

VARIABILIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN  
MOLECULAR DEL VIRUS DENGUE TIPO 1 EN LA  
REGIÓN SUDAMERICANA

Rodrigo Sologaistoa

Orientador: Dr. Juan Cristina

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Virología Molecular

CIN - Facultad de Ciencias

Universidad de la República

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introducción</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1 Epidemiología   | 3         |
| 1.2 El virus  | 6         |
| 1.3 El ciclo viral  | 11        |
| 1.4 Serotipos y genotipos de VDEN   | 11        |
| 1.5 Respuesta inmunitaria contra VDEN   | 13        |
| 1.6 Vacunas contra VDEN   | 20        |
| <b>2. Objetivos</b>   | <b>26</b> |
| 2.1 Objetivo General  | 26        |
| 2.2 Objetivos específicos   | 26        |
| <b>3. Materiales y Métodos</b>  | <b>27</b> |
| 3.1 Secuencias  | 27        |
| 3.2 Alineación de secuencias  | 27        |
| 3.3 Asignación de genotipo de VDEN-1  | 27        |
| 3.4 Construcción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud   | 28        |
| 3.5 Traducción in silico  | 28        |
| 3.6 Filogeografía   | 29        |
| 3.7 Predicción de sitios de glicosilación en la proteína E de VDEN-1  | 30        |
| 3.8 Mapeo de sustituciones de aminoácidos en una estructura 3D de la proteína E de VDEN-1                   | 30        |
| <b>4. Resultados</b>  | <b>31</b> |
| 4.1 Variabilidad genética de estirpes de VDEN-1 genotipo V recientemente aisladas en la región sudamericana | 31        |
| 4.2 Análisis coalescente bayesiano de estirpes de VDEN-1 genotipo V aisladas en la región sudamericana      | 32        |
| 4.3 Sustituciones encontradas en la proteína E de VDEN-1 genotipo V en estirpes aisladas en Sudamérica.     | 40        |
| <b>5. Discusión</b>   | <b>46</b> |
| <b>6. Conclusiones</b>  | <b>52</b> |
| <b>7. Limitaciones y perspectivas</b>   | <b>55</b> |
| <b>8. Agradecimientos</b>   | <b>57</b> |
| <b>9. Bibliografía</b>  | <b>59</b> |
| .-  | 95        |

# 1. Introducción

## 1.1 Epidemiología

El dengue constituye una arbovirosis de relevancia global, causada por cuatro serotipos virales (VDEN-1 a VDEN-4) pertenecientes al género *Flavivirus*. Transmitido principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*, según modelos estadísticos este patógeno afecta anualmente a 390 millones de personas en regiones tropicales y subtropicales, con una expansión acelerada hacia zonas templadas debido al cambio climático y la urbanización descontrolada (WHO 2023; WHO 2025; Harapan et al. 2020). La coexistencia de múltiples serotipos en un mismo territorio (observada en nueve países de las Américas en 2023) genera desafíos epidemiológicos, particularmente por el fenómeno denominado Aumento Dependiente de Anticuerpos (ADE), responsable de cuadros graves en infecciones secundarias (ver Introducción 1.4).

Según su severidad, el dengue se clasifica en fiebre del dengue (FD) -una enfermedad febril autolimitada- y formas graves como la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) o el síndrome de shock por dengue (SSD) (García et al. 2011).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los casos reportados de dengue aumentaron de 505.430 en el año 2000 a 5.2 millones en 2019. En 2023, se registraron 6.5 millones de casos globales y un total de 7.300 muertes. Aún considerando esta realidad, en muchos países afectados los sistemas de vigilancia y detección son deficientes.

Aunque el incremento en las infecciones por dengue es un fenómeno global, la región de las Américas y el Caribe ha experimentado el aumento más pronunciado. Entre enero y noviembre de 2024, se reportaron 13.8 millones de casos en la región, de los cuales 10 millones corresponden a Brasil (ver Figura 1) (WHO 2025).

Luego de sucesivos brotes epidémicos de Dengue predominantemente causados por VDEN-2 y -3, VDEN-1 es ahora el principal serotipo circulante en Brasil y en la región sudamericana (Paiva-Drumond et al., 2012). La primera epidemia importante de VDEN-1 en las Américas ocurrió en Jamaica y Cuba en 1977 (Guzman and Kouri, 2003) y desde ese momento ha estado circulando continuamente en el continente americano dando lugar a varios episodios de FD/FHD (San Martin et al., 2010). Al menos cinco genotipos han sido reportados dentro de VDEN-1, en estudios basados en el análisis del gen E (Goncalvez et al., 2001). La mayoría de las infecciones causadas por VDEN-1 en la región sudamericana son causadas por el genotipo V, probablemente introducido desde el sudeste asiático (Villabona-Arenas y Zanotto, 2013) o desde India (Walimbe et al., 2014). Este genotipo se ha diversificado en diferentes linajes con diferentes dinámicas, con reemplazo de linajes a lo largo del tiempo en sucesivos brotes epidémicos, siendo ésta una característica observada en la mayoría de los países americanos (Bruycker-Nogueira et al., 2016).

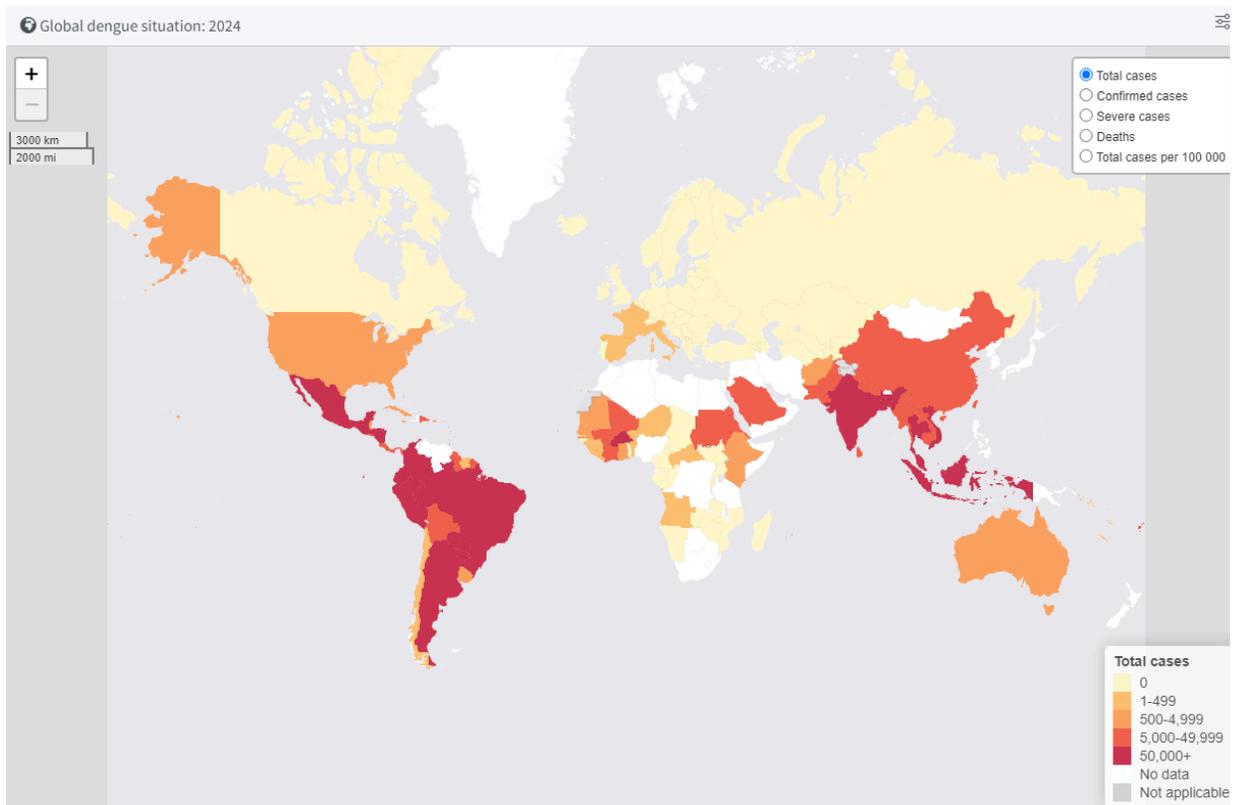


Figura 1. Mapa de los casos de virus Dengue en el mundo. En el mapa se muestran los casos de Dengue por país (WHO, 2025). Fuente: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/dengue\\_global/](https://worldhealthorg.shinyapps.io/dengue_global/)

## 1.2 El virus

El VDEN pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Su genoma consiste en una molécula de ARN de cadena positiva de aproximadamente 11 kilobases (Rice, 1996). Al igual que otros flavivirus, el VDEN tiene una cápside con simetría icosaédrica que contiene su genoma, el cual está rodeado por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora (Norazharuddin & Lai 2018). Este ARN genómico se traduce como una única poliproteína que es procesada postraduccionalmente en 10 proteínas maduras, 3 proteínas estructurales (Cápside (C), Premembrana (prM), y Envoltura (E)) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) vinculadas a replicación viral y evasión inmune (Murugesan and Manoharan 2020) (ver Figura 2). Las regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3' contienen elementos reguladores críticos para la traducción y replicación. La UTR 3' presenta estructuras secundarias tipo tallo-bucle que interactúan con NS5 durante la síntesis de ARN.

Las tres proteínas estructurales localizadas en el extremo N-terminal forman el virión, y las siete no estructurales son responsables de funciones esenciales para la replicación viral (Perera & Kuhn 2008) (ver Figura 2).

La proteína C es el principal componente estructural responsable del ensamblaje de la nucleocápside en los flavivirus (Sotcheff y Routh, 2020). Como elemento crítico en el ciclo de vida del VDEN, la proteína C es una proteína multifuncional participando en el empaquetamiento del genoma, el ensamblaje viral y, potencialmente, en la modulación de las interacciones huésped-patógeno.

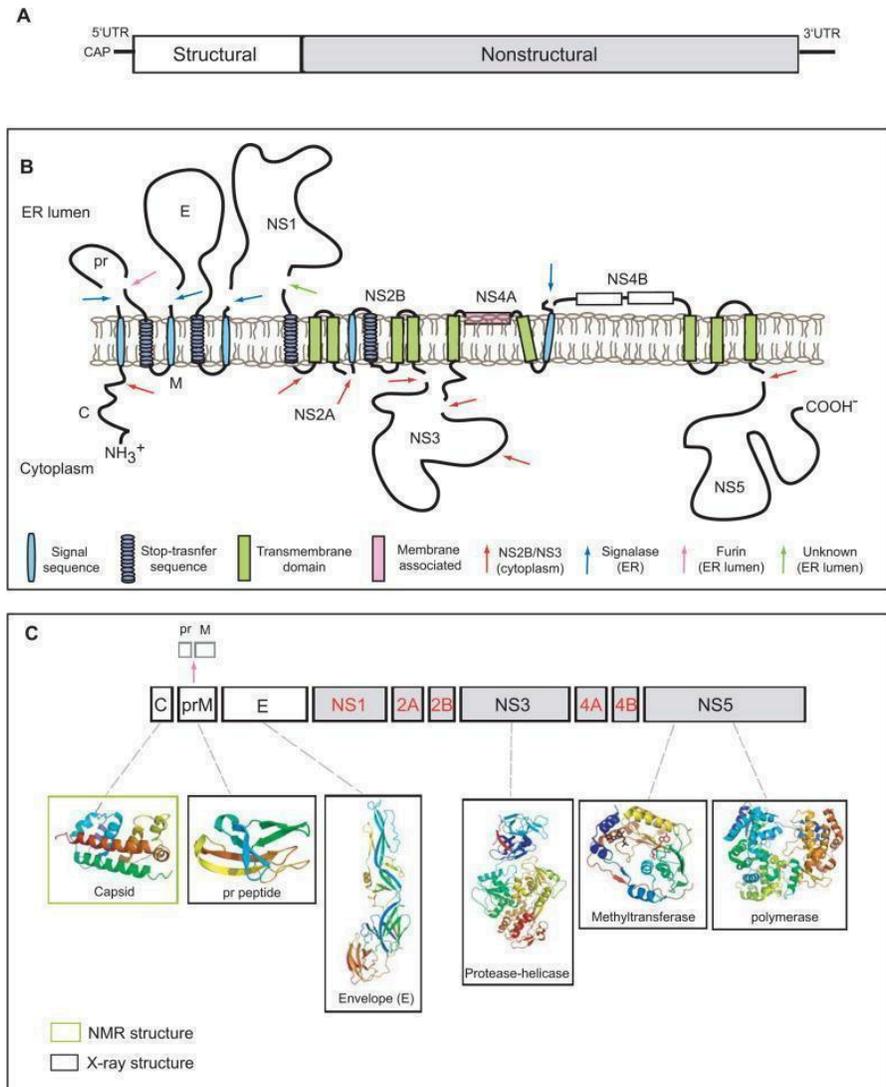


Figura 2. Esquema del genoma del virus dengue y de la poliproteína. En (A) se muestran las zonas estructurales y no estructurales del genoma. En (B) la topología de membrana de la poliproteína. En (C) el proteoma estructural del VDEN. Se muestran las estructuras por resonancia magnética nuclear y rayos-x (Perera & Kuhn 2008).

La proteína prM es una glicoproteína que desempeña un papel clave en la maduración de VDENV en la red trans-Golgi, induciendo un cambio morfológico de partículas inmaduras a partículas maduras (Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2010).

La proteína E se encuentra ubicada en la envoltura viral y está compuesta por tres dominios distintos: un dominio central (Dominio I), un dominio de bucle de fusión (Dominio II) y un dominio de unión al receptor (Dominio III). Estos dominios están organizados en dímeros en la superficie viral, con un total de 180 proteínas E dispuestas en una red icosaédrica. Esta disposición estructural es fundamental para la estabilidad viral y la entrada en las células huésped (Nayak et al., 2009)

La proteína NS1 es esencial para la replicación del genoma y además está implicada en la evasión inmunológica, ya que su secreción al torrente sanguíneo actúa como un señuelo para anticuerpos neutralizantes (Perera et al., 2024). Además, su presencia en altas concentraciones séricas está correlacionada con la severidad de la enfermedad, siendo un biomarcador clínico importante (Shu et al., 2022).

La proteína NS2A desempeña un papel fundamental en el ciclo de replicación viral, particularmente en el ensamblaje de nuevos viriones. Se ha sugerido que las mutaciones en NS2A alteran este proceso, lo que conduce a una síntesis de ARN deficiente y un ensamblaje defectuoso de partículas virales (Xie et al., 2019). Por otra parte, se ha observado que la proteína NS2A está implicada en la modulación de la respuesta del sistema inmunitario interfiriendo con la vía de señalización del interferón, suprimiendo la producción de interferones de tipo I y aumentando su potencial patogénico (Munoz-Jordan et al., 2003).

La proteína NS2B es un cofactor de gran importancia para la proteasa NS3, facilitando su actividad enzimática. NS2B y NS3 forman un heterodímero que es esencial para la escisión de la

poliproteína viral, generando proteínas tanto estructurales como no estructurales (Arias et al. 1993; Chambers et al. 1993).

La proteína NS3 es fundamental en el procesamiento de la poliproteína viral y en la replicación del genoma del VDEN. NS3 junto a su cofactor procesa la poliproteína viral realizando cortes en múltiples sitios específicos. Este procesamiento genera las proteínas estructurales (C, prM, E) y las no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS4A, NS4B, NS5). Por otra parte, la región C-terminal de NS3 contiene actividades enzimáticas clave: una nucleósido trifosfatasa, una ARN-trifosfatasa 5' y una helicasa. Esta región, altamente conservada dentro de la familia *Flaviviridae*, tiene un único sitio activo responsable de las actividades de ATPasa/helicasa y NTPasa. Estas funciones son determinantes para corregir errores previo a la síntesis de nuevo ARN como el *melting* de estructuras secundarias y errores posteriores a la síntesis de ARN por ejemplo desenrollando formación de doble hebras, removiendo proteínas que se hayan unido y participando en el capeado del extremo 5' del ARN viral (Sampath & Padmanabhan 2009).

La proteína NS4A tiene un rol clave en la modulación de los reordenamientos de membrana necesarios para la replicación viral interactuando con otras proteínas virales no estructurales para formar el complejo de replicación. Esto induce la formación de vesículas de doble membrana dentro del retículo endoplasmático del huésped, siendo estas vesículas microambientes protectores para una síntesis eficiente del ARN viral (Miller et al., 2007; McLean et al. 2011). La proteína NS4A de VDEN-1 presenta características únicas, dado que también inhibe la inducción de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) dirigida por TBK1, algo que no se observa en VDEN-2 ni en VDEN-4. La capacidad de la proteína NS4A del VDEN-1 para modular las respuestas de IFN puede contribuir a la mayor incidencia de enfermedades graves, como FHD y el SDC, asociadas con este serotipo. Las variaciones específicas de aminoácidos en la proteína NS4A del VDEN1

probablemente estén relacionadas con su capacidad para suprimir la señalización de IFN (Dalrymple et al. 2015).

La proteína NS4B es un componente multifuncional del complejo de replicación en flavivirus y desempeña papeles críticos en la replicación viral, la evasión inmunitaria y las interacciones proteína-proteína. La interacción entre NS4B y NS3 es necesaria para la funcionalidad del complejo de replicación, ya que la actividad de la helicasa de NS3 es modulada por NS4B para mejorar la síntesis de ARN (Muñoz-Jordán et al. 2005). NS4B junto a NS2A participan en la supresión de la inducción de IFN- $\beta$ . Estas proteínas bloquean la vía de señalización RIG-I/MDA5/MAVS/TBK1 al impedir la activación y fosforilación de TBK1, pasos cruciales para la inducción del IFN- $\beta$  (Dalrymple et al. 2015).

La proteína NS5 está conformada por dos dominios principales: una metiltransferasa en el extremo N-terminal y una ARN polimerasa dependiente de ARN en el extremo C-terminal. El dominio de metiltransferasa de NS5 es responsable de la adición de una estructura *cap* en el extremo 5' al ARN viral. Este *cap* protege al ARN viral de la degradación por parte de las exonucleasas celulares y asegura su reconocimiento por la maquinaria de traducción del huésped. Por otro lado, el dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN cataliza la síntesis de nuevas cadenas de ARN viral (Lim et al. 2015). NS5 también desempeña un papel destacado en la modulación de la respuesta inmune del huésped interactuando con diversas proteínas reguladoras del huésped, incluyendo STAT2, promoviendo su degradación y bloqueando así la transcripción de genes inducibles por IFN (Ashour et al. 2009).

### 1.3 El ciclo viral

El proceso de infección de VDENV comienza con la unión de la proteína E viral a receptores específicos en la membrana celular, lo que facilita la endocitosis mediada por receptor (Aoki et al., 2006). Las vesículas cubiertas de clatrina sirven como sitios de internalización.

Posteriormente, la clatrina se disocia iniciando un proceso de formación de endosoma. Cuando el pH del endosoma alcanza un valor aproximado a 6.5 se produce la maduración del endosoma, causando también cambios conformacionales que permiten la fusión de las proteínas de membrana virales y la membrana celular. El desensamblaje del virus lleva al genoma viral a establecerse en el citoplasma, el cuál sirve como molde para la traducción y replicación en el retículo endoplásmico. Posteriormente, el genoma progenie y las proteínas traducidas se ensamblan formando partículas virales inmaduras en el retículo endoplásmico. Estas partículas inmaduras sufren transformaciones en el complejo trans-golgi y las partículas maduras son transportadas a la superficie celular donde sufren un proceso de exocitosis completando así el ciclo celular. Por detalles de la replicación viral ver Figura 3.

### 1.4 Serotipos y genotipos de VDENV

VDENV circula en cuatro serotipos distintos (VDENV-1 a 4) con aproximadamente una divergencia en nucleótidos entre ellos de un 30 % (Yan et al., 2025). Asimismo, VDENV posee una significativa diversidad genética dentro de cada uno de los cuatro serotipos, diversificándose en múltiples genotipos (Velasco et al., 2024). Según la evidencia disponible, hasta el momento se han identificado seis genotipos de DENV-1: Asia (I), Tailandia (II), Malasia (III), Pacífico Sur (IV), Americano/Africano (V) y Selvático (VI) (Pyke et al., 2016). Para DENV-2 se han descrito

otros seis: Asiático (I), Asiático (II), Sudeste Asiático (III), Cosmopolitan (IV), Americano (V) y Selvático (VI). En el caso de DENV-3 se reconocen cinco genotipos (I al V) y para DENV-4 se han propuesto cuatro (I al IV), incluyendo un genotipo selvático (Roy & Bhattacharjee, 2021). Cabe destacar que estas clasificaciones se basan en estudios moleculares y filogenéticos disponibles hasta la fecha, sin que se descarte la posible existencia de otras variantes genéticas aún no identificadas, particularmente en ambientes selváticos o regiones con escasa vigilancia genómica.

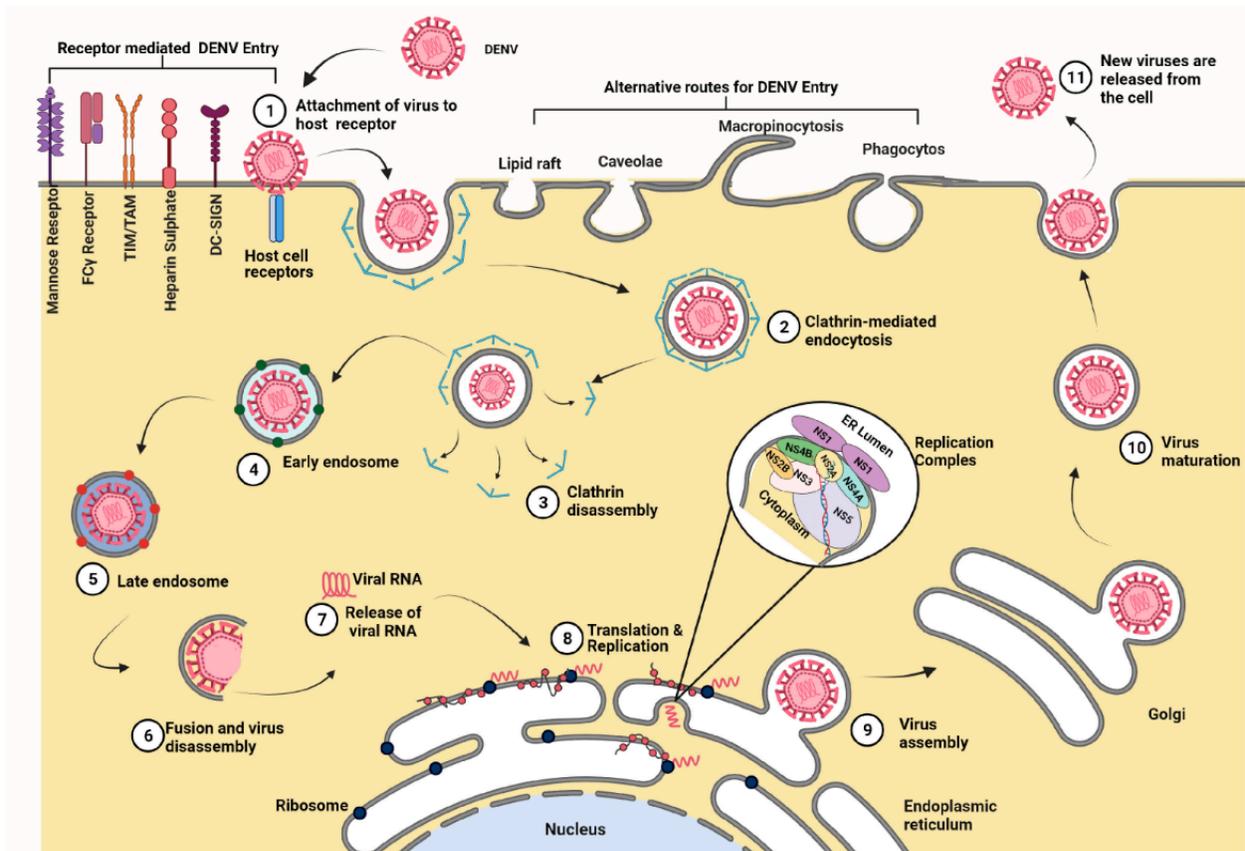


Figura 3. Ciclo de replicación de VDEN (Nanaware et al., 2021). En la parte superior de la figura se muestran la unión al receptor celular (1) y las rutas alternativas de entrada en la célula. En (2) la endocitosis mediada por clatrina. En (3) la liberación de clatrina y formación del endosoma (4). Luego de la maduración del endosoma (5), éste se disocia (6) y se libera el genoma viral (7) en el citoplasma. Este se transcribe y replica en el retículo endoplásmico (8), donde se ensamblan las partículas virales (9) inmaduras. Luego de la maduración en el sistema Golgi (10), las partículas maduras son liberadas de la célula huésped.

Dentro de cada genotipo, se ha reportado la existencia de linajes con distintas relaciones geográficas y temporales, y se ha observado que la rotación y el reemplazo de linajes son comunes (Drumond et al., 2012).

Estudios previos han demostrado que el genotipo V del VDENV ha sido el genotipo más prevalente en circulación en Sudamérica en los últimos años (Ribeiro et al., 2021; de Bruycker-Nogueira et al., 2016). Debido al alarmante panorama epidemiológico, comprender el grado de variabilidad genética del genotipo V del VDENV-1 es fundamental para anticipar posibles impactos en la salud pública y contribuir al desarrollo de vacunas seguras y eficaces contra VDENV (Martínez et al., 2020).

## 1.5 Respuesta inmunitaria contra VDENV

Cuando un mosquito vector infectado con VDENV pica a una persona para alimentarse inyecta VDENV en el torrente sanguíneo. El virus infecta queratinocitos de la piel, así como células de Langerhans. Estas últimas detectan el patógeno invasor y despliegan en su superficie antígenos virales lo cual activa la respuesta inmunitaria innata a través de la activación de monocitos y macrófagos. Normalmente, estas células del sistema inmunitario ingerirían y destruirían el patógeno. Lamentablemente, en vez de destruirlo, ambos tipos celulares son blancos de la infección viral. A medida que los monocitos y macrófagos viajan por el sistema linfático, VDENV se dispersa en todo el cuerpo, infectando más células, incluyendo aquellas de los nodos linfáticos y médula ósea, así como macrófagos del bazo y el hígado. Esto genera un alto nivel de circulación de partículas de VDENV en el torrente sanguíneo, condición conocida como viremia (Diamond et al., 2003) (ver Figura 4).

Las células infectadas producen interferones, los cuales tienen la habilidad de interferir con la replicación viral y activar las respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario, incluyendo la producción de anticuerpos IgM y IgG específicos, así como la activación de células T citotóxicas, a efectos de reconocer y eliminar células infectadas por VDEN. Asimismo, la respuesta inmunitaria innata activa el sistema de complemento. Ambas respuestas del sistema inmunitario neutralizan la infección viral (Guzman et al., 2010) (ver Figura 5).

Debido a que existen cuatro serotipos diferentes de VDEN circulando y a que las células memoria del sistema inmunitario solo proveen inmunidad contra una reinfección por parte del mismo serotipo que causó la primera infección, una segunda infección por un serotipo distinto puede dar lugar al fenómeno ADE (antibody-dependent enhancement) (Whitehead et al., 2007). ADE ocurre cuando los anticuerpos de la primoinfección pueden ayudar a la dispersión de la infección por VDEN y a un incremento de la viremia. Este fenómeno también puede ocurrir en niños que reciben anticuerpos de sus madres durante la gestación. ADE ocurre debido a que, en lugar de destruir el virus, los anticuerpos existentes pueden ayudar a infectar las células más eficientemente (ver Figura 6). La consecuencia es que la respuesta inmunitaria del huésped puede eventualmente provocar un cuadro clínico más severo.

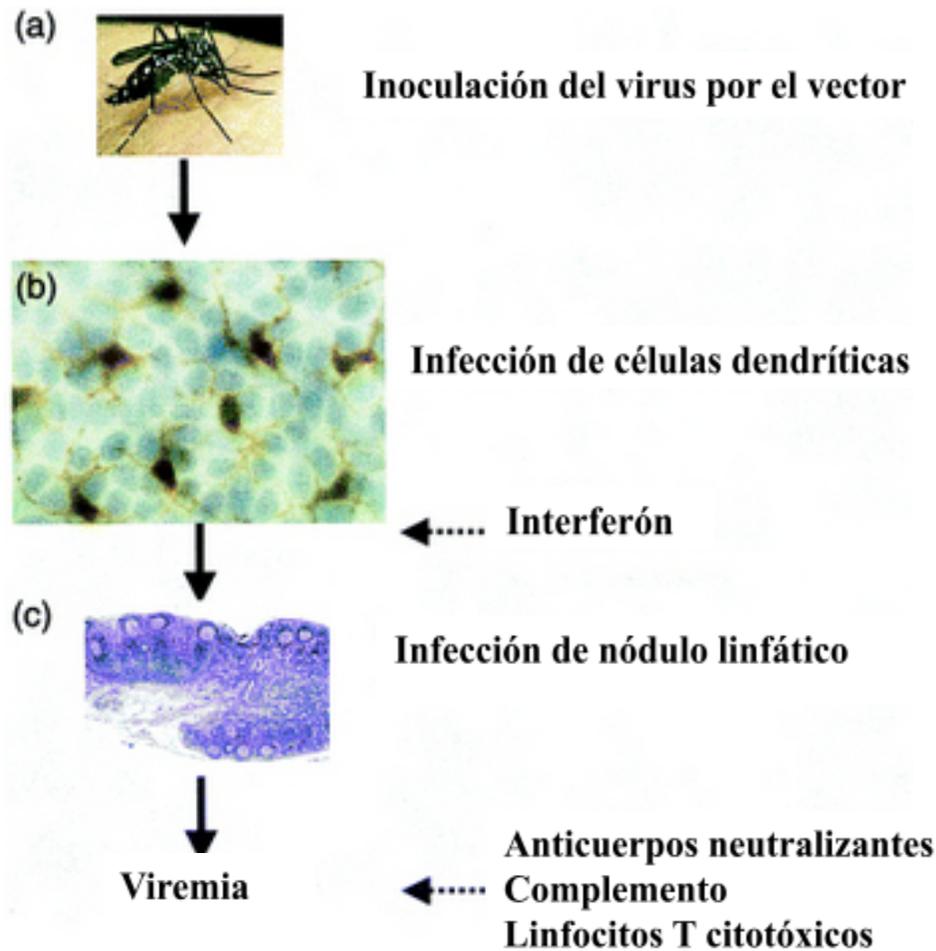


Figura 4. Infección por virus Dengue. En (a) la persona es infectada cuando el mosquito vector pica en la piel de la persona. En (b) VDEN infecta células de Langerhans, un tipo de células dendríticas de la piel. En (c) Las células de Langerhans infectadas producen interferón para limitar la infección. Otras células de Langerhans viajan a los nodos linfáticos llevando virus que infectan más células. La infección viral entonces resulta en viremia, lo que conduce a un alto nivel de virus circulante en el torrente sanguíneo. En (d) para atacar la infección el sistema inmunitario produce anticuerpos para neutralizar las partículas virales, y el sistema de complemento es activado. La respuesta inmunitaria también incluye la participación de linfocitos T citotóxicos, los cuales reconocen y matan las células infectadas (Diamond et al., 2003).

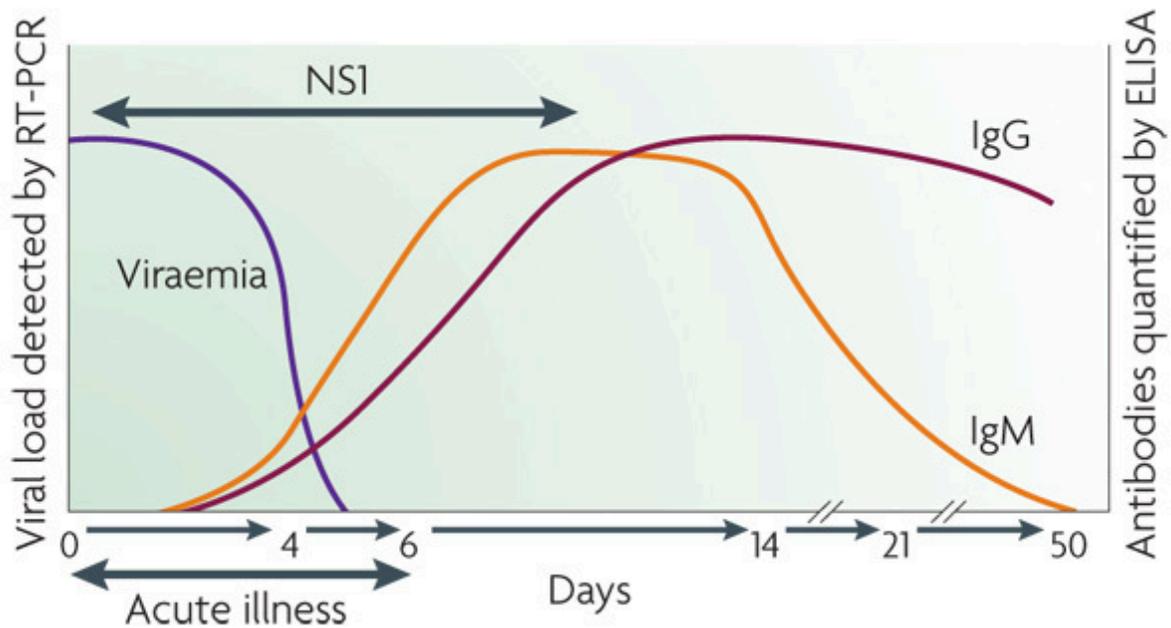


Figura 5. Respuesta inmunitaria contra VDEN.

La persona infectada experimenta síntomas agudos de VDEN cuando existen altos niveles de virus en el torrente sanguíneo. La respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos IgM e IgG en sangre y en el sistema linfático, que reconocen y neutralizan el virus, así como proteínas virales tales como NS1. La respuesta inmunitaria elimina el virus llevando al paciente a su recuperación (Guzman et al., 2010).

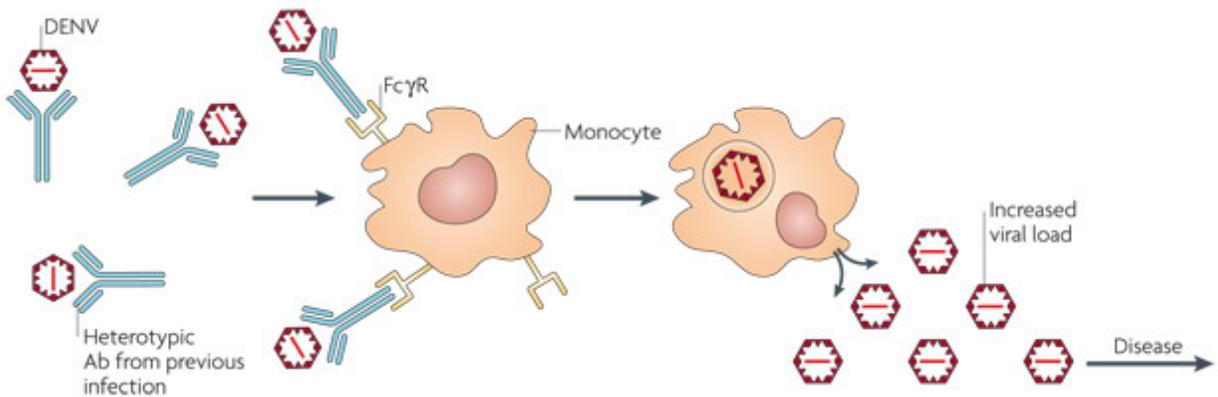


Figura 6. Antibody-dependent enhancement (ADE) en la infección por VDENV.

ADE ocurre cuando anticuerpos preexistentes de una primoinfección se unen a partículas de VDENV de una subsecuente infección de un serotipo diferente. Los anticuerpos provenientes de la primoinfección no pueden neutralizar el virus, por el contrario, el complejo virus-anticuerpo se une a receptores **Fcγ** en monocitos circulantes y de esta manera contribuyen a infectar el monocito mas eficientemente. El resultado es un incremento de la replicación del virus y un mayor riesgo de dengue severo. (Whitehead et al., 2007).

La proteína E es el principal blanco de anticuerpos neutralizantes contra VDEN (Wahala et al., 2011). La estructura del ectodominio de la proteína E de *Flavivirus* se compone de tres dominios (EDI al -III), cada uno conteniendo epítomos reconocidos por anticuerpos neutralizantes (VanBlargan et al., 2021) (ver Figura 7). Estudios previos también han revelado que anticuerpos neutralizantes humanos contra múltiples *Flavivirus*, incluido VDEN, virus de la Fiebre Amarilla y virus Zika se unen a epítomos presentes solo en dímeros de la proteína E (Dejnirattisai et al., 2015). Anticuerpos neutralizantes serotipo-específicos (SE) han sido aislados de humanos después de una infección por VDEN (de Alwis et al., 2011). Aunque estos anticuerpos representan una porción minoritaria de la respuesta humoral a VDEN, estos anticuerpos SE desarrollados luego de una infección primaria son los responsables en gran medida de la neutralización viral (Beltramello et al., 2010). Estudios previos realizados con anticuerpos monoclonales murinos demostraron que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes son SE y se unen al dominio EDIII (Shrestha et al., 2010). Sin embargo, un porcentaje importante de anticuerpos neutralizantes humanos no parece unirse a EDIII, sino a partículas virales enteras, sugiriendo que reconocen estructuras cuaternarias (Beltramello et al., 2010). Por consiguiente, el campo de investigar los principales epítomos blanco de anticuerpos neutralizantes contra VDEN continúa abierto (Wahala et al., 2011).

Por otra parte, los anticuerpos contra la proteína NS1 han sido estudiados con particular atención, debido a que esta proteína no estructural es secretada de las células infectadas. En modelos de ratón, los anticuerpos contra NS1 fueron efectivos en proteger de la infección viral (Falgout et al., 1990). Aunque se han encontrado anticuerpos contra NS3 y NS5 en personas infectadas, estos anticuerpos no influenciarían la infección viral, dado que NS3 y NS5 trabajan en procesos intracelulares (Wahala et al., 2011).

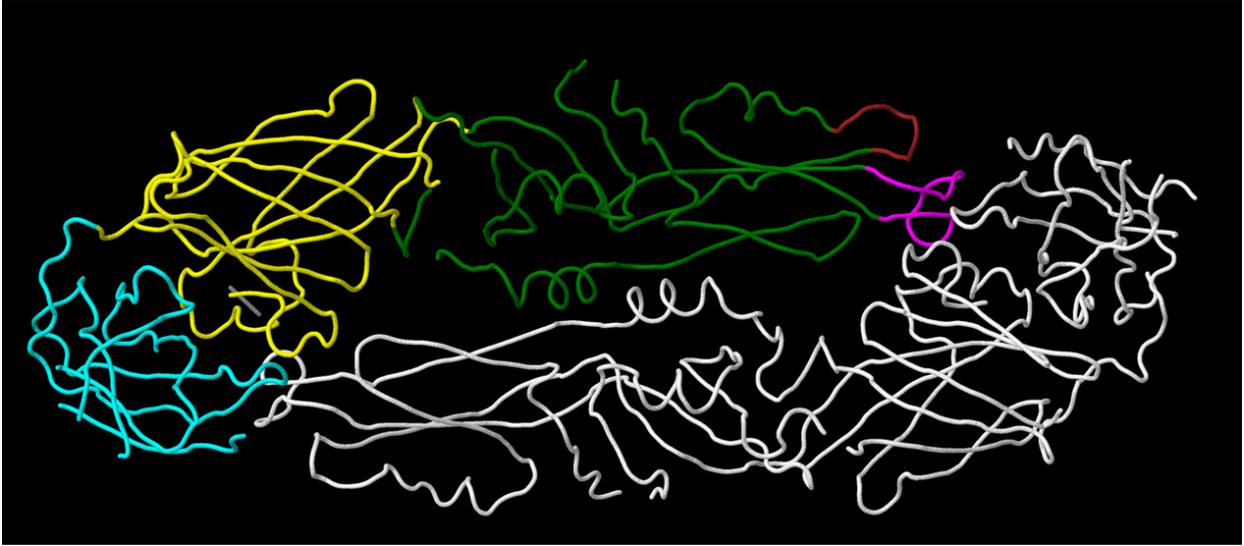


Figura 7. Estructura de la proteína E de VDEN-1 (PDB:3gt7). La estructura de la proteína E es un homodímero. Cada estructura contiene tres dominios (EDI al III) indicados en verde, amarillo y cian, respectivamente, en una de las estructuras. El sitio de unión al receptor y un sitio antigénico conservado entre distintas estirpes de VDEN (Fibriansah et al., 2014) se muestran en magenta y marrón, respectivamente.

## 1.6 Vacunas contra el VDEN

El desarrollo de vacunas eficaces contra el VDEN representa un desafío complejo en inmunología, con tres desarrollos principales de distintas vacunas, las cuales muestran distintos grados de éxito y limitaciones.

**CYD-TDV (Dengvaxia®)**, desarrollada por Sanofi Pasteur y aprobada en 2015, representa la primera vacuna autorizada contra el VDEN. Esta vacuna tetravalente viva atenuada emplea un enfoque innovador, utilizando la cepa vacunal del virus de la fiebre amarilla (YFV-17D) como estructura principal, con genes prM/E de los cuatro serotipos del VDEN insertados para generar inmunidad protectora (Pinheiro-Michelsen et al., 2020a) (ver Figura 8).

Las construcciones quiméricas incorporaron las siguientes cepas del VDEN:

ChimeriVax-D1: Cepa VDEN1 PUO359, aislada en Tailandia en 1980.

ChimeriVax-D2: Cepa VDEN2 PUO-218, aislada de un niño durante la epidemia de Bangkok en 1980.

ChimeriVax-D3: Cepa VDEN3 PaH881/88, aislada en Tailandia en 1988.

ChimeriVax-D4: Cepa VDEN-4 1228, aislada en Indonesia en 1978.

Este diseño tuvo como objetivo proporcionar una inmunidad equilibrada contra los cuatro serotipos del VDEN, aprovechando el perfil de seguridad establecido de la estructura de la cepa vacunal de la vacuna contra el virus de la Fiebre Amarilla (YFV-17D).

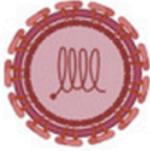
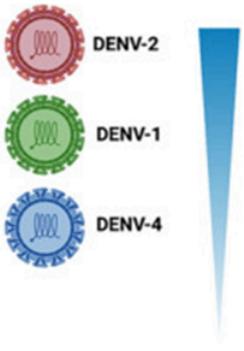
|                            | Dengvaxia  | DENVax  | TV003/TV005  |
|----------------------------|--|---|--|
| Backbone                   | <br>Yellow Fever Virus (17D)              | <br>Cell culture attenuated DENV | <br>DENVΔ30                                 |
| Serotype-specific efficacy | <br>DENV-4<br>DENV-3<br>DENV-1<br>DENV-2 | <br>DENV-2<br>DENV-1<br>DENV-4 | <br>DENV-4 *<br>DENV-3<br>DENV-1<br>DENV-2 |
| Overall Efficacy (%)       | **30.2% - 60.8%  | 62%   | Data not available   |
| Efficacy (%) seropositive  | 74.3-83.7 %  | 52.3%-83.4%   | Data not available   |
| Efficacy (%) seronegative  | 35.5%-43.2%  | ***43.5%-91.9%  | Data not available   |

Figura 8. Eficacia de los ensayos de vacunas contra VDENV en niños de América Latina y Asia.

(Torres-Flores et al., 2022). \* Actualmente en ensayos clínicos de fase III. \*\* Eficacia en ensayos de fase III en Tailandia. \*\*\* VDENVax fue solamente eficaz contra VDENV-1 y VDENV-2 en individuos seronegativos.

Un ensayo clínico de fase III de esta vacuna realizado en Australia evaluó la consistencia entre lotes de la vacuna contra el VDEN en adultos sanos. Los hallazgos revelaron que, si bien las personas sin exposición previa al dengue desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos del VDEN tras una sola dosis de la vacuna, solo el VDEN-4 generó anticuerpos neutralizantes específicos del serotipo. La neutralización de los VDEN 1-3 se produjo mediante anticuerpos de reactividad cruzada, lo que demuestra la inmunodominancia del componente VDEN-4 en la vacuna (Henein et al., 2017).

El estudio más completo sobre la eficacia y seguridad de Dengvaxia® involucró aproximadamente a 35.000 niños de 2 a 16 años. Los resultados demostraron una eficacia dependiente de la edad: 65% en niños mayores de 9 años frente al 45% en niños de 9 años o menos (Hadinegoro et al., 2015a). Es preocupante que los niños menores de 9 años mostraran una tendencia a desarrollar dengue grave tras la vacunación y la posterior exposición natural al virus, un efecto particularmente pronunciado en niños sin exposición previa a VDEN (Sridhar et al., 2018).

Ensayos de fase III a mayor escala, realizados en cinco países latinoamericanos con circulación endémica del VDEN con 20.869 niños sanos de 9 a 16 años, confirmaron una eficacia dependiente del serotipo: mayor protección contra VDEN-3 (74,0%) y VDEN-4 (77,0%) que contra VDEN-1 (50,3%) y VDEN-2 (42,3%). Este patrón reforzó las observaciones de que la eficacia de la vacuna varía según el serotipo y la edad (Villar et al., 2015).

Dengvaxia®, a pesar de ser uno de los desarrollos más avanzados en vacunas contra el VDEN, planteó serias preocupaciones de seguridad cuando los datos mostraron un mayor riesgo de hospitalización en personas vacunadas sin infección previa cuando estuvieron expuestas a una infección natural (Salmon et al., 2021).

Actualmente, la vacuna se recomienda solo para aquellas personas con infección previa por dengue confirmada por laboratorio debido al mayor riesgo de dengue grave en individuos seronegativos, como se observó en ensayos clínicos donde los niños seronegativos vacunados mostraron tasas de hospitalización más altas después de la vacunación (Comité Consultivo Mundial sobre Seguridad de las Vacunas de la Organización Mundial de la Salud).

**TAK-003 (Qdenga®) (VDENax)**, desarrollada por el laboratorio Takeda y aprobada en 2022, representa un enfoque en el cuál se utiliza la estructura principal de VDEN-2 PDK-53, pero reemplaza los genes de la premembrana (prM) y la envoltura (E) de la cepa VDEN-2 PDK53-V con los genes prM y E de VDEN pertenecientes a otros serotipos (Huang et al., 2003) (ver Figura 8). Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase III a gran escala para evaluar la eficacia de VDENax en una cohorte de 20.071 niños sanos de 4 a 16 años en países endémicos de dengue en Latinoamérica y Asia. Los resultados primarios a los 12 meses de la vacunación mostraron una eficacia variable según el serotipo de VDEN: 97,7 % para VDEN-2, 73,7 % para VDEN-1 y 62,6 % contra VDEN-3, mientras que los resultados de eficacia para VDEN-4 no fueron concluyentes. Cabe destacar que la eficacia general de la vacuna fue similar entre los participantes seronegativos (74,9 %) y seropositivos (82,2 %), independientemente del rango de edad. La eficacia general de esta vacuna contra VDEN que provocó hospitalización fue del 95,4 % entre los seronegativos y del 94,4 % entre los seropositivos (Biswal et al., 2019). Los datos del mismo ensayo, 18 meses después de la vacunación, revelaron una eficacia global de la vacuna del 76,1 % en individuos seropositivos y del 66,2 % en individuos seronegativos, con una eficacia global contra diferentes serotipos del virus del dengue que osciló entre el 95,1 % contra VDEN-2 y el 48,9 % contra VDEN-3.

Sin embargo, al estratificar por grupo de edad, la eficacia de la vacuna contra la hospitalización fue significativamente menor en niños previamente seronegativos de 4 a 5 años (59,1 %), mientras que la eficacia para prevenir la hospitalización en niños seropositivos de la misma edad fue del 51,6 % (Biswal et al., 2020).

### **Uso de TAK-003 (Qdenga®) en América del Sur: recomendaciones internacionales y aprobaciones nacionales**

El 10 de mayo de 2024, Qdenga fue incluido en la Lista de Vacunas Precalificadas de la OMS, lo que indica que cumple con estándares internacionales de calidad, seguridad y eficacia, y la hace elegible para adquisiciones por agencias de Naciones Unidas (WHO, 2024a).

El Grupo Estratégico Consultivo de Expertos en Inmunización (SAGE) de la OMS recomienda su uso programático en zonas con alta intensidad de transmisión de dengue, específicamente en personas de 6 a 16 años, sin necesidad de prueba serológica previa. Sin embargo, SAGE no recomienda su uso sistemático en menores de 6 años debido a la menor eficacia observada en este grupo etario y a las bajas tasas de seropositividad en niños pequeños. Tampoco recomienda su implementación en áreas de transmisión baja o moderada hasta contar con mayor evidencia sobre el perfil eficacia-riesgo frente a los serotipos DENV-3 y DENV-4 en individuos seronegativos (WHO, 2024b). Asimismo, para personas con comorbilidades en países endémicos, la vacunación puede considerarse entre los 6 y 60 años, siempre que exista evidencia local del alto riesgo de formas graves de la enfermedad en estos subgrupos (WHO, 2024b).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha respaldado esta precalificación e insta a los países de la región a desarrollar políticas de vacunación contra el dengue en función de la epidemiología local, priorizando a los escolares como grupo de mayor carga de enfermedad y promoviendo la integración del uso de la vacuna dentro de estrategias amplias de control de arbovirosis (PAHO, 2024).

Hasta mediados de 2025, TAK-003 ha sido formalmente aprobado en al menos tres países de América del Sur: Brasil, Argentina y Colombia.

#### Brasil

La vacuna fue aprobada por la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) el 2 de marzo de 2023, para su uso en personas de 4 a 60 años (ANVISA, 2023). Brasil se convirtió así en el primer país del mundo en incorporar Qdenga® dentro de su sistema público de salud (Ministério da Saúde, 2023).

#### Argentina

En abril de 2023, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) aprobó Qdenga® para su uso en personas mayores de 4 años, sin límite superior de edad (ANMAT, 2023). La vacuna se encuentra disponible en todo el país desde noviembre de 2023, principalmente en el ámbito privado y en campañas provinciales focalizadas.

#### Colombia

En noviembre de 2023, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) aprobó TAK-003 para su uso en personas de 4 a 60 años (INVIMA, 2023). Aunque su inclusión en el esquema nacional de vacunación aún está en evaluación, esta autorización permite su uso tanto privado como potencialmente institucional.

**Vacuna candidata TV003/TV005**, actualmente en ensayos de fase III, emplea un enfoque distinto al utilizar cepas vivas atenuadas de VDEN-1-4 con mutaciones específicas (ver Figura 8). La estrategia de atenuación se centró en la eliminación de 30 nucleótidos contiguos (172-143) en la región 3'-UTR de VDEN-4 (Men et al., 1996). Tras confirmar que estos virus modificados no causaban infección en ratones ni en primates no humanos, los investigadores procedieron a generar versiones quiméricas para los serotipos 1, 2 y 3 (Blaney et al., 2004, 2008; Whitehead et al., 2003).

Tras estos estudios preliminares, se seleccionaron seis vacunas candidatas para una evaluación clínica adicional, formuladas como cinco mezclas tetravalentes (TV-001 a TV-005). Dos candidatos (TV003 y TV005), ambos formulados con rDEN1D30, rDEN2/4D30, rDEN3D30/31 y rDEN4D30, pero con diferentes cantidades del componente rDEN2/4D30 ( $10^3$  unidades formadoras de placa (UFP)/ml en TV003 frente a  $10^4$  UFP/ml en TV005), fueron seleccionados para una evaluación clínica avanzada tras inducir las respuestas de anticuerpos neutralizantes más equilibradas contra los cuatro serotipos del VDEN (Kirkpatrick et al., 2015).

En estudios de fase III de esta vacuna, llevados a cabo por el Instituto Butantán (Brasil), la eficacia general de la vacuna a los 2 años de vacunación fue del 79,6 %, con una eficacia del 73,6 % entre los participantes sin evidencia de exposición previa al el VDEN y del 89,2 % entre aquellos con antecedentes de exposición. La eficacia contra VDEN-1 fue del 89,5 % y contra VDEN-2 del 69,6 %. No se detectaron casos de VDEN-3 ni VDEN-4 en estos estudios, lo que refleja los serotipos circulantes durante el período en el cual se desarrolló el estudio (Instituto Butantan, 2024).

## 2. Objetivo

Comprender el grado de variabilidad genética y evolución molecular de VDEN es fundamental para desarrollar estrategias efectivas para el control de este importante patógeno (Yu et al., 2022), así como comprender su emergencia y dispersión es esencial para contener futuras epidemias (Harish et al., 2024). Asimismo, comprender el grado de variabilidad genética de VDEN es extremadamente importante para el desarrollo de vacunas seguras y apropiadas. Dada la dramática reciente emergencia de VDEN-1 en la región sudamericana, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

### 2.1 Objetivo General

El objetivo general del presente proyecto es comprender el grado de variabilidad genética y el modo de evolución de VDEN-1 en la región sudamericana.

### 2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente proyecto son los siguientes:

- a) Determinar el o los genotipos de VDEN-1 que circulan en la región sudamericana.
- b) Evaluar la presencia de recombinantes en la población viral de VDEN-1 circulantes en la región sudamericana.
- c) Establecer las relaciones filogenéticas y el grado de variabilidad genética entre las estirpes de VDEN-1 que circulan en la región.
- d) Establecer la historia evolutiva de la población viral de VDEN-1 a lo largo del tiempo.

- e) Determinar las sustituciones de aminoácidos en la proteína E de VDEN-1 y su posible relación con las propiedades antigénicas de la proteína.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Secuencias

En estos estudios se utilizaron secuencias genómicas completas, disponibles y comparables, de 128 estirpes del genotipo V de VDEN1 aisladas en América del Sur desde el 22 de febrero de 2022 hasta el 5 de julio de 2024 (incluidos Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Paraguay y Uruguay). Las secuencias que se incluyeron en el conjunto de datos se seleccionaron cuidadosamente para tener un mínimo de N en la secuencia genómica completa. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos GISAID (<https://gisaid.org>). Por nombre de las estirpes, número de acceso, localidad geográfica y fecha de aislamiento ver Tabla 1 del Material Suplementario.

### 3.2 Alineación de secuencias

Las secuencias se alinearon utilizando el programa MAFFT versión 7 (Kato et al., 2019).

### 3.3 Asignación de genotipo de VDEN-1

Para confirmar la correcta asignación de todas las secuencias genómicas incluidas en estos

análisis a su respectivo genotipo de VDEN-1, empleamos el algoritmo DengueSurfer, disponible en la base de datos GISAID.

### 3.4 Construcción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud

A efectos de observar la variabilidad genética de las estirpes de VDEN-1 genotipo V con respecto a los linajes previamente descritos de este genotipo se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (maximum likelihood) utilizando el programa MEGA 11 program (Tamura et al., 2021). Como medida estadística de fiabilidad de cada nodo, se utilizó el método de bootstrap (1,000 pseudo-replicas).

### 3.5 Traducción in silico

Para observar las sustituciones de aminoácidos encontradas en la proteína E de las cepas incluidas en estos análisis, las secuencias de nucleótidos se tradujeron in silico utilizando el software del programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021).

### 3.6 Análisis Bayesianos de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC)

Para investigar la evolución a lo largo del tiempo de las variantes del genotipo V de VDEN-1 aisladas recientemente en la región de América del Sur, se utilizó un enfoque bayesiano de cadenas de Markov Monte Carlo, implementado en el paquete informático BEAST v2.5.2 (Bouckaert et al., 2019). El modelo evolutivo que mejor se ajustaba al conjunto de datos de secuencias se determinó utilizando el software del programa IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Utilizando el criterio de información bayesiano (BIC), el criterio de información de

Akaike (AIC) y el logaritmo de la verosimilitud (LnL) se identificó que el mejor modelo de la variabilidad de nucleótidos que describe el conjunto de datos es el GTR+ $\gamma$ +I. Utilizando este modelo y modelos de reloj molecular estrictos y relajados se probaron diferentes modelos dinámicos (tamaño de población constante, crecimiento de población exponencial, Skyline bayesiano y Skyline de nacimiento-muerte serial). La incertidumbre estadística en los datos se reflejó en los valores de densidad de probabilidad más alta (95 % high probability density, HPD). Los resultados se examinaron utilizando el programa TRACER v1.7.2 (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). La convergencia se evaluó mediante tamaños de muestra efectivos (Effective Sample Size, ESS) superiores a 200. Los árboles de máxima credibilidad se generaron mediante el uso del programa Tree Annotator del paquete BEAST. La visualización de los árboles anotados se realizó mediante el programa FigTree v1.4.4 (disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

### 3.6 Filogeografía

El análisis de la filogeografía se realizó utilizando el paquete BEAST v.2.5.2 (Bouckaert et al., 2019). Las secuencias completas del genoma de las estirpes del genotipo V de VDEN-1 incluidas en estos estudios, con sus respectivos metadatos (latitud, longitud y fecha de aislamiento), se insertaron en el programa Beauti del paquete BEAST. La visualización de los datos filogeográficos se realizó utilizando el programa SPREAD v1.0.7 (Bielejec et al, 2011).

### 3.7 Predicción de sitios de glicosilación en la proteína E de VDEN-1

Se predijeron sitios potenciales de glicosilación en la proteína E de VDEN-1 utilizando el servidor NetNGlyc 1.0 (Gupta y Brunak, 2002; Gupta y). El servidor NetNglyc predice sitios de glicosilación en proteínas utilizando redes neuronales artificiales que examinan el contexto de secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr.

### 3.8 Mapeo de sustituciones de aminoácidos en una estructura 3D de la proteína E de VDEN-1

Las sustituciones de aminoácidos encontradas en la proteína E de cepas aisladas recientemente en Sudamérica se mapearon en la estructura 3D de la proteína E de VDEN-1 (genotipo II), disponible en Protein Data Bank (PDB) (número de acceso: 7A3R, Sharma et al., 2021). La visualización se realizó utilizando el software J-mol-14.0.4 (disponible en: <http://www.jmol.org/>).

## 4. Resultados

### 4.1 Variabilidad genética de estirpes de VDEN-1 genotipo V recientemente aisladas en la región sudamericana

La evolución de VDEN se ha caracterizado por el reemplazo de linajes a lo largo del tiempo, lo cual, junto a factores ecológicos e inmunológicos, ha afectado la dinámica evolutiva y la manifestación de distintos fenotipos de VDEN (Thongsripong et al., 2023). A efectos de estudiar el grado de variabilidad genética de las estirpes sudamericanas recientemente aisladas con los linajes de VDEN-1 genotipo V previamente descritas, las secuencias completas de los genomas de estas cepas fueron alineadas con estirpes de VDEN-1 genotipo V previamente descritas pertenecientes a los linajes 1 al 6 (L1 al L6) (Dumond et al., 2012). A continuación, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud y su significado estadístico se midió mediante el método de Bootstrap (1.000 pseudo-replicas). Los resultados de estos estudios se muestran en el Figura 9. Las estirpes en el árbol filogenético están asignadas de acuerdo a su genotipo con un soporte estadístico de bootstrap muy significativo. Las estirpes sudamericanas están asignadas a dos clusters diferentes, mientras que las estirpes de referencia (L1 a L6) están asignadas a otras líneas genéticas diferentes de las cepas sudamericanas (Fig. 9). Estos resultados sugieren un reemplazo de linajes circulando durante 2023 y 2024 en la región sudamericana (ver Fig. 9).

## 4.2 Análisis coalescente bayesiano de estirpes de VDEN-1 genotipo V aisladas en la región sudamericana

A efectos de reconstruir la historia evolutiva de estirpes de VDEN-1 genotipo V que circulan en Sudamérica, se realizó un análisis coalescente bayesiano a partir de 128 secuencias completas de cepas de VDEN-1 genotipo V, aisladas entre febrero de 2022 y julio de 2024 en diversos países de Sudamérica (Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Paraguay y Uruguay) (Bouckaert et al., 2019). Los detalles específicos de las cepas, incluyendo nombre, número de acceso, ubicación geográfica y fecha de aislamiento, se encuentran en la Tabla S1 del Material Suplementario. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos luego de 60 millones de MCMC, utilizando el modelo de nucleótidos GTR+ $\gamma$ +I, un reloj molecular estricto y el modelo poblacional Bayesian Skyline.

Estos resultados revelaron una tasa de evolución de  $7.50 \times 10^{-4}$  sustituciones por sitio por año (s/s/a) para las estirpes incluidas en estos estudios. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados en cepas de VDEN-1 circulantes en Sudamérica ( $8.58 \times 10^{-4}$  s/s/a (Mendez et al., 2010). Los resultados de estos estudios también sugieren que las variantes de VDEN-1 genotipo V aisladas en la región sudamericana derivan de ancestros que circulaban en la región alrededor del 23 de abril del 2001.

A efectos de reconstruir la historia demográfica de las estirpes de VDEN-1 genotipo V incluidas en estos estudios, se construyó un “Skyline plot”, el cuál es una representación del tamaño efectivo de la población viral a lo largo del tiempo (Drummond et al., 2005). Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 10. Un aumento pronunciado del tamaño efectivo de la población viral fue observado a partir del 2020, el cuál continúa creciendo hasta 2024. Estos

resultados están de acuerdo con la epidemiología observada en la región sudamericana (WHO, 2025).

A efectos de estudiar las relaciones filogenéticas de las estirpes de VDEN-1 genotipo V circulantes en la región sudamericana, se construyó un árbol de máxima credibilidad a partir de software del paquete BEAST (Rambaut et al., 2020). Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 11.

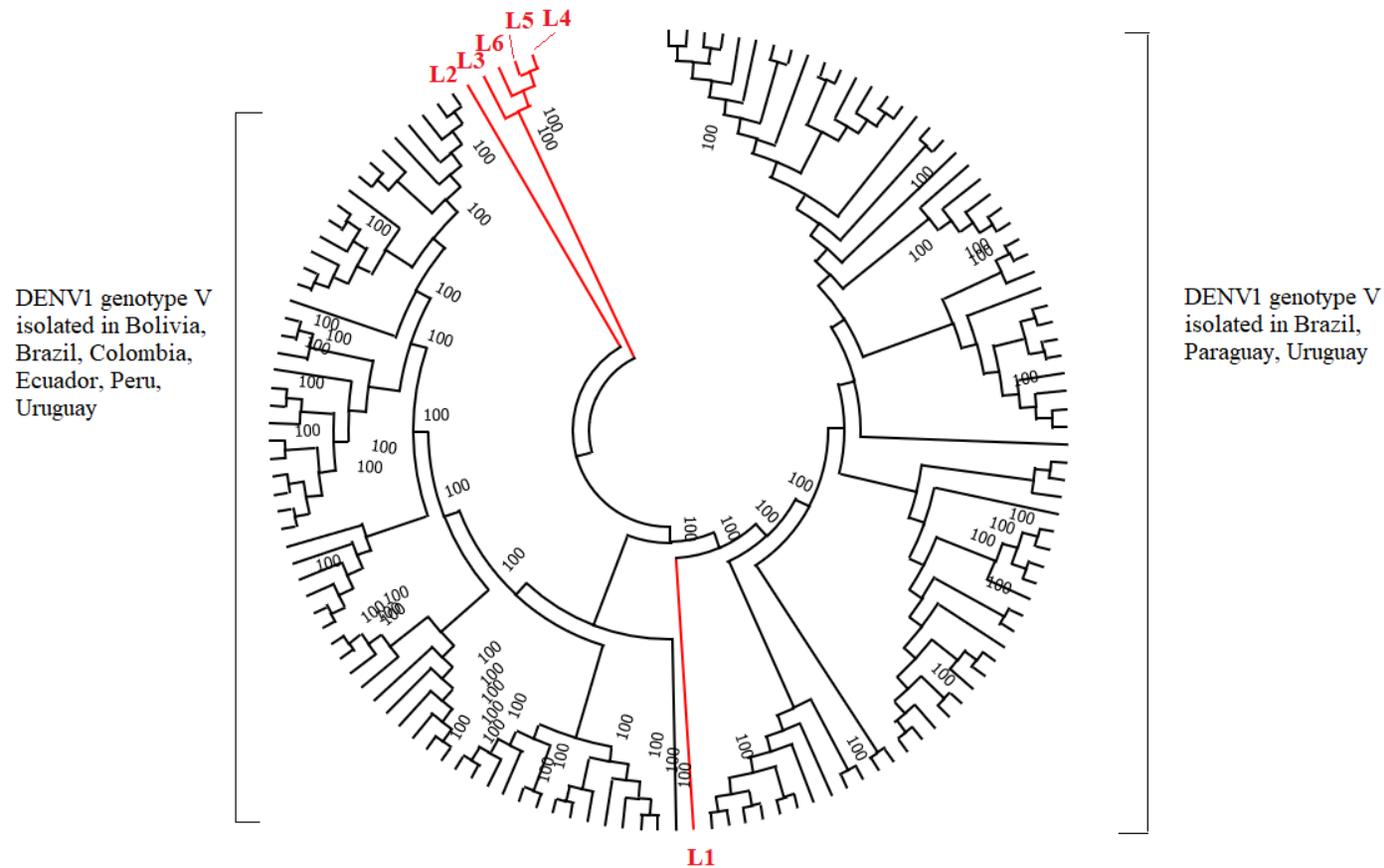


Figura 9. Análisis filogenético mediante árboles de máxima verosimilitud de VDENV-1 genotipo V aisladas en Sudamérica en 2023 y 2024. Los linajes compuestos por cepas aisladas en Sudamérica se muestran en negro y su localidad geográfica de aislamiento se muestra al lado de su respectivo linaje. Las estirpes previamente descritas como linaje 1 (BR/BID-V2401/2008, GeneBank:FJ850093), linaje 2 (NI/BID-V629/2005, GeneBank:FJ024485), linaje 3 (BR/BID-V2378/2001, GeneBank:FJ850073), linaje 4 (US/BID-1742/1998, GeneBank: JF390380), linaje 5 (US/BID-V1743/1995, GeneBank:FJ205874) y linaje (BR/BID-V2389/2004, GeneBank:FJ850081) (according to Drumont et al. (2012) se muestran L1 a L6 en rojo, respectivamente. Los números en las ramas del árbol indican valores de bootstrap.

**Tabla 1. Análisis Bayesiano coalescente de estirpes de VDEN-1 genotipo V aisladas en Sudamérica.**

| Grupo <sup>a</sup>          | Parámetro                      | Valor <sup>b</sup>      | HPD <sup>c</sup>                                   | ESS <sup>d</sup> |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|--|------------------|
| Genomas completos de VDEN-1 | Posterior                      | -37.350.30              | -37392.98 to -37303.21                             | 221.20           |
|                             | Likelihood                     | -36675.97               | -36721.75 to -36640.37                             | 2113.90          |
|                             | Tasa de evolución <sup>e</sup> | 7.50 x 10 <sup>-4</sup> | 5.92 x 10 <sup>-4</sup> to 9.07 x 10 <sup>-4</sup> | 349.40           |
|                             | tACMR                          | 23.20                   | 18.69 to 28.69                                     | 353.90           |
| <b>23/4/2001</b>            |                                |                         |  |                  |

<sup>a</sup> Ver Material Suplementario Table 1 por estirpes incluidas en estos análisis. <sup>b</sup> En todos los casos, se muestran los valores medios. <sup>c</sup> HPD, valores de alta densidad de probabilidad (high probability density values). <sup>d</sup> ESS, tamaño efectivo de la muestra (effective sample size). <sup>e</sup> La tasa está expresada en sustituciones por sitio por año. <sup>f</sup> tACMR, el tiempo al ancestro común más reciente se muestra en años. La fecha estimada para el tACMR se muestra en negrita.

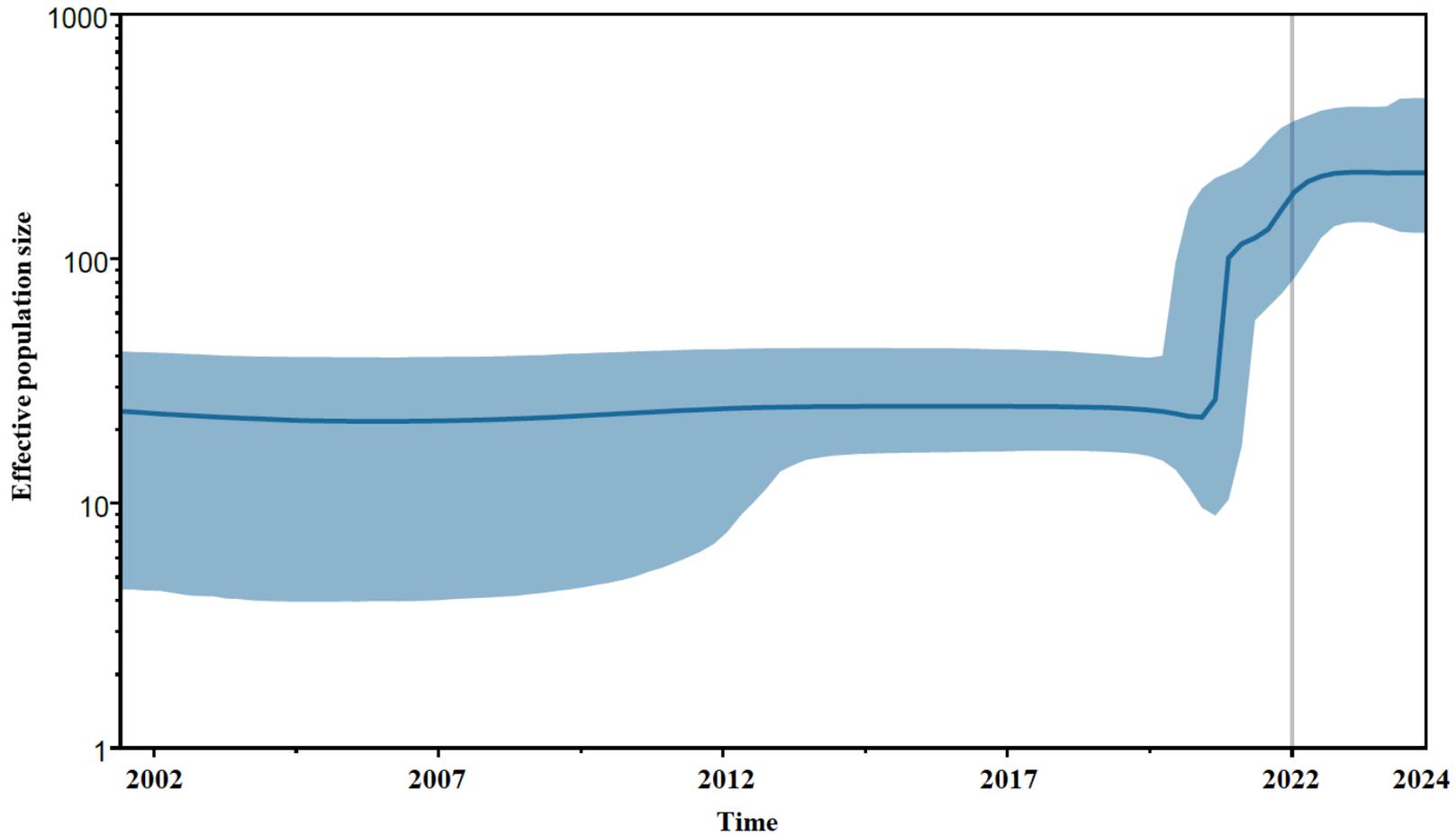


Figura 10. “Skyline plot” bayesiano. En la figura se muestra la variación del tamaño efectivo de la población viral a lo largo del tiempo. La línea azul sólida muestra la mediana y el área celeste muestra el 95 % de los valores de alta densidad de probabilidad (95 % high probability density, HPD).

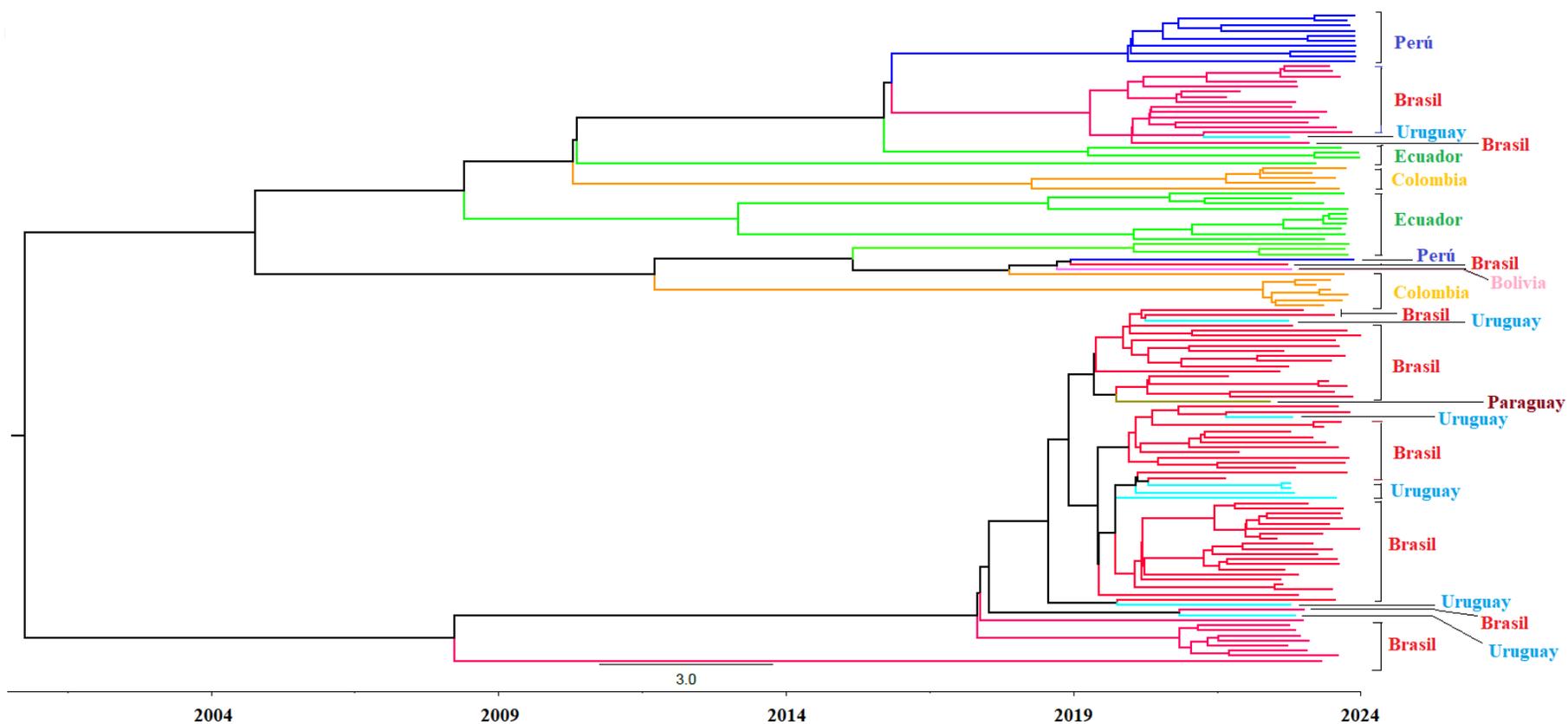


Figura 11. Árbol de máxima credibilidad de estirpes de VDEN-1 genotipo V aisladas en la región sudamericana. La raíz del árbol es el ancestro común mas reciente (tACMR). El tiempo al ACMR se muestra en años en la parte inferior de la figura. La barra muestra tiempo en años. Los nodos en el árbol están coloreados de acuerdo a la región geográfica de su aislamiento e indicada a la derecha de la figura.

Las estirpes de VDEN-1 genotipo V aisladas en la región sudamericana fueron asignadas a dos clados distintos (Fig. 11). Uno de estos clados está compuesto mayoritariamente por estirpes aisladas en la región norte de Sudamérica (Bolivia, Ecuador, Colombia, Perú y algunas estirpes aisladas en Brasil), mientras el otro clado está compuesto mayoritariamente por estirpes aisladas en la región sur de Sudamérica (Brasil, Paraguay y Uruguay). Ambos clados co-circulan en Brasil y Uruguay (ver Fig. 11). Por otra parte, existe un significativo grado de diversificación genética de las estirpes en distintas líneas aproximadamente a partir del año 2020.

En orden a profundizar en la reconstrucción filogenética de las estirpes de VDEN-1 genotipo V circulantes en la región sudamericana, se realizó una filogeografía de las estirpes incluidas en estos estudios mediante el uso del programa Spread (Beileject et al., 2011). Este abordaje permite mapear las filogenias encontradas con información espacial. El resultado de estos estudios se muestra en la figura 12. A partir de un ancestro común, probablemente originado en la región amazónica central, el genotipo V se divide en dos grandes líneas. Ya en 2017 es posible observar estos dos linajes migrando hacia la región norte y sur, respectivamente (ver Fig. 12). El linaje que migra hacia al norte va a dar lugar a la diversificación posterior en Ecuador, Perú y Colombia, mientras que el linaje que migra hacia el sur, hacia regiones de los estados de Paraná y Sao Paulo en Brasil, se dividirá a su vez en sub-linajes, uno migrando hacia los estados del norte de Brasil y otro hacia el sur hacia Paraguay y Uruguay (ver Fig. 12).

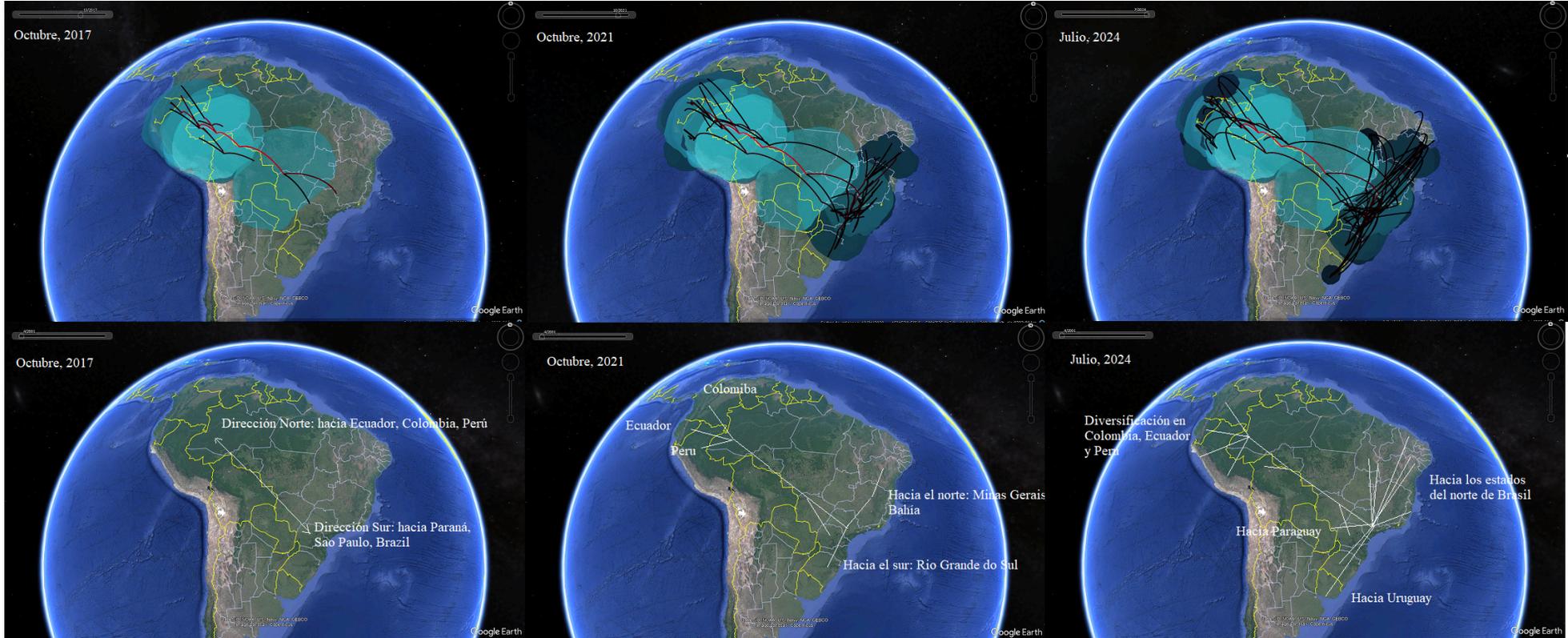


Figura 12. Filogeografía de VDEN-1 genotipo V de estirpes aisladas en la región sudamericana. En el panel superior se muestra todas las ramas del árbol filogenético en una difusión geográfica continua y los contornos sombreados representan el contorno del 95 % de mayor densidad probabilística (95% HPD) de cada localidad de los nodos en el árbol filogenético. En el panel inferior se indica esquemáticamente los resultados observados en el panel superior.

### 4.3 Sustituciones encontradas en la proteína E de VDEN-1 genotipo V en estirpes aisladas en Sudamérica.

La proteína E de VDEN, la cuál se une a los receptores celulares y desempeña un papel crucial en el proceso de la entrada del virus a la célula es el mayor blanco de la respuesta inmunitaria mediante anticuerpos neutralizantes (Roherig, 2003). Por consiguiente, una detallada caracterización de esta proteína es sumamente importante para desarrollar vacunas adecuadas y efectivas contra VDEN-1 genotipo V. En orden a comprender mejor el grado de variabilidad existente entre las proteínas E aisladas de estirpes circulantes en la región sudamericana y las correspondientes proteínas E de los componentes de VDEN-1 de las vacunas ensayadas hasta el momento, las secuencias de aminoácidos de las proteínas E de las cepas de VDEN-1 genotipo V incluidas en estos estudios fueron alineadas con las secuencias de las proteínas E de los componentes vacunales para VDEN-1. Una vez alineadas, las sustituciones entre ambas fueron observadas. Ejemplos de los resultados obtenidos de estos análisis se muestran en la Tabla 2.

Diversas sustituciones de aminoácidos fueron observadas entre las estirpes sudamericanas y los componentes vacunales para VDEN-1, en particular entre dichas estirpes y los componentes vacunales para VDEN-1 de las vacunas Denvaxia y TV-003 (ver Tabla 2). El componente de VDEN-1 de la vacuna QDENGGA (TAK-003) posee una mayor relación genética con las estirpes sudamericanas que con las dos vacunas mencionadas anteriormente (ver Tabla 2). Sin embargo, es posible observar sustituciones en la proteína E con respecto a las tres vacunas en distintas estirpes incluidas en estos estudios. En

particular, la sustitución V55I en estirpes aisladas en Colombia y Brasil; la sustitución S338L en estirpes aisladas en Ecuador; K394R en estirpes aisladas en Brasil y Uruguay;

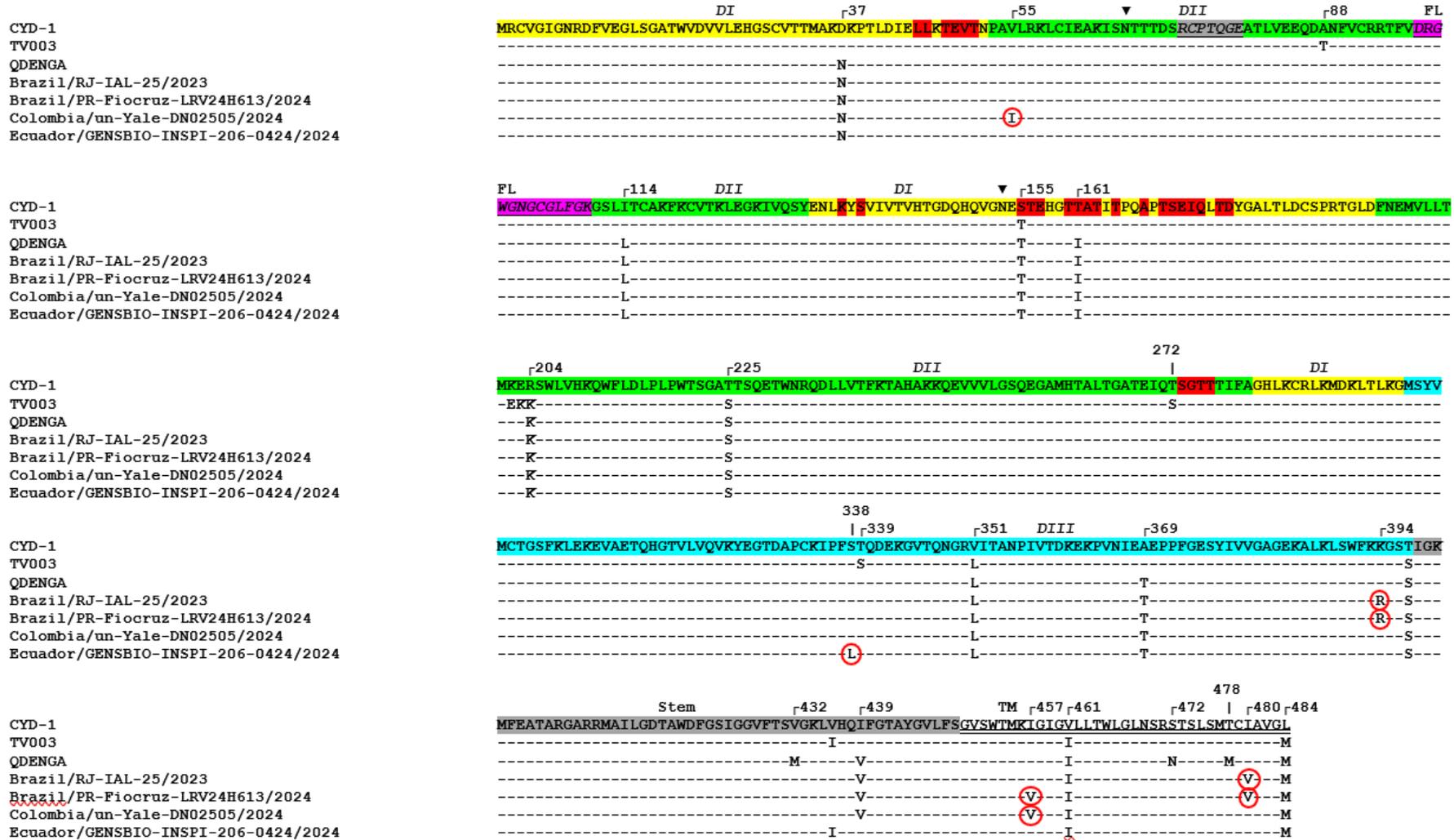
Tabla 2. Substituciones de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 genotipo V aislados en Sudamérica. <sup>a</sup>

| Estirpes                            | Proteína E |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |   |
|-------------------------------------|------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|
|                                     | Posiciones |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |   |
|                                     | 7          | 37 | 55 | 83 | 88 | 114 | 140 | 155 | 160 | 180 | 161 | 202 | 203 | 204 | 225 | 252 | 272 | 338 | 339 | 345 | 351 | 369 | 382 | 394 | 397 | 432 | 436 | 439 | 457 | 461 | 463 | 472 | 478 | 480 | 484 |   |   |
| Denvaxia -CYD-1                     | G          | D  | V  | V  | A  | I   | I   | S   | T   | A   | T   | K   | E   | R   | T   | V   | T   | S   | T   | V   | V   | A   | A   | K   | T   | V   | V   | I   | I   | V   | L   | S   | T   | I   | L   |   |   |
| TV-003                              | *          | *  | *  | *  | I  | *   | *   | T   | *   | *   | *   | E   | K   | K   | S   | *   | S   | *   | S   | *   | L   | *   | *   | *   | S   | *   | I   | *   | *   | I   | *   | *   | *   | *   | M   |   |   |
| QDENGGA                             | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | S   | M   | *   | V   | *   | I   | *   | N   | M   | *   | M   |   |   |
| Brazil/RJ-IAL-25/2023               | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | *   | I   | *   | *   | *   | V   | M |   |
| Brazil/SC-LACENSC-422079734/2024    | *          | N  | *  | *  | L  | M   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | *   | I   | *   | *   | *   | V   | M |   |
| Brazil/SC-LACENSC-421994988/2024    | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | V   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | *   | I   | *   | *   | *   | V   | M |   |
| Brazil/SC-LACENSC-421267343/2023    | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | I   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | *   | I   | *   | *   | *   | V   | M |   |
| Brazil/SE-IAL-280765849/2024        | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | I   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Brazil/MS-IAL-24010200397/2023      | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | I   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Brazil/MS-IAL-249926000003/2024     | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Brazil/SE-IAL-280736648/2024        | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Brazil/PR-Fiocruz-LRV24H613/2024    | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Brazil/PE-FIOCRUZ-IAM16618/2024     | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Brazil/TO-IAL-170586851/2024        | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Brazil/PR-Fiocruz-LRV24H634/2024    | *          | N  | I  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Colombia/un-Yale-DN02379/2023       | *          | N  | I  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Colombia/un-Yale-DN02505/2024       | *          | N  | I  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Ecuador/GENSBIO-INSPI-6636/2024     | S          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | L   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | F   | *   | *   | *   | M |   |
| Ecuador/GENSBIO-INSPI-206-0424/2024 | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | L   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | I   | I   | *   | I   | *   | *   | *   | M |   |
| Ecuador/GENSBIO-INSPI-58-0324/2024  | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | L   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | I   | I   | *   | I   | *   | *   | *   | M |   |
| Ecuador/GENSBIO-INSPI-130-0324/2024 | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | L   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Ecuador/GENSBIO-INSPI-51-0324/2024  | *          | N  | M  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Ecuador/GENSBIO-INSPI-GSB3211/2024  | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Peru/PIU-INS-0218/2024              | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Peru/PIU-INS-0220/2024              | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | I   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Peru/ANC-INS-0214/2024              | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | M |   |
| Paraguay/un-NB6/2022                | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V | M |
| Uruguay/UN-257/2023                 | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | *   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | V   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V   | M |   |
| Uruguay/UN-130/2023                 | *          | N  | *  | *  | L  | *   | T   | *   | *   | I   | R   | *   | K   | S   | *   | *   | *   | *   | *   | L   | T   | *   | *   | R   | S   | *   | *   | V   | V   | I   | *   | *   | *   | *   | V   | M |   |

<sup>a</sup> Substituciones de aminoácidos en relación con el componente vacunal de DENV-1 Denvaxia-CYD-1 (hDEN1/Thailand/PU0359/1980, GeneBank:KX239894) (Juranska et al., 2018); TV-003 (TV-003-rDEN1delta30, GeneBank:AY145123) (Whitehead et al., 2003); QDENGGA-TAK-003 (hDEN1/Thailand/16007/1964; GISAID:EPI\_ILS\_17575059) (Velasco et al., 2024). Identidad con Denvaxia-CYD-1 se muestra mediante un asterisco. Las substituciones de aminoácidos se muestran resaltadas en amarillo. Los círculos rojos muestran substituciones no encontradas en ninguna de los tres componentes vacunales de DENV-1.

I457V en estirpes aisladas en Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay e I480V en estirpes de Brasil, Paraguay y Uruguay (ver Tabla 2).

A fin de observar los dominios de la proteína E donde se encontraron sustituciones en las secuencias de las proteínas E de estirpes sudamericanas que no estaban presentes en los componentes vacunales, las secuencias de las mismas y los componentes vacunales fueron alineadas y las posiciones de las sustituciones en los diferentes dominios fueron establecidas. Ejemplos de estos estudios se muestran en la Figura 13. Una de las sustituciones (V55I) mapea en el dominio *DII*, mientras que dos sustituciones (S338L y K394R) mapean en el dominio *DIII* y otras dos en el dominio transmembrana de la proteína (I457V e I480V) (ver Fig. 13). No se observaron sustituciones en el péptido de fusión al receptor celular, ni en el epítipo altamente conservado entre estirpes de VDEN en el dominio *DII* (ver Fig. 13). Es de resaltar que se observaron dos sustituciones en sitios de unión del anticuerpo 1F4, altamente neutralizante contra VDEN. Sin embargo, dichas sustituciones también se encuentran en el componente vacunal para VDEN-1 de la vacuna QDENGGA (sustituciones S155T y T161I) (ver Fig. 13). A efectos de tener una mejor comprensión de estos resultados se estableció las posiciones de las distintas sustituciones encontradas en las estirpes de VDEN-1 genotipo V en la única estructura 3D de VDEN-1 determinada hasta el momento (PDB:7a3r, genotipo II) (Sharma et al., 2021). Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 14. Tanto el dominio de fusión al receptor celular, así como el epítipo altamente conservado se muestran cercanos a la sustitución en la posición 394, a una distancia aproximada de 20,12 y 14.84 Å aproximadamente (ver Fig. 14).



**Figura 13. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína E de virus Dengue tipo 1 genotipo V y estirpes vacunales.** Identidad con respecto al componente DENV1 en CYD-1 es indicada con un guion. Las estirpes aisladas en Sudamérica están indicadas por su nombre. Los dominios I a III de la proteína están indicados en la parte superior del alineamiento (*DI a DIII*) en amarillo, verde y cian, respectivamente. El dominio *stem* está indicado en gris y el dominio transmembrana (TM) está subrayado. El dominio de fusión (FD) está indicado subrayado en fucsia. Las posiciones donde se encuentran sustituciones de aminoácidos están indicadas sobre el alineamiento. Los sitios de *N*-glicosilación están indicados por un triángulo. El epítipo altamente conservado entre cepas de virus Dengue en DII está indicado en gris y subrayado (Verma et al., 2019; Yen et al., 2023). Los sitios de unión del anticuerpo 1F4, altamente neutralizante contra virus DENV-1 se muestran resaltadas en rojo (Andrade et al., 2019).

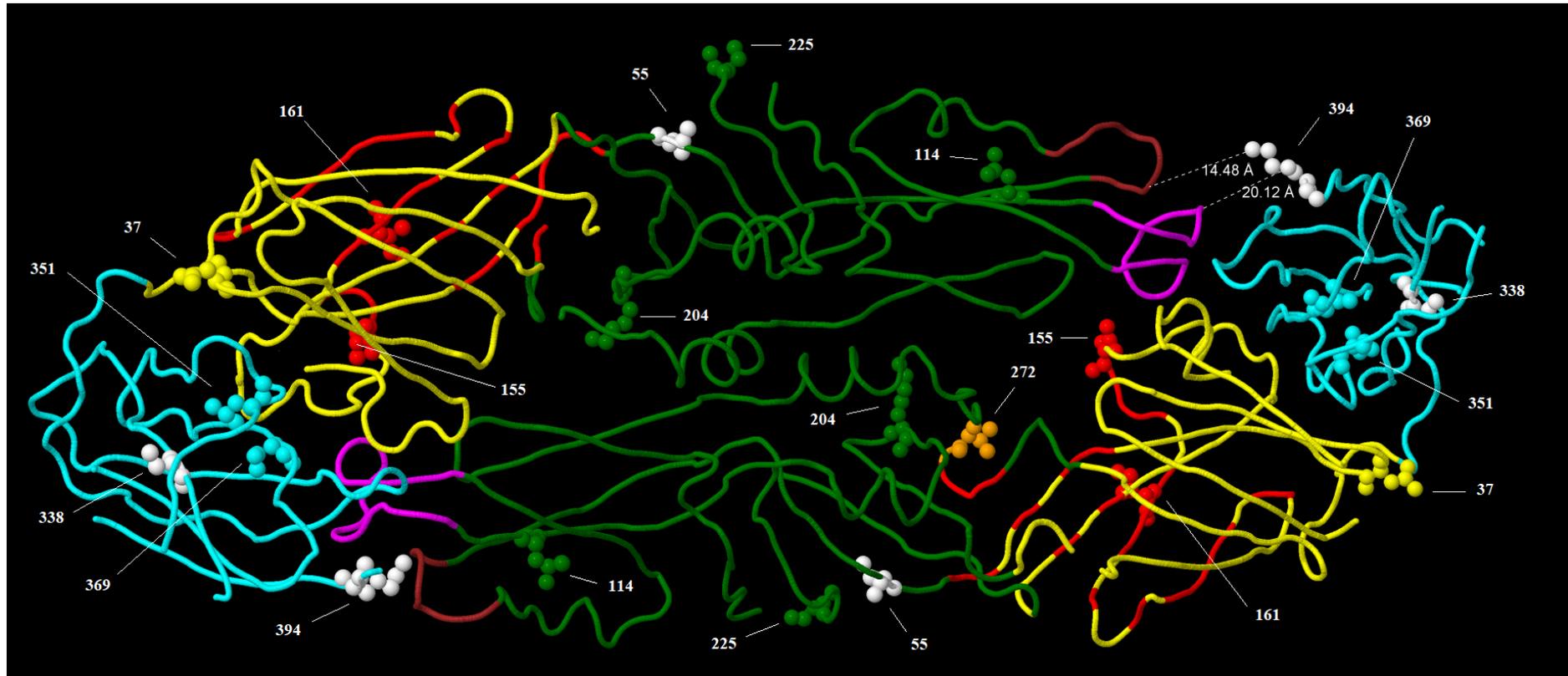


Figura 14. Sustituciones de aminoácidos en la estructura 3D de la proteína E de VDEN-1. En la figura se muestra la estructura 3D del dímero de la proteína E de VDEN-1 (PDB:7a3r). Los dominios DI a DIII se indican en amarillo, verde y cian, respectivamente. El dominio de fusión se indica en fucsia y el epítipo altamente conservado en marrón (Verma et al., 2019; Yen et al., 2023). Los sitios de unión del anticuerpo 1F4, altamente neutralizante contra virus VDEN-1 se muestran en rojo (Andrade et al., 2019). Las sustituciones encontradas solamente en las estirpes sudamericanas se muestran en blanco, las sustituciones encontradas en las estirpes sudamericanas y en el componente vacunal para VDEN-1 de QDENG A se muestran en colores de acuerdo al dominio de la proteína. La sustitución T272S, solo observada en TV-003 se muestra en naranja.

## 5. Discusión

Las infecciones por VDEN constituyen hoy un grave problema de salud pública en todo el mundo. La OMS estima que cerca de la mitad de la población mundial está ahora en riesgo de dengue, con aproximadamente entre 100 y 400 millones de infecciones por año (WHO, 2024c). En la región sudamericana, Brasil es en este momento el país con más notificaciones de casos de VDEN en toda la región sudamericana (Allicock et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que el genotipo V de VDEN-1 es el más prevalente en la región sudamericana (Ribeiro et al., 2021). Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados en este trabajo, dado que todas las estirpes sudamericanas incluidas en los mismos fueron clasificadas en el genotipo V de VDEN-1 (ver Materiales y Métodos). Hasta mediados de 1980, la región del Caribe fue identificada como el mayor epicentro de la dispersión del genotipo V en la región de las Américas. En los años siguientes, hubo una continua dispersión del mismo en la región sudamericana, lo que resultó en la emergencia de diferentes líneas de variantes locales (De Bruycker-Nogueira et al., 2016).

Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que las estirpes sudamericanas de VDEN-1 genotipo V evolucionaron a partir de ancestros que circulaban alrededor de abril de 2001 (ver Tabla 1). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos indicando que los primeros casos de este genotipo en la región amazónica brasileña de Amapá fueron entre 1998 y 2001 (Salles et al., 2018) (previamente nombrados BR4 o Clade 1b (Ribeiro et al., 2021; De Bruycker-Nogueira et al., 2016). Es de destacar el marcado aumento del tamaño efectivo de la población viral a partir de principios de 2020 hasta la actualidad (ver Fig. 10). Estos resultados están de acuerdo con el aumento pronunciado de los casos de

Dengue en la región de las Américas y el Caribe, en la cual en 2024 se han reportaron 13.8 millones de casos, de los cuales 10 millones corresponden a Brasil (WHO, 2025).

Dentro del genotipo V de VDEN-1 por lo menos seis diferentes linajes han sido descritos, basados en el análisis del gen E (Goncalvez et al., 2001). Estudios previos han demostrado que los primeros aislados de Brasil y en la región de las Américas pertenecían al genotipo V, linaje 1 (Neto et al., 2005). Sin embargo, estudios recientes han reportado la circulación de otros linajes en Brasil (dos Santos et al., 2011), así como distintos linajes han circulado en distintas regiones de Brasil y en diferentes períodos de tiempo (Drumond et al., 2012).

En orden a comprender el grado de variabilidad genética de las estirpes recientemente aisladas en la región sudamericana con los linajes circulantes en la región previamente descritos, se realizó un análisis filogenético de las mismas incluyendo estirpes pertenecientes a los seis linajes previamente descritos (de acuerdo con Drummond et al., 2012) (ver Fig. 9). Las estirpes sudamericanas fueron asignadas a clados distintos de las estirpes de los linajes previamente descritos (Fig. 9). Estos resultados revelan que las estirpes recientemente aisladas en la región poseen una relación genética más estrecha entre sí y una relación genética más distante con respecto a los linajes previamente descritos (Fig. 9). Los resultados de estos estudios sugieren el reemplazo de nuevos linajes con respecto a linajes que han circulado previamente. El reemplazo de linajes ha sido observado previamente, siendo ésta una característica de la evolución de VDEN (Siqueira et al., 2005). Mas aún, estudios previos han demostrado que el reemplazamiento de linajes está generalmente correlacionado con un aumento en el número de casos y frecuentemente con brotes significativos (Lee et al., 2011; dos Santos et al., 2011), en acuerdo con la epidemiología observada en la región en los últimos años.

Cuando se analizó el grado de variabilidad de las cepas de VDEN genotipo V aisladas recientemente en la región sudamericana e incluidas en estos estudios se observó nuevamente que las mismas eran asignadas a dos linajes genéticos diferentes (Fig. 10). Uno de estos linajes contiene todas las estirpes aisladas en Ecuador, Colombia y Perú, así como estirpes aisladas en Bolivia y en Brasil en los estados de Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Sao Paulo y Paraná. El otro linaje está constituido por todas las estirpes aisladas en Uruguay y Paraguay, así como estirpes aisladas en los estados de Alagoas, Ceará, Tocantins, Sergipe, Pernambuco, Bahía, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina y Sao Paulo (Fig. 10). Estos resultados sugieren que las estirpes de VDEN-1 genotipo V recientemente aisladas en la región sudamericana se han diversificado en al menos dos linajes que circulan en distintas localidades geográficas de la región. A efectos de obtener una mejor comprensión de la circulación de estos linajes en la región se procedió a estudiar la filogeografía de las estirpes recientemente aisladas en la región sudamericana e incluidas en estos estudios (ver Fig. 11). Los resultados de estos estudios revelan que, a partir de un origen probablemente amazónico, dos líneas genéticas migran hacia el norte y el sur de Sudamérica. Uno de ellos dará origen a las cepas recientemente aisladas en el norte sudamericano (ejemplo, Ecuador, Colombia, Perú), mientras que el otro, a través de un importante papel que juegan regiones de Brasil como los estados de Paraná y Sao Paulo, migrará hacia los estados del norte de Brasil, así como hacia el sur a Paraguay y Uruguay (ver Fig. 11). Estos resultados demuestran que diferentes regiones geográficas pueden jugar un rol importante en el mantenimiento y diversificación de VDEN-1 genotipo V en Sudamérica, en acuerdo con estudios previos llevados a cabo en la región sudamericana (Bruycker-Nogueira et al., 2016). Es de destacar el papel de los estados brasileños de Paraná y Sao Paulo en la generación de dos rutas migratorias hacia el

norte y sur de Brasil (Fig. 11). En este sentido, estos resultados sugieren la importancia del control de VDEN en esta región de Brasil, siendo un importante nodo de comunicación intrarregional (ver Fig. 11).

La respuesta inmunitaria de VDEN es compleja debido a la presencia de cuatro serotipos. Esto genera problemas importantes dado que tanto la respuesta celular como humoral luego de una primoinfección por VDEN pueden ser protectoras contra el mismo, pero también puede causar ADE en una infección secundaria con un serotipo diferente. De esta forma se han generado desafíos en el desarrollo de vacunas adecuadas y efectivas contra VDEN (Coloma y Harris, 2015). La proteína E de VDEN es el mayor blanco de la respuesta inmunitaria contra VDEN (Lay et al., 2025). Los anticuerpos contra esta proteína están dirigidos contra los tres dominios (*DI* a *DIII*) en el ecto-dominio de la misma (VanBlargan et al., 2021) (ver Figura 7). Estudios recientes sugieren que sustituciones de aminoácidos en la proteína E de VDEN-1, que el virus ha adquirido a través de su evolución, podrían permitir al mismo una mejor adaptación y una mayor virulencia (Jiang et al., 2024). A modo de ejemplo, sustituciones observadas en el dominio *DIII* de la proteína E de VDEN-1 genotipo I (V324I, V351L y V380I), las cuales emergieron en la década del '70 al '90 del siglo pasado fueron conservadas y expandidas en estirpes aisladas después del año 2000. Estos trabajos sugieren que estas sustituciones han promovido la infectividad y la evasión de la respuesta inmunitaria, lo que facilita su transmisión (Jiang et al., 2024). Por consiguiente, es sumamente importante conocer los cambios en la proteína E de las estirpes de VDEN-1 genotipo V recientemente aisladas en la región sudamericana, en orden a contribuir a desarrollar vacunas apropiadas y eficaces para la región sudamericana.

A efectos de una mejor comprensión de las relaciones genéticas entre las estirpes de VDEN-1 genotipo V recientemente aisladas en la región y los componentes vacunales para VDEN-1 de las tres principales vacunas desarrolladas hasta el momento, las secuencias de la proteína E de las mismas fueron alineadas con todas las estirpes sudamericanas incluidas en estos estudios. Los resultados de estos estudios muestran que diversas sustituciones fueron encontradas a lo largo de los tres dominios de la proteína E (Tabla 2). Las estirpes sudamericanas incluidas en estos estudios comparten un porcentaje significativo de sustituciones con el componente vacunal QDENGGA para VDEN-1, revelando una relación genética más estrecha entre este componente vacunal en relación con los componentes de las vacunas Denvaxia y TV-003 (ver Tabla 2). Sin embargo, varias sustituciones observadas en las estirpes sudamericanas no se encuentran en ninguno de los tres componentes vacunales (V55I en *DII*, S338L, K394R en *DIII* y I457V y I480V en TM) (Tabla 2 y Fig. 13). No se encontraron sustituciones en el dominio de fusión (FL) ni en el epítopo altamente conservado entre estirpes de VDEN en *DII* (Verma et al., 2019). Asimismo, no se detectaron sustituciones en los sitios de glicosilación previamente descritos en VDEN (Modis et al., 2003). De las sustituciones previamente descritas por Jiang et al. (2024) solo la sustitución V351L fue observada, tanto en las estirpes sudamericanas como en los componentes vacunales QDENGGA y TV-003 (ver Fig. 13). La sustitución S338L o la sustitución K394R han sido descritas independientemente en distintas estirpes circulantes en Brasil entre 2009 y 2011 (Bruycker-Nogueira et al., 2015). Debido a que determinadas regiones de *DIII* son blanco de anticuerpos neutralizantes humanos, sustituciones en esta región pueden tener importantes consecuencias (Thai et al., 2012). Más estudios serán necesarios para observar el fenotipo de estas estirpes con respecto a las manifestaciones de la enfermedad causada por VDEN. Aunque la

substitución K394R fue observada en distintos linajes circulantes en la región sudamericana, la distancia observada entre esta posición y el epítopo altamente conservado entre estirpes de VDEN fue superior a 14 Å, lo cual indicaría una baja probabilidad que esta sustitución interaccionara con dicho epítopo (Fig. 14).

El aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos (hmABs), derivados de pacientes con historia de infección por VDEN, ha resultado fundamental para elucidar la especificidad de los mecanismos de neutralización en respuesta a la infección por VDEN. Un hallazgo importante ha sido que potentes hmABs se unen a epítopos conformacionales que requieren la proteína E intacta (de Alwis et al., 2012). Uno de estos potentes anticuerpos neutralizantes, específico para VDEN-1, es 1F4 (Fibriansah et al., 2014; Andrade et al., 2019). Sustituciones en el epítopo conformacional de 1F4 fueron observadas en la proteína E de estirpes recientemente aisladas en la región sudamericana (S155T y T161I) (ver Fig. 13 y 14). La sustitución T161I ha sido observada previamente en estirpes de VDEN-1 genotipo V aislados en Nicaragua (Andrade et al., 2019). Estos resultados sugieren que estas sustituciones en el epítopo 1F4 pueden eventualmente tener un efecto en la neutralización de VDEN-1 y epítopos adicionales podrían ser necesarios para contribuir a la neutralización del virus, en acuerdo con hallazgos anteriores (Andrade et al., 2019). Mas estudios serán necesarios para profundizar en este importante tema.

## 6. Conclusiones

El análisis de las 128 cepas del genotipo V de VDEN-1, la mayoría aisladas en Sudamérica entre 2022 y 2024, muestra una dinámica evolutiva compleja. Los resultados de estos estudios indican la presencia de dos clados filogenéticos principales claramente diferenciados y contemporáneos que se muestran distantes de los seis linajes (L1 a L6) que caracterizaron la circulación del genotipo V en décadas anteriores en el continente. Este patrón es un indicativo fuerte de un fenómeno de reemplazo de linajes, un proceso evolutivo que ya se evidenció antes para VDEN en distintas regiones donde variantes virales posiblemente mejor adaptadas desplazan a las preexistentes. Este reemplazo en el contexto sudamericano podría estar impulsado por múltiples factores, incluyendo la presión selectiva ejercida por la inmunidad poblacional, la competencia entre variantes virales con diferentes capacidades de transmisión, ventajas selectivas conferidas por mutaciones específicas que afecten la eficiencia de replicación o la transmisión por el vector *Aedes aegypti*, y las condiciones ecológicas que favorecen su proliferación.

El análisis estadístico bayesiano MCMC proporcionó estimaciones de la tasa evolutiva ( $7.50 \times 10^{-4}$  s/s/a; 95% HPD:  $5.92-9.07 \times 10^{-4}$ ), un valor que se encuentra dentro del rango típico reportado para flavivirus, reflejando la notable plasticidad evolutiva del virus. La datación del ancestro común más reciente (tMRCA) para las cepas analizadas se situó alrededor del 23 de abril de 2001 (95% HPD: abril de 1996 - octubre de 2006). Estos datos, cuya fiabilidad se ve respaldada por adecuados valores de ESS (>200), indican que las cepas actuales derivan de un ancestro común que circulaba en la región hace más de dos

décadas, consolidando patrones de introducción temprana y posterior diversificación y dispersión sostenida dentro del continente.

De forma complementaria, el análisis de la historia demográfica mediante Bayesian Skyline Plot detectó un incremento pronunciado y sostenido del tamaño efectivo de la población viral ( $N_e$ ) a partir de finales de 2021, alcanzando su punto máximo a principios de 2022 y continuando elevado hasta mediados de 2024 (dato de última secuencia analizada). Este período de rápida expansión viral precede directamente al aumento masivo de casos de dengue reportados en Sudamérica durante 2023 y 2024.

Esta correlación temporal sugiere fuertemente que el crecimiento poblacional del virus y la expansión de diversidad a nivel genómico fue un precursor y probablemente un factor clave del subsiguiente incremento epidémico, al aumentar la prevalencia viral y las cadenas de transmisión. Una mayor población viral, en línea con la teoría de cuasiespecies (Sardanyés et al., 2024; Bifani et al. 2022), amplía la base genética para la selección de variantes potencialmente más transmisibles o patogénicas. También el vector se vio favorecido por factores ecológicos (urbanización, condiciones climáticas) y demográficos (movilidad humana).

La aparente rapidez con la que ocurrió este reemplazo sugiere que las nuevas variantes podrían poseer ventajas adaptativas significativas, lo que podría traducirse en un aumento de la incidencia y severidad de los brotes.

Finalmente, la detección de sustituciones en aminoácidos de la proteína E, ausentes en los componentes de las vacunas más utilizadas, subraya una divergencia antigénica que podría comprometer la eficacia vacunal y aumentar el riesgo de fenómenos como ADE. Más

estudios serán necesarios para establecer este importante tema. Las estirpes de genotipo V recientemente aisladas e incluidas en estos estudios poseen una relación genética más cercana con el componente vacunal para VDEN-1 de la vacuna QDENGGA. Sin embargo, se encontraron sustituciones en las estirpes sudamericanas que no se encuentran en los componentes vacunales de VDEN-1 de ninguna de las tres vacunas.

Algunas de las mutaciones encontradas en la proteína E se encuentran en epítomos de anticuerpos humanos altamente neutralizantes contra VDEN-1. Más estudios serán necesarios para observar el posible efecto de estas sustituciones en la neutralización del virus por parte de estos anticuerpos.

En conclusión, el genotipo V de VDEN-1 continúa siendo el genotipo más prevalente en la región sudamericana. La integración de los hallazgos de este estudio revela una evolución viral activa y compleja del VDEN-1 genotipo V en Sudamérica, caracterizada por reemplazo de linajes, expansión demográfica correlacionada con epidemias, dispersión geográfica estructurada y divergencia genética respecto a las cepas vacunales. Esto refuerza la importancia de integrar la vigilancia genómica en tiempo real con la evaluación continua de la cobertura inmunológica de las vacunas, así como de considerar la heterogeneidad genética regional al diseñar nuevas estrategias de control, definición de tratamientos antivirales y formulaciones vacunales de las siguientes generaciones.

## 7. Limitaciones y perspectivas

Este estudio se enfocó en estudiar las estirpes de VDEN-1 recientemente aisladas en la región sudamericana. Existen otros serotipos y genotipos circulando en esta región, por lo cual sería necesario estudiar el grado de variabilidad genética de los mismos y su evolución a efectos de obtener un panorama global de la situación de VDEN en la región sudamericana.

Asimismo en este trabajo nos concentramos específicamente en la región de la proteína E para las cepas estudiadas por su relevancia inmunológica. Expandir estos estudios al genoma completo permitiría ampliar la comprensión del virus y su estado actual, así como evaluar mutaciones en otras proteínas (estructurales y no estructurales) que podrían influir en la aptitud viral, patogénesis o respuesta inmune.

Asimismo, si bien los estudios realizados sobre la proteína E de VDEN-1 genotipo V contribuyen a la comprensión de la respuesta inmunitaria de VDEN, la variabilidad genética de VDEN sigue constituyendo una gran dificultad para el desarrollo de vacunas efectivas contra las variantes circulantes actuales y sobre todo mantener esta efectividad frente a los cambios que puedan surgir en futuras cepas circulantes. Las tres vacunas licenciadas hasta el momento poseen sus limitaciones y más estudios serían necesarios para conocer su desempeño contra los cuatro serotipos presentes en la región sudamericana.

De cara al futuro, resulta imprescindible profundizar en estudios funcionales que evalúen el impacto de las mutaciones de la proteína E sobre la infectividad, la capacidad de fusión y la neutralización por anticuerpos, tanto en modelos celulares como en animales. La implementación de redes de secuenciación en tiempo real en países como Brasil, Colombia,

Perú, Paraguay y Uruguay facilitará la detección temprana de variantes emergentes.

Paralelamente, la integración de datos de movilidad humana, clima y densidad vectorial con análisis filogeográficos podría generar modelos predictivos de brotes, optimizando la asignación de recursos y las intervenciones de control vectorial. Dado el potencial rol de la mejora dependiente de anticuerpos (ADE), es también necesario investigar si las mutaciones identificadas modulan este fenómeno.

## 8. Agradecimientos

Al Dr. Juan Cristina, quien aceptó la orientación de este proyecto de fin de grado, por su dedicación, guía académica y sus consejos sobre como encarar el estudio científico en esta etapa de mi carrera. Asimismo destaco su interés por acompañar mis primeros pasos en el mundo académico, guiandome en la formación continua, impulsando con gran generosidad desde el inicio mi carrera como científico e investigador, abriendo puertas para integrarme en cursos y futuros proyectos con otros científicos.

Por todo el tiempo dedicado más allá de la Tesis, muchas gracias.

A la Dra. Gabriel Bedó como orientadora durante toda la carrera, guiándome y buscando soluciones en cada etapa, estando presente desde el inicio.

Al Laboratorio de Virología Molecular de Facultad de Ciencias, Universidad de la República por aceptarme y sumarme en sus actividades durante este trabajo.

A funcionarios, estudiantes y docentes de la Facultad de Ciencias y el Instituto Pasteur Uruguay por su esfuerzo y permanente ayuda para habilitar mi participación en igualdad de condiciones a pesar de mis requerimientos de accesibilidad, buscando siempre una solución en cada materia y actividad en la que elegí participar.

A la organización GISAID y el acceso que nos provee a su base de datos, junto con laboratorios y autores que generaron y publicaron las secuencias de VDEN en dicha base permitiendo realizar estos estudios con datos abiertos y de buena calidad, destacando el esfuerzo y trabajo en la curaduría de la información.

A Rocio Barrios quien me asistió en el inicio de la Carrera acompañándome en cada momento, formándonos juntos en el mundo de la Biología y compartiendo tiempo y esfuerzo durante los primeros años.

A Daniela Sosa por su apoyo en estos últimos años de carrera participando en el día a día, por el recorrido que hicimos juntos en nuestras carreras y por su acompañamiento en cada actividad académica con dedicación y esfuerzo.

Agradezco a mi Familia por acompañarme durante todos estos años integrándose día a día en mis actividades académicas y trabajando para lograr avanzar y superar los desafíos que enfrentamos juntos.

Finalmente a mis amigos, compañeros, comunidad del Colegio Seminario y todos los participantes en el movimiento Arriba Ro que se involucraron dedicando esfuerzo y cariño para ayudarme a superar cada nuevo desafío, permitiendo llegar hasta aquí.

## 9. Bibliografía

<https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>

Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8), 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>

García, G., González, N., Pérez, A. B., Sierra, B., Aguirre, E., Rizo, D., Izquierdo, A., Sánchez, L., Díaz, D., Lezcay, M., Pacheco, B., Hirayama, K., & Guzmán, M. G. (2011). Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 15(1), e38–e43. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.09.008>

QDENGGA® | WHO - Prequalification of medical products (IVDs, medicines, vaccines and immunization devices, Vector Control). (2024, September 5).

<https://extranet.who.int/prequal/vaccines/p/qdengar>

Dengue vaccine (TAK-003) GRADE tables for consideration by SAGE. (2025, June 18).

<https://www.who.int/publications/m/item/dengue-vaccine-tak-003-grade-tables-for-consideration-by-the-strategic-advisory-group-of-experts-sage-on-immunization>

World Health Organization. (2025, January 02). Global dengue surveillance. Retrieved from: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/dengue\\_global/](https://worldhealthorg.shinyapps.io/dengue_global/)

World Health Organization. (2024, April 23). Dengue and severe dengue. Retrieved from:  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Martina, B. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 564–581.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>

Formato Documento Electrónico(APA)

Martínez, Jahnyer, Hernández, Juan C, & Urcuqui-Inchima, Silvio. (2017). Papel de las células dendríticas en la infección por el virus dengue: blancos de replicación y respuesta inmune. *Revista chilena de infectología*, 34(3), 249-256.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000300007>

Castro-Mussot, M. E., Machain-Williams, C., Loroño-Pino, M. A., & Salazar, M. I. (2013). Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue [Immune responses and immunopathogenesis in infections with dengue virus]. *Gaceta medica de Mexico*, 149(5), 531–540.

Corrales-Aguilar, Eugenia, & Hun-Opfer, Laya. (2012). Nuevas perspectivas sobre la patogénesis del dengue. *Acta Médica Costarricense*, 54(2), 75-85. Retrieved February 20, 2025, from

[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022012000200003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022012000200003&lng=en&tlng=es).

Rice CM (1996) Flaviviridae: the viruses and their replication. En: Virology. Edited by: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP. Lippincott-Raven, Philadelphia; pp. 931-1034.

Murugesan, A., & Manoharan, M. (2020). Dengue Virus. Emerging and Reemerging Viral Pathogens, 281–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00016-8>

Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. Current opinion in microbiology, 11(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H et al. (2010) Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol. 8:S7-16. doi: 10.1038/nrmicro2460.

Norazharuddin, H., & Lai, N. S. (2018). Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest. The Malaysian journal of medical sciences : MJMS, 25(5), 6–15. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.5.2>

Sampath, A., & Padmanabhan, R. (2009). Molecular targets for flavivirus drug discovery. Antiviral research, 81(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.08.004>

Alcalá, A. C., & Ludert, J. E. (2023). The dengue virus NS1 protein; new roles in pathogenesis due to similarities with and affinity for the high-density lipoprotein (HDL)?. PLoS pathogens, 19(8), e1011587. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011587>

Tan, B. E. K., Beard, M. R., & Eyre, N. S. (2023). Identification of Key Residues in Dengue Virus NS1 Protein That Are Essential for Its Secretion. *Viruses*, 15(5), 1102. <https://doi.org/10.3390/v15051102>

Perera, D. R., Ranadeva, N. D., Sirisena, K., & Wijesinghe, K. J. (2024). Roles of NS1 Protein in Flavivirus Pathogenesis. *ACS infectious diseases*, 10(1), 20–56. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00566>

Shu, B., Ooi, J.S.G., Tan, A.W.K. et al. CryoEM structures of the multimeric secreted NS1, a major factor for dengue hemorrhagic fever. *Nat Commun* 13, 6756 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34415-1>

Gabriel, M., Navarro, G. S. C., De Borba, L., Rossi, A. H., Gamarnik, A. V., & Estrada, L. C. (2020). Dengue virus Capsid protein dynamics reveals spatially heterogeneous motion in Live-Infected-Cells. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65625-6>

Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., Popov, V. L., Chen, X., Wang, Q. Y., Dong, H., & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell host & microbe*, 26(5), 606–622.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.015>

Muñoz-Jordan, J. L., Sánchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., & García-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 100(24), 14333–14338.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>

Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P. Y. (2013). Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *Journal of virology*, 87(8), 4609-4622.

Kümmerer, B. M., & Rice, C. M. (2002). Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *Journal of virology*, 76(10), 4773-4784.

Liu, W. J., Chen, H. B., Wang, X. J., Huang, H., & Khromykh, A. A. (2004). Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *Journal of virology*, 78(22), 12225-12235.

Cardosa, M. J., Wang, S. M., Sum, M. S. H., & Tio, P. H. (2002). Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *BMC Microbiology*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-9>

Smith, S. A., Nivarthi, U. K., de Alwis, R., Kose, N., Sapparapu, G., Bombardi, R., Kahle, K. M., Pfaff, J. M., Lieberman, S., Doranz, B. J., de Silva, A. M., & Crowe, J. E., Jr (2015). Dengue Virus prM-Specific Human Monoclonal Antibodies with Virus Replication-Enhancing Properties Recognize a Single Immunodominant Antigenic Site. *Journal of virology*, 90(2), 780–789. <https://doi.org/10.1128/JVI.01805-15>

Balinsky, C. A., Schmeisser, H., Ganesan, S., Singh, K., Pierson, T. C., & Zoon, K. C. (2013). Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles. *Journal of virology*, 87(24), 13094–13106. <https://doi.org/10.1128/JVI.00704-13>

Arias, C. F., Preugschat, F., & Strauss, J. H. (1993). Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*, 193(2), 888–899. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1198>

Faustino, A. F., Martins, A. S., Karguth, N., Artilheiro, V., Enguita, F. J., Ricardo, J. C., Santos, N. C., & Martins, I. C. (2019). Structural and Functional Properties of the Capsid Protein of Dengue and Related Flavivirus. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3870. <https://doi.org/10.3390/ijms20163870>

Faustino, A. F., Martins, I. C., Carvalho, F. A., Castanho, M. a. R. B., Maurer-Stroh, S., & Santos, N. C. (2015). Understanding Dengue Virus Capsid Protein Interaction with Key Biological Targets. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep10592>

Boon, P. L. S., Martins, A. S., Lim, X. N., Enguita, F. J., Santos, N. C., Bond, P. J., Wan, Y., Martins, I. C., & Huber, R. G. (2023). Dengue virus capsid protein facilitates genome compaction and packaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8158. <https://doi.org/10.3390/ijms24098158>

Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>

Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., ... & Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral research*, 87(2), 125-148.

Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2016). Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual review of virology*, 3(1), 263–281.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042334>

Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., Yin, Z., Keller, T. H., Vasudevan, S. G., & Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nature structural & molecular biology*, 13(4), 372–373. <https://doi.org/10.1038/nsmb1073>

Li, X. D., Deng, C. L., Ye, H. Q., Zhang, H. L., Zhang, Q. Y., Chen, D. D., Zhang, P. T., Shi, P. Y., Yuan, Z. M., & Zhang, B. (2016). Transmembrane Domains of NS2B Contribute to both Viral RNA Replication and Particle Formation in Japanese Encephalitis Virus. *Journal of virology*, 90(12), 5735–5749. <https://doi.org/10.1128/JVI.00340-16>

Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, S., & Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8873-8882.

Miller, S., Sparacio, S., & Bartenschlager, R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8854–8863. <https://doi.org/10.1074/jbc.m512697200>

McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *The Journal of biological chemistry*, 286(25), 22147–22159.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192500>

Lin, C. H. A. O., Amberg, S. M., Chambers, T. J., & Rice, C. M. (1993). Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *Journal of virology*, 67(4), 2327-2335.

Dalrymple, N. A., Cimica, V., & Mackow, E. R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio*, 6(3), e00553-15.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00553-15>

Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host & microbe*, 8(5), 422–432.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>

Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C. J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell host & microbe*, 20(3), 342–356.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.008>

Dalrymple, N. A., Cimica, V., & Mackow, E. R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio*, 6(3), e00553-15.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00553-15>

Muñoz-Jordán, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., & García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of virology*, 79(13), 8004–8013.

<https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005>

Davidson, A. D. (2009). New insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Advances in virus research*, 74, 41-101.

Lim, S. P., Noble, C. G., & Shi, P. Y. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral research*, 119, 57–67.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>

Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P. Y., & García-Sastre, A. (2009). NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *Journal of virology*, 83(11), 5408–5418.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>

Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3414–3419.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>

Podbilewicz, B. (2014). Virus and Cell Fusion Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 111–139.

<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122422>

Nayak, V., Dessau, M., Kucera, K., Anthony, K., Ledizet, M., & Modis, Y. (2009). Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *Journal of virology*, 83(9), 4338–4344.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02574-08>

Anasir, M. I., Ramanathan, B., & Poh, C. L. (2020). Structure-Based Design of Antivirals against Envelope Glycoprotein of Dengue Virus. *Viruses*, 12(4), 367.

<https://doi.org/10.3390/v12040367>

Christian, E. A., Kahle, K. M., Mattia, K., Puffer, B. A., Pfaff, J. M., Miller, A., Paes, C., Davidson, E., & Doranz, B. J. (2013b). Atomic-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18662–18667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310962110>

Toh, Y. X., Gan, V., Balakrishnan, T., Zuest, R., Poidinger, M., Wilson, S., Appanna, R., Thein, T. L., Ong, A. K., Ng, L. C., Leo, Y. S., & Fink, K. (2014). Dengue Serotype Cross-Reactive, Anti-E Protein Antibodies Confound Specific Immune Memory for 1 Year after Infection. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00388>

Keelapang, P., Sriburi, R., Supasa, S., Panyadee, N., Songjaeng, A., Jairungsri, A., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., & Sittisombut, N. (2004). Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *Journal of virology*, 78(5), 2367–2381. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2367-2381.2004>

Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T., Lim, X., Zhang, S., Lim, X., Wang, J., Shi, J., Morais, M. C., Corti, D., & Lok, S. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature Communications*, 11(1).

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>

Zhang, Q., Hunke, C., Yau, Y. H., Seow, V., Lee, S., Tanner, L. B., Guan, X. L., Wenk, M. R., Fibriansah, G., Chew, P. L., Kukkaro, P., Biukovic, G., Shi, P. Y., Shochat, S. G., Grüber, G., & Lok, S. M. (2012). The stem region of premembrane protein plays an important role in the virus surface protein rearrangement during dengue maturation. *The Journal of biological chemistry*, 287(48), 40525–40534.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384446>

Kurosu T. (2011). Quasispecies of dengue virus. *Tropical medicine and health*, 39(4 Suppl), 29–36. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S02>

Batschelet, E., Domingo, E., & Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene*, 1(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(76\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(76)90004-4)

Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 76(2), 159–216.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>

Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., & Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell*, 13(4), 735–744.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90223-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90223-4)

Kurosu T. (2011). Quasispecies of dengue virus. *Tropical medicine and health*, 39(4 Suppl), 29–36. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S02>

Guzman, M. G., & Vazquez, S. (2010). The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*, 2(12), 2649–2662.

<https://doi.org/10.3390/v2122649>

Kliks, S. C., Nisalak, A., Brandt, W. E., Wahl, L., & Burke, D. S. (1989).

Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 40(4), 444–451. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.444>

Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365), 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>

Shukla, R., Ramasamy, V., Shanmugam, R. K., Ahuja, R., & Khanna, N. (2020).

Antibody-Dependent enhancement: A challenge for developing a safe dengue vaccine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572681>

McSherry, J. A. (1982). Some Medical Aspects of the Darien Scheme: Was it Dengue?

*Scottish Medical Journal*, 27(2), 183–184. <https://doi.org/10.1177/003693308202700215>

Brathwaite Dick, O., San Martín, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American*

journal of tropical medicine and hygiene, 87(4), 584–593.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>

Espinosa, J. a. L. (2008). Memoria sobre la epidemia vulgarmente nombrada el dengue, que ha sufrido esta ciudad. *Acimed*, 18(6), 0.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-94352008001200017](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352008001200017)

Hotta, S. (1952). Experimental studies on dengue: i. Isolation, identification and modification of the virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 90(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1093/infdis/90.1.1>

Sabin, A. B., & Schlesinger, R. W. (1945). Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science*, 101(2634), 640–642.

<https://doi.org/10.1126/science.101.2634.640>

Halstead, S. B. (2006). Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Revista Panamericana De Salud Pública*, 20(6), 407–415.

<https://doi.org/10.1590/s1020-49892006001100007>

Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C.,  
Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Muhammad Ismail, H. I., Reynales, H., Limkittikul, K.,  
Rivera-Medina, D. M., Tran, H. N., Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M.,  
Bonaparte, M., Machabert, T., Savarino, S., Zambrano, B., Moureau, A., Khromava, A.,  
Moodie, Z., Westling, T., Mascareñas, C., Frago, C., Cortés, M., Chansinghakul, D.,

Noriega, F., Bouckennooghe, A., Chen, J., Ng, S. P., DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *The New England journal of medicine*, 379(4), 327–340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>

Bouckennooghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., CYD-TDV Dengue Vaccine Working Group (2015). Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *The New England journal of medicine*, 373(13), 1195–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>

Henein, S., Swanstrom, J., Byers, A. M., Moser, J. M., Shaik, S. F., Bonaparte, M., Jackson, N., Guy, B., Baric, R., & de Silva, A. M. (2017). Dissecting Antibodies Induced by a Chimeric Yellow Fever-Dengue, Live-Attenuated, Tetravalent Dengue Vaccine (CYD-TDV) in Naive and Dengue-Exposed Individuals. *The Journal of infectious diseases*, 215(3), 351–358. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw576>

Pinheiro, F. P., & Corber, S. J. (1997). Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*, 50(3-4), 161–169.

Torres-Flores, J. M., Reyes-Sandoval, A., & Salazar, M. I. (2022). Dengue Vaccines: An Update. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 36(3), 325–336. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00531-z>

Martinez, D. R., Yount, B., Nivarthi, U., Munt, J. E., Delacruz, M. J., Whitehead, S. S., Durbin, A. P., de Silva, A. M., & Baric, R. S. (2020). Antigenic Variation of the Dengue Virus 2 Genotypes Impacts the Neutralization Activity of Human Antibodies in Vaccinees. *Cell reports*, 33(1), 108226. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108226>

Rabaa, M. A., Girerd-Chambaz, Y., Hue, K. D. T., Tuan, T. V., Wills, B., Bonaparte, M., Van Der Vliet, D., Langevin, E., Cortes, M., Zambrano, B., Dunod, C., Wartel-Tram, A., Jackson, N., & Simmons, C. P. (2017). Genetic epidemiology of dengue viruses in phase III trials of the CYD tetravalent dengue vaccine and implications for efficacy. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/elife.24196>

Thomas, S. J. (2023). Is new dengue vaccine efficacy data a relief or cause for concern? *Npj Vaccines*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00658-2>

Mukherjee, S., Pierson, T. C., & Dowd, K. A. (2014). Pseudo-infectious reporter virus particles for measuring antibody-mediated neutralization and enhancement of dengue virus infection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1138, 75–97. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1_6)

Tsai, W. Y., Lai, C. Y., Wu, Y. C., Lin, H. E., Edwards, C., Jumnainsong, A., Kliks, S., Halstead, S., Mongkolsapaya, J., Screaton, G. R., & Wang, W. K. (2013). High-avidity and potently neutralizing cross-reactive human monoclonal antibodies derived from secondary dengue virus infection. *Journal of virology*, 87(23), 12562–12575. <https://doi.org/10.1128/JVI.00871-13>

Henein, S., Adams, C., Bonaparte, M., Moser, J. M., Munteanu, A., Baric, R., & de Silva, A. M. (2021). Dengue vaccine breakthrough infections reveal properties of neutralizing antibodies linked to protection. *The Journal of clinical investigation*, 131(13), e147066. <https://doi.org/10.1172/JCI147066>

Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (VDEN-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical journal, Armed Forces India*, 71(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>

Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses*, 9(11), 338. <https://doi.org/10.3390/v9110338>

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus Type 3 envelope glycoprotein. *Journal of Virology*, 79(2), 1223–1231. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.2.1223-1231.2005>

Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1690>

Zonetti, L. F. C., Coutinho, M. C., & de Araujo, A. S. (2018). Molecular Aspects of the Dengue Virus Infection Process: A Review. *Protein and peptide letters*, 25(8), 712–719. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180709115506>

Kok, B. H., Lim, H. T., Lim, C. P., Lai, N. S., Leow, C. Y., & Leow, C. H. (2023). Dengue virus infection - a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus research*, 324, 199018. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199018>

Hou, J., Ye, W., & Chen, J. (2022). Current Development and Challenges of Tetravalent Live-Attenuated Dengue Vaccines. *Frontiers in immunology*, 13, 840104. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840104>

Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717–725. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8)

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 6986–6991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>

Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>

Nayak, V., Dessau, M., Kucera, K., Anthony, K., Ledizet, M., & Modis, Y. (2009). Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *Journal of virology*, 83(9), 4338–4344.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02574-08>

Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*, 87(10), 2755–2766. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82210-0>

Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M. C., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design.

*EMBO reports*, 19(2), 206–224. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>

De Melo, F. L., Romano, C. M., & De Andrade Zanotto, P. M. (2009). Introduction of Dengue Virus 4 (VDEN-4) Genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(4), e390. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000390>

Gubler, D. J. (1997). Dengue and dengue hemorrhagic fever. In Elsevier eBooks (pp.

813–822). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06668-9.50077-6>

Drumond, B. P., Mondini, A., Schmidt, D. J., Bosch, I., & Nogueira, M. L. (2012).

Population dynamics of VDEN-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Archives of Virology*, 157(11), 2061–2073.

<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1393-9>

Pyke, A. T., Moore, P. R., Taylor, C. T., Hall-Mendelin, S., Cameron, J. N., Hewitson, G. R., Pukallus, D. S., Huang, B., Warrilow, D., & Van Den Hurk, A. F. (2016). Highly divergent dengue virus type 1 genotype sets a new distance record. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep22356>

De Oliveira Ribeiro, G., Gill, D. E., Ribeiro, E. S. D., Monteiro, F. J. C., Morais, V. S., Marcatti, R., Da S Rego, M. O., Araújo, E. L. L., Witkin, S. S., Villanova, F., Deng, X., Sabino, E. C., Delwart, E., Leal, É., & Da Costa, A. C. (2021). Adaptive evolution of new variants of dengue virus serotype 1 genotype V circulating in the Brazilian Amazon. *Viruses*, 13(4), 689. <https://doi.org/10.3390/v13040689>

De Bruycker-Nogueira, F., Mir, D., Santos, F. B. D., & Bello, G. (2016). Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of VDENV-1 genotype V in the Americas. *Infection Genetics and Evolution*, 45, 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.025>

Martinez, D. R., Yount, B., Nivarthi, U., Munt, J. E., Delacruz, M. J., Whitehead, S. S., Durbin, A. P., De Silva, A. M., & Baric, R. S. (2020). Antigenic variation of the Dengue virus 2 genotypes impacts the neutralization activity of human antibodies in vaccinees. *Cell Reports*, 33(1), 108226. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108226>

Pinheiro-Michelsen, J. R., Souza, R. D. S. O., Santana, I. V. R., da Silva, P. S., Mendez, E. C., Luiz, W. B., & Amorim, J. H. (2020). Anti-dengue Vaccines: From Development to Clinical Trials. *Frontiers in immunology*, 11, 1252. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01252>

Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., Savarino, S., Zambrano, B., Moureau, A., Khromava, A., Moodie, Z., Westling, T., Mascareñas, C., Frago, C., Cortés, M., Chansinghakul, D., Noriega, F., Bouckennooghe, A., Chen, J., Ng, S. P., ... DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *The New England journal of medicine*, 379(4), 327–340.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>

Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M., Cunha, R., Deseda, C., Reynales, H., Costa, M. S., Morales-Ramírez, J. O., Carrasquilla, G., Rey, L. C., Dietze, R., Luz, K., Rivas, E., Miranda Montoya, M. C., Cortés Supelano, M., Zambrano, B., Langevin, E., Boaz, M., Tornieporth, N., ... CYD15 Study Group (2015). Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *The New England journal of medicine*, 372(2), 113–123. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411037>

Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Muhammad Ismail, H. I., Reynales, H., Limkittikul, K., Rivera-Medina, D. M., Tran, H. N., Bouckennooghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., CYD-TDV Dengue Vaccine Working Group (2015). Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *The New England journal of medicine*, 373(13), 1195–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>

Biswal, S., Reynales, H., Saez-Llorens, X., Lopez, P., Borja-Tabora, C., Kosalaraksa, P., Sirivichayakul, C., Watanaveeradej, V., Rivera, L., Espinoza, F., Fernando, L., Dietze, R., Luz, K., Venâncio da Cunha, R., Jimeno, J., López-Medina, E., Borkowski, A., Brose, M., Rauscher, M., LeFevre, I., ... TIDES Study Group (2019). Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. *The New England journal of medicine*, 381(21), 2009–2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903869>

Biswal, S., Borja-Tabora, C., Martinez Vargas, L., Velásquez, H., Theresa Alera, M., Sierra, V., Johana Rodriguez-Arenales, E., Yu, D., Wickramasinghe, V. P., Duarte Moreira, E., Jr, Fernando, A. D., Gunasekera, D., Kosalaraksa, P., Espinoza, F., López-Medina, E., Bravo, L., Tuboi, S., Hutagalung, Y., Garbes, P., Escudero, I., ... TIDES study group (2020). Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4-16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 395(10234), 1423–1433. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30414-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30414-1)

Rivera, L., Biswal, S., Sáez-Llorens, X., Reynales, H., López-Medina, E., Borja-Tabora, C., Bravo, L., Sirivichayakul, C., Kosalaraksa, P., Martinez Vargas, L., Yu, D., Watanaveeradej, V., Espinoza, F., Dietze, R., Fernando, L., Wickramasinghe, P., Duarte Moreira Jr, E., Fernando, A. D., Gunasekera, D., Luz, K., ... Borkowski, A. (2022). Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine Candidate (TAK-003). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 75(1), 107–117. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab864>

Anderson, K. B., Gibbons, R. V., Cummings, D. A., Nisalak, A., Green, S., Libraty, D. H., Jarman, R. G., Srikiatkachorn, A., Mammen, M. P., Darunee, B., Yoon, I. K., & Endy, T. P. (2014). A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *The Journal of infectious diseases*, 209(3), 360–368. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit436>

Halstead S. B. (2014). Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiology spectrum*, 2(6), 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014>

Salmon, D. A., Lambert, P. H., Nohynek, H. M., Gee, J., Parashar, U. D., Tate, J. E., Wilder-Smith, A., Hartigan-Go, K. Y., Smith, P. G., & Zuber, P. L. F. (2021). Novel vaccine safety issues and areas that would benefit from further research. *BMJ global health*, 6(Suppl 2), e003814. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-003814>

Kinney, R. M., Butrapet, S., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Roehrig, J. T., Bhamarapavati, N., & Gubler, D. J. (1997). Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*, 230(2), 300–308. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8500>

Butrapet, S., Huang, C. Y., Pierro, D. J., Bhamarapavati, N., Gubler, D. J., & Kinney, R. M. (2000). Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1

and 3. *Journal of virology*, 74(7), 3011–3019.

<https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3011-3019.2000>

Men, R., Bray, M., Clark, D., Chanock, R. M., & Lai, C. J. (1996). Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *Journal of virology*, 70(6), 3930–3937.

<https://doi.org/10.1128/JVI.70.6.3930-3937.1996>

Whitehead, S. S., Falgout, B., Hanley, K. A., Blaney, J. E., Jr, Markoff, L., & Murphy, B. R. (2003). A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *Journal of virology*, 77(2), 1653–1657. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.1653-1657.2003>

Blaney, J. E., Jr, Sathe, N. S., Goddard, L., Hanson, C. T., Romero, T. A., Hanley, K. A., Murphy, B. R., & Whitehead, S. S. (2008). Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the VDEN-3 3'-UTR with that of VDEN-4. *Vaccine*, 26(6), 817–828.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.082>

Blaney, J. E., Jr, Hanson, C. T., Firestone, C. Y., Hanley, K. A., Murphy, B. R., & Whitehead, S. S. (2004). Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(6), 811–821.

Kirkpatrick, B. D., Durbin, A. P., Pierce, K. K., Carmolli, M. P., Tibery, C. M., Grier, P. L., Hynes, N., Diehl, S. A., Elwood, D., Jarvis, A. P., Sabundayo, B. P., Lyon, C. E., Larsson, C. J., Jo, M., Lovchik, J. M., Luke, C. J., Walsh, M. C., Fraser, E. A., Subbarao, K., & Whitehead, S. S. (2015). Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *The Journal of infectious diseases*, 212(5), 702–710. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv082>

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>

ClinicalTrials.gov. (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02406729?tab=table>

Brasil. Ministério da Saúde. Monitoramento dos Casos de Arboviroses Até a Semana Epidemiológica 52 de 2022. Available online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/> (accessed on 6 February 2023).

Reich, N. G., Shrestha, S., King, A. A., Rohani, P., Lessler, J., Kalayanarooj, S., Yoon, I., Gibbons, R. V., Burke, D. S., & Cummings, D. a. T. (2013). Interactions between serotypes

of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(86), 20130414. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0414>

Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1993). Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *PubMed*, 2(6), 383–393.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8012739>

Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005>

Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(4), 523–540.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>

de Bruycker-Nogueira, F., Souza, T. M. A., Chouin-Carneiro, T., da Costa Faria, N. R., Santos, J. B., Torres, M. C., Ramalho, I. L. C., de Aguiar, S. F., Nogueira, R. M. R., de Filippis, A. M. B., & Dos Santos, F. B. (2018). VDENV-1 Genotype V in Brazil:

Spatiotemporal dispersion pattern reveals continuous co-circulation of distinct lineages until 2016. *Scientific reports*, 8(1), 17160. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35622-x>

Gonçalves, C. M., Melo, F. F., Bezerra, J. M., Chaves, B. A., Silva, B. M., Silva, L. D., Pessanha, J. E., Arias, J. R., Secundino, N. F., Norris, D. E., & Pimenta, P. F. (2014).

Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti*

from a Brazilian dengue-endemic risk city. *Parasites & Vectors*, 7(1).

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-320>

Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 3(1), 19–28.

[https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00004-2)

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília—DF. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2005.

Available online: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia\\_Vig\\_Epid\\_novo2.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf)

(accessed on 6 February 2023).

Nogueira, R. M. R., De Araújo, J. M. G., & Schatzmayr, H. G. (2007). Dengue viruses in Brazil, 1986-2006 *Virus del dengue en Brasil, 1986-2006*. DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/0ad8f29d767743bbaf72f881b8d1765f>

Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue--quo tu et quo vadis?. *Viruses*, 3(9), 1562–1608.

<https://doi.org/10.3390/v3091562>

Añez, G., Heisey, D. A., Espina, L. M., Stramer, S. L., & Rios, M. (2012). Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 4 circulating in Puerto Rico and Key West, Florida, during 2010 epidemics. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(3),

548–553. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0091>

Carneiro, A. R., Cruz, A. C., Vallinoto, M., Melo, D.deV., Ramos, R. T., Medeiros, D. B., Silva, E. V., & Vasconcelos, P. F. (2012). Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6), 805–812. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000600016>

Drumond, B. P., Mondini, A., Schmidt, D. J., Bosch, I., & Nogueira, M. L. (2012). Population dynamics of VDEN-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Archives of virology*, 157(11), 2061–2073. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1393-9>

Carvalho, S. E. S., Martin, D. P., Oliveira, L. M., Ribeiro, B. M., & Nagata, T. (2009). Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. *Virus Genes*, 40(1), 60–66. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0428-0>

Fritsch, H., Moreno, K., Lima, I. A. B., Santos, C. S., Costa, B. G. G., de Almeida, B. L., Dos Santos, R. A., Francisco, M. V. L. O., Sampaio, M. P. S., de Lima, M. M., Pereira, F. M., Fonseca, V., Tosta, S., Xavier, J., de Oliveira, C., Adelino, T., de Mello, A. L. E. S., Gräf, T., Alcantara, L. C. J., Giovanetti, M., ... de Siqueira, I. C. (2023). Phylogenetic Reconstructions Reveal the Circulation of a Novel Dengue Virus-1V Clade and the Persistence of a Dengue Virus-2 III Genotype in Northeast Brazil. *Viruses*, 15(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/v15051073>

de Bruycker-Nogueira, F., Souza, T. M. A., Chouin-Carneiro, T., da Costa Faria, N. R., Santos, J. B., Torres, M. C., Ramalho, I. L. C., de Aguiar, S. F., Nogueira, R. M. R., de Filippis, A. M. B., & Dos Santos, F. B. (2018). VDENV-1 Genotype V in Brazil: Spatiotemporal dispersion pattern reveals continuous co-circulation of distinct lineages until 2016. *Scientific reports*, 8(1), 17160. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35622-x>

De Souza, U. J. B., Da Silva Miranda Macedo, Y., Santos, R. N. D., Cardoso, F. D. P., Galvão, J. D., Gabev, E. E., Franco, A. C., Roehe, P. M., Spilki, F. R., & Campos, F. S. (2023). Circulation of dengue virus serotype 1 genotype V and Dengue virus serotype 2 genotype III in Tocantins State, northern Brazil, 2021–2022. *Viruses*, 15(11), 2136. <https://doi.org/10.3390/v15112136>

Brasil. Ministério da Saúde. Monitoramento dos Casos de Arboviroses Até a Semana Epidemiológica 52 de 2022. Available online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/> (accessed on 6 February 2023).

Xie, X., Zou, J., Wang, Q. Y., & Shi, P. Y. (2015). Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral research*, 118, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.007>

Zhao, Y., Soh, T. S., Zheng, J., Chan, K. W., Phoo, W. W., Lee, C. C., Tay, M. Y., Swaminathan, K., Cornvik, T. C., Lim, S. P., Shi, P. Y., Lescar, J., Vasudevan, S. G., & Luo, D. (2015). A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain

interface essential for protein flexibility and virus replication. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004682. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004682>

Ferron, F., Decroly, E., Selisko, B., & Canard, B. (2012). The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs. *Antiviral research*, 96(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.07.007>

Yap, T. L., Xu, T., Chen, Y. L., Malet, H., Egloff, M. P., Canard, B., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *Journal of virology*, 81(9), 4753–4765. <https://doi.org/10.1128/JVI.02283-06>

Bartholomeusz, A. I., & Wright, P. J. (1993). Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Archives of virology*, 128(1-2), 111–121. <https://doi.org/10.1007/BF01309792>

Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L., & Canard, B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO journal*, 21(11), 2757–2768. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2757>

Bartholomeusz, A., & Thompson, P. (1999). Flaviviridae polymerase and RNA replication. *Journal of viral hepatitis*, 6(4), 261–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.1999.00173.x>

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. *Journal of virology*, 77(16), 8831–8842. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8831-8842.2003>

You, S., Falgout, B., Markoff, L., & Padmanabhan, R. (2001). In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), 15581–15591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010923200>

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2014). A STRUCTURAL PERSPECTIVE OF THE FLAVIVIRUS LIFE CYCLE. In *WORLD SCIENTIFIC eBooks* (pp. 374–383). [https://doi.org/10.1142/9789814513357\\_0044](https://doi.org/10.1142/9789814513357_0044)

Twiddy, S. S., Holmes, E. C., & Rambaut, A. (2003). Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Molecular biology and evolution*, 20(1), 122–129. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg010>

Nunes, M. R. T., Palacios, G., Faria, N. R., Sousa, E. C., Pantoja, J. A., Rodrigues, S. G., Carvalho, V. L., Medeiros, D. B. A., Savji, N., Baele, G., Suchard, M. A., Lemey, P., Vasconcelos, P. F. C., & Lipkin, W. I. (2014). Air Travel Is Associated with Intracontinental Spread of Dengue Virus Serotypes 1–3 in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), e2769. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002769>

Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(4), 523–540.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>

Twiddy, S. S., Holmes, E. C., & Rambaut, A. (2003). Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 20(1), 122–129.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msg010>

Pourzangiabadi, M., Najafi, H., Fallah, A., Goudarzi, A., & Pouladi, I. (2024). Dengue virus: Etiology, epidemiology, pathobiology, and developments in diagnosis and control – A comprehensive review. *Infection Genetics and Evolution*, 105710.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105710>

Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(4), 523–540.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>

Klein, D. E., Choi, J. L., & Harrison, S. C. (2013). Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *Journal of virology*, 87(4), 2287–2293.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02957-12>

Bailon H, Jimenez V, Galarza M, Medrano P, Mestanza O, Figueroa D, Lizarraga W, Silva I, Sevilla L, Hurtado V, Izarra V, Padilla C, Barcena L, Caceres O, Merino S, Marcelo A, Ruiz N, Hapuarachchii HC, Sánchez CC, García MP. Rapid spread of the emerging cosmopolitan genotype of dengue virus serotype 2, and expansion of dengue virus serotype 1 genotype V in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2025 Jan 31;41(4):375-384. doi: 10.17843/rpmesp.2024.414.13898.

Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res*. 2003;59:141-75. doi: 10.1016/s0065-3527(03)59005-4.

Thongsripong P, Edgerton SV, Bos S, Saborío S, Kuan G, Balmaseda A, Harris E, Bennett SN. Phylodynamics of dengue virus 2 in Nicaragua leading up to the 2019 epidemic reveals a role for lineage turnover. *BMC Ecol Evol*. 2023 Sep 28;23(1):58. doi: 10.1186/s12862-023-02156-4.

WHO (2024) Dengue and Severe Dengue.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (acceso 13/4/2025).

Allicock O.M., Lemey P., Tatem A.J., Pybus O.G., Bennett S.N., Mueller B.A., Suchard M.A., Foster J.E., Rambaut A., Carrington C.V.F. Phylogeography and Population Dynamics of Dengue Viruses in the Americas. *Mol. Biol. Evol*. 2012;29:1533–1543. doi: 10.1093/molbev/msr320.

Ribeiro GO, Gill DE, Ribeiro ESD, Monteiro FJC, Morais VS, Marcatti R, Rego MODS, Araújo ELL, Witkin SS, Villanova F, Deng X, Sabino EC, Delwart E, Leal É, da Costa AC. Adaptive Evolution of New Variants of Dengue Virus Serotype 1 Genotype V Circulating in the Brazilian Amazon. *Viruses*. 2021 Apr 16;13(4):689. doi: 10.3390/v13040689.

De Bruycker-Nogueira F., Mir D., Dos Santos F.B., Bello G. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of VDEN-1 genotype V in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* 2016;45:454–460. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.025.

Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH et al (2001) Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 303:110–119.

Neto RJP, Lima DM, de Paula SO et al (2005) Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res* 38:843–852.

dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG et al (2011) First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J.* doi:10.1186/1743-422X-8-387.

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML. Population dynamics of VDEN-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch Virol.* 2012 Nov;157(11):2061-73. doi: 10.1007/s00705-012-1393-9.

Siqueira JB Jr, Martelli CM, Coelho GE et al (2005) Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. *Emerg Infect Dis* 11:48–53.

Lee KS, Lo S, Tan SS et al (2011) Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infect Genet Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2011.10.012.

Coloma J, Harris, E. (2015) Broad and strong: the ultimate antibody to dengue virus. *Nature Immunol.* 16, 135-137.

Lay S, Bohaud C, Sorn S, Ken S, Rey FA, Ariën KK, Ly S, Duong V, Barba-Spaeth G, Auerswald H, Cantaert T. 0. Toward a deeper understanding of dengue: novel method for quantification and isolation of envelope protein epitope-specific antibodies. *mSphere* 0:e00961-24.

<https://doi.org/10.1128/msphere.00961-24>.

Jiang T, Huang C, Ruan Q, Huang X, Liang C, Chen Z, Yu X, Peng Y, Liu Z, Cheng G, Dai J, Sun J. Envelope domain III E324, E351, and E380 mutations lever adaptive evolution of VDEN-1 genotype I. *J Virol.* 2024 Oct 22;98(10):e0118324. doi: 10.1128/jvi.01183-24.

Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, & S.C. Harrison, A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (12) 6986-6991, <https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100> (2003).

de Bruycker-Nogueira F, Nogueira RM, Faria NR, Simões JB, Nunes PC, de Filippis AM, dos Santos FB. Insights of the genetic diversity of VDEN-1 detected in Brazil in 25 years:

Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect Genet Evol.* 2015 Aug;34:126-36. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.007.

Thai, K.T., Henn, M.R., Zody, M.C., Tricou, V., Nguyet, N.M., Charlebois, P., Lennon, N.J., Green, L., de Vries, P.J., Hien, T.T., Farrar, J., van Doorn, H.R., de Jong, M.D., Birren, B.W., Holmes, E.C., Simmons, C.P., 2012. High-resolution analysis of intrahost genetic diversity in dengue virus serotype 1 infection identifies mixed infections. *J. Virol.* 86, 835–843.

de Alwis R, et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109:7439–7444. doi: 10.1073/pnas.1200566109.

Fibriansah G, et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol. Med.* 2014;6:n/a–n/a. doi: 10.1002/emmm.201303404.

Sardanyés, J., Perales, C., Domingo, E., & Elena, S. F. (2024). Quasispecies theory and emerging viruses: challenges and applications. *Npj Viruses*, 2(1).

<https://doi.org/10.1038/s44298-024-00066-w>

Bifani, A. M., Siriphanitchakorn, T., & Choy, M. M. (2022). Intra-Host diversity of dengue virus in Mosquito vectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.888804>

1999-2024 TAG recommendations for Dengue. (2025, January 8). PAHO/WHO | Pan American Health Organization.

<https://www.paho.org/en/documents/1999-2024-tag-recommendations-dengue>

Qdenga (Vacina dengue 1, 2, 3 e 4 atenuada): novo registro. (n.d.). Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Anvisa.

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/qdenga-vacina-dengue-1-2-3-e-4-atenuada-novo-registro>

La ANMAT aprobó el uso de la vacuna del laboratorio Takeda contra el. (2023, April 26). Argentina.gob.ar.

<https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-anmat-aprobo-el-uso-de-la-vacuna-del-laboratorio-takeda-contra-el-dengue>

De Comunicaciones, D. (2024, November 20). ¡Qdenga®, the vaccine against dengue is now available! Comunicaciones UIS.

<https://comunicaciones.uis.edu.co/qdenga-the-vaccine-against-dengue-is-now-available/>

.-