activación y liberación de citocinas, lo que se relaciona con la mayor gravedad del cuadro clínico. También en la DHF se ha demostrado la activación del sistema del complemento, pudiéndose detectar en los casos graves concentraciones elevadas de las proteínas C3 y C1q, planteándose como una explicación, que los complejos virus-anticuerpos circulantes serían los que activan la reacción en cascada del complemento (Rothman *et al.,* 1999; Lei *et al.,* 2001).

Igualmente, existe la posibilidad que en la DHF se presenten reacciones autoinmunes, que pueden estar dadas por la presencia de anticuerpos contra las proteínas virales que presenten reactividad cruzada contra plaquetas y factores de coagulación (Markoff *et al.,* 1991; Lei *et al.,* 2001). Algunas proteínas no estructurales como NS1, NS2 y NS3 parecen tener cierta homología estructural con factores de coagulación, plaquetas, integrinas y adhesinas de células endoteliales humanas, permitiendo la activación de clonas LT autorreactivas que participan en la patología del Dengue (Markoff *et al.,* 1991).

Por otra parte, la activación de linfocitos de reactividad cruzada o serotipo-específicos pueden llevar a la consecuente formación de anticuerpos de reactividad cruzada, inespecíficos y autorreactivos involucrados con la gravedad de la enfermedad (Li *et al.,* 2003).

No todos los casos de DHF ocurren en individuos que experimentan una infección secundaria, en algunos casos la propia virulencia del virus, sumada a las características del hospedero, llevan a la complicación de la enfermedad (Bravo *et al.,* 1998). Algunos genotipos están más relacionados con el desarrollo de epidemias de DF o de mayor gravedad, como son las variantes genotípicas asiáticas del serotipo 2 y también la procedencia asiática del serotipo 3 (Watts *et al.,* 1999; Cologna *et al.,* 2005), y por otro lado, la mayor carga viral en los casos de DHF en comparación con los casos de DF (Vaughn *et al.,* 2000).

También es de destacar que el retículo endoplasmático (RE) del hospedador está involucrado en la síntesis proteica, replicación genómica y ensamblaje de las partículas virales de *Flavivirus*. Por esta razón, durante una infección con *Flavivirus* se suele sobrecargar la capacidad funcional del RE (Mackenzie y Westaway, 2001). Como consecuencia, estos eventos llevan a la activación de respuestas al estrés del RE, modulándose diversas señales con la posible inducción de la muerte celular (Umareddy, *et al.,* 2007).

1.5. Ciclo replicativo del virus Dengue

1.5.1. Unión y entrada

Estudios in vitro han demostrado que el DENV es capaz de infectar un gran número de células humanas, entre ellas células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B y T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales (Anderson, 2003). Sin embargo, in vivo solo se ha encontrado a monocitos, macrófagos y células dendríticas como blancos primarios de las infecciones por DENV (Jessie *et al.,* 2004).

El primer paso de la infección requiere la interacción entre la partícula viral y receptores presentes en la superficie de la célula huésped, que llevan a la entrada del virión a través de una endocitosis mediada por receptores. La proteína viral responsable de esta unión es la glicoproteína E, mediante su dominio III localizado hacia su extremo carboxiterminal (Crill y Roehring, 2001).

En cuanto a los receptores celulares, mucho esfuerzo se ha puesto en tratar de identificarlos. Diversos estudios indican que el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS) está involucrado en la unión del DENV con células de mamíferos (Chen *et al.,* 1997; Germi *et al.,* 2002; Hilgard y Stockert, 2000; Hung *et al.,* 2004). Dado que el HS está presente en una gran diversidad de células, su interacción con el virus permite la adsorción viral a la superficie de distintos tipos celulares, por lo que otros receptores más específicos son necesarios. En el caso específico de células dendríticas de Langerhans, que están presentes en la piel del huésped humano y que son de las primeras que se infectan con DENV, el receptor DC-SIGN fue encontrado indispensable para la entrada de los 4 serotipos de DENV (Navarro-Sanchez *et al.,* 2003; Tassaneetrithep *et al.,* 2003). Sin embargo, DC-SIGN es un receptor de baja afinidad que concentra partículas de DENV en la superficie de la célula dendrítica. Para realizar la internalización son necesarios receptores de alta afinidad que aún no fueron caracterizados (Lozach *et al.,* 2005; Mondotte *et al.,* 2007).

La internalización del virión también puede ocurrir por la formación de complejos con las IgG, las cuales se unen a las células susceptibles por sus receptores Fc (Myint *et al.,* 1991).

Luego de la internalización de los viriones, se acidifica el endosoma por la fusión con lisosomas, produciendo cambios conformacionales en la glicoproteína E, que se trimeriza irreversiblemente. Esto induce la fusión de las membranas celular y viral, con la consiguiente liberación de la nucleocápside al citoplasma, donde se decapsida liberando el genoma viral (Clyde *et al.,* 2006; Bartenschlager & Miller, 2008).

1.5.2. Síntesis proteica

Luego de que el genoma viral ya se encuentra en el citoplasma, comienza la traducción de una única poliproteína, por medio de un mecanismo dependiente su cap 5' terminal. En este paso, el factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) reconoce este cap del genoma viral (del mismo modo que ocurre con los mensajeros celulares), y solo así recluta al complejo ribosómico para iniciar la traducción (Gingras *et al.,* 1999).

También se ha reportado la existencia de un modelo de traducción independiente del cap, mediante un mecanismo que requiere la interacción de 5' NCR y 3' NCR del DENV, lo que refleja una adaptación a las respuestas antivirales celulares o a diferentes tipos celulares que contienen variados niveles de factores de traducción esenciales. (Edgil *et al.,* 2006).

La traducción de la poliproteína ocurre en el RE rugoso, lo cual facilita la localización de las proteínas virales dentro y alrededor de él para su posterior ensamblaje en viriones maduros (Yu, *et al.,* 2006).

El procesamiento proteolítico ocurre co y post-traduccionalmente por proteasas tanto celulares como virales (NS2B-NS3), dando lugar a 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales, en el orden C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, que atraviesan la membrana del RE (Chambers, *et al.,* 1990) (Fig. 1).

1.5.3. Replicación

Una vez sintetizadas las proteínas esenciales para la replicación, las proteínas NS3 y NS5 forman el complejo de replicasa viral (CRV). Éste reconoce los ARN

virales por su estructura secundaria característica, ubicada en el extremo 5', que es altamente conservada entre *Flavivirus* (Filomatori *et al.,* 2006).

Ésta consiste de una horquilla estabilizante grande (SLA) seguida de una más pequeña (SLB), ubicadas justo antes del codón iniciador de la traducción AUG (Fig. 2A). Sin embargo, para que ocurra la replicación del ARN es necesario ubicar el CRV en el extremo 3'. Para que ello suceda se establecen interacciones ARN-ARN de largo alcance mediadas por secuencias complementarias ubicadas en ambos extremos del genoma (Álvarez *et al.,* 2005). Éstas son 5' UAR y 3' UAR (región corriente arriba de AUG), ubicadas en las NCR 5' y 3', respectivamente; y 5' CS y 3' CS (secuencia de ciclación), que se ubican en la secuencia codificante de la cápside, y corriente arriba de la horquilla estabilizante 3' (3'SL), respectivamente (Brinton, *et al.,* 1986; Zeng *et al.,* 1998; Tilgner *et al.,* 2005) (Fig. 2A y 2B).

De esta forma el ARN genómico funciona como molde para la síntesis de cadenas de polaridad negativa, y éstas generarán copias de ARN de polaridad positiva que tendrán tres destinos posibles. Podrán servir nuevamente como plantillas transcripcionales, funcionar como mensajeros para la síntesis proteica, o ensamblarse dentro de la nucleocápside y transformarse en los ARN genómicos de nuevos viriones (Diamond, 2003).

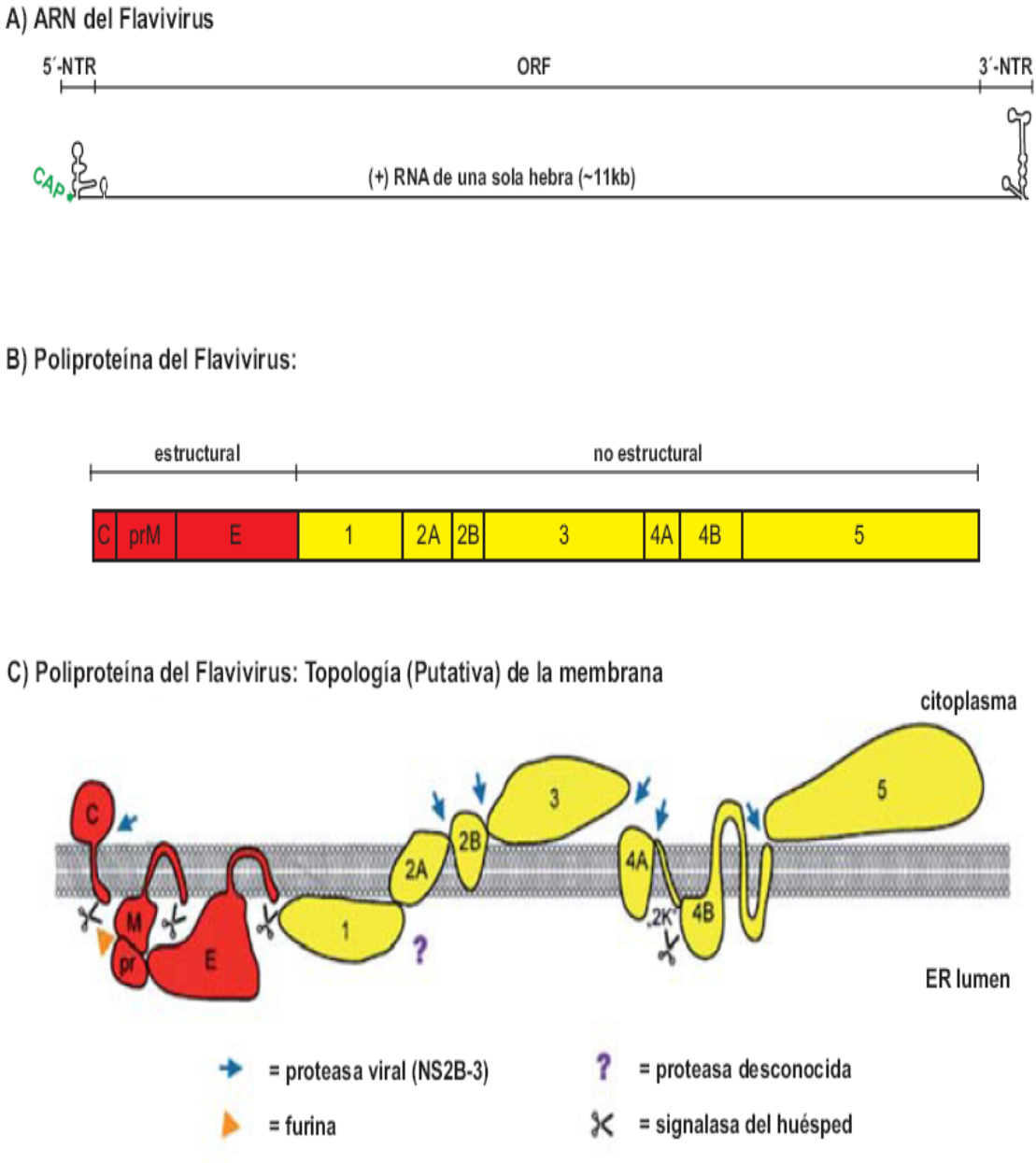
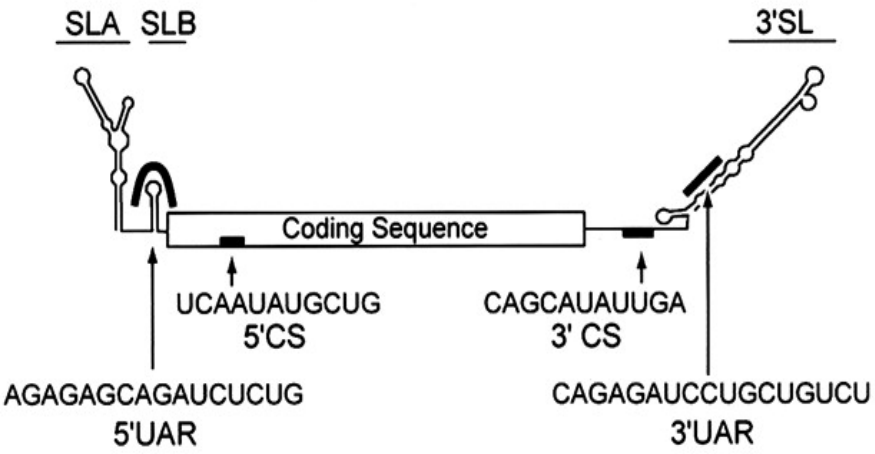
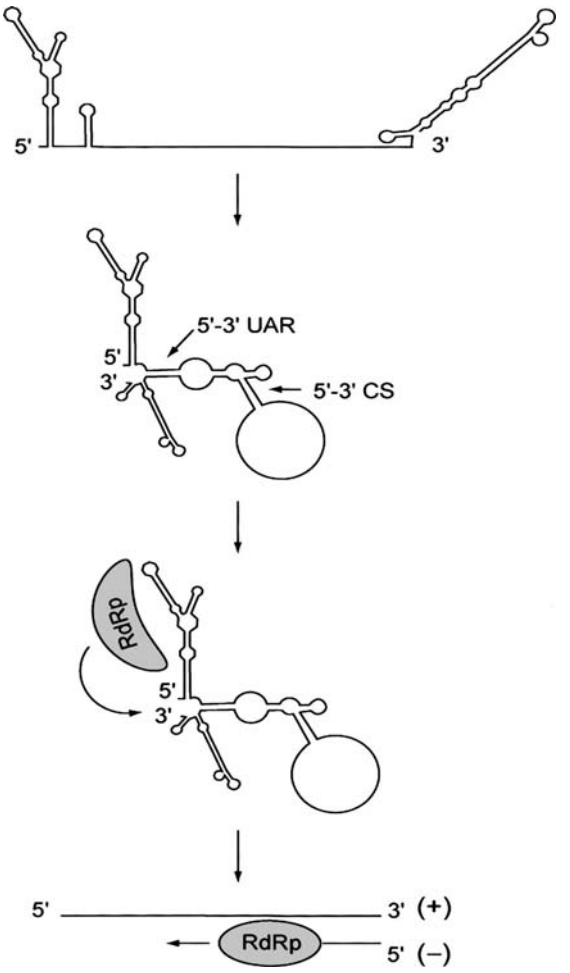


Figura 1. Organización genómica del DENV. (A) Genoma de un *Flavivirus*. **(B)** Representación de los genes que traducen proteínas estructurales y no estructurales del DENV. **(C)** Disposición del las proteínas del DENV entorno a la membrana del RE. (Modificado de *Dengue virus. Genome organization & viral protein expresión. Molecular Virology. University of Heidelberg*).



A



B

Figura 2. (A) Representación esquemática del genoma del DENV mostrando la ubicación y secuencias de las regiones complementarias 5' UAR, 5' CS, 3' CS y 3' UAR. También se indican las ubicaciones de SLA, SLB y 3' SL.
(B) Modelo para la síntesis de las cadenas de polaridad negativa del DENV. El genoma viral se circulariza mediante la hibridación de 5'-3' UAR y 5'-3' CS. El CRV se une al SLA, y a través de interacciones ARN-ARN de largo alcance, es transferido al sitio de iniciación de la transcripción en el extremo 3' del genoma (Filomatori *et al.,* 2006).

1.5.4. Ensamblaje y Salida

Inicialmente se forman unas partículas virales inmaduras no infecciosas a nivel del RE, formadas por las proteínas E y prM, además de la nucleocápside y lípidos de membrana. La ruptura proteolítica de prM ocurre en el aparato de Golgi, madurando de esta forma la partícula viral y haciéndola infecciosa. Este virus completo es liberado de la célula por exocitosis para así infectar nuevas células (Diamond, 2003).

1.6. Teoría de Coalescencia

La teoría de la coalescencia establece que todos los genes o alelos en una población determinada son heredadas de un ancestro único y compartido por todos los miembros de la población, conocido como el ancestro común más reciente (MRCA) (Kingman, 2000). Las relaciones de herencia entre alelos son generalmente representados como una genealogía de genes, de forma similar a un árbol filogenético. Esta genealogía genética es también conocida como el coalescente. La comprensión de las propiedades estadísticas de la coalescencia bajo diferentes supuestos es la base de la teoría de coalescencia. El coalescente ejecuta modelos de la deriva génica hacia atrás en el tiempo y permite reconstruir la historia evolutiva de una población viral (Harding, 1998).

La teoría básica de coalescencia asume que los genes no sufrieron procesos de recombinación y modela la deriva génica como un proceso estocástico conocido como un proceso de Markov (Rice, 2004). Debido a que el proceso de fijación de genes debido a la deriva génica es un componente crucial de la teoría de coalescencia, es muy útil cuando el locus genético en estudio no está bajo selección natural. Esta teoría es una extensión natural del concepto clásico de genética de poblaciones de la evolución neutral y es una aproximación al modelo de Fisher-Wright para grandes poblaciones. Se han realizado importantes contribuciones al desarrollo de la teoría de coalescencia, que permitieron la incorporación de variaciones en el tamaño de la población, recombinación y selección, así como también la inclusión de prácticamente cualquier modelo de evolución arbitrariamente complejo o modelos demográficos en el análisis de

genética de poblaciones (Kaplan *et al.,* 1988; Hudson, 1991; Donelly & Tavaré, 1995; Neuhauser & Krone, 1997; Staktin, 2001).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo de esta tesis es establecer el grado de variabilidad genética y el modo de evolución del DENV en la región Sudamericana.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar las relaciones filogenéticas entre variantes de DENV-3 aisladas en Ecuador y Venezuela, con respecto a otras estirpes aisladas en la región Latinoamericana.

2. Estimar las tasas evolutivas y dinámicas poblacionales de las variantes de DENV-3 circulantes en la región Sudamericana.

3. Estudiar los cambios aminoacídicos en la proteína E de estirpes de DENV-3 aisladas en diferentes regiones de Sudamérica.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras

Las muestras de suero de 23 pacientes Ecuatorianos con síntomas de la enfermedad fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical "Leopoldo Inquieta Perez" en Guayaquil, Ecuador. Todos estos pacientes resultaron positivos contra DENV por la presencia de IgM, aumento de IgG especificas, o ambas, mediante ensayos con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) específicos para DENV.

Las muestras de suero de pacientes Venezolanos infectados con DENV-3 reportadas en el marco de este trabajo (19 muestras), fueron aisladas en el "Departamento de Virología" del "Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), Caracas, Venezuela, y del "Laboratorio Regional de Diagnóstico e

Investigación del Dengue y Otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), Maracay, Venezuela. Estas muestras fueron identificadas como positivas para DENV-3 a través del protocolo descrito en el punto 3.4 (Lanciotti *et al.,* 1992), y se utilizaron para infectar monocapas de la línea celular de *Aedes albopictus* C6/36. Se crecieron durante 7 días a 32º C, procediéndose luego a la recolección de los sobrenadantes de las células infectadas.

3.2. Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN de las muestras de suero Ecuatorianas, se utilizó el kit de extracción de ARN viral (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones brindadas por el fabricante, obteniendo ARNs totales de las 23 muestras Ecuatorianas. A continuación, estas muestras fueron enviadas a nuestro laboratorio.

Por otra parte, el ARN viral de muestras Venezolanas fue extraído a partir de 280 µl del sobrenadante de células C6/36 infectadas, utilizando el mismo kit de extracción mencionado.

3.3. Transcripción Reversa.

Realizamos una Transcripción Reversa (RT) para obtener ADN copia (ADNc) de las 23 muestras de DENV Ecuatorianas y 19 Venezolanas, a partir de los ARN aislados de dichas muestras. Para ello realizamos una mezcla de reacción utilizando los siguientes reactivos por cada muestra: 3 microlitros (µl) de agua Milli-Q, 1 µl de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP's) a una concentración de 10 milimolar (mM), 3 µl de hexámeros aleatorios y 5 µl de cada muestra de ARN. Esta mezcla se incuba a 65 °C por 5 minutos (min) y posteriormente fue colocada en hielo 1 minuto. A continuación se adicionaron a la mezcla 4 µl de buffer 5X, 2 µl de DTT 100 mM, 1µl de ARNasa out y 1µl de la enzima ADN polimerasa ARN dependiente superscript II (Invitrogen) en una concentración de 200 unidades de enzima (U) / µl, obteniendo un volumen final de 20 µl. Esta mezcla de reacción fue incubada 10 min a 25 ºC, 50 min a 42 ºC y 15 min a 70 ºC en el termociclador Corbett PalmCycler CG-196.

3.4. Determinación de serotipo.

Para determinar el serotipo de DENV circulantes en cada una de las muestras mencionadas, sometimos los ADNc generados a una Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (Nested PCR) (Lanciotti *et al.,* 1992; Harris *et al.,* 1998) amplificando la región PreM-C. Para la primera ronda de amplificación preparamos la siguiente mezcla de reacción por muestra: 17,6 µl de agua Milli-Q; 3 µl de Buffer 10X (Invitrogen); 1 µl de $MgCl_2$ a una concentración de 50 mM; 1 µl de dNTP's 10 mM; 1 µl de los cebadores D1 (-) y D2 (+), cuyas secuencias nucleotídicas son 5' TCA ATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3', y 5' TTGCACCAACAGTCAATGTCT TCAGGTTC 3', respectivamente, a una concentración de 15 µM; y 0,4 µl de la ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen), en una concentración de 5 U/µL. A esta mezcla se le agregaron 5 µl de ADNc y se incubaron los 25 µl resultantes a 94 ºC / 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min; culminando con 5 minutos a 72 °C. El producto obtenido de 511 pares de bases (pb) fue sometido a una nueva ronda de amplificación, manteniendo el primer externo D1, e incluyendo esta vez los cebadores TS1, TS2, TS3 y D4, con las siguientes secuencias nucleotídicas: TS1: 5' CGTCTCAGTTGATCCGGCGGG 3'; TS2: 5' CGCCACAAGGGCCATGAACAG 3'; TS3: 5' TAACATCATCATGAGACAGAGC; D4: 5' TGTTGTCTTAAACAAGAGA GGTC 3'. Los productos obtenidos a través de este método difieren en su tamaño (DENV-1: D1-TS1, 482 pb; DENV-2: D1-TS2, 119 pb; DENV-3: D1-TS3, 290 pb; DENV-4: D1-D4, 389 pb). De esta manera podemos determinar el serotipo de cada muestra por la comparación de sus diferentes movilidades electroforéticas (Fig. 3). Esta técnica nos permitió determinar que 8 de las cepas Ecuatorianas pertenecen al serotipo DENV-3, siendo las restantes de otros serotipos.

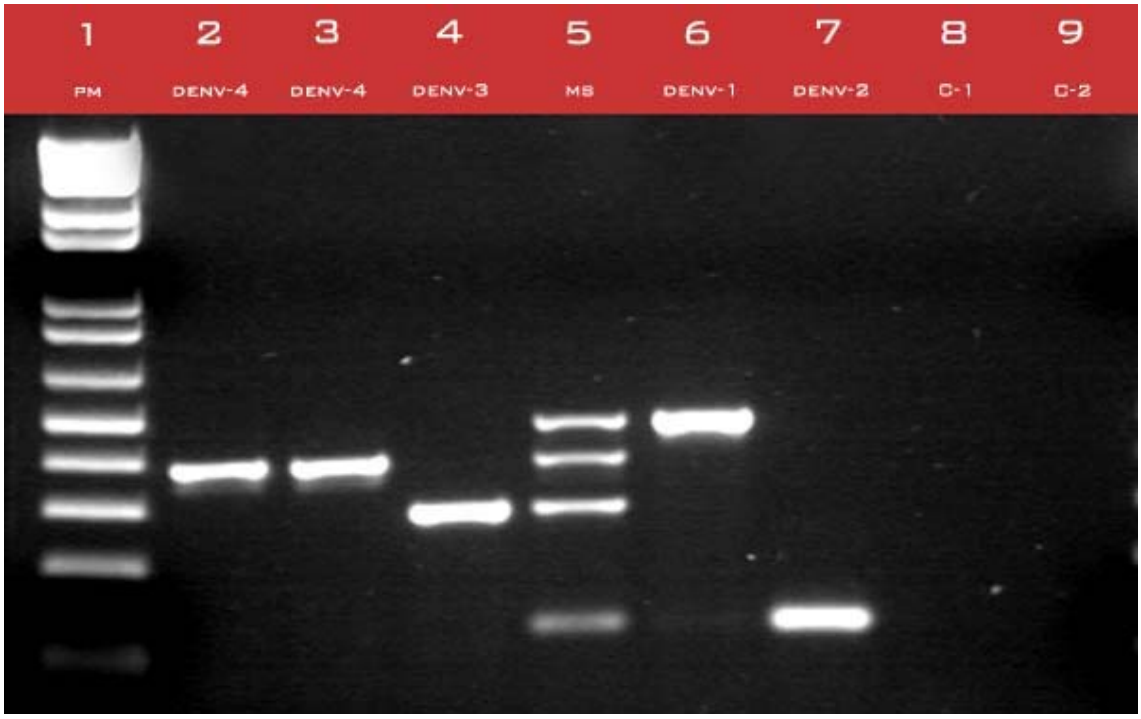


Fig. 3. Visualización de una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, para determinar los serotipos de DENV. Los fragmentos amplificados a través de esta Nested-PCR migran de acuerdo a su tamaño, indicándonos así el serotipo de la cepa de DENV analizada. Teniendo como referencia el Marcador de Serotipos (MS) en el carril 5, podemos comparar la migración de los amplificados y determinar si se tratan de un DENV-1 (482 pb), DENV-2 (119 pb), DENV-3 (290 pb), o DENV-4 (389 pb).

3.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Procedimos a una amplificación por PCR para obtener secuencias competas del gen de la envoltura viral (E) de las muestras Ecuatorianas positivas para DENV-3 (Aquino *et al.,* 2006). Para ello se realizó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra: 13,25 µl de agua Milli-Q; 2,5 µl de Buffer 10X (Invitrogen); 0,75 µl de $MgCl_2$ a una concentración de 50 mM; 1 µl de dNTP's 10 mM; 1 µl de los cebadores EC (-) y ES (+), cuyas secuencias nucleotídicas son 5' CCGCACACTCCATTCTCCCAA 3', y 5' GCCCTATTTCTTGCCCATTACA 3', respectivamente, a una concentración de 15 µM; y 0,5 µl de la ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen), en una concentración de 5 U/µL. Luego, a esta mezcla de reacción se le añadieron 5 µl de ADNc obtenido previamente por RT, consiguiendo así un volumen final de 25 µl. Finalmente, a este volumen final se lo incubó a 94 ºC durante 2 minutos; 40 ciclos de 94 ºC / 30 segundos, 50 ºC / 1 minuto y 72 ºC / 1,5 minutos, y por último se lo incubó a 72 ºC durante 10 minutos en el termociclador Corbett PalmCycler CG-196, para luego ser almacenado a 4 ºC. El tamaño de banda esperado es de aproximadamente 1600 pb.

Alternativamente, se utilizaron los cebadores 796 (+) (5' CGAGAAGGTAGAGATGGGC 3'), y 2576 (-) (5' CACTCCATTCTCCCCAAGCG 3') para amplificar la E completa de las variantes aisladas en Venezuela.

3.6. Electroforesis en gel de agarosa.

Con el fin de observar los producto obtenidos por PCR, se realizaron corridas electroforética en gel de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X. Se preparó una solución de agarosa en buffer TAE 1X y se calentó hasta que tornara a transparente, luego se dejó enfriar unos minutos y se vertió la misma dentro de las cubetas niveladas de forma correcta. Se dejó gelificar por aproximadamente 20 minutos para poder retirar los peines y verter sobre el gel 150 ml de TAE 1X. A continuación se sembraron en cada pocillo 10 µL de los productos de PCR con 2 µL de buffer de carga 12X (Promega), compuesto de Azul de bromofenol y Xilencianol. Además en un pocillo se sembró como referente de corrida un marcador de peso molecular de 100 pb (Fementas). La corrida fue realizada por 50 minutos a 90 voltios (V) para que el frente de corrida alcance las 3/4

partes del gel. Por último el gel se tiño durante 10–15 minutos a temperatura ambiente en una solución de Bromuro de Etidio (0.5μg/ml) y se visualizó en un documentador de geles con luz ultravioleta (Gel Doc X5 170-8170, Biorad).

3.7. Purificación de productos de PCR.

Los amplicones fueron purificados utilizando el kit de purificación "QIAquick PCR Purification Kit" de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante. Se agregan 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen de producto de PCR y se coloca la columna QIAquick en un tubo de centrifuga de 2 ml. Luego, se agrega la muestra a la columna para que el ADN se una, y se centrifuga por 1 minuto. El eluido es descartado y se vuelve a colocar la columna en el tubo, lavando la columna con 750 μL de buffer PE y centrifugando durante 1 minuto. Luego se descarta el eluido y se coloca la columna en el mismo tubo, centrifugándose por 1 minuto. A continuación se coloca la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml para poder llevar a cabo la elución del ADN, mediante el agregado de 50 μL de buffer EB (10mM Tris pH 8.5) al centro de la membrana de la columna. Para este paso es necesario dejar incubar la columna durante 1 minuto a temperatura a ambiente y por último centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.

3.8. Secuenciación.

La secuenciación de los amplicones generados a partir de cepas Ecuatorianas fue realizada por la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Institut Pasteur de Montevideo, en un secuenciador automático de 4 capilares ABI3130 de Applied Biosystems. Para ello se utilizaron los mismos oligonucleótidos con los cuales se llevó a cabo la amplificación. Todos los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones a los efectos de evitar cualquier discrepancia posible. Las secuencias obtenidas corresponden a la región codificante para la proteína E de DENV-3 y fueron asignadas en el GenBank con los números de acceso FM246466-FM246473 (ver Tabla 1).

Alternativamente, las secuencias Venezolanas fueron obtenidas a través del servicio de secuenciación comercial Macrogene Inc, Seoul, Korea. Las secuencias nucleotídicas del gen E obtenidas fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso HM348812-HM348831, (ver Tabla 1). Las secuencias del gen E de DENV-3 aisladas en Venezuela previamente reportadas fueron obtenidas de la base de datos "Virus Variation Database", NCBI (Resch *et al.,* 2009).

3.9. Análisis de secuencias.

3.9.1. Análisis filogenéticos.

Con el objetivo de estudiar el grado de variabilidad genética de las cepas de DENV-3 aisladas entre 2000 y 2008 en Ecuador y Venezuela, procedimos a alinear sus secuencias nucleotídicas correspondientes a la región codificante de la proteína E mediante los programas CLUSTAL W (Thompson *et al.,* 1994) y MUSCLE (Edgar, 2004), con 47 secuencias de DENV-3 aisladas en otros países Latinoamericanos y 11 secuencias de distintos genotipos de DENV-3 aisladas en otras regiones geográficas del mundo (ver Tabla 1). Dos conjuntos de datos diferentes fueron realizados. El primero incluye todas las secuencias del gen E de cepas del genotipo III de DENV-3 aisladas entre 2000 y 2008 en Venezuela (n=119), junto con las restantes secuencias mencionadas (Fig. 5). Debido a que este alto número de secuencias dificulta la visualización del árbol, procedimos luego a reducir el número de secuencias Venezolanas (n=31), sin alterar el resto de las secuencias (Fig. 4).

A los efectos de investigar la posible presencia de eventos de recombinación en las secuencias utilizadas, se aplicaron dos aproximaciones implementadas en el Programa SimPlot (Lole *et al.,* 1999): el método de ventanas deslizantes ("*sliding windows*") de análisis de distancias; y el proceso de "*bootscanning*" (Salminen *et al.,* 1995), no encontrándose cepas recombinantes. El programa Modelgenerator (Keane *et al.,* 2006) fue utilizado para identificar el modelo evolutivo que mejor representa los datos obtenidos. A través del criterio de información de Akaike (AIC) y de la prueba del cociente de verosimilitud (LRT) jerárquica, se encontró que el modelo GTR+Γ es el modelo evolutivo óptimo para describir este conjunto de secuencias. Utilizando este modelo se construyeron árboles de máxima verosimilitud, mediante el programa PhyML (Guindon *et al.,* 2005, www.phylogeny.fr/phylo_cgi/phyml), utilizando un test

de relación de verosimilitud aproximada (aLRT) como medida de robustez de cada nodo.

3.9.2. Análisis de Coalescencia.

Una vez obtenido el cluster en el que se agrupan todas la cepas Ecuatorianas (ver Fig. 4, Cluster C, en celeste) y Venezolanas (Fig. 4, Cluster A, en rojo), procedimos a realizar los análisis de coalescencia con el objetivo de estudiar las tasas evolutivas y el modo de evolución del genotipo III de DENV-3 en Sudamérica. Para ello utilizamos la aproximación Bayesiana Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC) implementada en el paquete BEAST (Drummond & Rambaut, 2007), para analizar, por un lado, cepas de Ecuador y de Perú; y por otro lado cepas Venezolanas. Usando el modelo GTR+Γ y 20 millones de generaciones de MCMC, se testaron diferentes dinámicas poblacionales (tamaño poblacional constante, skyline bayesiano, crecimiento poblacional exponencial, expansional y logístico), y los resultados se examinaron con el programa TRACER (Drummond & Rambaut, 2007). La incertidumbre estadística en los datos se refleja en la densidad de probabilidad mayor al 95 % (HPD). La convergencia se evaluó con los valores de ESS (tamaño efectivo de muestreo).

Para realizar el primer análisis, se incluyeron secuencias aisladas en Ecuador y Perú entre 2000 y 2005 (dos por cada año), que forman parte del Cluster C (ver Fig. 4 y Tabla 1).

De forma similar procedimos con el análisis de las cepas incluidas en el Cluster A de la Figura 4. Este clado contiene 31 secuencias de cepas aisladas en Venezuela entre 2000 y 2007 (de 3 a 4 por cada año) (ver Tabla 1). No obstante se consideraron diferentes conjuntos de secuencias para estos estudios, teniendo en cuenta diferentes factores como el número de secuencias totales, el número de secuencias por año y la inclusión o no de secuencias idénticas. Los resultados de estos estudios no arrojaron diferencias significativas.

3.9.3. Análisis de sustituciones aminoacídicas.

A los efectos de observar las posibles sustituciones de aminoácidos en la proteína E de DENV, se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes a la región E de variantes del genotipo III de DENV-3 aisladas en Ecuador, con secuencias de diferentes clados y de distintos genotipos, y la cepa CH53489 (genotipo II de DENV-3), para la que se conoce la estructura de su proteína E determinada a través de cristalografía de rayos X (Modis *et al.,* 2003). Se incluyeron además secuencias Venezolanas de los tres clados. Posteriormente se utilizó el programa MEGA 4 para traducir las secuencias a aminoácidos, y se procedió al análisis de las sustituciones aminoacídicas (en relación a la cepa CH53489, residuos 1 a 393). Con el objetivo de poder mapear estas modificaciones en la estructura de la proteína E, utilizamos la aplicación An Interactive Server-side Molecule Image Generador (AISMIG) (Bohne-Lang *et al.,* 2005).

Para mapear las sustituciones aminoacídicas encontradas en la estructura de la proteína E de diferentes cepas Venezolanas, se utilizo el programa PDB ProteinWorkshop 3.6 (Moreland *et al.,* 2005).

4. Resultados

4.1. Variabilidad genética de cepas de DENV-3 aisladas en América Latina.

A efectos de estudiar el grado de variabilidad genética de estirpes del genotipo III de DENV-3 aisladas en la región Latinoamericana, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, bajo el modelo GTR+Γ y su fiabilidad fue testada mediante valores de aLRT. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 4.

Todas las cepas de DENV-3 incluidas en este análisis (ver Tabla 1) se agrupan de acuerdo a su genotipo (ver Fig. 4). Cada cluster está respaldado por valores de aLRT altos, al igual que los indicados para diferentes linajes genéticos que se advierten dentro de cada cluster. Todas las cepas Ecuatorianas y Venezolanas analizadas en este estudio pertenecen al genotipo III de DENV-3 (Fig. 4). Si embargo hay una gran diversificación de este genotipo en las Américas, pudiéndose apreciar 3 diferentes linajes genéticos: uno compuesto exclusivamente por cepas aisladas en Venezuela (Cluster A; Fig. 4, en rojo); otro con cepas de Brasil, Paraguay y Bolivia (Cluster B; Fig. 4, en verde); y otro principalmente con cepas de Perú y Ecuador (Cluster C, Fig. 4, en celeste). Todas las cepas Ecuatorianas analizadas pertenecen a este último clado. Los Clusters B y C también incluyen cepas aisladas en la región del Caribe. Se advierte además un clado diferente dentro del genotipo III con cepas de Nicaragua, Panamá y México aisladas entre 1994 y 2000. Este clado extinto contiene cepas que circularon en primeros años luego de la introducción de este genotipo al continente Americano, pero muestra una gran divergencia con las cepas Latinoamericanas actuales.

Se puede observar que las cepas Venezolanas no solo se agrupan en el Cluster A, sino que también forman parte del Cluster B (cepa DENV-3/VE/BID-V911/2001) y C (cepas DENV-3/VE/BID-V1593/2005 y Gua2007), lo que revela al menos 3 eventos de introducción del genotipo III de DENV-3 en este país (ver Fig. 4).

Para confirmar estos resultados se realizó un nuevo árbol filogenético en el que se incluyeron todas las cepas Venezolanas correspondientes a la región E de DENV-3.

Encontramos que salvo las 3 secuencias mencionadas, el resto de las 119 secuencias Venezolanas se agruparon en el Cluster A (Fig. 5).

Tabla 1: Orígenes de las cepas de DENV-3 incluidas en los análisis filogenéticos

Nombre	Año	País de Aislamiento	Nº de Acceso
Aruba 1999*	1999	Aruba	HM348812
DENV-3/BO/FSB413/2003	2003	Bolivia	DQ177886
DENV-3/BO/FSB439/2003	2003	Bolivia	DQ177887
DENV-3/BR/BR74886/2002	2002	Brasil	AY679147
DENV-3/BR/PV5/2002	2002	Brasil	DQ118875
DENV-3/BR/PV4/2003	2003	Brasil	DQ118874
DENV-3/BR/BR8/2004	2004	Brasil	DQ118864
DENV-3/CU/CUBA116/2000	2000	Cuba	AY702032
DENV-3/CU/CUBA580/2001	2001	Cuba	AY702030
DENV-3/CU/CUBA21/2002	2002	Cuba	AY702031
DENV-3/EC/OBS8852/2000	2000	Ecuador	DQ177898
DENV-3/EC/OBS8857/2000	2000	Ecuador	DQ177899
EC8241_2000*	2000	Ecuador	FM246468
EC5080_2001*	2001	Ecuador	FM246467
EC9110_2003*	2003	Ecuador	FM246470
EC8801_2004*	2004	Ecuador	FM246469
EC15082_2004*	2004	Ecuador	FM246472
EC9266_2005*	2005	Ecuador	FM246473
EC9233_2005*	2005	Ecuador	FM246471
EC4860_2007*	2007	Ecuador	FM246466
DENV-3/ID/1280/1978	1978	Indonesia	L11426
DENV-3/ID/85-159/1985	1985	Indonesia	L11428
DENV-3/ID/PI64/2004	2004	Indonesia	AY858046
DENV-3/MQ/1243/1999	1999	Martinica	AY099337
DENV-3/MQ/1567/2000	2000	Martinica	AY099338
DENV-3/MQ/1706/2000	2000	Martinica	AY099339
DENV-3/MQ/2012/2001	2001	Martinica	AY099340
DENV-3/MQ/2023/2001	2001	Martinica	AY099341
DENV-3/MX/6097/1995	1995	México	AY146763
DENV-3/MX/4841/1995	1995	México	DQ341202
DENV-3/MX/6584/1996	1996	México	DQ341203
DENV-3/MX/6883/1997	1997	México	DQ341204
DENV-3/MX/6889/1997	1997	México	DQ341205
DENV-3/MX/6896/1997	1997	México	DQ341206
DENV-3/MX/OAXACA/2000	2000	México	DQ341207
DENV-3/NI/24/1994	1994	Nicaragua	AY702033
DENV-3/PA/PANAMA/1994	1994	Panama	DQ341209
DENV-3/PY/AS10/2003	2003	Paraguay	DQ118883
DENV-3/PY/AS12/2003	2003	Paraguay	DQ118884
DENV-3/PY/AS9/2003	2003	Paraguay	DQ118885

Nombre	Año	País de Aislamiento	Nº de Acceso
DENV-3/PY/FM11/2003	2003	Paraguay	DQ118886
DENV-3/PY/PJ4/2003	2003	Paraguay	DQ118887
DENV-3/PY/PJ5/2003	2003	Paraguay	DQ118888
DENV-3/PY/PJ6/2003	2003	Paraguay	DQ118889
DENV-3/PY/PJ7/2003	2003	Paraguay	DQ118890
DENV-3/PY/YA2/2003	2003	Paraguay	DQ118891
DENV-3/PE/ OBT412/2000	2000	Peru	DQ177903
DENV-3/PE/FSP581/2001	2001	Perú	DQ177890
DENV-3/PE/OBT1467/2001	2001	Perú	DQ177900
DENV-3/PE/FSL706/2002	2002	Perú	DQ177889
DENV-3/PE/IQD1728/2002	2002	Perú	DQ177895
DENV-3/PE/OBT2812/2003	2003	Perú	DQ177901
DENV-3/PE/FST145/2003	2003	Perú	DQ177891
DENV-3/PE/JQD5132/2003	2003	Perú	DQ177896
DENV-3/PE/FST289/2004	2004	Perú	DQ177892
DENV-3/PE/FST312/2004	2004	Perú	DQ177893
DENV-3/PE/FST346/2004	2004	Perú	DQ177894
DENV-3/PE/FSL1212/2004	2004	Perú	DQ177888
DENV-3/PE/MFI624/2005	2005	Perú	DQ177897
DENV-3/PE/OBT4024/2005	2005	Perú	DQ177902
DENV-3/PR/BID-V1091/2004	2004	Puerto Rico	EU529704
DENV-3/PR/BID-V1090/1998	1998	Puerto Rico	EU529703
DENV-3/FP/3050/1990	1990	Polinesia Francesa	L11439
DENV-3/WS/1696/1986	1986	Samoa	L11435
DENV-3/LK/1266/2000	2000	Sri Lanka	AY099336
DENV-3/LK/1326/1981	1981	Sri Lanka	L11431
DENV-3/LK/1594/1985	1985	Sri Lanka	L11436
DENV-3/TH/C0360/1994	1994	Tailandia	AY923865
DENV-3/TH/CH53489/1973	1973	Tailandia	L11620
DENV-3/TL/ET209/2000	2000	Timor Oriental	EF440434
Mir 2000*	2000	Miranda, Venezuela	HM348813
Ara 2001*	2001	Aragua, Venezuela	HM348814
Ara 2001B*	2001	Aragua, Venezuela	HM348815
Ara 2001C*	2001	Aragua, Venezuela	HM348816
Ara 2001D*	2001	Aragua, Venezuela	HM348817
DC 2001A*	2001	Caracas, Venezuela	HM348818
DC 2001B*	2001	Caracas, Venezuela	HM348819
DC 2001C*	2001	Caracas, Venezuela	HM348820
Mir 2001A*	2001	Miranda, Venezuela	HM348821
Mir 2001B*	2001	Miranda, Venezuela	HM348822
Mir 2001C*	2001	Miranda, Venezuela	HM348823

Nombre	Año	País de Aislamiento	Nº de Acceso
Mir 2001D*	2001	Miranda, Venezuela	HM348824
Mir 2003*	2003	Miranda, Venezuela	HM348825
DC 2003*	2003	Caracas, Venezuela	HM348826
Lar 2004*	2004	Lara, Venezuela	HM348827
Mon 2005*	2005	Monagas, Venezuela	HM348828
Gua 2005*	2005	Guárico, Venezuela	HM348829
Coj 2007*	2007	Cojedes, Venezuela	HM348830
Gua 2007*	2007	Guárico, Venezuela	HM348831
DENV-3/VE/BID-V2174/2000	2000	Venezuela	FJ639746
DENV-3/VE/BID-V2175/2000	2000	Venezuela	FJ639747
DENV-3/VE/BID-V2178/2000	2000	Venezuela	FJ639749
DENV-3/VE/BID-V2179/2000	2000	Venezuela	FJ639750
DENV-3/VE/LARD5990/2000	2000	Venezuela	AY146764
DENV-3/VE/LARD6007/2000	2000	Venezuela	AY146765
DENV-3/VE/LARD6812/2000	2000	Venezuela	AY146766
DENV-3/VE/LARD6315/2000	2000	Venezuela	AY146767
DENV-3/VE/LARD6318/2000	2000	Venezuela	AY146768
DENV-3/VE/LARD6397/2000	2000	Venezuela	AY146769
DENV-3/VE/LARD6411/2000	2000	Venezuela	AY146770
DENV-3/VE/LARD6456/2000	2000	Venezuela	AY146771
DENV-3/VE/C02-003/2001	2001	Venezuela	DQ367720
DENV-3/VE/C09-006/2001	2001	Venezuela	DQ371245
DENV-3/VE/BID-V904/2001	2001	Venezuela	EU482612
DENV-3/VE/BID-V906/2001	2001	Venezuela	EU482613
DENV-3/VE/BID-V913/2001	2001	Venezuela	EU482614
DENV-3/VE/BID-V1113/2001	2001	Venezuela	EU529684
DENV-3/VE/BID-V1116/2001	2001	Venezuela	EU529685
DENV-3/VE/BID-V1117/2001	2001	Venezuela	EU529686
DENV-3/VE/BID-V1118/2001	2001	Venezuela	EU529687
DENV-3/VE/BID-V903/2001	2001	Venezuela	EU529688
DENV-3/VE/BID-V907/2001	2001	Venezuela	EU529689
DENV-3/VE/BID-V908/2001	2001	Venezuela	EU529690
DENV-3/VE/BID-V911/2001	2001	Venezuela	EU529691
DENV-3/VE/BID-V1115/2001	2001	Venezuela	EU569688
DENV-3/VE/BID-V912/2001	2001	Venezuela	EU569689
DENV-3/VE/BID-V915/2001	2001	Venezuela	EU569690
DENV-3/VE/BID-V916/2001	2001	Venezuela	EU569691
DENV-3/VE/BID-V905/2001	2001	Venezuela	EU660420
DENV-3/VE/BID-V1114/2001	2001	Venezuela	FJ182015
DENV-3/VE/BID-V1585/2001	2001	Venezuela	FJ373303
DENV-3/VE/LARD6666/2001	2001	Venezuela	AY146772

Nombre	Año	País de Aislamiento	Nº de Acceso
DENV-3/VE/LARD6667/2001	2001	Venezuela	AY146773
DENV-3/VE/LARD6668/2001	2001	Venezuela	AY146774
DENV-3/VE/LARD6722/2001	2001	Venezuela	AY146775
DENV-3/VE/LARD7110/2001	2001	Venezuela	AY146776
DENV-3/VE/LARD7812/2001	2001	Venezuela	AY146777
DENV-3/VE/LARD7984/2001	2001	Venezuela	AY146778
DENV-3/VE/BID-V2180/2001	2001	Venezuela	FJ639751
DENV-3/VE/BID-V2181/2001	2001	Venezuela	FJ639752
DENV-3/VE/BID-V2182/2001	2001	Venezuela	FJ639753
DENV-3/VE/BID-V2183/2001	2001	Venezuela	FJ639754
DENV-3/VE/BID-V2184/2001	2001	Venezuela	FJ639755
DENV-3/VE/BID-V2185/2001	2001	Venezuela	FJ639756
DENV-3/VE/BID-V2187/2001	2001	Venezuela	FJ639757
DENV-3/VE/BID-V2188/2001	2001	Venezuela	FJ639758
DENV-3/VE/BID-V2189/2001	2001	Venezuela	FJ639759
DENV-3/VE/BID-V2190/2001	2001	Venezuela	FJ639760
DENV-3/VE/BID-V2191/2001	2001	Venezuela	FJ639761
DENV-3/VE/BID-V2192/2001	2001	Venezuela	FJ639762
DENV-3/VE/BID-V2193/2001	2001	Venezuela	FJ639763
DENV-3/VE/BID-V2195/2001	2001	Venezuela	FJ639765
DENV-3/VE/BID-V2196/2001	2001	Venezuela	FJ639766
DENV-3/VE/BID-V2197/2001	2001	Venezuela	FJ639767
DENV-3/VE/BID-V2198/2001	2001	Venezuela	FJ639768
DENV-3/VE/BID-V2199/2001	2001	Venezuela	FJ639769
DENV-3/VE/BID-V2203/2001	2001	Venezuela	FJ639770
DENV-3/VE/BID-V2204/2001	2001	Venezuela	FJ639771
DENV-3/VE/BID-V2207/2001	2001	Venezuela	FJ639774
DENV-3/VE/BID-V2186/2001	2001	Venezuela	FJ744700
DENV-3/VE/BID-V2208/2002	2002	Venezuela	FJ639775
DENV-3/VE/BID-V2209/2002	2002	Venezuela	FJ639776
DENV-3/VE/BID-V2210/2002	2002	Venezuela	FJ639777
DENV-3/VE/BID-V2211/2002	2002	Venezuela	FJ639778
DENV-3/VE/C23-009/2003	2003	Venezuela	DQ367721
DENV-3/VE/C29-008/2003	2003	Venezuela	DQ367722
DENV-3/VE/BID-V2212/2003	2003	Venezuela	FJ639779
DENV-3/VE/BID-V2213/2003	2003	Venezuela	FJ639780
DENV-3/VE/BID-V2214/2003	2003	Venezuela	FJ639781
DENV-3/VE/BID-V2215/2003	2003	Venezuela	FJ639782
DENV-3/VE/BID-V2217/2003	2003	Venezuela	FJ639784
DENV-3/VE/BID-V2218/2003	2003	Venezuela	FJ639785
DENV-3/VE/BID-V1591/2004	2004	Venezuela	EU854291

Nombre	Año	País de Aislamiento	Nº de Acceso
DENV-3/VE/BID-V1590/2004	2004	Venezuela	FJ373304
DENV-3/VE/BID-V2220/2004	2004	Venezuela	FJ639787
DENV-3/VE/BID-V2222/2004	2004	Venezuela	FJ639789
DENV-3/VE/BID-V2223/2004	2004	Venezuela	FJ639790
DENV-3/VE/BID-V2224/2004	2004	Venezuela	FJ639791
DENV-3/VE/BID-V2225/2004	2004	Venezuela	FJ639792
DENV-3/VE/BID-V2226/2004	2004	Venezuela	FJ639793
DENV-3/VE/BID-V2228/2004	2004	Venezuela	FJ639795
DENV-3/VE/BID-V2231/2004	2004	Venezuela	FJ639798
DENV-3/VE/BID-V2232/2004	2004	Venezuela	FJ639799
DENV-3/VE/BID-V2233/2004	2004	Venezuela	FJ639800
DENV-3/VE/BID-V2234/2004	2004	Venezuela	FJ639801
DENV-3/VE/BID-V1593/2005	2005	Venezuela	EU854292
DENV-3/VE/BID-V2239/2005	2005	Venezuela	FJ639803
DENV-3/VE/BID-V2240/2005	2005	Venezuela	FJ639804
DENV-3/VE/BID-V2242/2005	2005	Venezuela	FJ639805
DENV-3/VE/BID-V2244/2005	2005	Venezuela	FJ639807
DENV-3/VE/BID-V2247/2005	2005	Venezuela	FJ639810
DENV-3/VE/BID-V2256/2005	2005	Venezuela	FJ639816
DENV-3/VE/BID-V2257/2006	2006	Venezuela	FJ639817
DENV-3/VE/BID-V2266/2006	2006	Venezuela	FJ639825
DENV-3/VE/BID-V2219/2006	2006	Venezuela	FJ639786
DENV-3/VE/BID-V2205/2007	2007	Venezuela	FJ639772
DENV-3/VE/BID-V1102/2007	2007	Venezuela	EU529683
DENV-3/VE/BID-V2267/2008	2008	Venezuela	FJ639826
DENV-3/VE/BID-V2268/2008	2008	Venezuela	FJ639827

*Las secuencias señaladas con un asterisco son las obtenidas en este estudio. Las resaltadas en rojo y celeste fueron utilizadas para realizar los análisis de coalescencia para el Cluster A y C, respectivamente.

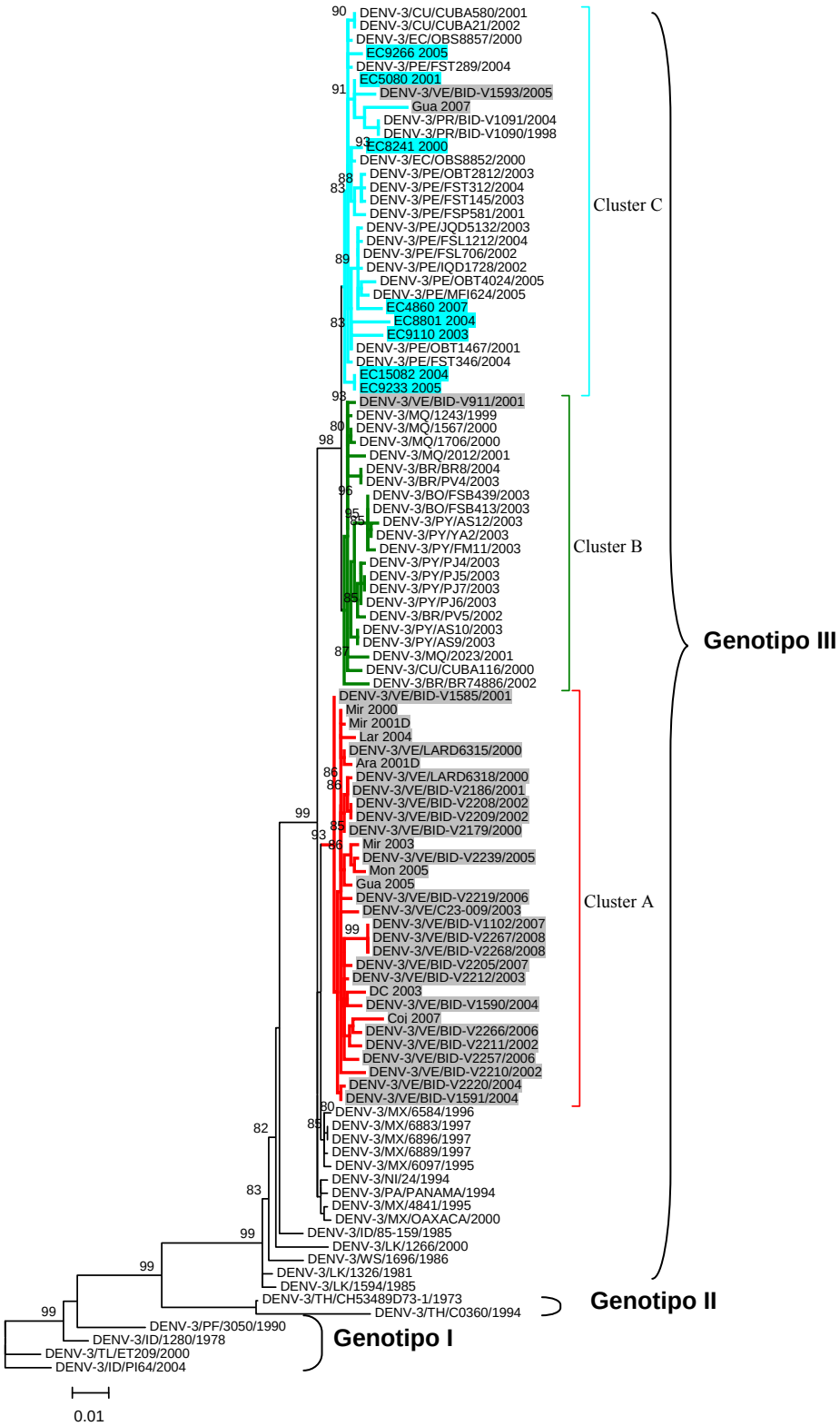


Fig. 4. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de cepas de DENV-3 aisladas en América Latina. Las cepas previamente descriptas se indican de acuerdo a la nomenclatura estandarizada que indica el organismo, país de aislamiento, nombre de la cepa y año de aislamiento, respectivamente. Las cepas Ecuatorianas y Venezolanas reportadas en este estudio se muestran por su nombre y resaltadas en celeste y gris, respectivamente. Los números en los nodos indican los valores de aLRT. La barra en la parte inferior de la figura indica la distancia.

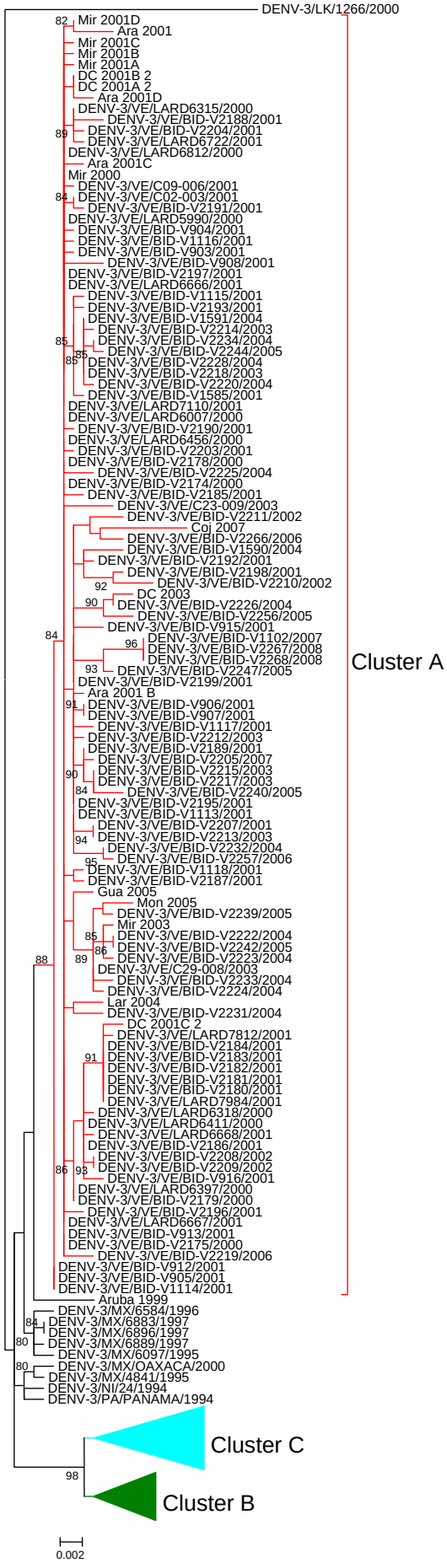


Fig. 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de cepas de DENV-3 aisladas en América Latina. Las cepas previamente descritas se indican por la nomenclatura estandarizada, incluyendo el organismo, país de aislamiento, nombre de la cepa y año de aislamiento, respectivamente. Las cepas Venezolanas reportadas en este estudio se muestran por su nombre (Cluster A). Las secuencias pertenecientes a los Clusters B y C, no se indican (para mejor visualización de las relaciones filogenéticas de las cepas del Cluster A), pero corresponden a las mismas cepas incluidas en la Figura 4. Los números en los nodos indican los valores de aLRT. La barra en la parte inferior de la figura indica la distancia.

4.2. Análisis Bayesiano de coalescencia de cepas del genotipo III de DENV-3 aisladas en la región Sudamericana.

A los efectos de analizar secuencias del gen E de cepas de Ecuador y de Perú del genotipo III de DENV-3 que forman un cluster monofilético (Fig. 4, Cluster C, en celeste), utilizamos la aproximación Bayesiana Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC). Para ello seleccionamos secuencias aisladas en estos países y seriadas en el tiempo (dos de cada año desde 2000 a 2005), procediendo con los análisis de coalescencia para estudiar la tasa evolutiva y el modo de evolución de este genotipo en dicha región. De forma similar procedimos con las cepas incluidas en el Cluster A de la Figura 4. Este clado contiene 31 secuencias de cepas aisladas en Venezuela entre 2000 y 2007 (de 3 a 4 por cada año).

Luego de realizar un análisis de 20 millones de generaciones de MCMC, usando el modelo GTR+Γ, un reloj molecular relajado (Drummond *et al.,* 2006) y testando diferentes dinámicas poblacionales (tamaño poblacional constante, skyline bayesiano, crecimiento poblacional exponencial, expansional y logístico), encontramos que el genotipo III de DENV-3 sigue un modelo de crecimiento poblacional expansional para ambos clados analizados (Drummond *et al.,* 2005) (ver Tablas 2 y 3).

Estos resultados nos indican que las variantes de DENV-3 genotipo III que circulan en Ecuador y Perú, evolucionaron de un ancestro que existió alrededor del año 1994 (ver Tabla 2). Por otra parte, el MRCA de las cepas circulantes en Venezuela (Cluster A), se halló alrededor del año 1998 (ver Tabla 3).

Las tasas evolutivas determinadas para los Clusters A y C, fueron de 8,5 x 10^{-4} y 10,3 x 10^{-4} sustituciones por sitio por año (s/s/a), respectivamente (ver Tablas 2 y 3).

Tabla 2: Análisis Bayesiano de Coalescencia de secuencias del genotipo III de DENV-3 aislados en Ecuador y Perú.

Grupo[a]	Parámetro	Valor[b]	HPD[c]	ESS[d]
DENV-3 genotipo III				
	Log likelihood	-1.847	(-1840 a -1856)	6232
	Prior	-50,7	(-22,7 a -77,8)	316
	Posterior	-1797	(-1786 a -1826)	323
	Tasa promedio[e]	**$1{,}03 \times 10^{-3}$**	($3{,}18 \times 10^{-4}$ a $1{,}77 \times 10^{-3}$)	2682
	Edad de raíz (años)	11,8	(5,5 a 22,3)	1856
	MRCA[f]	**1994**	(1982 a 2000)	

[a]Ver Figura 4 y Tabla 1 para ver las cepas incluidas en este análisis. [b]Se muestran los valores promedios para cada parámetro. [c]HPD, valores de densidad de probabilidad alta (high probability density). [d]ESS, tamaño efectivo de muestreo (effective sample size). [e]Tasa promedio, se expresa en sustituciones/sitio/año. [f]MRCA, año del Ancestro Común Más Reciente.

Tabla 3: Análisis Bayesiano de Coalescencia de secuencias del genotipo III de DENV-3 aislados en Venezuela.

Grupo[a]	Parámetro	Valor[b]	HPD[c]	ESS[d]
DENV-3 genotipo III				
	Log likelihood	-2727	(-2739 a -2719)	4586
	Prior	-70,8	(-88,5 a -56,0)	685
	Posterior	-2799	(-2817 a -2780)	1123
	Tasa promedio[e]	**$8{,}48 \times 10^{-4}$**	($5{,}62 \times 10^{-4}$ a $1{,}15 \times 10^{-3}$)	1451
	Edad de raíz (años)	8,96	(7,32 a 11,2)	1013
	MRCA[f]	**1998**	(1996 a 2000)	

[a]Ver Fig. 4 y Tabla 1 para ver las cepas incluidas en este análisis. [b]Se muestran los valores promedios para cada parámetro. [c]HPD, valores de densidad de probabilidad alta (high probability density). [d]ESS, tamaño efectivo de muestreo (effective sample size). [e]Tasa promedio, se expresa en sustituciones/sitio/año. [f]MRCA, año del Ancestro Común Más Reciente.

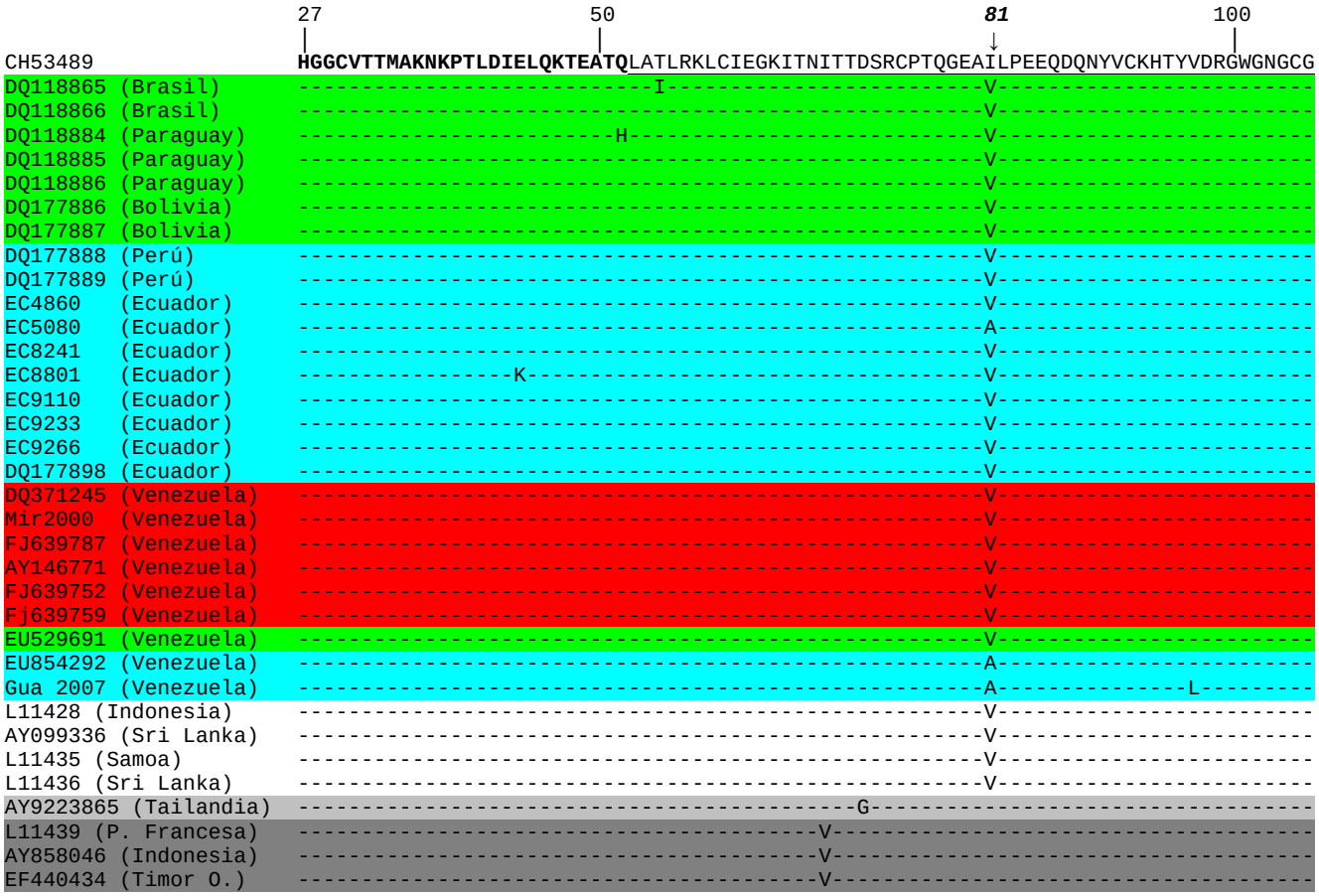
4.3. Mapeo de las sustituciones aminoacídicas en la proteína E de estirpes de DENV-3 que circulan en la región Sudamericana.

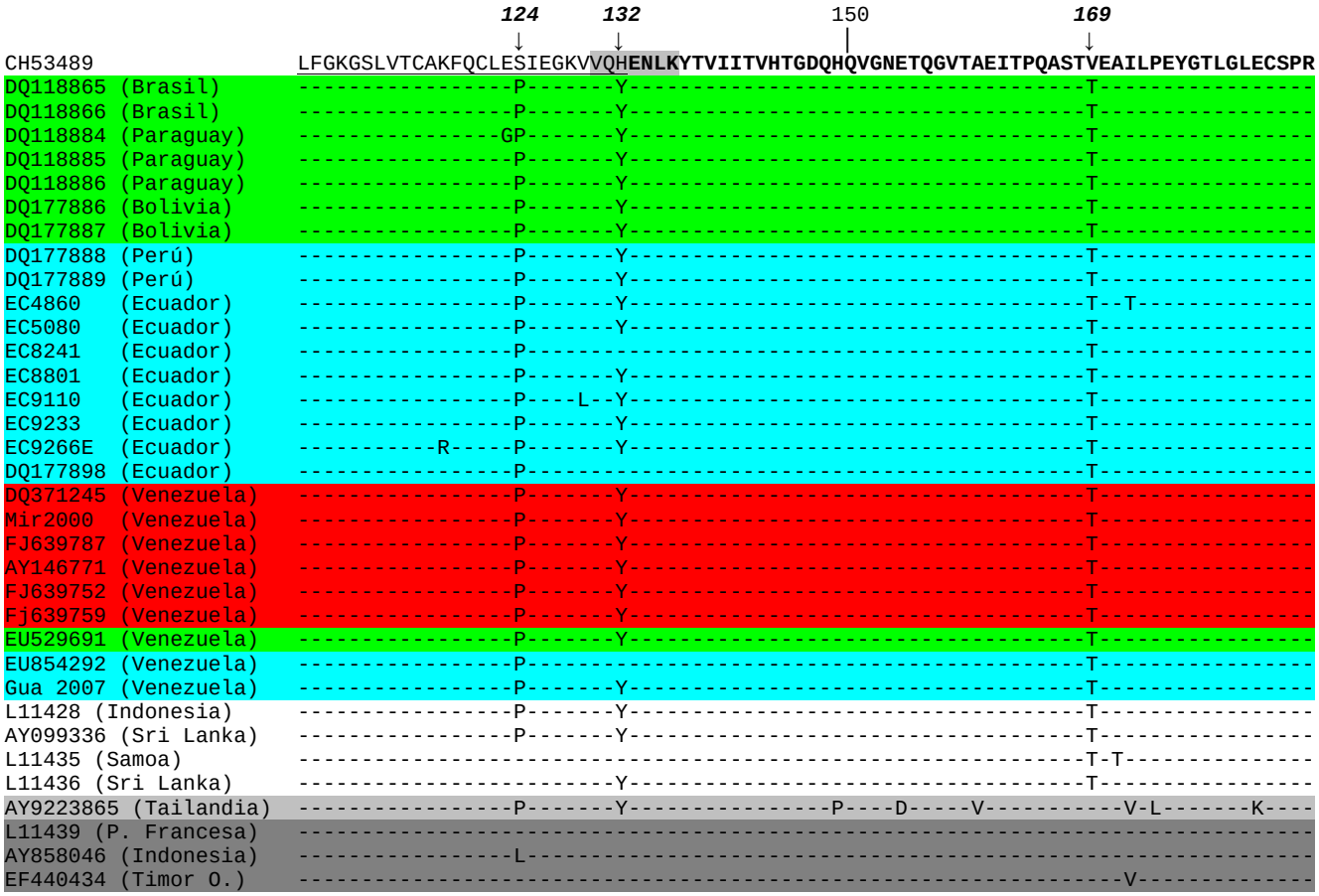
Con el objetivo de estudiar la diversificación de este genotipo en la región Latinoamericana, procedimos a realizar una comparación de las secuencias aminoacídicas correspondientes a la proteína E de cepas de DENV-3 pertenecientes a distintos clusters, con respecto a la cepa CH53489 (Número de acceso L11620). Como se aprecia en la Figura 6, diferentes sustituciones aminoacídicas son compartidas entre las cepas de genotipo III de DENV-3 estudiadas. En las posiciones 301 y 383 (dominio III) ocurren sustituciones no conservativas y que son compartidas por todas las cepas del genotipo III (Leucina a Treonina; Lisina a Asparagina; respectivamente). Estas sustituciones aminoacídicas han sido previamente reportadas como involucradas en epítopes de neutralización (Hiramatsu *et al.,* 1996; Hung *et al.,* 2004; Matsui *et al.,* 2009), lo que puede ser claramente apreciable en la estructura generada de la proteína E (ver Fig. 7).

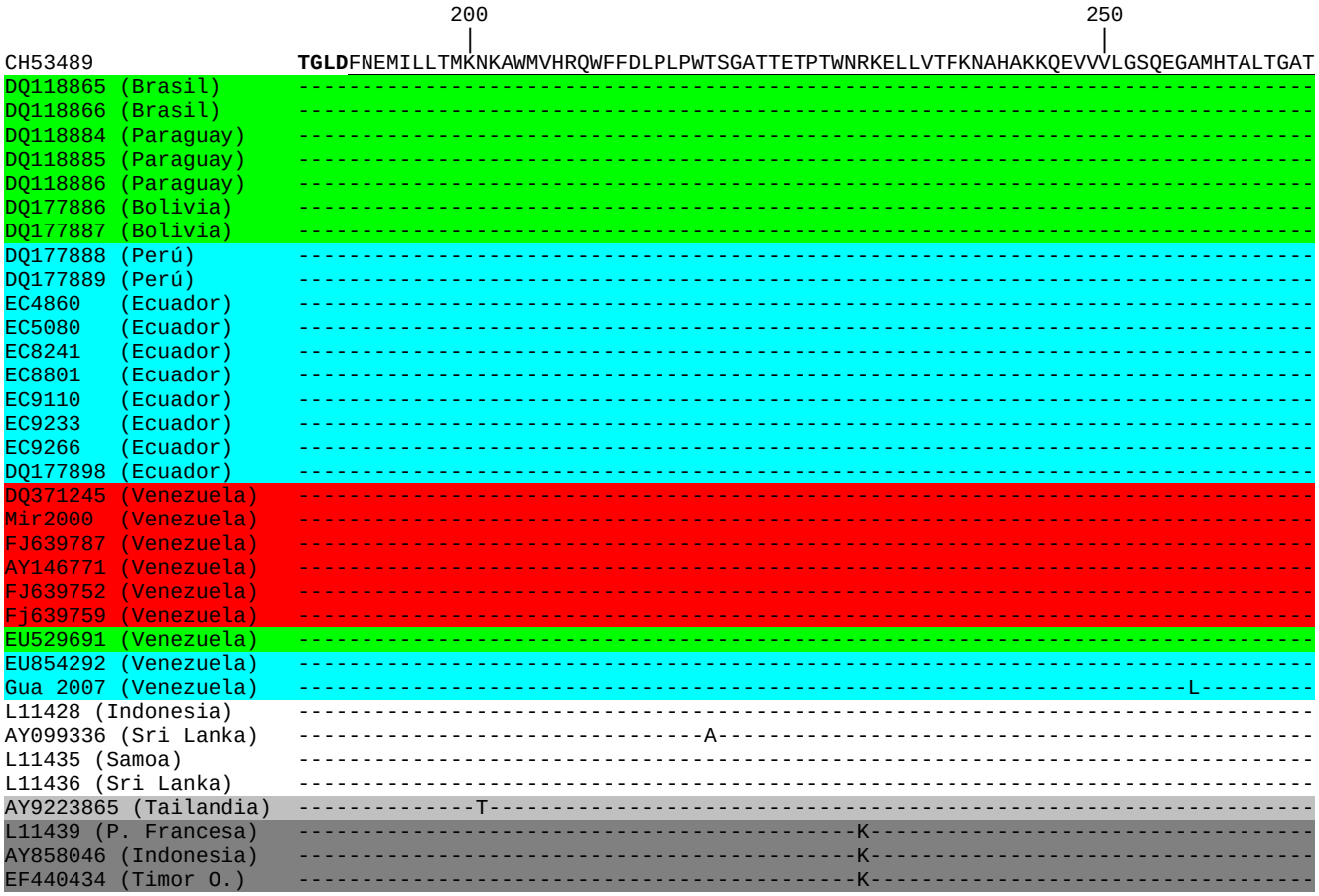
La presencia de una Asparagina en la posición 388 (dominio III) ha sido relacionada con una mayor incidencia de casos de DHF (Lin *et al.,* 1994). En todas las cepas analizadas, este residuo esta presente en dicha posición (Fig. 6).

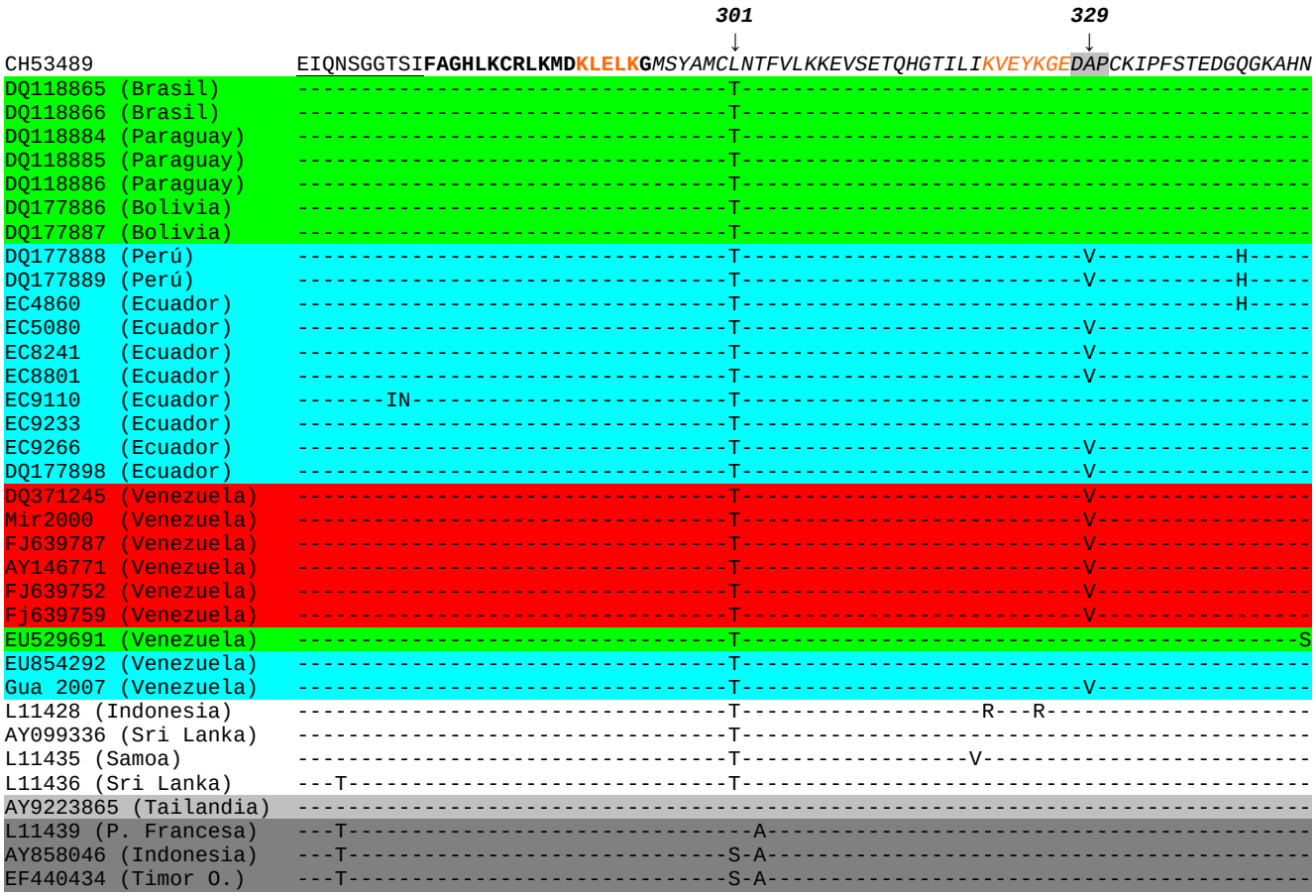
En la posición 329 (dominio III) ocurre un cambio de una Alanina a una Valina (sólo en cepas de Ecuador, Perú y Venezuela). Esta mutación ocurre en todas las cepas Venezolanas del Cluster A, pero dos de las tres variantes Venezolanas de los Clusters B y C mantienen una Alanina. Este sitio se identificó expuesto a la superficie de la envoltura en otros estudios (Falconar, 2008; Modis *et al.,* 2003), lo que también puede ser apreciado en este estudio (Fig. 7 y 8).

En el sitio 132 (dominio II) se encuentra una Tirosina en la mayoría de las cepas del genotipo III analizadas. Sin embargo, en cepas del Cluster C (entre ellas una Venezolana), se ubica una Histidina (Fig. 8). Este residuo también está expuesto a la superficie de la envoltura (Fig. 7 y 8).


27
50
81
100
CH53489 HGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLCIEGKITNITTDSRCPTQGEAILPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCG
DQ118865 (Brasil)
DQ118866 (Brasil)
DQ118884 (Paraguay)
DQ118885 (Paraguay)
DQ118886 (Paraguay)
DQ177886 (Bolivia)
DQ177887 (Bolivia)
DQ177888 (Perú)
DQ177889 (Perú)
EC4860 (Ecuador)
EC5080 (Ecuador)
EC8241 (Ecuador)
EC8801 (Ecuador)
EC9110 (Ecuador)
EC9233 (Ecuador)
EC9266 (Ecuador)
DQ177898 (Ecuador)
DQ371245 (Venezuela)
Mir2000 (Venezuela)
FJ639787 (Venezuela)
AY146771 (Venezuela)
FJ639752 (Venezuela)
Fj639759 (Venezuela)
EU529691 (Venezuela)
EU854292 (Venezuela)
Gua 2007 (Venezuela)
L11428 (Indonesia)
AY099336 (Sri Lanka)
L11435 (Samoa)
L11436 (Sri Lanka)
AY9223865 (Tailandia)
L11439 (P. Francesa)
AY858046 (Indonesia)
EF440434 (Timor O.)


124
132
150
169
CH53489 LFGKGSLVTCAKFQCLESIEGKVVQHENLKYTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAEITPQASTVEAILPEYGTLGLECSPR
DQ118865 (Brasil)
DQ118866 (Brasil)
DQ118884 (Paraguay)
DQ118885 (Paraguay)
DQ118886 (Paraguay)
DQ177886 (Bolivia)
DQ177887 (Bolivia)
DQ177888 (Perú)
DQ177889 (Perú)
EC4860 (Ecuador)
EC5080 (Ecuador)
EC8241 (Ecuador)
EC8801 (Ecuador)
EC9110 (Ecuador)
EC9233 (Ecuador)
EC9266E (Ecuador)
DQ177898 (Ecuador)
DQ371245 (Venezuela)
Mir2000 (Venezuela)
FJ639787 (Venezuela)
AY146771 (Venezuela)
FJ639752 (Venezuela)
Fj639759 (Venezuela)
EU529691 (Venezuela)
EU854292 (Venezuela)
Gua 2007 (Venezuela)
L11428 (Indonesia)
AY099336 (Sri Lanka)
L11435 (Samoa)
L11436 (Sri Lanka)
AY9223865 (Tailandia)
L11439 (P. Francesa)
AY858046 (Indonesia)
EF440434 (Timor O.)


200
250
CH53489 TGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGAT
DQ118865 (Brasil)
DQ118866 (Brasil)
DQ118884 (Paraguay)
DQ118885 (Paraguay)
DQ118886 (Paraguay)
DQ177886 (Bolivia)
DQ177887 (Bolivia)
DQ177888 (Perú)
DQ177889 (Perú)
EC4860 (Ecuador)
EC5080 (Ecuador)
EC8241 (Ecuador)
EC8801 (Ecuador)
EC9110 (Ecuador)
EC9233 (Ecuador)
EC9266 (Ecuador)
DQ177898 (Ecuador)
DQ371245 (Venezuela)
Mir2000 (Venezuela)
FJ639787 (Venezuela)
AY146771 (Venezuela)
FJ639752 (Venezuela)
Fj639759 (Venezuela)
EU529691 (Venezuela)
EU854292 (Venezuela)
Gua 2007 (Venezuela)
L11428 (Indonesia)
AY099336 (Sri Lanka)
L11435 (Samoa)
L11436 (Sri Lanka)
AY9223865 (Tailandia)
L11439 (P. Francesa)
AY858046 (Indonesia)
EF440434 (Timor O.)


301
329
CH53489 EIQNSGGTSIFAGHLKCRLKMDKLELKGMSYAMCLNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGKAHN
DQ118865 (Brasil)
DQ118866 (Brasil)
DQ118884 (Paraguay)
DQ118885 (Paraguay)
DQ118886 (Paraguay)
DQ177886 (Bolivia)
DQ177887 (Bolivia)
DQ177888 (Perú)
DQ177889 (Perú)
EC4860 (Ecuador)
EC5080 (Ecuador)
EC8241 (Ecuador)
EC8801 (Ecuador)
EC9110 (Ecuador)
EC9233 (Ecuador)
EC9266 (Ecuador)
DQ177898 (Ecuador)
DQ371245 (Venezuela)
Mir2000 (Venezuela)
FJ639787 (Venezuela)
AY146771 (Venezuela)
FJ639752 (Venezuela)
Fj639759 (Venezuela)
EU529691 (Venezuela)
EU854292 (Venezuela)
Gua 2007 (Venezuela)
L11428 (Indonesia)
AY099336 (Sri Lanka)
L11435 (Samoa)
L11436 (Sri Lanka)
AY9223865 (Tailandia)
L11439 (P. Francesa)
AY858046 (Indonesia)
EF440434 (Timor O.)

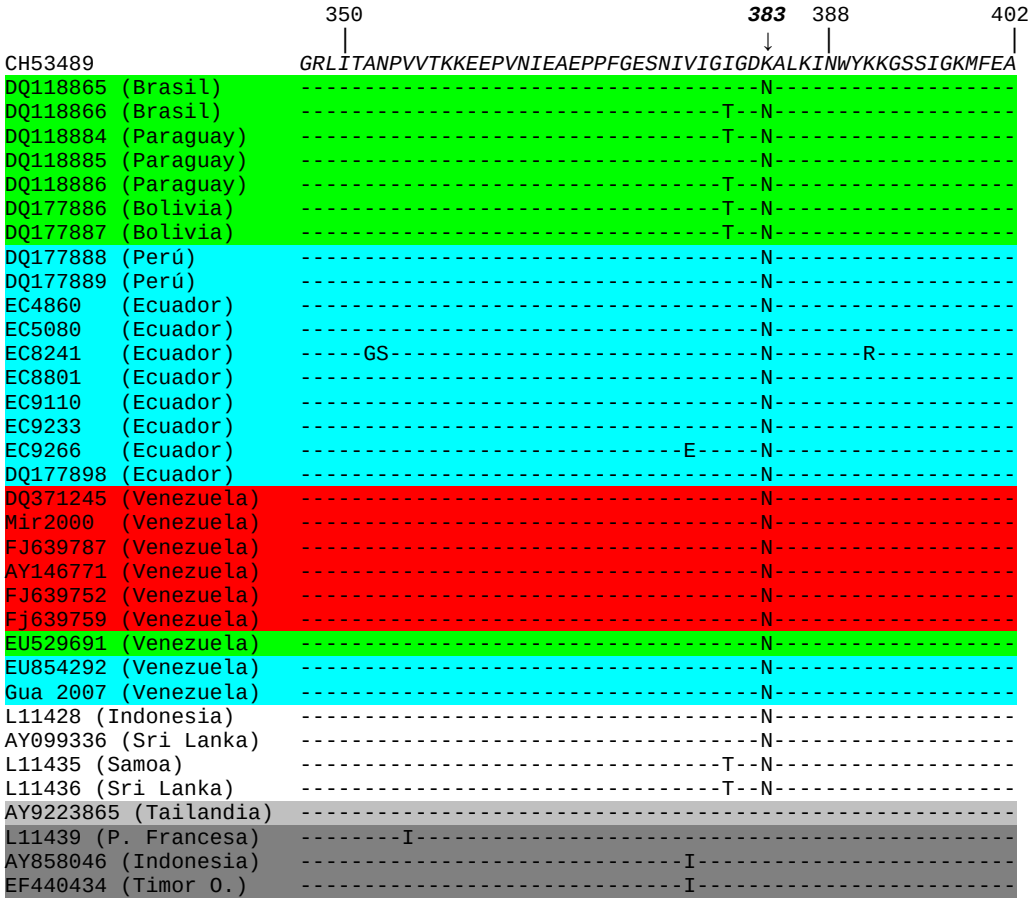


Fig. 6. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de cepas Latinoamericanas correspondientes al genotipo III de DENV-3, con la cepa CH53489 (genotipo II de DENV-3). Las cepas se muestran por su número de acceso para cepas previamente descriptas, mientras que las Ecuatorianas y Venezolanas reportadas en este estudio, se muestran por su nombre. Los sitios idénticos con la cepa CH53489 se indican con un guión. Las posiciones de los aminoácidos (relativas a la cepa CH53489) se muestran por número encima del alineamiento. Las secuencias correspondientes a los dominios I, II y III se indican en negrita, subrayadas e itálicas, respectivamente. Los sitios previamente indicados como expuestos a la superficie se resaltan en gris. Los potenciales motivos tipo-ELK/KLE y tipo-KELK/KLEK se indican con letra anaranjada (Falconar, 2008). Las cepas correspondientes a los Cluster A, B y C, se resaltan en rojo, verde y celeste, respectivamente. Las demás cepas se indican en blanco, gris oscuro y gris claro, de acuerdo a su genotipo, III, II y I, respectivamente.

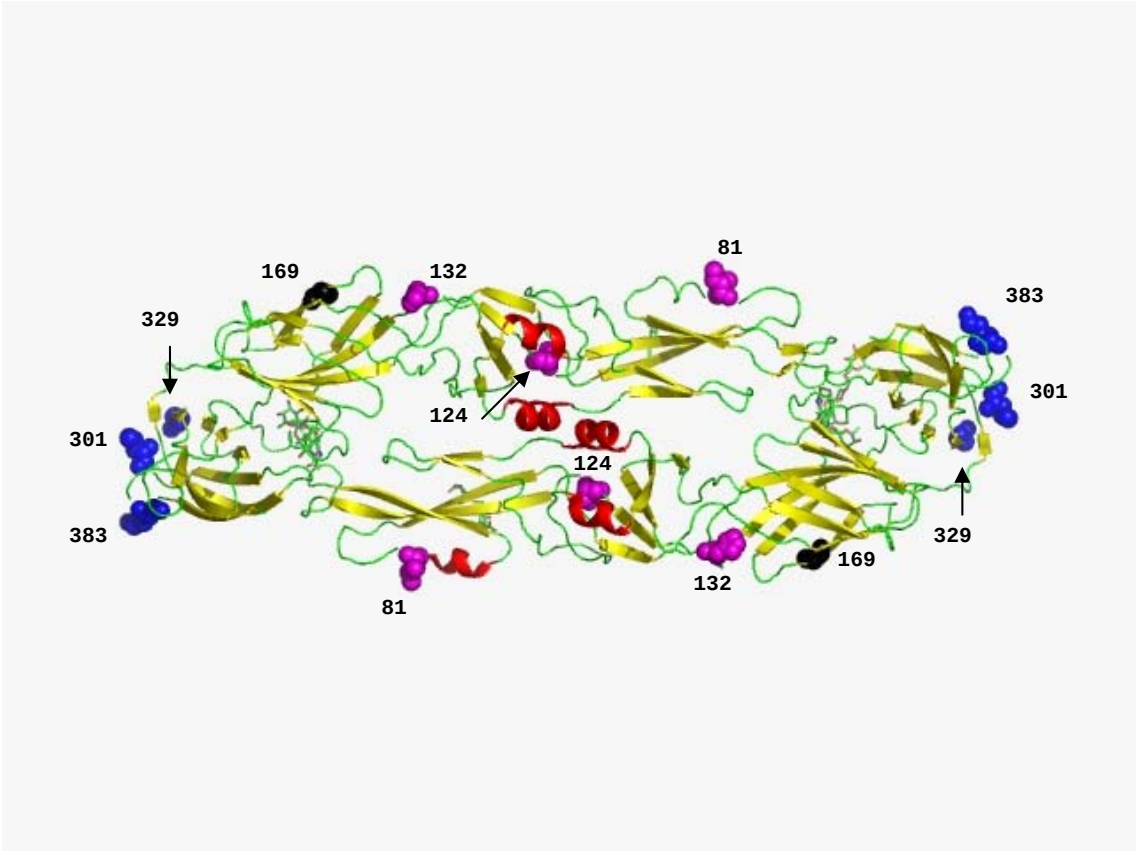
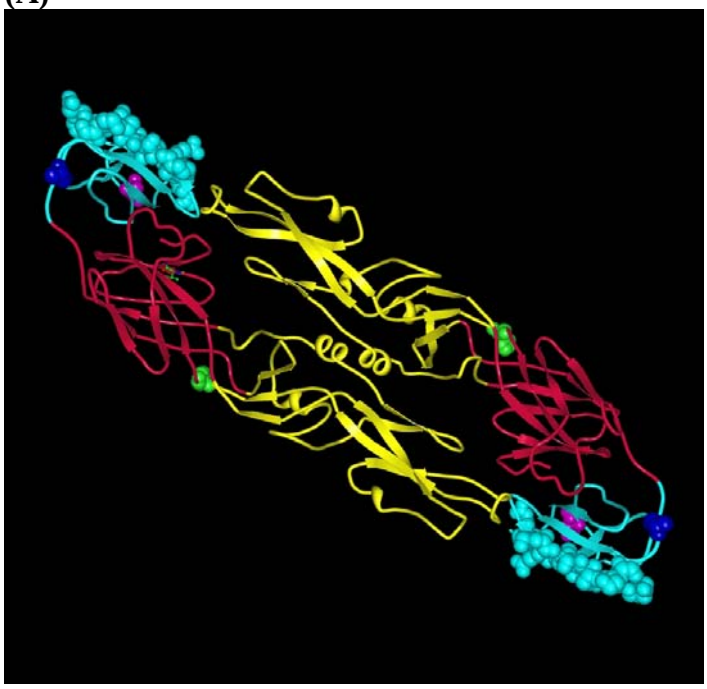


Fig. 7. Estructura dimérica de la proteína E de DENV-3. Los sitios donde se encuentran cambios de residuos en cepas Latinoamericanas del genotipo III de DENV-3 se representan color negro, magenta y azul, para cambios en los dominios I, II y III, respectivamente, y sus posiciones aminoacídicas se indican por número.

(A)



(B)

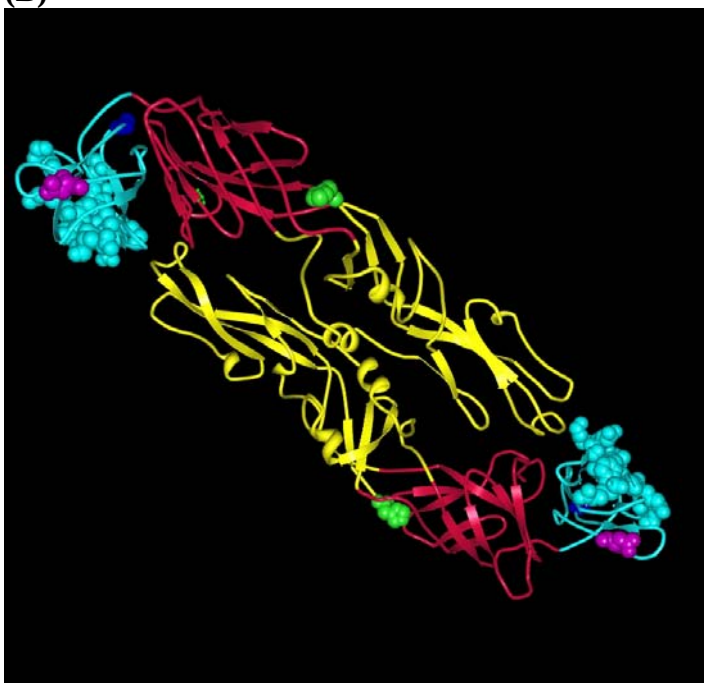


Figura 8. Estructura dimérica de la proteína E de DENV-3. Los dominios I, II y III se indican en rojo, amarillo y celeste, respectivamente. Los residuos recientemente identificados como cruciales para la neutralización (Matsui *et al.,* 2009) se indican en volumen. El aminoácido presente en la posición 329 (Valina en cepas Peruanas, Ecuatorianas y Venezolanas del Cluster A; Alanina en cepas Venezolanas de los Clusters B y C), se representa en azul. La sustitución en la posición 346 (N→S), encontrada en la cepa Venezolana del Cluster B se indica en magenta. El sitio 132, que posee una Tirosina en la mayoría de las cepas analizadas, excepto en variantes del Cluster C (que mantienen una Histidina) se indica en verde. Se pueden apreciar dos perspectivas de la estructura dimérica de E, mediante su rotación sobre el eje z, en A y B.

5. Discusión

Luego de una ausencia de 17 años en la región Latinoamericana, DENV-3 re-emergió en América Central en 1994 (Usuku *et al.,* 2001), y se expandió hacia Sudamérica (Messer *et al.,* 2003; Peyrefitte *et al.,* 2003; Uzcategui *et al.,* 2003; Kochel *et al.,* 2008; Regato *et al.,* 2008). En este trabajo encontramos que todas las cepas de DENV-3 circulantes en las Américas son del genotipo III. Numerosos estudios indican que la aparición del genotipo III de DENV-3 en las Américas no sólo ha reemplazado a otros serotipos, sino que también está relacionado con el aumento de brotes de DEF/DSS. La primera gran epidemia de DHF/DSS ocurrió en Sri Lanka en 1989, y coincide con la emergencia de una variante del genotipo III de DENV-3, que se ha expandido desde el subcontinente indio hacia África y el Caribe, llegando finalmente a América Latina (Messer *et al.,* 2003). Los análisis filogenéticos presentados en este estudio revelan una evolución *in situ* de este genotipo a partir de su introducción a la región Latinoamericana, donde 3 clados genéticos diferentes pueden ser observados (Fig. 4). Este alto grado de diversificación es significativo y se relaciona claramente con las características fenotípicas de este genotipo de DENV-3, así como con los reportes epidemiológicos que relacionan este genotipo particular con una mayor incidencia de casos severos de la enfermedad.

Los primeros casos de DENV-3 en Venezuela fueron reportados en la región central del país (Uzcategui *et al.,* 2003). Estudios previos han propuesto que una característica del DENV en Venezuela es que los brotes se reportaron por primera vez en países vecinos, específicamente en América Central y las islas del Caribe, desde donde se expanden hacia el Norte hasta México y Sur de Estados Unidos, y al Sur hacia Sudamérica. Por consiguiente, la introducción de estas variantes de DENV-3 a Venezuela ocurrió seguramente a consecuencia de la propagación de cepas circulantes en América Central y el Caribe, y no directamente por importación de cepas Asiáticas (Uzcategui *et al.,* 2003). Esta hipótesis es apoyada por los resultados de nuestro trabajo, donde reportamos una cepa de la isla de Aruba del año 1999, que es la estirpe filogenéticamente más relacionada con las variantes Venezolanas, y deriva de una isla del Caribe ubicada geográficamente muy cercana a este país (Fig. 5).

Las cepas Venezolanas ubicadas en los clusters B y C (años 2001, 2005 y 2007, ver Fig. 4), indican diversos eventos de introducción de variantes del genotipo III de DENV-3 a este país. Sin embargo, dado que la historia de viaje de estos pacientes es desconocida, no podemos determinar si estos aislados corresponden simplemente a casos importados o forman parte de la circulación de variantes minoritarias que permanecen indetectables debido al bajo número de aislados disponibles. No obstante, la gran mayoría de las cepas de DENV-3 circulantes en Venezuela, se agrupan en el Cluster A (Fig. 4). Este clado incluye cepas aisladas en el estado de Aragua (2000-2008), así como también en Miranda, Mónagas, Guárico, Lara, Cojedes y el Distrito Federal.

Estudios previos han sugerido que DENV-3 está evolucionando a una tasa de 9,0 x 10^{-4} s/s/a (Twiddy *et al.,* 2003). Otros estudios más recientes utilizando un número mayor de secuencias arrojaron una tasa evolutiva similar (8,9 x 10^{-4} s/s/a) (Araujo *et al.,* 2009). Nuestros resultados indican una tasa de 8,5 x 10^{-4} s/s/a para las cepas Venezolanas y 10,3 x 10^{-4} s/s/a para el Cluster C, compuesto por cepas aisladas en Ecuador y Perú (ver Fig. 4 y Tablas 2 y 3). Estos resultados se encuentran dentro del rango de tasas determinadas específicamente para cepas del genotipo III de DENV-3 (11.6 x 10^{-4} s/s/a, Twiddy *et al.,* 2003; 8.2 x 10^{-4} s/s/a, Araujo *et al.,* 2009). Las diferencias entre estas estimaciones se deben probablemente al diferente número de secuencias analizadas en estos estudios, aunque se encuentran dentro de los intervalos de confianza de estas estimaciones.

La capacidad del virus de mutar lógicamente está relacionada con la cantidad de variantes que puedan surgir de él, y por lo tanto mientras más alta sea esta tasa de mutaciones, mayor puede ser la diversidad genética de él, lo que tiene incidencia en las características fenotípicas del genotipo, ya que pueden generarse virus con antigenicidad alterada, generando mayor nivel de transmisibilidad, infectividad o virulencia. De esta manera, la tasa evolutiva nos va a estar dando una idea de la capacidad patogénica de una variante determinada. Estudios previos utilizando variantes de DENV circulantes en las Américas, determinaron tasas evolutivas para el genotipo III de DENV-2 y el genotipo II de DENV-4, de 8,0 x 10^{-4} y 8,3 x 10^{-4} s/s/a, respectivamente (Carrington *et al.,* 2005). Otros estudios han establecido una tasa promedio para todos los serotipos de aproximadamente 6,5 x 10^{-4} s/s/a (Twiddy *et al.,*

2003). Los resultados de nuestros estudios indican tasas evolutivas superiores a estos valores (8,5 x 10^{-4} s/s/a y 10,3 x 10^{-4} s/s/a). Esto concuerda con reportes previos que sugieren que DENV-3, y en particular su genotipo III, está evolucionando con una tasa de mutaciones comparativamente más alta que otros serotipos (Twiddy *et al.,* 2003).

El MRCA determinado para las variantes aisladas en la región del Pacífico de los Andes, circuló alrededor de 1994 (ver Tabla 2). Este resultado concuerda con los primeros reportes de este genotipo de DENV-3 en las Américas, en Nicaragua en 1994 (Guzman *et al.,* 1996), desde donde se ha propagado al resto del Caribe y Sudamérica. Además estudios recientes indican que el ingreso de este genotipo a Ecuador y Perú se produjo directamente desde el Caribe a través de una ruta diferente a la de otros países Sudamericanos (Araújo *et al.,* 2009). Por otra parte, nuestros estudios sugieren que las cepas Venezolanas pertenecientes al Cluster A, evolucionaron de un ancestro que circuló alrededor de 1998 (1996-2000) (ver Tabla 3). Esta fecha es próxima al aislamiento de las primeras variantes Venezolanas en el año 2000, y es consistente con estudios recientes que indican la introducción de este genotipo hacia regiones de Sudamérica a través de México, donde los primeros aislados de este genotipo se remontan a 1995 (Araujo *et al.,* 2009).

Muchos estudios indican que las sustituciones encontradas en mutantes de escape generalmente suceden en el dominio III de la proteína E (Beasley *et al.,* 2001; Gromowski *et al.,* 2008; Lisova *et al.,* 2007; Messer *et al.,* 2003; Modis *et al.,* 2003; Thomas *et al.,* 2003). Este dominio se no sólo está involucrado en el reconocimiento de los receptores celulares, sino que también posee múltiples epítopes neutralizantes específicos para cada serotipo (Modis *et al.,* 2003). En este estudio pudimos identificar que la mayoría de las sustituciones aminoacídicas que suceden en cepas Americanas del genotipo III de DENV-3, ocurren efectivamente en este dominio, o en residuos expuestos al solvente. En las posiciones 301 y 383, suceden sustituciones no conservativas en todas las cepas del genotipo III analizadas. Estos sitios han sido previamente reportados como involucrados en epitopes de neutralización (Hiramatsu *et al.,* 1996; Hung *et al.,* 2004; Matsui *et al.,* 2009). A su vez, el sitio 388 permanece sin cambios, y estudios previos indican que una Asparagina en esta posición estaría relacionada con una mayor incidencia de casos de DHF (Lin *et al.,* 1994). Esto es observado en todas las cepas aisladas en América Latina y analizadas en estos estudios.

Estudios recientes han indicado que los aislados Americanos del genotipo III están asociados a epidemias de DHF (Silva *et al.,* 2008, San Martin *et al.*, 2010). La sustitución aminoacídica en la posición 329 del dominio III, encontrada en cepas aisladas en Ecuador, Perú y Venezuela, está situada en sitios previamente identificados como expuestos a la superficie en la proteína E de DENV-3 (Modis *et al.,* 2003; Falconar, 2008). Este cambio de una Alanina a una Valina implica un cambio de un aminoácido hidrofóbico por otro hidrofóbico pero alifático de mayor tamaño, lo que podría conferirle a estas cepas ventajas evolutivas que les permiten escapar a la neutralización. Además, la sustitución en el sitio 132 del dominio II (Tirosina a Histidina) en cepas del Cluster C, sucede en una posición que se encuentra expuesta a la superficie. Esto podría sugerir la acción de presiones selectivas en estas regiones de la superficie proteica.

Por otra parte, estudios recientes indican que el dominio III de la proteína E es reconocido por anticuerpos monoclonales contra la proteína no-estructural 1 (NS1) de DENV-2 (Falconar, 2008). Esto puede tener importantes consecuencias en la patogénesis causada por DENV, ya que los anticuerpos policlonales IgG generados contra NS1 son detectados solo durante la fase convaleciente en una infección primaria, pero son altamente identificados durante la fase aguda en una infección secundaria de DENV (Silva *et al.,* 2008), por lo que pueden jugar un papel importante en la progresión hacia cuadros de DHF/DSS. Durante una infección por DENV, se generan anticuerpos policlonales contra motivos compuestos por la sucesión de aminoácidos: ácido (E o D)-alifático/aromático (G, A, I, L o V/F, W o Y)-básico (K o R), (motivos tipo-ELK o KELK presentes en ambas orientaciones) en la proteína NS1 de DENV, y estas respuestas son mayores en pacientes con DSS (Falconar, 2007). Como se puede apreciar en la Figura 6, estos motivos se encuentran en la secuencia aminoacídica de la E de las cepas analizadas (KLELK entre los sitios 289 y 293; KVEYKGE entre los sitios 321 y 327). Se ha descrito que las cepas del genotipo III de DENV-3 que causaron epidemias de DHF tanto en el sudeste Asiático como en las Américas (Cuba, Venezuela, Nicaragua y México), contenían estos motivos en las mismas regiones de los dominios I y III, respectivamente (Falconar, 2008). Por ende, la localización de estos epítopes en la proteína E de este genotipo de DENV-3 puede ayudar a explicar la capacidad patogénica de estas variantes.

La localización de estas mutaciones en el dominio III es significativa, ya que este dominio esta involucrado en la unión con los receptores celulares (Modis *et al.*, 2005). El mecanismo más probable de neutralización mediante anticuerpos que reconocen epitopes en el dominio III, es el de la inhibición de la unión del virus a la célula. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que la inhibición de la unión del virus mediante estos anticuerpos es relativamente baja y que otros factores podrían contribuir a la neutralización (Roehrig *et al.,* 1998).

6. Conclusiones

Todas las cepas de DENV-3 que circulan en la región Latinoamericana que fueron incluidas en estos estudios, pertenecen al genotipo III. Este genotipo no sólo se ha asociado a grandes brotes de DHF en el mundo entero, sino que ha reemplazado otras variantes que circulaban en las Américas, estableciéndose como uno de los serotipos con mayor prevalencia. En la actualidad existe una gran diversificación de este genotipo en las Américas, pudiéndose apreciar 3 diferentes linajes genéticos.

En Venezuela se pudo apreciar la presencia de cepas del genotipo III presentes en los 3 clados mencionados. Esto revela diversos fenómenos de introducción de DENV-3 a este país.

Las tasas evolutivas halladas para diferentes clados Americanos son comparativamente más altas que las reportadas para otros serotipos. Este hecho concuerda con estudios que indican que DENV-3, y en particular su genotipo III, está evolucionando a una tasa significativamente más rápida que otros serotipos de DENV. Asimismo, estas elevadas tasas evolutivas se relacionan con la capacidad patogénica de este genotipo particular.

Se observaron sustituciones de aminoácidos en regiones de la proteína E, particularmente en su dominio III o en residuos expuestos a la superficie. Estos cambios pudieron conferirle a estas cepas ventajas evolutivas que les permitieron escapar a la neutralización.

Estos hechos en conjunto pueden explicar, al menos en parte, las características particulares del genotipo III de DENV-3 en las Américas, y su elevada asociación con progresiones hacia estados severos de la enfermedad (DHF/DSS). Más estudios son necesarios para caracterizar este genotipo circulante en América Latina, lo que permitirá diseñar estrategias antivirales contra infecciones con DENV.

7. Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente:

Al Dr. Juan Cristina, por haberme dado la oportunidad y confianza de realizar la maestría en su laboratorio, así como por dedicarme tanto de su valioso tiempo, siempre con predisposición y amabilidad.

A los miembros del tribunal: Dr. Rodney Colina, Dra. Mabel Berois y Dr. Otto Pritsch por haber aceptado ser parte del mismo.

A la Dra. Pilar Moreno y al MSc. Gonzalo Moratorio por la dedicación brindada y la gran disposición y paciencia que tuvieron.

A mis compañeros, Lucía D' Andrea, Ricardo Recarey y Matias Castells por todo su apoyo, compañerismo y por generar un ambiente tan agradable en el laboratorio.

Al Dr. Ferdinando Liprandi del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, así como a mis compañeros durante 3 meses del Laboratorio Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular en Caracas, Venezuela.

A mi familia: mis padres, mis hermanos y mis abuelos, por su apoyo constante, su cariño, preocupación y por estar siempre conmigo.

A mis amigos que siempre estuvieron y siguen estando presentes.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay), por el apoyo económico brindado, otorgándome tanto una Beca de Postgrado para poder llevar a cabo la Maestría en Uruguay, como también una Beca de Movilidad para realizar una pasantía en Caracas, Venezuela.

8. Bibliografía

Aquino, V.H., Anatriello, E., Goncalves, P.F., Da Silva, E.V., Vasconcelos, P.F., Vieira, D.S., Batista, W.C., Bobadilla, M.L., Vazquez, C., Moran, M., Figueiredo, L.T., 2006. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brasil and Paraguay, 2002–2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 710–715.

Alvarez, D.E., Lodeiro, M.F., Ludueña, S.J., Pietrasanta, L.I., Gamarnik, A.V., 2005. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol.* **79**, 6631-6643.

Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood ratio test for branchs: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* **55,** 539–552.

Anderson, R., 2003. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **59**, 229-274.

Araújo, J.M., Bello, G., Schatzmayr, H.G., Santos, F.B., Nogueira, R.M., 2009. Dengue virus type 3 in Brasil: a phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz.***104**, 526-529.

Araújo J.M, Nogueira, R.M., Shatzmayr, H.G., Zanotto, P.M., Bello, G., 2009. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol.* **9**, 716-725.

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

Ayers, M., Adachi, D., Johnson, G., Andonova, M., Drebot, M., Tellier, R., 2006. A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. *J. Virol. Methods* **135**, 235–239.

Baleotti, F.G., Moreli, M.L., Figueiredo, L.T., 2003. Brasilian *Flavivirus* phylogeny based on NS5. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**, 379–382.

Barrero, P.R., Mistchenko, A.S., 2004. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires. *Argent. Virus Res*. **101**, 135–145.

Bartenschlager, R., Miller, S., 2008. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* **3,** 155-165.

Batista,W.C., Kashima, S., Marques, A.C., Figueiredo, L.T., 2001. Phylogenetic analysis of Brasilian *Flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 and 3_ non-coding regions. *Virus Res.* **75**, 35–42.

Beasley, D.W., Aaskov, J.G., 2001. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. *Virology* **279,** 447–458.

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

Berrios, V., Kurane, I., Ennis, F.A., 1996. Immunomodulatory effects of IL-7 on dengue virus-specific cytotoxic CD4+ T cell clones. *Immun. Invest.* **25**, 231-240.

Bravo, J.R., Guzman, M.G., Kouri, G.P., 1998. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/ DSS). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **81**, 816-20.

Brinton, M.A., Fernandez, A.V., Dispoto, J.H., 1986. The 3_-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **153,** 113–121.

Carey, D.E., 1971. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist. Med. Allied Sci.* **26**, 243–262.

Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C.M., 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649–688.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., Marks, R.M., 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3,** 866-871.

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 ocurrs in human and mosquitoes. *J. Virol*. **79**, 853-859.

Crill, W.D., Roehring, J.T., 2001. Monoclonal antibodies that bind to domain III of DEN E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* **75**, 4002-4007.

Diamond, M.S., 2003. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Flavivirus*. *Immunol. Cell Biol*. **81**, 196-206.

Donnelly, P., Tavaré, S., 1995. Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annual Review of Genetics* **29,** 401–421.

Drummond, A.J., Ho, S.Y., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confindence. *PLoS Biol*, **4,** e88.

Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol*, **22,** 1185-1192.

Domingo, E., 2002. Quasispecies theory in virology. *J Virol*, **76(1),** 463-465.

Dong, T., Moran, E., Vinh Chau, N., Simmons, C., Luhn, K., Peng, Y., Wills, B., Phuong Dung, N., Thi Thu Thao, L., Hien, T.T., McMichael, A., Farrar, J.,

Rowland-Jones, S., 2007. High Pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Loss of High Avidity Cross-Reactive Cytotoxic T-Cells during the Course of Secondary Dengue Virus Infection. *PLoS ONE.* **2**, 1192.

Dussart, P., Lavergne, A., Lagathu, G., Lacoste, V., Martial, J., Morvan, J., Cesaire, R., 2006. Reemergence of dengue virus type 4, French Antilles and French Guiana, 2004–2005. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1748–1751.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, **32:** 1792-1797.

Edgil, D., Polacek, C., Harris, E., 2006. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J. Virol.* **80**, 2976-2986.

Falconar, A.K.I., 2007. Antibody responses to immunodominant ELK-type motifs on the dengue virus nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin Vaccine Immonol.* **15,** 493-504.

Falconar, A.K.I., 2008. Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the Dengue Virus Type 2 Nonstructural-1 and Envelope Glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. *Clin Vaccine Immunol.* **15,** 549-561.

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.

Fink, J., Gu, F., Ling, L., Tolfvenstam, T., Olfat, F., Chin, K.C., Aw, P., George, J., Kuznetsov, V.A., Schreiber, M., Vasudevan, S.G., Hibberd, M.L., 2007. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **1**, 86.

Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., Drouet, E., **2002.** Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* **292,** 162-168.

Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., Sonenberg, N., 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* **13,** 1422-1437.

Gratz, N., Knudsen, B., 1996. The rise and spread of dengue, dengue haemorrhagic fever and its vectors. A historical review (up to 1995). CTD/FIL(DEN). Ginebra: World Health Organization.

Gromowski, G.D., Barrett, N.D., Barrett, A.D., 2008. Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus. *J Virol* **82,** 8828–8837.

Gromowski, G.D., Barrett, A.D., 2007. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* **366,** 349–360.

Gubler, D.J., 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* **2**, 100–103.

Gubler, D.J., 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* **277**, 3-22; 71-73; 251-253.

Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O., 2005. PHYML online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res*. **33** (web server issue), W557–W559.

Gurugama, P., Garg, P., Perera, J., Wijewickrama, A., Seneviratne, S.L., 2010. Dengue viral infections. *Indian J. Dermatol.* **55(1),** 68-78.

Guzman, M.G., Vazquez, S., Martinez, E., Alvarez, M., Rodriguez, R., Kouri, G., de los Reyes, J., Acevedo, F., 1996. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol. Oficina Sanit. Panam*, **121,** 102–110.

Halstead, S.B., 1989. Antibody, macrophages, dengue infections, shock and haemorrage: a pathogenic cascade. *Rev. Infectol. Dis*. **11**, 830-839.

Harding, R.M., 1998. New phylogenies: an introductory look at the coalescent. Pp. 15-22.

Henchal, E.A., Putnak, J.R., 1990. The dengue viruses. *Clin. Microbiol Rev.* **3**, 376-396.

Hilgard, P., Stockert, R., **2000.** Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology.* **32,** 1069-1077.

Hiramatsu, K., Tadano, M., Men, R., 1996. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology* **224,** 437–445.

Hober, D., Poli, L., Roblin, B., Gestas, P.,Chungue, E., Granic, G., 1993. Serum levels of tumor necrosis factoralpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6), and Interleukin 1 beta (IL-1beta) in dengue infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **48**, 324-331.

Holmes, E.C., Twiddy, S.S., 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection. Gen. Evol*. **3**, 19–28.

Hudson, R.R., 1991. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveysin Evolutionary Biology* **7**, 1–44.

Hung, J.J., Hsieh, M.T., Young, M.J., Kao, C.L., King, C.C., Chang, W., 2004. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J. Virol*. **78**, 378-388.

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.

Kaplan, N.L., Darden, T., Hudson, R.R., 1988. The coalescent process in models with selection. *Genetics* **120,** 819–829.

Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* **6**, 29.

Kingman, J.F.C., 2000. Origins of the coalescent 1974–1982. *Genetics* **156,**1461–1463.

Kochel, T., Aguilar, P., Felices, V., Comach, G., Cruz, C., Alava, A., Vargas Olson, J., Blair, P., 2008. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000-2005. *Infec Genet Evol*, **8:** 682-688.

Kuno, G., Chang, G.J., Tsuchiya, R., Karabatsos, N., Cropp, C.B., 1998. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J. Virol.* **72**, 73–83.

Kurane, I., Hennlewaite, D., Brandt, W.E., Ennis, F.A., 1984. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* **52**, 223-230.

Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., Vorndam, A.V. 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*.**30,** 545-51.

Lanciotti, R.S., Lewis, J.G., Gubler, D.J., 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* **75,** 65–75.

Lanciotti, R.S., Gubler, D.J., Trent, D.W., 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J. Gen. Virol*. **78**, 2279–2286.

Lei, H.Y., Yeh, T.M., Liu, H.S., Chen, S.H., Liu, C.C., 2001. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed. Sci*. **8**, 377-388.

Li, C.F., Lei, H.Y., Shiau, A.L., Liu, C.C., Liu, H.S., Yeh, T.M., 2003. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J. Med. Virol*. **69**, 82-90.

Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K.E., Padmanabhan, R., 1999. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J. Virol*. **73,** 3108-3116.

Lin, B., Parrish, C.R., Murray, J.M., 1994. Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2. *Virology* **202,** 885–890.

Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **59**, 23-61.

Lisova, O., Hardy, F., Petit, V., 2007. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J Gen Virol* **88,** 2387–2397.

Lozach, P.Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.L., Rey, F.A., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F., Amara, A., 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem*. **280,** 23698-23708.

Mackenzie, J.M., Westaway, E.G., 2001. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.***75**, 10787–10799.

Markoff, J.L., Innis, L.B., Houghten, R., Henchal, S.L., 1991. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J. Infect. Dis*. **164**, 294-301.

Matsui, K., Gromowski, G.D., Li, L., Schuh, A.J., Lee, J.C., Barrett, A.D., 2009. Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III. *Virology*, **384:** 16-20.

Messer, W.B., Gubler, D.J., Harris, E., Sivananthan, K., de Silva, A.M., 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis*. **9**, 800–809.

Ministerio de Salud Pública (Uruguay), 2006. Plan Nacional de Contingencia para una Epidemia de Dengue. Ministerio de Salud Pública.

Modis, Y., Harrison, S.C., 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci.* **100,** 6986–6991.

Monath, T.P., 1994. Yellow fever and dengue— the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Semin. Virol.* **5**, 133–145.

Mondotte, J.A., Lozach, P., Amara, A., Gamarnik, A.V., 2007. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *J. Virol.* **81**, 7136–7148.

Moreland, J., Gramada, A., Buzko, O.V., Zhang, Q., Bourne, P.E., 2005. The Molecular Biology Toolkit (mbt): A Modular Platform for Developing Molecular Visualization Applications. *BMC Bioinformatics*, **6:** 21.

Morens, D.M., 1994. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 500–512.

Morens, D.M., Halstead, S.D., 1990. Measurement of antibody dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Gen. Virol*. **70**, 2909–2914.

Myint, K.S., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., 1991. Six hour laboratory confirmation of dengue. Antigen detection in peripheral blood mononuclear cells by inmunohistochemistry. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **45**, 173-181.

Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. **4,** 723-728.

Neuhauser, C., Krone, S.M., 1997. The genealogy of samples in models with selection. *Genetics* **145,** 519–534.

Nomaguchi, M., Ackermann, M., Yon, C., You, S., Padmanabhan, R., 2003. De novo synthesis of negative-strand RNA by dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. *J. Virol.* **77**, 8831-8842.

Pan American Health Organization, 2007. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/eid-eer-2007-09-26.htm.

Pan American Health Organization, 2007. The History of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Region of the Americas. 1635-2001. http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue_history.htm.

Peyrefitte, C.N., Coussinier-Paris, P., Mercier-Perennec, V., Bessaud, M., Martial, J., Kenane, N., Durand, J.P., Tolou, H.J., 2003. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). *J. Clin. Microbiol*. **41**, 5195–5198.

Peyrefitte, C.N., Pastorino, B.A.M., Bessaud, M., Gravier, P., Tock, F., Couissinier-Paris, P., Martial, J., Huc-Anais, P., Cesaire, R., 2005. Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003–2004. *Emerg. Infect. Dis*. **11**, 757–761.

Popa, L., 2003. Replication strategies of the Flaviviridae family. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.* **48**, 75-92.

Regato, M., Recarey, R., Moratorio, G., de Mora, D., Garcia-Aguirre, L., Gonzalez, M., Mosquera, C., Alava, A., Fajardo, A., Alvarez, M., D´Andrea, L., Dubra, A., Martinez, M., Khan, B., Cristina, J., 2008. Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. *Virus Res*, **132:** 197-200.

Resch, W., Zaslavsky, L., Kiryutin, B., Rozanov, M., Bao, Y., Tatusova, T.A., 2009. Virus variation resources at the National Center for Biotechnology Information: dengue virus. *BMC Microbiology*, **9:** 65.

Rey, F.A., 2003. Dengue virus envelope glyco-protein structure: new insight into its interactions durng viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **1000**, 6899–6901.

Rice, S.H., 2004. Evolutionary Theory: Mathematical and Conceptual Foundations. *Sinauer Associates: Sunderland, MA.* Chapter 3.

Rico-Hesse, R., 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* **174,** 479–493.

Rigau-Perez, J.G., Clark, G.G., Gubler, D.J., Reiter, P., Sanders, E.J., Vorndam, A.V., 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet,* **352**, 971–977.

Roehrig, J.T., Bolin, R.A., Kelly, R.G., 1998. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* **246,** 317-328.

Rothman, A.L., Ennis, F.A., 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. **257**, 1-6.

Salvatella, R., Rosa, R., 2003. Culícidos y Salud Humana en Uruguay. *Entomol. Vect.* **10,** 431-436.

Salvatella, R., 1996. *Aedes aegypti, Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Rev. Med. Uruguay.* **12,** 28-36.

Salvatella, R., 1997. *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Notificación de su presencia en Uruguay. *Rev. Med. Uruguay*. **13,** 118-121.

San Martín, J.L., Brathwaite, O., Zambrano, B., Solórzano, J.O., Bouckenooghe, A., Dayan, G.H., Guzmán, M.G., 2010. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* **82(1)**, 128-135.

Senanayake, S., 2006. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: a diagnostic challenge. *Aust. Fam. Physician*. **35**, 609-612.

Silva, R.L., de Silva, A.M., Harris, E., *et al.*, 2008. Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 50 and 30 non-coding regions. *Virus Res.* **135,** 320–325.

Simpson, J.A., Weiner, E.S.C., 1989. *The Oxford English Dictionary.* Oxford. Claredon.

Sosa, P., 1916. Informe del Médico del Servicio Público del Departamento de Salto, relative a una epidemia de dengue desarrollada en la capital de aquel departamento. *Bol. Cons. Nal. Hig.* **11,** 222-223.

Slatkin, M., 2001. Simulating genealogies of selected alleles in populations of variable size. *Genetic Research* **145,** 519–534.

Tan, B.H., Fu, J., Sugrue, R.J., Yap, E.H., Chan, Y.C., Tan, Y.H., **1996.** Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* **216**, 317-325.

Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., **2003.** DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med*. **197,** 823-829.

Thomas, S.J., Strickman, D., Vaughn, D.W., 2003. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology and emergence. *Adv Virus Res*. **61,** 235–289.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **22**, 4673-4680.

Tilgner, M., Deas, T.S., Shi, P.Y., 2005. The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3_ stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology* **331,** 375–386.

Tolou, H., Couissinier-Paris, P., Mercier, V., Pisano, M.R., de Lamballerie, X., de Micco, P., Durand, J.P., 2000. Complete genomic sequence of a dengue type 2 virus from the French West Indies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277,** 89-92.

Twiddy, S.S., Holmes, E.C., 2003. The extent of homologous recombination in members of the genus floavivirus. *J. Gen. Virol.* **84**, 429–440.

Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q.Y., Vasudevan, S.G., Chevet, E., Gu, F., 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol. J.* **4**, 91.

Usuku, S., Castillo, L., Sugimoto, C., Noguchi, Y., Yogo, Y., Kobayashi, N., 2001. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch Virol*, **146:** 1381-1390.

Uzcategui, N.Y., Comach, G., Camacho, D., Salcedo, M., Quintana, M.C., Jimenez, M., Sierra, G., Uzcategui, R.C., James, W.S., Turner, S., Holmes, E.C., Gould,

E.A., 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol*, **84:** 1569–1575.

Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.,L., Nimmannitya, S., Suntyakorn, S., 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* **181**, 2-9.

Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D.T., Warowich, S.J., Gubler, D.J., 2007. Evolutionary relationship of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.* **74**, 3227–3234.

Wang, W.K., Lin, S.R., Lee, C.M., King, C.C., Chang, S.C., 2002. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J. Virol.* **76**, 4662–4665.

Watts, D.M., Porter, K.R., Putvatana, P., Vasquez, B., Calampa, C., Hayes, C.G., 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. **354**, 1401-1402.

Weaver, S.C., Barrett A.D.T., 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol*. **2**, 789–801.

World Health Organization, 2007. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - Dengue and dengue haemorrhagic fever. http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR_ISR_2000_1/en/print.html.

World Health Organization, 2007. www.who.int/features/qa/54/es/index.html.

Yu, C.Y., Hsu, Y.W., Liao, C.L., Lin, Y.L., 2006. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J. Virol.* **80**, 11868-11880.

Zeng, L., Falgout, B., Markoff, L., 1998. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3_-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J. Virol.* **72,** 7510–7522.

Zhang, C., Mammen, 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 Tailandia. *J. Gen. Virol*. **87**, 873–883.

Zivny, J., DeFronzo, M., Jarry, W., Jameson, J., Cruz, J., Ennis, F.A., 1999. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. *J. Immunol.* **163**, 2754-2760.

9. Publicaciones derivadas en el marco de esta tesis