



# **Dinámica espacio-temporal de los linajes de DENV-2 genotipo asiático-americano en América.**

---

**Lic. Daiana Mir da Silva**

Tesis de Maestría en Bioinformática

Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Orientadores: Dr. Héctor Romero

Dr. Ernesto Mordecki

# ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	Virus del Dengue.....	1
1.1.1.	Historia del Dengue - ki denga pepo.....	1
1.1.2.	Taxonomía, Transmisión,Estructura y Genoma.....	4
1.1.3.	Variabilidad genética y su distribución.....	7
1.1.4.	DENV en América.....	11
1.2.	Filogeografía.....	13
1.3.	Teoría del Coalescente.....	15
1.4.	DENV-2 genotipo AS/AM en las Américas.....	16
2.	Objetivos.....	18
2.1.	Objetivo general.....	18
2.2.	Objetivos específicos.....	18
3.	Materiales y Métodos.....	19
3.1.	Conjunto de secuencias.....	19
3.2.	Análisis filogenético.....	20
3.3.	Identificación y extracción del clado AS/AM.....	20
3.4.	Ponderación del conjunto de secuencias AS/AM y asignación de estado geográfico	23
3.5.	Modelo evolutivo.....	23

3.5.1.	Modelo de sustitución de nucleótidos .....	25
3.5.2.	Modelo de reloj molecular .....	27
3.5.3.	Modelo coalescente .....	31
3.5.4.	Modelo filogeográfico .....	34
3.6.	Conteo de flujo viral .....	36
4.	Resultados .....	37
4.1.	Reconstrucción filogenética de DENV-2 .....	37
4.2.	Identificación del clado AS/AM .....	37
4.3.	Testeo de la señal temporal .....	39
4.4.	Análisis de patrón de dispersión espacio-temporal .....	40
4.5.	Diversificación de DENV-2 genotipo AS/AM en América .....	46
4.6.	Escala de tiempo y rutas de migración del Clado III de DENV-2 genotipo AS/AM	46
4.7.	Escala de tiempo y rutas de migración del Clado IV de DENV-2 genotipo AS/AM	49
5.	Discusión.....	53
6.	Bibliografía.....	60

## Resumen

*El genotipo asiático americano (AS/AM) del virus del dengue tipo 2 (DENV- 2) ha estado evolucionando en América en los últimos 30 años, dando lugar a varias oleadas de epidemias de dengue y la aparición de diferentes linajes virales en la región. En este trabajo, se analiza el patrón de difusión espacio-temporal de los linajes DENV- 2 a nivel regional. Se aplican métodos filogenéticos y filogeográficos a un amplio conjunto de datos compuesto por 582 secuencias del gen E de DENV- 2 genotipo AS/AM aislado de 29 países de América durante un período de 30 años (1983-2012). Los análisis realizados muestran que la diversidad genética de DENV-2 genotipo AS/AM que circula en América es principalmente el resultado de un evento fundador único y puede organizarse en un mínimo de cuatro linajes principales (I a IV) , que surgieron en la región del Caribe alrededor de la década de 1980 y luego se extendieron y extinguieron con dinámicas diferentes. Los linajes I y II dominaron las epidemias en la región del Caribe durante la década de 1980 y principios de 1990, el linaje III se convirtió en el DENV-2 predominante en el Caribe y América del Sur durante la década de 1990, mientras que el linaje IV domina las epidemias en América del Sur y Central a partir del año 2000. Surinam y Guyana representan importantes puntos de entrada de DENV -2 desde las Antillas Menores a América del Sur, mientras que Venezuela , Brasil y Nicaragua resultan ser los principales centros de difusión secundaria a otros países del continente .Este trabajo también concluye que el DENV- 2 genotipo AS/AM difundió dentro de América del Sur a través de dos rutas principales . La primera ruta afectó Venezuela y el lado occidental de los Andes, mientras que la segunda ruta principalmente afectó Brasil y la parte oriental de los Andes. El fenómeno de reemplazo de linajes de DENV- 2 entre sucesivos brotes epidémicos ha sido una característica común en todos los países americanos, aunque el momento de ocurrencia de los mismos varía mucho entre las diferentes regiones de América incluidas en el análisis.*

# 1. Introducción

## 1.1. Virus del Dengue

### 1.1.1. Historia del Dengue - *ki denga pepo*

***"El trópico es una enfermedad. Las enfermedades del trópico se curan con el tiempo, pero el trópico jamás... Las pasiones ocultas se alimentan dentro de la vida de las personas, se esconden detrás de ellas, como los tifones se esconden tras las ciénagas, los montes y los bosques. Todo tipo de pasiones. Por eso en Inglaterra son sospechosos todos los que regresan del trópico..."***

*El último encuentro. Sándor Márai*

La historia evolutiva del virus del dengue (DENV) y su relación con los seres humanos ofrece un caso ideal para el estudio de cómo la urbanización y globalización han influido en la aparición de enfermedades infecciosas. Algunos autores sostienen que su origen se ha producido en el continente africano debido al mismo origen de su principal vector, *Aedes aegypti* (Chritophers 1960; Edwards, FW). Sin embargo, estudios ecológicos y serológicos (Smith 1956; Rudnick, A. 1986) así como análisis filogenéticos (Diallo et al. 2005; Wang et al. 2000) apuntan a un origen Asiático. Independientemente de su origen, el DENV probablemente evolucionó como un virus de mosquitos arbóreos antes de adaptarse a primates no humanos en entornos silvestres (Duane J. Gubler 1998; DJ 1997)

El primer registro de una enfermedad compatible con la fiebre del dengue se encuentra en un enciclopedia médica China publicada por primera vez durante la dinastía Chin (265-420 d.C.). Esta enfermedad fue llamada por lo chinos como "agua venenosa" y ellos pensaban que de algún

modo estaba conectada con insectos voladores asociados al agua (Nobuchi 1979). Sin embargo no fue hasta finales del siglo XVIII que se realizó la primera descripción de una epidemia provocada por una enfermedad clínicamente compatible con el dengue. La epidemia ocurrida en 1780 en Filadelfia fue documentada por el eminente psiquiatra Benjamín Rush (Carey 1971), quien describió los síntomas distintivos de la enfermedad<sup>1</sup>.

Por ese tiempo también se registraron las primeras epidemias de dengue en Asia y África que datan de 1779-1780 (Hirsch 1883; Howe 1977; Pepper 1941). La ocurrencia casi simultánea de los brotes en tres continentes indica que este virus y el mosquito vector que lo transporta, ya estaban ampliamente distribuidos en el siglo XVIII, aunque la fiebre del dengue no se consideró un importante problema de salud pública, excepto por epidemias esporádicas (Duane J Gubler 2011).

El término “dengue” se originó en América en 1827-28 a raíz de la primera pandemia ocurrida en el Caribe y la costa atlántica de Estados Unidos. El virus causal y el mosquito vector, sin duda se introdujeron en barco como consecuencia no deseada del azúcar, el ron y el comercio de esclavos entre África y los puertos coloniales de América Latina y el Caribe. Los esclavos provenientes de África, identificaron esta entidad patológica como dinga o dyenga, homónimo del **Swahili: *ki denga pepo***, la cual describe un ataque repentino como un calambre que es provocado por un espíritu demoníaco. El dengue fue aceptado como un riesgo ocupacional de la vida y el

---

<sup>1</sup> Benjamin Rush fue uno de los firmantes de la declaración de la independencia de los Estados Unidos, describió varias enfermedades nerviosas (a una de las cuales le llamó ***anarquía*** y la definió como una enfermedad cerebral de aquellos que estaban descontentos con el nuevo sistema americano (Levine 2008)<sup>2</sup>) e inventó la Silla Tranquilizante, un artefacto que inmovilizaba a sus pacientes.

trabajo en las zonas tropicales, y durante años las personas se dieron cuenta de que los brotes de dengue coincidían con la llegada de los buques de pasaje o buques navales que transportaban soldados o esclavos entre ciudades puerto relacionadas por actividades comerciales. Sin embargo todavía no se conocía el agente que producía la enfermedad ni su forma de contagio.

En la última década del siglo XIX transcurría todavía la edad de oro de la bacteriología, y agentes infecciosos no bacterianos como causa de enfermedades animales era un concepto nuevo y anómalo no fácilmente aceptado por la mayoría de los microbiólogos. En 1907, los científicos, Percy Ashburn y Charles Franklin Craig confirmaron que un 'virus filtrable' era el agente causal del dengue (Ashburn and Craig 1907).

El momento decisivo en el estudio del dengue y su agente causal fue durante la Segunda Guerra Mundial. Las actividades asociadas con esta guerra y el período de posguerra están particularmente implicadas en el aumento de dengue y la aparición del dengue hemorrágico en el Sudeste Asiático (Duane J. Gubler 1998). En primer lugar los sistemas de abastecimiento de agua y alcantarillado existentes fueron destruidos resultando en criaderos favorables para *Aedes aegypti*. En segundo lugar, el dengue y la malaria fueron dos de las principales enfermedades que afectaron tanto a las fuerzas japonesas como a las aliadas en el Pacífico y Asia (Sabin 1952; Hotta 1952). El movimiento de tropas por períodos cortos de tiempo, presentó al virus una gran oferta de nuevos huéspedes susceptibles lo que indujo al aumento de la propagación de la enfermedad. El aislamiento del virus se llevó a cabo en este momento a ambos lados del conflicto militar en Asia y el Pacífico.

En el lado japonés, cuando los soldados comenzaron a mermar en grandes números debido al dengue, los médicos militares japoneses trataron de aislar el virus a través de la inoculación de muestras de sangre de los soldados enfermos con síndrome de dengue en embriones de pollo.

Dado que el virus del dengue no se replica fácilmente en embriones de pollo, el verdadero aislamiento del virus se llevó a cabo en 1943 en Nagasaki. Allí, Susumu Hotta aisló DENV-1 en ratones lactantes. Éste fue el primer virus dengue aislado en el mundo (Konishi and Kuno 2013).

Por el lado de las Fuerzas Aliadas, el hombre a cargo de aislamiento del virus fue Albert Sabin (Sabin 1952). Durante los intensos combates en la selva de Nueva Guinea, muchos soldados de las Fuerzas Aliadas contrajeron dengue. Los médicos tomaron muestras de sangre y las enviaron a Sabin en Cincinnati. Afortunadamente, 4 cepas se aislaron con éxito. Aquí surgió la cepa Nueva Guinea "C", el prototipo de DENV- 2. A diferencia de Hotta, Sabin utilizaba voluntarios humanos para crecer sus aislados hasta que también logró adaptar sus virus para crecer en ratones.

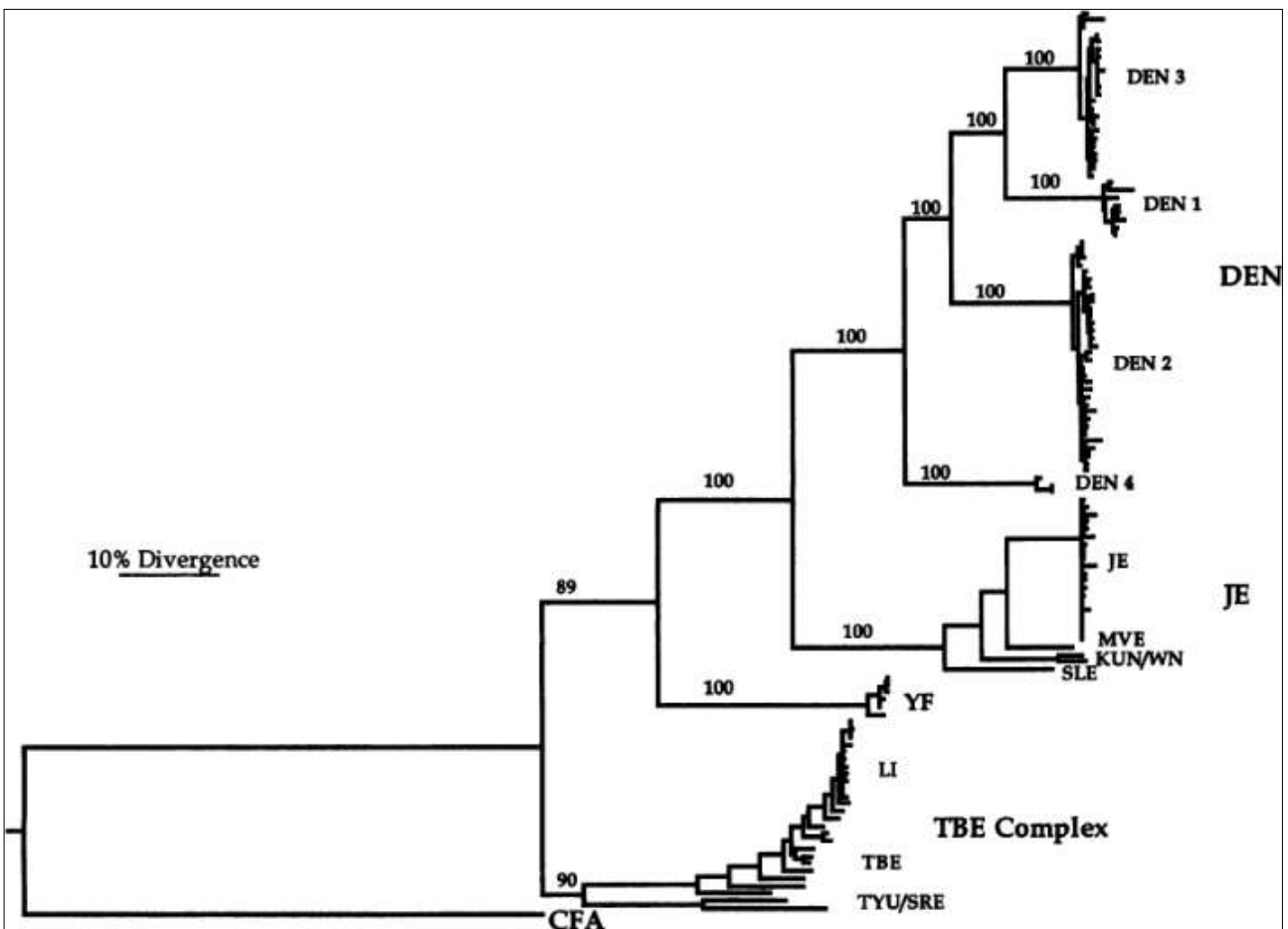
Una vez realizado el aislamiento y cultivo del virus, se desarrollaron pruebas diagnósticas para la primera vacuna candidata. Setenta años después, todavía hay sólo vacunas contra el dengue "candidatas" (Chang et al. 2004; Kinney and Huang 2001; Halstead and Deen 2002).

### 1.1.2. Taxonomía, Transmisión, Estructura y Genoma

Existen 4 virus de cadena sencilla de ARN y polaridad positiva antigénicamente y genéticamente diferentes pero relacionados filogenéticamente conocidos como serotipos de dengue (DENV-1 a 4). Existe la hipótesis de que los cuatro serotipos han evolucionado independientemente de un virus selvático ancestral entre 100 y 1,500 años atrás (Wang et al. 2000).



En base a neutralización cruzada usando antisueros policlonales hiperinmunes y a similitudes de organización y secuencia genómica, todos los DENV son miembros del complejo antigénico DEN en el género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (Calisher et al. 1989). Evidencia posterior a partir de datos moleculares reafirmó ésta clasificación y también proporcionó una comprensión más clara de la filogenia de los cuatro serotipos. Entre los virus del dengue, DENV-4 se separó primero del ancestro común, seguido por DENV-2 y DENV-1 y finalmente DENV-3 (Figura 1) (Zanotto et al. 1996).



**Figura 1:** Árbol de máxima verosimilitud para el gen E de 123 Flavivirus. (Figura 1 de Zanotto et al, 1996)

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector de transmisión primario de DENV; sin embargo, otras especies del género *Aedes*, tales como *Aedes albopictus*, también pueden ser vectores de transmisión del virus (San Martín et al. 2010). Las personas infectadas son los portadores y multiplicadores principales del virus, y los mosquitos se infectan al picarlas. Tras la aparición de los primeros síntomas, las personas infectadas con el virus pueden transmitir la infección (durante 4 o 5 días; 12 días como máximo) a los mosquitos *Aedes* (“OMS | Dengue Y Dengue Hemorrágico” 2014)

El espectro clínico de la enfermedad incluye la infección asintomática, la fiebre del Dengue (DF) o Dengue clásico y la fiebre hemorrágica del Dengue (FHD) o Dengue hemorrágico que evoluciona en ocasiones en el síndrome de choque por dengue (DSS), que es frecuentemente fatal a causa de la permeabilidad capilar anormal y pérdida de plasma (Henchal and Putnak 1990). Por el momento no existe un tratamiento específico de la enfermedad del dengue y el control de su vector es la única estrategia de prevención.

A nivel estructural, son virus esféricos, envueltos de 40 a 50 nanómetros de diámetro. El ARN está envuelto por una nucleocápside con simetría icosaédrica rodeada por una bicapa lipídica asociada a las proteínas de membrana (M) y envuelta (E). Su genoma está constituido por una cadena simple de ARN de polaridad positiva de cerca de 11.000 nucleótidos (nt) que presenta un capuchón (cap) en el extremo 5' y carece de cola poli(A) en el extremo 3' terminal. Posee un único marco de lectura abierto que está flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR) y que codifica para una poliproteína que es clivada por proteasas virales y celulares, dando proteínas estructurales (C, prM, M y E) y proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Lindenbach and Rice 2003, Chambers et al. 1990).

De las proteínas estructurales, la proteína C compone la cápside que rodea, protege al ácido nucleico y media la asociación con la membrana celular (Ma et al. 2004). La M, deriva de la proteólisis de prM y es una proteína transmembrana que interactúa con la proteína E (Muylaert, Galler, and Rice 1997). La función de prM es estabilizar la proteína E, previniendo de la exposición prematura del péptido de fusión al bajo pH que se encuentra en la vía de exocitosis. La retención de la proteína prM puede afectar la conformación y la antigenicidad de la proteína E así como reducir la infectividad inhibiendo la fusión ácido dependiente (Stadler et al. 1997; Heinz and Allison 2001). La proteína E, conforma la envoltura y está involucrada en la penetración del virus en la célula. Es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes y tiene actividad hemaglutinante (Nowak and Wengler 1987; Winkler, Heinz, and Kunz 1987; Chambers et al. 1990)

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

### 1.1.3. Variabilidad genética y su distribución

Así como ocurre con otros virus de ARN, los DENV's exhiben un alto grado de variabilidad genética debido a sus altas tasas de mutación en el intervalo de  $10^{-3}$ -  $10^{-5}$  mutaciones por nucleótido por ronda de replicación (Drake 1993). La ausencia del mecanismo de corrección de la ARN polimerasa viral durante el proceso de replicación contribuye a las altas tasas de mutación y a la gran diversidad genética en los virus de ARN (Steinhauer, Domingo, and Holland 1992).

La evolución de los virus de ARN y por ende su diversidad, también es afectada por sus grandes tamaños poblacionales. La selección juega un papel importante en presencia de grandes tamaños poblacionales y la competencia resultante entre los genomas que portan diferentes mutaciones, asegura la fijación de aquellas más beneficiosas y la emergencia de nuevos linajes virales que reemplazan linajes ancestrales (Elena et al. 2001)

La recombinación es otro de los factores que contribuye a la diversidad genética viral. En DENV's fue demostrada por primera vez en 1999 (E C Holmes, Worobey, and Rambaut 1999) (Tolou et al. 2001; Uzcategui et al. 2001; Worobey and Holmes 1999) De los flavivirus transmitidos por mosquitos, DENV tiene la frecuencia más alta de recombinación la cual se adjudica a la fácil co-infección de *Aedes aegypti* con más de una cepa viral así como a la hiperendemicidad de sus cuatro serotipos (Twiddy and Holmes 2003).

La amplia diversidad genética existente dentro de cada uno de los 4 serotipos, generada por los mecanismos anteriormente descritos, históricamente ha sido clasificada de diferente forma acompañando el progreso tecnológico. En los años 90, Rico-Hesse (R Rico-Hesse 1990) definió los genotipos de DENV como grupos virales que presentaban una divergencia en su secuencia nucleotídica menor al 6% dentro de una región determinada del genoma (región de unión entre los genes E/NS1). Actualmente la asignación de genotipos se realiza mediante la utilización de métodos de secuenciación y análisis filogenético en lugar de depender de puntos de corte arbitrarios en la diversidad de las secuencias (R Rico-Hesse 2003; Vasilakis and Weaver 2008). Asimismo, los análisis filogenéticos demuestran la existencia de múltiples linajes dentro de cada genotipo a menudo diferenciados geográficamente de la manera siguiente: DENV-1 se puede dividir en cinco genotipos en base a la secuencia completa del gen E (Goncalvez et al. 2002), (Tabla 1). DENV-2 es el más estudiado entre los serotipos del virus Dengue y se propone su división en

seis genotipos (Tabla 2) en base a la secuencia completa del gen E (Twiddy, Woelk, and Holmes 2002).

**Tabla 1** Genotipos de DENV-1 de acuerdo a Goncalvez et al. (2002).

<b>Genotipo</b>	<b>Distribución</b>
<b>I</b>	Japón, Hawaii en 1940 (cepa prototipo), China, Taiwan y Sudeste de Asia
<b>II</b>	Tailandia en 1950 y 1960
<b>III</b>	Fuente Selvática en Malasia
<b>IV</b>	Nauru, Australia, Indonesia y las Filipinas
<b>V</b>	Africa, Sudeste de Asia y América

**Tabla 2** Genotipos de DENV-2 de acuerdo a Twiddy et al. (2002).

<b>Genotipo</b>	<b>Distribución</b>
<b>Americano</b>	América Latina, cepas antiguas de la India, Caribe e islas del Pacífico entre 1960 y 1970.
<b>Asiático/Americano</b>	China, Vietnam, Tailandia y América desde los años 80.
<b>Asia I</b>	Tailandia, Myanmar y Malasia
<b>Asia II</b>	China, Filipinas, Sri Lanka y Vietnam
<b>Cosmopolitan</b>	Australia, este y oeste de Africa, Islas del Pacífico, India y Oriente Medio.
<b>Salvaje</b>	Aislado de primates no humanos en el oeste de Africa y Malasia.

La clasificación actual del serotipo DENV-3 sigue la nomenclatura propuesta por Weaver & Vasilakis (2009) (Weaver and Vasilakis 2009) y Araújo et al., (2009) (Josélio Maria Galvão de Araújo et al. 2012) reconociendo cinco genotipos en base a secuencias del gen E (Tabla 3).

**Tabla 3** Genotipos de DENV-3 y su distribución.

<b>Genotipo</b>	<b>Distribución</b>
<b>I</b>	Indonesia, Malasia, Filipinas y Sur de islas del Pacífico
<b>II</b>	Tailandia, Vietnam y Bangladesh
<b>III</b>	Sri Lanka, India, Africa, Samoa, Tailandia (1962)
<b>IV</b>	Puerto Rico, América Latina y Central, Tahiti (1965)
<b>V</b>	Filipinas, Japón (1073), China (1980), América del Sur (2002-2004)

Los DENV-4 presentan cuatro genotipos distintos en base a análisis de la secuencia del gen E (Lanciotti, Gubler, and Trent 1997) o la secuenciación del genoma viral completo (Klungthong et al. 2004).

**Tabla 4** Genotipos de DENV-4 y su distribución.

<b>Genotipo</b>	<b>Distribución</b>
<b>I</b>	Tailandia, Malasia, Filipinas y Sri Lanka
<b>II</b>	Indonesia, Malasia, Tahiti, Islas del Caribe y América
<b>III</b>	Tailandia em 1950 y 1960
<b>Salvaje</b>	Aislado de primates no humanos en Malasia

La diferenciación geográfica de los genotipos de DENV es un rasgo biológico importante de este virus que ha permitido el seguimiento de la ruta de transmisión del mismo a través del tiempo y el espacio y ha servido como base de estudios epidemiológicos moleculares que pueden determinar si las epidemias de DENV son causadas por la introducción de nuevas cepas de virus o el resultado de la re-emergencia de cepas endémicas. No está claro si la variación en la distribución geográfica es simplemente el resultado de la exportación al azar de linajes específicos o refleja diferencias intrínsecas de aptitud (“fitness”), de tal manera que algunos genotipos tienen mayor potencial epidémico que otros. Existe cierta evidencia de que los genotipos de DENV difieren en aptitud y virulencia (Halstead 2006).

#### 1.1.4. DENV en América

En las Américas, los programas de erradicación de *Aedes aegypti* para luchar contra la fiebre amarilla se interrumpieron a principios de 1970 teniendo como consecuencia que a finales de la misma década fueron re-infestados por el mosquito todos los países de los cuales había sido eliminado (D J Gubler 1989).

En 1977, el DENV-1 fue reportado por primera vez en la región, causando una epidemia generalizada de DF que se extendió desde Jamaica a Cuba, Puerto Rico y Venezuela. Esta epidemia posteriormente abarcó el resto de los países del Caribe, México, América Central y el norte de América del Sur (Guzman and Kouri 2003; Allicock et al. 2012).

Otra epidemia de gran importancia ocurrió con la introducción del genotipo AS/AM de DENV-2 desde el sudeste asiático en 1981. En esta epidemia Cuba experimentó uno de sus mayores brotes de dengue hemorrágico y probablemente el evento más importante en la historia del dengue en las Américas. Duró alrededor de 4 meses y se reportaron un total de 344.203 casos, incluyendo 10.000 casos de FHD y 158 muertes (Kouri et al. 1989).

También en 1981, se introdujo el DENV-4 en las islas del Caribe extendiéndose en los años siguientes para Centro y Sur América y México. Sin embargo la infección por DENV-4 generalmente se ha asociado con enfermedad leve y esporádicamente con FHD (Pinheiro and Corber 1997).

Durante los años 80 hubo un creciente número de casos en la región pero la incidencia de dengue hemorrágico se mantuvo baja hasta 1989, cuando el segundo brote mas importante de FHD en las Américas se registró en Venezuela durante 1989/90, con más de 6.000 casos y 73 muertes. Esta epidemia se relacionó con DENV-1, -2 y -4 siendo DENV-2 genotipo AS/AM el predominante y específicamente asociado con casos fatales al igual que en la epidemia en Cuba de 1981 (R Rico-Hesse et al. 1997; Lewis et al. 1993).

En 1994 se re-introdujo el DENV-3 en las Américas por primera vez desde 1978 (Pinheiro and Corber 1997). Inicialmente reportado en Nicaragua, DENV-3 se expandió posteriormente a América Central y México en 1995, Puerto Rico y otras islas del Caribe en 1998, causando importantes epidemias (Figueroa and Ramos 2000).

Durante la década del 2000 al 2010 se registró un muy alto número de casos reportados en las Américas, produciéndose dos brotes epidémicos el primero en el 2002 y el último en el 2010. En el 2002 fueron reportados 1.015.420 siendo los países con mayor incidencia Honduras, Trinidad y Tobago, Brasil, Costa Rica, El Salvador, Colombia, Barbados y Suriname. Aunque se reporta la co-circulación de los cuatro serotipos en la región, los identificados mas frecuentemente fueron DENV-3 seguido por DENV-2 (Pan American Health Organization (PAHO) 2002). Por su parte el brote epidémico del año 2010 tuvo mas de 1.6 millones de casos reportados siendo los países mas afectados Colombia, Venezuela, Brasil, Honduras, Guadalupe, Martinica, Costa Rica, Belize y Puerto Rico (Pan American Health Organization (PAHO) 2011).

El dengue en el año 2013 también tuvo un comportamiento epidémico para la región de las Américas, con el mayor reporte histórico de casos (Pan American Health Organization (PAHO) 2014b). En total más de 2.3 millones de casos fueron notificados por los países, y se reportó la



circulación de los cuatro serotipos en la región, y la co-circulación simultánea de todos ellos en 11 países y/o territorios. En el corriente año 2014, hasta la semana epidemiológica número 8, se han reportado un total de 73.763 casos de dengue en todo el continente. La subregión Andina reporta el mayor número de casos (29.727), seguido por el cono Sur (22.714) y posteriormente Norteamérica, México y Centroamérica (18.988) (Pan American Health Organization (PAHO) 2014a).

## 1.2. Filogeografía

***The species phylogeny is more like a statistical distribution, being composed of various trees (the gene trees), each of which may indicate different relationships.***

*Wayne Maddison, 1995*

El término “filogeografía” fue creado a finales de los años ochenta por John Avise y colaboradores para referirse al “estudio de los principios y procesos que determinan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente dentro y entre taxas cercanamente emparentados” (Avise, J.C. 2000).

El surgimiento de ésta disciplina proporcionó la vinculación entre disciplinas tradicionalmente separadas tales como la genética de poblaciones y la filogenética. Esta vinculación tuvo su aspecto revolucionario al permitir el reconocimiento de que los procesos microevolutivos que operan dentro de las especies se pueden extrapolar para explicar las diferencias macroevolutivas entre las especies y taxones superiores (Avise et al. 1987).

Para lo anterior, la filogeografía aplica el análisis de genealogías al estudio de la evolución de las poblaciones y permite obtener conclusiones acerca de procesos históricos o recurrentes que causaron la distribución particular de la variabilidad observada. Por ejemplo, se pueden inferir patrones de colonización, diversificación y extinción de linajes en áreas determinadas. Además el estudio comparado de patrones filogeográficos de varias especies co-distribuidas, contribuye al planteo de hipótesis sobre posibles eventos de vicarianza o dispersión y a la identificación de las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos (Bermingham and Avise 1986).

Dados los fines de este trabajo cabe destacar que entre las múltiples aplicaciones del análisis filogeográfico, se encuentran los análisis destinados a la reconstrucción del origen geográfico de una especie, (es decir aquellas áreas de distribución original con gran diversidad genética) y el establecimiento de sus posibles rutas de colonización y centros secundarios de dispersión. Esta reconstrucción de los movimientos geográficos ancestrales a partir de secuencias génicas, proporciona la comprensión fundamental de la dinámica evolutiva subyacente a las epidemias (Andrew Rambaut et al. 2008; Russell et al. 2008).

Un enfoque metodológico emergente para la inferencia estadística eficiente de los parámetros filogeográficos de interés, es la introducción de los procesos de difusión espacial tanto en espacio discreto (Lemey et al. 2009) como continuo (Lemey et al. 2010) en el análisis filogenético Bayesiano. Esta introducción permite la reconstrucción simultánea de la historia de la dispersión geográfica, la estimación geográfica de los orígenes de los clados y la caracterización del proceso de dispersión (Bloomquist, Lemey, and Suchard 2010; N. R. Faria et al. 2011) tomando en cuenta la incertidumbre de la reconstrucción filogenética lo que permite un análisis más preciso de la historia filogeográfica de los linajes (Sanmartín, Van Der Mark, and Ronquist 2008)

### 1.3. Teoría del Coalescente

***If we count backwards this multiplication of individuals in each species, in the same way as we have multiplied forward, the series ends up in one single parent.***

*Carolus Linnaeus, 1758*

La teoría del coalescente originalmente formulada por Kingman (Kingman, J. F. C. 1982a; Kingman, J. F. C. 1982b; Kingman, J. F. C. 1982c) y luego refinada por Tavaré (Tavaré 1984) y Hudson (Hudson 1990) provee un marco conceptual para el análisis de la distribución de la divergencia génica en una genealogía y la descripción de los procesos genéticos que influyeron históricamente sobre las poblaciones y que dieron lugar a la distribución actual de su variabilidad genética.

La idea básica subyacente a la teoría es que todos los individuos en una población tienen una genealogía por lo que si se toma una muestra aleatoria de  $n$  individuos de una población y reconstruimos su genealogía se van a comenzar a distinguir linajes que coalescen a medida que retrocedemos en el tiempo. Cada evento de coalescencia representa la división de dos linajes a partir de un ancestro común. Si se retrocede lo suficiente en el tiempo, llegamos a un punto en el que todos los linajes se han unido, y este punto representa el antepasado común más reciente de todas las secuencias de la muestra (MRCA) (Rodrigo et al. 1999).

Cuantitativamente, el coalescente proporciona una distribución de probabilidad de los tiempos entre los eventos de coalescencia (eventos de división de linajes) a lo largo de la genealogía. La distribución de los tiempos de coalescencia entre los linajes va a depender de la

dinámica de la población en cuestión (Slatkin and Hudson 1991). De hecho, cualquier proceso poblacional que afecte la relación de los individuos seleccionados al azar también afectará la distribución de los tiempos de coalescencia de manera predecible, de modo que se hace posible inferir la forma y magnitud de estos procesos mediante modelos simples que relacionan la dinámica poblacional con la genealogía (Rodrigo et al. 1999).

#### 1.4. DENV-2 genotipo AS/AM en las Américas

Una observación muy común en los estudios filogenéticos de DENV es el de reemplazo de linajes (Edward C Holmes and Twiddy 2003). Uno de los eventos de reemplazo de linaje mejor documentados ocurrió en la década de 1980 cuando se introdujo el genotipo AS/AM de DENV- 2 por primera vez en las Américas, desplazando al genotipo Americano local (R Rico-Hesse et al. 1997). Tal sustitución se ha asociado con una mayor aptitud de DENV- 2 genotipo AS/AM tanto en los humanos como en los mosquitos (Armstrong and Rico-Hesse 2001; Cologna, Armstrong, and Rico-Hesse 2005; Cologna and Rico-Hesse 2003).

Desde su introducción, estimada a finales de 1970 (Allicock et al. 2012; Carrington et al. 2005), el DENV- 2 genotipo AS/AM ha estado circulando y evolucionando en el continente americano lo que ha causado varias oleadas de epidemias de FHD (San Martín et al. 2010) y la aparición continua de diferentes linajes virales en la región.

Los análisis filogenéticos del genotipo AS/AM de DENV- 2 en las Américas han identificado la circulación de : tres clados en Puerto Rico ( 1986-2007 ) (Bennett et al. 2006; McElroy et al. 2011) y

las Antillas Menores (Foster et al. 2004) , dos linajes en Bolivia ( 1997-2006) (Roca et al. 2009) , Paraguay (2001-2006 ) (Aquino et al. 2008) y el Perú ( 1999-2012 ) (Cruz et al. 2013) , hasta tres linajes en Brasil ( 1990-2010 ) (Oliveira et al. 2010; Romano et al. 2010; Faria et al. 2013; Drumond et al. 2013) y Colombia (1988-2010) (Méndez et al. 2012) , hasta seis clados filogenéticos en Venezuela ( 1991-2008 ) (Uzcategui et al. 2001; Huhtamo et al. 2013) , y dos clados en México (1996-2000 ) (Carrillo-Valenzo et al. 2010) y en América Central ( 1999-2009) (Añez, Morales-Betoulle, and Rios 2011) .

Sin embargo, la información acerca de la dinámica de dispersión espacio-temporal de DENV-2 a nivel regional es escasa. Los estudios filogenéticos mencionados previamente, se han limitado principalmente a países individuales de América brindando una imagen incompleta de la distribución geográfica, la superposición temporal, y las rutas de migración de los distintos linajes de DENV-2 genotipo AS/AM a nivel regional.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Reconstruir el patrón de difusión espacio temporal de DENV-2 genotipo AS/AM a nivel regional e identificar los países y linajes virales que son más propensos a difundir y ser fuente de nuevas epidemias utilizando herramientas metodológicas y conceptuales del área de la filogeografía aplicada a virología evolutiva a partir de datos de secuencias dentro de un enfoque in-silico.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Determinar las relaciones filogenéticas entre linajes de DENV-2 genotipo AS/AM en América.
2. Estimar el lugar geográfico de origen,  $T_{MRCA}$  y tasa de sustitución de nucleótidos de DENV-2 genotipo AS/AM en América.
3. Estimar las rutas y tasas de migración de DENV-2 genotipo AS/AM en América.
4. Adquirir herramientas metodológicas y conceptuales del área de la filogeografía aplicada a virología evolutiva para el estudio de poblaciones mensurables evolutivamente.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Conjunto de secuencias

Se bajaron 4607 secuencias de DENV-2 del GenBank (Benson et al. 2008) a través de los módulos Bio::DB::GenBank y Bio::DB::Query::GenBank de BioPerl utilizando como query “Dengue virus 2[ORGN]”. Las mismas se utilizaron para construir una base de datos mediante herramientas del paquete BLAST (Altschul et al. 1997).

Seguidamente, fue bajada del GenBank (Benson et al. 2008) la secuencia completa para el gen E (1484 pb) de DENV-2. Ésta se utilizó como entrada en una búsqueda de BLASTn local contra la base de datos mencionada (Altschul et al. 1990) (e value  $\leq 1E-3$ ). En consecuencia se obtuvieron 3239 hits, a partir de los cuales se extrajeron los fragmentos de secuencia que presentaron similitud con el gen E de DENV-2 utilizando herramientas también pretenecientes al paquete BLAST (Altschul et al. 1997)

A continuación se realizó el alineamiento múltiple de dichas secuencias mediante el programa MAFFT v6.902b (Kato and Toh 2008) Luego de identificar de 2603 secuencias que formaban un bloque de 1400pb en el alineamiento, se seleccionaron aquellas que contaban con fecha y lugar de aislamiento. El conjunto resultante compuesto por 1932 secuencias del gen E de 1400pb provenientes de 63 países diferentes y aisladas durante 1944-2012 (Tabla 5), fue utilizado en análisis posteriores. El número de acceso de GenBank, el país de origen y el año de aislamiento

de cada secuencia incluida en este trabajo se muestran en el Apéndice 1. Los alineamientos fueron inspeccionados visualmente y editados utilizando el programa Jalview v2 (Waterhouse et al. 2009).

### 3.2. Análisis filogenético

El análisis filogenético para clasificar las 1932 secuencias de DENV-2 en genotipos se llevó a cabo por máxima verosimilitud (ML, maximum likelihood) (ver Cuadro 1) utilizando el programa PhyML (Stéphane Guindon and Gascuel 2003) a través de su servidor Web en línea (Stephane Guindon et al. 2005) La inferencia fue realizada con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+I+ $\Gamma$ 4 (ver 3.5.1), seleccionado mediante el programa jModelTest (Posada 2008). La búsqueda heurística del árbol se efectuó a través del algoritmo de intercambio de rama SPR (Swofford, D. L., and G. J. Olsen 1990) (ver Cuadro 1). La fiabilidad de la filogenia se estimó a través de la prueba aproximada de razón de verosimilitudes (*Approximate Likelihood-Ratio Test* aLRT) (Anisimova and Gascuel 2006) basada en el procedimiento de Shimodaira–Hasegawa. (H. Shimodaira and M. Hasegawa 1999) a través de la comparación de los valores de máxima verosimilitud correspondientes al mejor y segundo mejor reordenamiento alrededor de la rama de interés.

### 3.3. Identificación y extracción del clado AS/AM

Una vez identificado el clado con las secuencias pertenecientes al genotipo AS/AM en la reconstrucción filogenética general, se procedió a su extracción a través de la obtención automática de los números de acceso de las secuencias que lo componen y posterior recuperación de las mismas a partir de la base de datos local y a través de herramientas pertenecientes al paquete



BLAST (Altschul et al. 1997). Finalmente se obtuvo un conjunto de 582 secuencias de genotipo AS/AM de 1400pb que fueron alineadas con el programa MAFFT v6.902b (Kato and Toh 2008).

**Tabla 5.** Conjunto global de datos de DENV-2

Región	País	N	Fechas de muestreo
America del Sur	Brasil	77	1990-2011
	Peru	40	2002-2012
	Venezuela	45	1990-2008
	Colombia	20	1944-2007
	Bolivia	12	1997-2010
	Surinam	11	1986-1999
	Otros	10	1995-2010
America Central	Nicaragua	87	1999-2009
	Mexico	17	1992-2008
	Honduras	13	1984-2007
	Otros	6	1987-2009
Caribe	Puerto Rico	195	1977-2010
	Antillas Menores	41	1981-2010
	Cuba	21	1997
	Otros Antillas Mayores	8	1983-2008
Asia	Singapur	475	2000-2011
	Vietnam	357	1988-2011
	Tailandia	213	1964-2010
	Otras	243	1956-2010
Otras	-	51	1966-2011

Se indican regiones y países dentro de cada región, con el tamaño de la muestra y el rango temporal.

**Cuadro 1****Reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud**

La idea del método de máxima verosimilitud (ML) es encontrar la probabilidad de los datos dada una hipótesis:  $P(D|H)$ . En inferencia filogenética la hipótesis la constituyen el árbol (topología ( $\tau$ ) + longitud de las ramas ( $\nu$ )) y el modelo de evolución ( $\Phi$ ), y los datos son el alineamiento múltiple (D).

$$\Pr(D | H) = \Pr(D | \tau \cup \Phi)$$

Cuando se calcula el árbol de máxima verosimilitud, los parámetros del modelo y las longitudes de las ramas tienen que ser calculadas para cada árbol posible y luego se selecciona el árbol que resulta tener la mayor probabilidad. Debido a las numerosas topologías de árboles posibles, calcular la probabilidad y estimar los parámetros del modelo de cada uno de ellos es imposible y computacionalmente inviable. Por lo tanto, diversas heurísticas se utilizan para sugerir árboles razonables. Las operaciones heurísticas de reordenación total de árboles cambian la estructura de un árbol dado con  $n$  hojas generando una serie de posibles árboles para los cuales se calcula su valor de verosimilitud. El árbol con la probabilidad más alta se utiliza entonces para repetir el procedimiento. La operación de reordenamiento se detiene si no se encuentra un mejor árbol. El árbol encontrado con el mayor valor de verosimilitud es denominado el árbol localmente óptimo (Salemi and Vandamme 2003)

Tres operaciones de reorganización de árboles son empleadas generalmente:

- Intercambio del vecino más cercano (Nearest Neighbour Interchange NNI) Se parte de una topología y se procede a la yuxtaposición de las posiciones de los vecinos en el árbol filogenético.
- Poda de sub-árbol e injerto (Sub-tree Pruning and Regrafting SPR). Se parte de una topología y se procede rompiendo parte del árbol y conectando el fragmento a otra parte del árbol.
- Bisección de árbol y reconexión (Tree-Bisection and Reconnection TBR). El árbol se divide en dos partes, y estas se vuelven a conectar a través de cada posible par de ramas.

### 3.4. Ponderación del conjunto de secuencias AS/AM y asignación de estado geográfico

Con el fin de minimizar el problema de la sobre-representación de algunos países, el conjunto de secuencias AS/AM se redujo a no más de 80 secuencias por país. Para lo anterior se aplicó el programa CD-HIT (W. Li and Godzik 2006) a los conjuntos de secuencias con origen en Puerto Rico y Nicaragua. Los parámetros se ajustaron para formar grupos de secuencias que comparten  $\geq 99.5\%$  de identidad. Finalmente fueron eliminadas del conjunto de datos 113 secuencias de Puerto Rico y 40 de Nicaragua. Asimismo también retiramos 20 secuencias de Cuba por compartir un 100% de identidad. El conjunto de secuencias resultante de genotipo AS/AM con el que se realizaron los análisis descritos a continuación abarcó 406 secuencias de 29 países de América aisladas durante 1983-2012 a las cuales se agrupó dentro de diez estados geográficos discretos (Tabla 6). El agrupamiento se realizó de forma tal que aquellos países vecinos con pocas secuencias ( $n \leq 15$ ) se fusionaron en un solo estado geográfico discreto.

### 3.5. Modelo evolutivo

*“All models are wrong. We make tentative assumptions about the real world which we know are false but which we believe may be useful”*

*George E. P. Box 1976*

A los efectos de estimar la tasa de sustitución de nucleótidos, el tiempo del ancestro común más reciente ( $T_{MRCA}$ ) y la difusión espacial de DENV-2 genotipo AS/AM en las Américas, se utilizó

un modelo evolutivo, que consiste en una combinación de un **modelo de sustitución de nucleótidos**, un **modelo de reloj molecular**, un **modelo genealógico de genes** y un **modelo de difusión espacial**.

El modelo evolutivo elegido, se implementó en el paquete de software BEAST (*Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*) v1.7.5 (Alexei J. Drummond and Rambaut 2007) el cual proporciona un marco general para la estimación de parámetros y pruebas de hipótesis de los modelos evolutivos de datos de secuencias moleculares.

BEAST realiza la estimación de los parámetros del modelo evolutivo a través de una aproximación bayesiana. El análisis bayesiano se efectúa haciendo uso de simulación Monte Carlo en base a cadenas de Markov (*Markov chain Monte Carlo MCMC*) (ver cuadro 2).

El análisis de MCMC se corrió durante 100 y 70 millones de generaciones para los modelos filogeográficos asimétrico y simétrico respectivamente (ver 3.5.4). La convergencia de los parámetros se evaluó mediante el cálculo del tamaño efectivo de la muestra (*effective sample size ESS*) a través del programa TRACER v1.5 (Rambaut A, Drummond A 2009), después de excluir el 10% del recorrido inicial. La incertidumbre en las estimaciones de los parámetros se reflejó en la densidad de probabilidad mayor al 95% (*Highest Probability Density HPD*).

Los programas TreeAnnotator v1.7.5 y FigTree v1.3.1 (Rambaut A, 2009) se utilizaron para resumir la distribución posterior del árbol y visualizar el árbol de máxima credibilidad (*Maximum Clade Credibility MCC*), respectivamente.

### 3.5.1. Modelo de sustitución de nucleótidos

Dado que las sustituciones de nucleótidos o aminoácidos en una secuencia son usualmente consideradas eventos aleatorios, un importante pre-requisito para el cálculo de distancias genéticas es la especificación de un modelo de sustitución que brinde una descripción estadística del proceso estocástico. Es así, que los cambios de nucleótidos normalmente son modelados como procesos de Markov, caracterizados por matrices de tasas instantáneas que contienen el número relativo de los cambios por unidad de tiempo para todos los reemplazos posibles (Yang 2006).

Los modelos de sustitución de nucleótidos que se utilizan comúnmente bajo la premisa de que las frecuencias de los cuatro nucleótidos son iguales incluyen: el JC69 que supone una tasa igual de sustitución entre cualquier par de nucleótidos y el modelo K80 (Kimura 1980) que asume tasas diferentes para las transiciones y las transversiones. El supuesto de igualdad de frecuencias se relajó con los modelos HKY85 (Hasegawa, Kishino, and Yano 1985) y Tiempo Reversible General (GTR). El GTR es un modelo de sustitución flexible que incluye frecuencias de bases variables y una matriz de sustitución simétrica (Tavaré, S 1986).

Dado que el fenómeno de sustitución nucleotídica puede variar sustancialmente entre diferentes posiciones en la secuencia, la aproximación más utilizada para modelar la heterogeneidad de tasas entre sitios es la de describir la tasa de sustitución de cada posición como una variable aleatoria con distribución gamma (Yang 1994) a lo que también puede agregarse una forma de modelar una proporción de sitios invariables (Hasegawa, Kishino, and Yano 1985).

El modelo de sustitución de nucleótidos utilizado para la inferencia de los parámetros de interés de DENV-2 genotipo AS/AM fue el GTR + I +  $\Gamma$ 4 seleccionado mediante el programa jModelTest (Posada 2008).

**Tabla 6.** Secuencias de DENV-2 genotipo AS/AM de origen Americano.

<b>Estado Geográfico</b>	<b>País</b>	<b>Total de secuencias</b>	<b>Subconjunto representativo de secuencias</b>	<b>Fecha de muestreo<sup>a</sup></b>
<b>GA</b>	Puerto Rico	192	79	1987-2010
	Cuba	21	1	1997
	República Dominicana	3	3	1990-2003
	Jamaica	3	3	1983-2008
<b>LA/SR/GY</b>	Trinidad y Tobago	15	15	1986-2000
	Surinam	11	11	1986-1999
	Saint Vincent and the Grenadines	5	5	1998-2010
	Saint Lucia	4	4	1999
	Virgin Islands	4	4	1987-2005
	Barbados	3	3	1987-1998
	Dominica	3	3	1995
	Curacao	2	2	1993-1996
	Aruba	1	1	1996
	Grenada	1	1	1999
	Guyana	1	1	2000
	Saint Kitts and Nevis	1	1	2001
<b>NI</b>	Nicaragua	87	47	1999-2009
<b>CAM/MX</b>	Mexico	15	15	2002-2008
	Guatemala	2	2	2007-2009
	Honduras	2	2	2007
	Belize	1	1	2002
	Costa Rica	1	1	2003
	<b>VE</b>	Venezuela	45	45
<b>PE</b>	Perú	38	38	2002-2012
<b>CO/EC</b>	Colombia	19	19	1992-2007
	Ecuador	4	4	2000
<b>BR-SE</b>	Brasil región Sureste	59	59	1990-2011
<b>BR-N/NE</b>	Brasil región Norte	11	11	2000-2008
	Brasil región Noreste	7	7	1991-2009
<b>BO/PY</b>	Bolivia	12	12	1997-2010
	Paraguay	6	6	2001-2010
<b>TOTAL</b>		582	406	1983-2011

<sup>a</sup> Las fechas de muestreo de las secuencias fueron las mismas tanto para el conjunto de datos completo como para el subconjunto representativo.

### 3.5.2. Modelo de reloj molecular

Dado que: la **distancia genética es función de la tasa de evolución y el tiempo de divergencia**, una pequeña distancia genética entre dos secuencias puede sugerir un antepasado común reciente, pero también es consistente con una menor tasa de sustitución y un ancestro común más antiguo. Por lo tanto, las distancias genéticas por sí solas, son de poca utilidad como indicadores temporales de la historia evolutiva y es necesario entonces calibrar una filogenia para extraer información temporal a partir de las distancias genéticas.

La hipótesis del reloj molecular postula que el ADN y las secuencias de proteínas evolucionan a una velocidad que es relativamente constante en el tiempo y entre diferentes organismos (Zuckerkandl, E. and Pauling, L.B. 1962; Zuckerkandl, E. and Pauling, L.B. 1965) Una consecuencia directa de esta constancia en las tasas de evolución, es que la distancia genética entre dos especies es proporcional al tiempo que estas especies comparten hasta su ancestro común. Por lo tanto, si la hipótesis del reloj molecular se considera cierta, sirve como un método extremadamente útil para la estimación de escalas de tiempo evolutivas (Oliver G Pybus 2006).

Por lo anterior, para comprobar que los datos (alineamiento múltiple de secuencias) se adecúan a la hipótesis del reloj molecular o dicho de otra manera que existe señal temporal en los datos, luego de realizarse una reconstrucción filogenética por ML de las 406 secuencias de genotipo AS/AM se efectuó una regresión lineal entre el tiempo de muestreo de cada secuencia y la distancia genética (longitud de rama) hasta la raíz de la filogenia analizada utilizando el programa Path-O-Gen v1.2 (A. Drummond, Pybus, and Rambaut 2003).

El modelo lineal fue por lo tanto:  $E [d_{raíz, i}] = \mu (t_i - t_{raíz}) = \mu t_i - \mu t_{raíz}$  donde  $t_i$  es el tiempo de muestreo de la secuencia  $i$ ,  $\mu$  es la tasa de sustitución desconocida y  $t_{raíz}$  es el tiempo del ancestro común más reciente. Bajo este modelo, la pendiente de la regresión lineal de  $t_{raíz, i}$  contra  $t_i$  proporciona una estimación de la tasa de sustitución y la intersección con el eje y es igual a  $-\mu t_{raíz}$ . Por construcción, la intersección con el eje x es igual a  $t_{raíz}$ .

Sin embargo, un problema persistente que ha complicado la inferencia filogenética es la ineludible existencia de alejamientos del comportamiento evolutivo tipo reloj y de variaciones en la tasa de sustitución de un mismo gen entre los linajes (Britten 1986; Ayala 1997; Hasegawa and Kishino 1989). Para contemplar este tipo de comportamiento evolutivo surgieron alternativas para relajar el supuesto de reloj molecular “estricto”, permitiendo que la tasa de evolución varíe a través del árbol o más generalmente, entre diferentes partes de una filogenia. Este tipo de aproximación “relajada” para la estimación de los tiempos de divergencia en una filogenia (A Rambaut and Bromham 1998; Thorne, Kishino, and Painter 1998) se basa en el supuesto de que ramas vecinas de una filogenia tienen tasas más similares que ramas distantes, propiedad denominada “autocorrelación”. De esta forma la tasa de cada rama es estimada a partir de una distribución paramétrica cuya media es función de la tasa en la rama parental. En los abordajes bayesianos del reloj relajado autocorrelacionado, hay un vector de tasas  $R = \{r_1, r_2, \dots, r_{2n-1}\}$  y un vector correspondiente de alturas de nodo  $t = \{t_1, t_2, \dots, t_{2n-1}\}$  en unidades de tiempo. El vector de alturas de nodo, junto con un grafo,  $E$ , define un árbol genealógico  $g = \{E, t\}$  en unidades de tiempo. Para convertir este árbol de unidades de tiempo a unidades de evolución molecular, las tasas se asignarán a las ramas (Thorne, Kishino, and Painter 1998) o los nodos (Kishino, Thorne, and Bruno 2001). En ambos casos, la probabilidad previa de las tasas  $f_R(R|g)$  se puede calcular por el producto de la probabilidad de cada tasa  $r_2$  en el árbol dada la tasa ancestral  $r_{A(i)}$  y el tiempo  $\Delta t_i$  entre la tasa ancestral y la derivada:

$$f_R(R|g) = \prod f(r_i | r_{A(i)}, \Delta t_i)$$



Recientemente, se ha presentado una alternativa a la aproximación autocorrelacionada en la que no se asume ninguna correlación entre ramas adyacentes. En este caso, las tasas específicas por rama se infieren de forma independiente e idénticamente distribuida de una tasa de distribución subyacente, tal como una distribución exponencial  $r \sim \text{Exp}(\lambda)$  o logarítmica normal  $r \sim \text{LogNormal}(\mu, \theta^2)$ . Estas alternativas se pueden enmarcar en un contexto bayesiano, al igual que en el caso de los modelos autocorrelacionados. En este escenario, la versión exponencial de reloj relajado no correlacionado tendría una probabilidad previa en el vector de tasas de:

$$f_R(\mathbf{R}|\mathbf{g}) = \prod f(R_i) = \prod \lambda e^{-\lambda r_i}$$

Este modelo de reloj relajado no correlacionado, es un poco más descontraído que sus predecesores, y lo más importante es que puede estimar el nivel de autocorrelación en cada conjunto de datos. Otra ventaja de su enfoque es que se estima de forma simultánea tanto la forma de la filogenia y la tasa de variación entre las ramas de la filogenia, dos tareas que antes tenían que realizarse por separado (Alexei J Drummond et al. 2006).

En definitiva, para el análisis del patrón de dispersión espacio-temporal de DENV-2 genotipo AS/AM descrito seguidamente, se utilizó un **modelo de reloj molecular lognormal, relajado y no correlacionado** a través del cual se modeló la variación de las tasas de sustitución del gen E de los diferentes linajes de DENV-2 genotipo AS/AM incluyendo de esta forma la naturaleza dependiente del tiempo del proceso evolutivo.

## Cuadro 2

### Reconstrucción filogenética a través de análisis Bayesiano

El método bayesiano (MB) determina para cada árbol, la probabilidad de que sea la hipótesis correcta en función de los datos. A la probabilidad de cada árbol dados los datos,  $P(H|D)$ , se le denomina probabilidad posterior porque se calcula la probabilidad de una hipótesis a partir de los resultados que produciría dicha hipótesis.

El teorema de Bayes es el utilizado para el cálculo de la distribución posterior de los parámetros del modelo, tanto del árbol filogenético (topología ( $\tau$ ) + longitud de las ramas ( $\nu$ )) y/o del modelo de evolución ( $\Phi$ ), en base a la probabilidad anterior de los mismos y la función de verosimilitud de los datos (alineamiento múltiple (D))

$$\Pr(H|D) = \frac{\Pr(H) \Pr(D|H)}{\Pr(D)} = \frac{\Pr(\tau \nu \Phi) \Pr(D|\tau \nu \Phi)}{\sum_H \Pr(\tau \nu \Phi) \Pr(D|\tau \nu \Phi)}$$

- $\Pr(D|H)$  = verosimilitud de los datos
- $\Pr(H)$  = probabilidad anterior
- $\Pr(D)$  = prob. incondicional de los D, que puede ser obtenida usando la ley de la prob. total, calculando  $\sum_H P(H) P(D|H)$ . Funciona como constante normalizadora asegurando que la probabilidad posterior = 1

Dado el enorme espacio de parámetros y topologías posibles no existe una solución analítica al sistema de Bayes en el problema de inferencia filogenética por lo cual se aplican métodos heurísticos. El método de simulación Monte Carlo basado en cadenas de Markov (MCMC) denominado algoritmo Metrópolis- Hastings, es un algoritmo heurístico que permite elegir de forma aleatoria los puntos en los que se evaluará una función. Su idea básica es construir una cadena de Markov estacionaria que converja a la distribución posterior. Para lo anterior, se ejecutan pequeños cambios aleatorios a algún valor de los parámetros y a continuación se calcula la relación de las probabilidades posteriores en los dos puntos del espacio de parámetros para finalmente aceptar o rechazar los cambios de acuerdo a sus probabilidades correspondientes. Finalmente, si repetimos este proceso muchas veces, obtendremos una estimación de la probabilidad asociada a cada parámetro en función del tiempo que la cadena permanece en cada punto del espacio de valores que los define.

El rasgo clave de los MB es la noción de una distribución de probabilidad para los parámetros al considerarlos variables aleatorias y que ésta probabilidad es usada para representar la incertidumbre asociada a los mismos. En cambio, en el caso de ML, sabemos cuál es el valor más probable del parámetro de interés pero no conocemos su probabilidad ni la de los otros valores que el mismo puede tomar. Por eso, para éste tipo de metodología así como para reconstrucciones por Neighbor Joining ( NJ ) o Máxima Parsimonia ( MP ) en donde no tenemos una medida de incertidumbre asociada al valor inferido, es muy importante realizar un contraste de hipótesis para saber cuán soportada por los datos está nuestra hipótesis.

### 3.5.3. Modelo coalescente

El proceso coalescente básico de Kingman (Kingman, J. F. C. 1982a; Kingman, J. F. C. 1982b; Kingman, J. F. C. 1982c) es un modelo matemático retrospectivo de la genética de poblaciones basado en el modelo Fisher-Wright (Fisher 1930; Wright 1931). para el estudio de las propiedades probabilísticas de genealogías que relacionan individuos muestreados al azar de una población de interés.

La teoría provee las bases para estimar tiempos de coalescencia y para establecer la relación entre estos tiempos y el tamaño poblacional, tiempo del ancestro común mas reciente y otros parámetros poblacionales (migración, mutación, etc.).

El desarrollo de la teoría asume que todos los miembros de la misma generación dentro de la población tienen la misma probabilidad de ser el antepasado de cualquier miembro de la siguiente generación.

Si consideramos un población de tamaño fijo  $N$ , la probabilidad de que dos miembros elegidos al azar de la misma encuentren su ancestro común la primera generación hacia atrás en el tiempo es  $1/N$ . La probabilidad de que los dos genes tengan distintos ancestros es por lo tanto  $1 - 1/N$ .

Ya que el muestreo en diferentes generaciones es independiente uno del otro, la probabilidad de que dos genes encuentren su antepasado común  $j$  generaciones hacia atrás será:

$$\frac{1}{N} \left(1 - \frac{1}{N}\right)^j$$

Por lo que  $j$ , puede describirse como una variable aleatoria con distribución geométrica, tasa de éxito  $\lambda = 1/N$  y una media de  $N$ .

Si en vez de dos miembros, consideramos  $n$  linajes, el tiempo para la primera coalescencia se deriva de la misma manera, sólo que ahora hay  $\binom{n}{2}$  posibles pares que pueden coalescer, lo que resulta en una tasa de éxito de  $\lambda = \binom{n}{2}/N$  y tiempo medio de coalescencia de  $N/\binom{n}{2}$ .

Una consecuencia interesante es que el número total de generaciones requeridas para la coalescencia de  $n$  linajes es  $\sum_{i=2}^n N/\binom{i}{2} = 2N(1 - 1/n)$  que es siempre inferior a  $2N$  independientemente de  $n$ .

A tiempo continuo, consideraremos,  $\lambda = 1/N$  como la probabilidad instantánea de coalescencia, es decir, la probabilidad de coalescencia en un intervalo de tiempo corto  $\Delta t$ . Por lo que a medida que  $N$  aumenta el proceso de coalescencia puede describirse a través de la distribución exponencial  $f(t) = \lambda e^{-\lambda t}$  el equivalente continuo de la distribución geométrica.

Aunque el coalescente de Kingman se basa en el modelo poblacional Fisher-Wright, el mismo puede ser fácilmente extendido para incluir desviaciones de los supuestos incluyendo cambios en el tamaño efectivo poblacional (Griffiths and Tavaré 1994; Kuhner, Yamato, and Felsenstein 1998), compartimentación (Slatkin and Maddison 1989; Slatkin and Maddison 1990; Beerli and Felsenstein 1999), recombinación (Griffiths and Marjoram 1996; R R Hudson and Kaplan 1985; Richard R. Hudson 1987; R. R. Hudson and Kaplan 1988), y selección (Krone and Neuhauser 1997; Neuhauser and Krone 1997; Kaplan, Darden, and Hudson 1988).

En la generalización del coalescente para el caso donde el tamaño de la población cambia a lo largo del tiempo,  $N = N(t)$  dada por Griffiths y Tavaré (Griffiths and Tavaré 1994). se demuestra

que la densidad de probabilidad para la ocurrencia del primer evento de coalescencia en el tiempo  $t$  entre los últimos  $n$  linajes es:

$$\frac{C}{N(t)} \exp\left(-\int_0^t \frac{C}{N(x)} dx\right) \text{ donde } C = \binom{n}{2}$$

Entonces mientras  $N = N(t)$  es una función demográfica que puede tomar cualquier forma cuya inversa pueda ser integrada y su densidad se caracteriza por dos números: la intensidad (inversa del promedio del tamaño de la población durante el intervalo) y el tamaño de la población en el final del intervalo.

Todo junto, dada una función demográfica  $N(t)$  y una lista de tiempos de coalescencia  $T = (t_n, t_{n-1}, \dots, t_2)$ , donde  $t_n$  es el tiempo en que  $n$  linajes coalescen en  $n-1$ , la probabilidad de que esos tiempos sean el resultado de un proceso de coalescencia que reduce  $n$  linajes a 1, se obtiene multiplicando las probabilidades (independientes) para cada evento de coalescencia:

$$f(T|N(t)) = \prod_{i=2}^n \frac{\binom{i}{2}}{N(t_i)} \exp\left(-\int_{t_{i+1}}^{t_i} \frac{\binom{i}{2}}{N(t)} dt\right)$$

La teoría del coalescente se ha utilizado para estimar dinámicas poblacionales haciendo uso de varias funciones demográficas que permiten modelar un tamaño poblacional constante (Wilson and Balding 1998), un crecimiento poblacional exponencial (Beaumont 1999) o una población bajo crecimiento logístico o expansional (Kuhner, Yamato, and Felsenstein 1998). Además de las funciones demográficas mencionadas, para reconstruir la historia demográfica, los métodos tipo “skyline plot” aprovechan la relación relativamente simple entre el tamaño poblacional y el largo esperado del intervalo coalescente. Inicialmente se desarrollo con estimadores de máxima

verosimilitud (MLE) de la función demográfica para una genealogía conocida (O G Pybus, Rambaut, and Harvey 2000). Luego se desarrolló el “Skyline Plot Bayesiano” (BSP) (A. J. Drummond et al. 2005), que estima la función demográfica directamente de los datos de secuencia y proporciona intervalos de credibilidad. Este último método fue el utilizado como modelo demográfico para la inferencia del árbol de coalescencia de DENV-2 genotipo AS/AM.

#### 3.5.4. Modelo filogeográfico

La inferencia de caracteres ancestrales distribuidos de manera discreta, como ser las localidades ancestrales de muestras de virus de diferentes países o ciudades, se realiza a través de modelos con Cadenas de Markov a Tiempo Continuo (CMTCC). Dicha aproximación permite la inferencia de realizaciones discretas en tiempo continuo. de forma análoga al Modelo GTR de sustitución de nucleótidos caracterizado completamente por su matriz de tasas de transición (Tavaré, S 1986).

La reconstrucción de caracteres distribuidos de forma continua, por ejemplo la ubicación espacial ancestral de muestras virales obtenidas utilizando coordenadas de latitud y longitud, se realiza a través de modelos de difusión de Movimiento Browniano (MB). En contraste con el enfoque filogeográfico discreto, donde las estimaciones de los lugares ancestrales se realizan necesariamente a partir del conjunto de los lugares incluidos en la muestra, los modelos de difusión brownianos permiten la exploración de todo el espacio de dos dimensiones (Lemmon and Lemmon 2008) permitiendo a los virus ancestrales residir en cualquier lugar dentro de un paisaje geográfico continuo

Para la reconstrucción de las vías de transmisión de DENV-2 genotipo AS/AM se consideraron dos escenarios dentro un modelo filogeográfico discreto: una difusión filogeográfica reversible (Lemey et al. 2009) y otra no reversible (Edwards et al. 2011) entre los 10 estados geográficos en

los que se agruparon las secuencias nombrados: **GA, LA/SR/GY, NI, CAM/MX, VE, PE, CO/EC, BR-SE, BR-N/NE, BO/PY** (ver Tabla 6).

Dado que generalmente no todas las tasas de transición entre localidades son imprescindibles para la adecuada inferencia del proceso de difusión a lo largo de la filogenia, se empleó un procedimiento de búsqueda estocástica bayesiana para la selección de variables (BSSVS) (Lemey et al. 2009). El BSSVS es un procedimiento que permite la reducción del conjunto de parámetros de tasas de transición a un número limitado capaz de proporcionar una descripción parsimoniosa del proceso de difusión espacial. A través de ésta metodología las tasas de transición disminuyen a cero con cierta probabilidad en base a una distribución previa.

Se compararon los resultados de los dos modelos de difusión mediante la estimación de los valores de probabilidad marginal (MLE) de cada uno de ellos calculada a través de los métodos de muestreo de ruta (*path sampling* PS) y muestreo de escalón (*stepping stone sampling* SS) (Baele et al. 2012).

Finalmente se realizó una prueba de Factor de Bayes (BF) a través de la plataforma SPREAD (Bielejec et al. 2011) para identificar las tasas de transición inferidas estadísticamente significativas ( $BF > 3$ ).

**Cuadro 3****Resumen de modelo evolutivo utilizado para el análisis de DENV-2 genotipo AS/AM**

- Modelo de sustitución de nucleótidos GTR + I +  $\Gamma$ 4 (Tavaré, S 1986; Yang 1994)
- Modelo de reloj molecular lognormal, relajado y no correlacionado (Alexei J Drummond et al. 2006)
- Modelo demográfico no paramétrico “Bayesian Skyline” (Strimmer and Pybus 2001).
- Modelo filogeográfico discreto simétrico y asimétrico (Lemey et al. 2009; Lemey et al. 2010)

### 3.6. Conteo de flujo viral

Con el fin de cuantificar el flujo viral y para reducir el impacto potencial del tamaño desigual de muestreo entre las regiones, las secuencias de DENV-2 se subdividieron en seis nuevos estados geográficos con tamaños muestrales más homogéneos nombrados: **GA** (n = 86), **LA / SR / GY** (n = 51), **SA1** (BR / BO / PY) (n = 95), **SA2** (VE / CO / CE) (n = 68), **PE** (n = 38) y **CAM** (Centroamérica y México) (n = 68). Las tasas de migración entre estas regiones se estimaron utilizando conteo de saltos de Markov de las transiciones entre las mismas a lo largo de la filogenia. El conteo de saltos de Markov estima la probabilidad de cambio del estado geográfico a lo largo de cada rama condicionada a los datos observados (Minin and Suchard 2008; O’Brien, Minin, and Suchard 2009).



## 4. Resultados

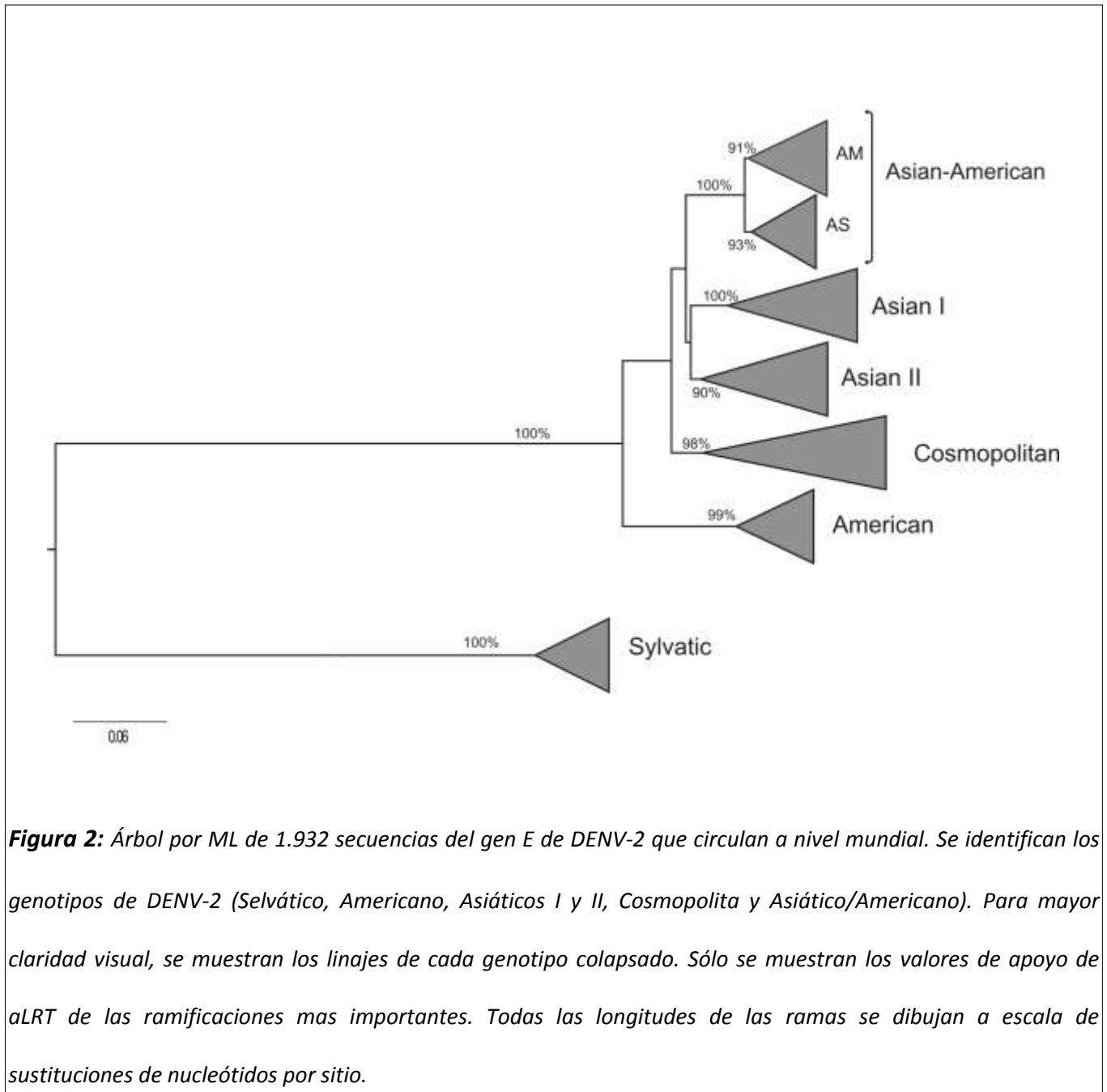
### 4.1. Reconstrucción filogenética de DENV-2

La reconstrucción filogenética por ML del conjunto completo de 1932 secuencias del gen E de DENV-2, muestra claramente la agrupación característica de los linajes no-selváticos del serotipo en cinco clados monofiléticos altamente apoyados ( $aLRT \geq 0,90$ ) conocidos como genotipos Americano (AM) , Asiático/Americano (AS/AM) , Asia I, Asia II y Cosmopolita (figura 2).

### 4.2. Identificación del clado AS/AM

Todas las secuencias de DENV-2 genotipo AS/AM de origen americano ( $n = 582$ ) segregan en un ( $aLRT = 0,91$ ) subgrupo monofilético muy apoyado junto a las secuencias de origen asiático, apoyando así que la diversidad actual de secuencias de DENV-2 genotipo AS/AM en las Américas es principalmente el resultado de un solo evento fundador.

Tras excluir secuencias muy similares ( $> 99,5\%$ ) de las ubicaciones (Puerto Rico y Nicaragua) más densamente muestreadas ( $n > 80$  secuencias) y secuencias idénticas de Cuba, se obtuvo un subconjunto de 406 secuencias de DENV-2 genotipo AS/ AM de origen americano que se utilizaron para las reconstrucciones evolutivas y filogeográficas posteriores (Tabla 6).

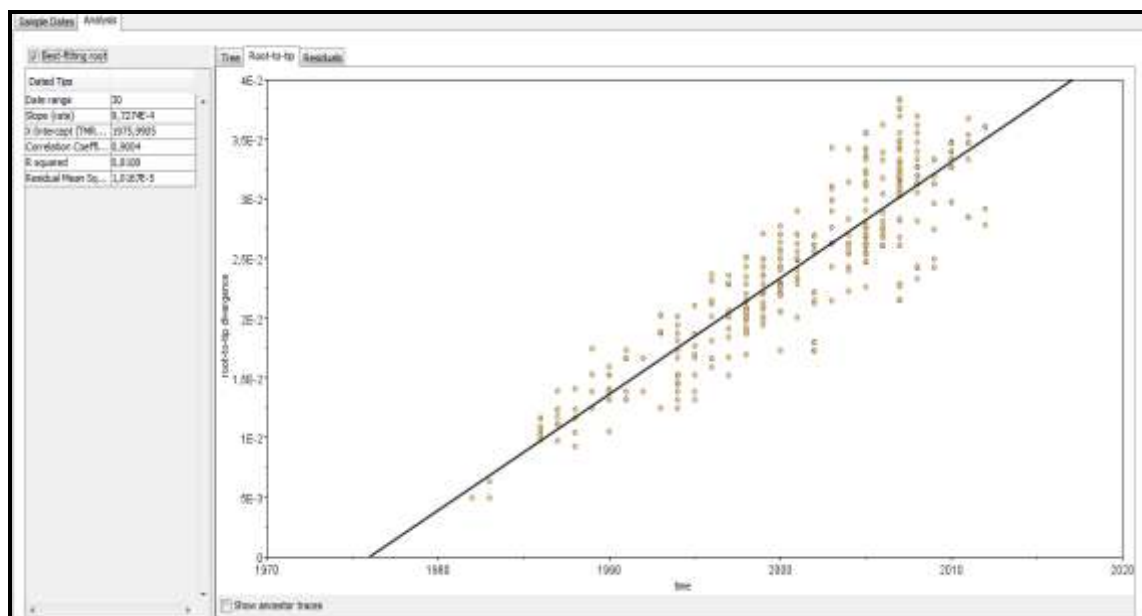


**Figura 2:** *Árbol por ML de 1.932 secuencias del gen E de DENV-2 que circulan a nivel mundial. Se identifican los genotipos de DENV-2 (Selvático, Americano, Asiáticos I y II, Cosmopolita y Asiático/Americano). Para mayor claridad visual, se muestran los linajes de cada genotipo colapsado. Sólo se muestran los valores de apoyo de aLRT de las ramificaciones mas importantes. Todas las longitudes de las ramas se dibujan a escala de sustituciones de nucleótidos por sitio.*

### 4.3. Testeo de la señal temporal

Al utilizar el programa Path-O-Gen (A. Drummond, Pybus, and Rambaut 2003) para investigar la señal temporal y ver que tan válida puede ser la suposición de un reloj molecular para las 406 secuencias del clado AS/AM de origen americano se obtuvieron valores valores que verifican la señal de un comportamiento tipo reloj en los datos (coeficiente de correlación = 0.99) (Figura 3)

La pendiente de la regresión lineal inferida resulta en un valor de  $9.7 \text{ E-4}$  lo cual es consistente con la tasa de sustitución para DENV estimada en trabajos anteriores (Twiddy, Holmes, and Rambaut 2003; Zanotto et al. 1996). Por su lado la intersección de la recta de regresión con el eje x estima el  $T_{\text{MRCA}}$  de las secuencias en 1976.



**Figura 3:** Regresión lineal entre el tiempo de muestreo de cada secuencia de DENV-2 genotipo AS/AM y la distancia genética hasta la raíz de la filogenia analizada

#### 4.4. Análisis de patrón de dispersión espacio-temporal

De acuerdo con las estimaciones realizadas a través de BEAST (Alexei J. Drummond and Rambaut 2007), la tasa de evolución de DENV-2 genotipo AS/AM en las Américas es de  $9,5 \times 10^{-4}$  subs / sitio / año (95% HPD:  $8.5$  a  $10.7 \times 10^{-4}$  subs / sitio / año) y el  $T_{MRCA}$  fue el año 1981 (95% HPD: 1979-1983).

Las tasas de sustitución por rama parecen ser suficientemente diferentes dentro del árbol como se indica en la distribución de su coeficiente de variación (95% HPD: 0.26-0.52) que claramente excluye el cero, lo que justifica el uso de un reloj molecular relajado.

Inicialmente se asignaron diez estados geográficos discretos a las 406 secuencias americanas de DENV-2 (Tabla 6) y el patrón de difusión en la región fue reconstruido utilizando los modelos simétrico y asimétrico de dispersión geográfica. La comparación de los valores calculados de MLE utilizando los métodos PS y SS reveló un fuerte apoyo a favor del modelo de dispersión filogeográfica asimétrico ( $BF > 100$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Factores de Bayes (BF) entre los modelos filogeográficos.

<b>Comparación de modelos</b>	<b>Método</b>	<b>ln(BF)<sup>a</sup></b>	<b>Evidencia contra H<sub>0</sub><sup>b</sup></b>
Simétrico(H <sub>0</sub> ) vs Asimétrico (H <sub>1</sub> )	PS	185	Decisiva
	SS	184	Decisiva

a ln (BF) es la diferencia (en el espacio ln) de la probabilidad marginal de la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) y el modelo alternativo (H<sub>1</sub>). b La evidencia contra H<sub>0</sub> se evaluó de la siguiente forma: ln (BF) <0 indica que no hay pruebas contra el modelo nulo; ln (BF) entre 0-2,3 indica evidencia débil frente al modelo nulo, ln (BF) entre 2.3 a 3.4 indica una fuerte evidencia en contra del modelo nulo; ln (BF) entre 3.4 a 4.6 indica una evidencia muy fuerte contra el modelo nulo; y ln (BF) > 4.6 indica pruebas decisivas contra el modelo nulo. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Bayes\\_factor](http://en.wikipedia.org/wiki/Bayes_factor)).

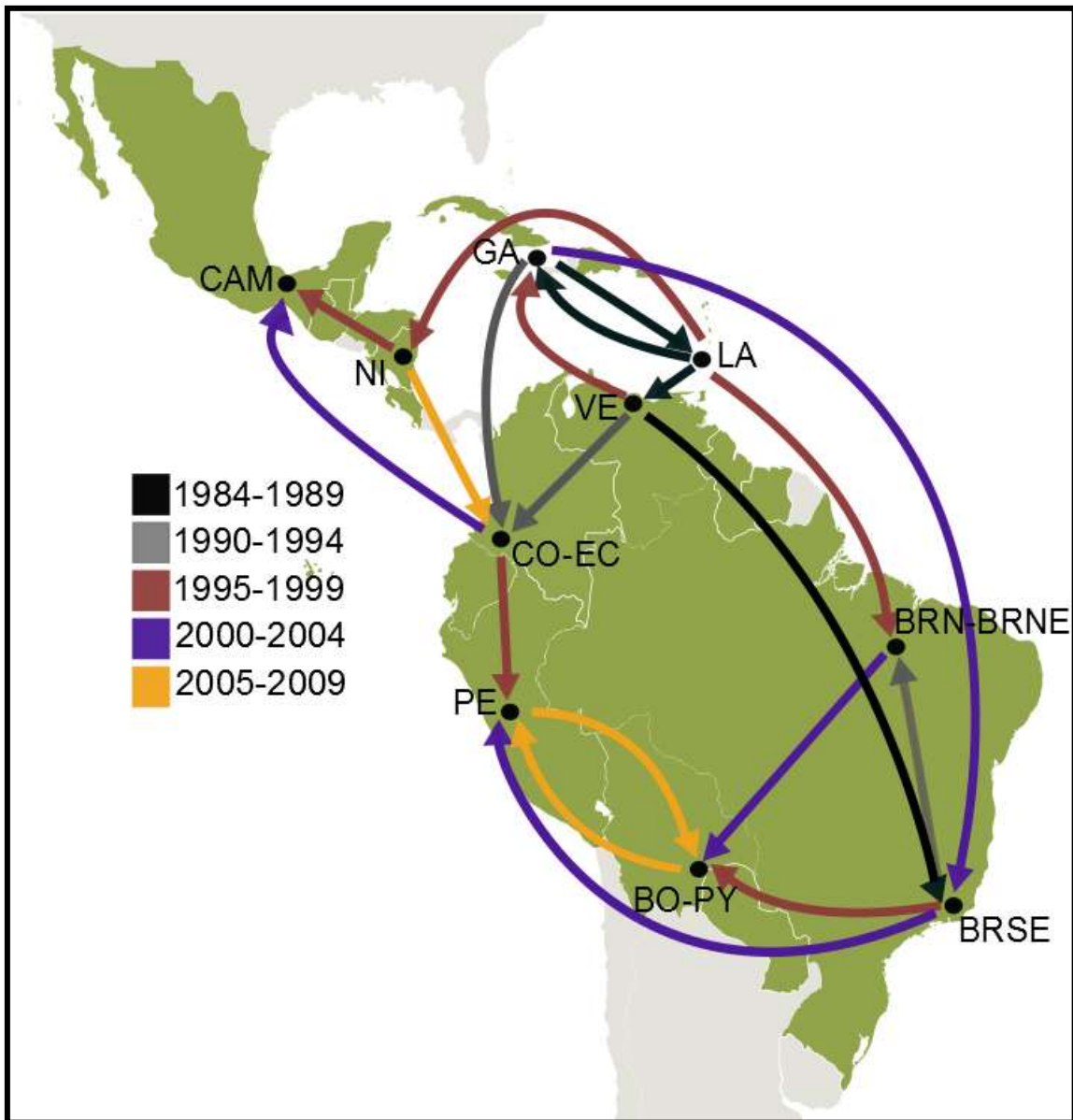
Bajo el modelo asimétrico, el análisis confirma que el DENV-2 genotipo AS/AM fue probablemente introducido en las Américas por las Antillas Mayores (GA) (probabilidad posterior de estado [PSP] = 0,69) y luego rápidamente difundido a las Antillas Menores (LA) y la costa noreste de América del Sur (Suriname [SR] y Guyana [GY]). A fines de 1980 el virus pasó a Brasil y Venezuela y por la mitad de la década de 1990 llegó a los demás países de América del Sur y entró en América Central desde el Caribe (Figura 4).

El análisis filogeográfico también revela que la difusión viral dentro de América del Sur se produjo a través de dos rutas principales: la primera (ruta occidental) fue a través de Venezuela (VE), Colombia (CO) y Ecuador (EC); mientras que la segunda (ruta oriental) comenzó en Brasil (BR), siguió por Bolivia (BO) y luego Paraguay (PY) (Figura 4). Ambas rutas parecen finalmente converger en Perú (PE) que recibe virus tanto de la ruta migratoria occidental como de la oriental.

Los vínculos de dispersión más significativos ( $BF > 3$ ) de DENV-2 genotipo AS/AM en América fueron entre: VE y CO/EC, las regiones brasileñas BRSE y Norte/Noreste, GA y LA, NI y CAM, CO/EC y PE, LA y GA, LA, y VE (Figura 5).

Las tasas de transición viral más altas fueron entre: GA y LA / SR / GY, desde el Caribe con SA1 y SA2, tanto SA1 como SA2 con PE y entre SA2 y CAM (Tabla 8 y Figura 6). La mayor tasa neta de migración viral (flujo de salida menos flujo de afluencia) fue para la región del Caribe (6,01), seguida por las regiones SA1 (0,88), SA2 (0,40), CAM (-0,84) y PE (-6,45).

Las distribuciones de PSP para las raíces de los principales linajes de DENV-2 genotipo AS/AM en las Américas obtenidos de los análisis filogeográficos con seis y diez estados geográficos fueron casi idénticos (Tabla 9).



**Figura 4:** Dinámica espacio-temporal de difusión de DENV-2 genotipo AS/AM en América entre 1984 y 2009. Las flechas entre las ubicaciones representan ramas en el árbol Bayesiano a los largo de las cuales se produce la transición de ubicación. El color de las flechas informa la fecha de las migraciones virales más tempranas entre cada par de localidades.



**Figura 5:** Vínculos de dispersión más significativos ( $BF > 3$ ) de DENV-2 genotipo AS/AM en América.

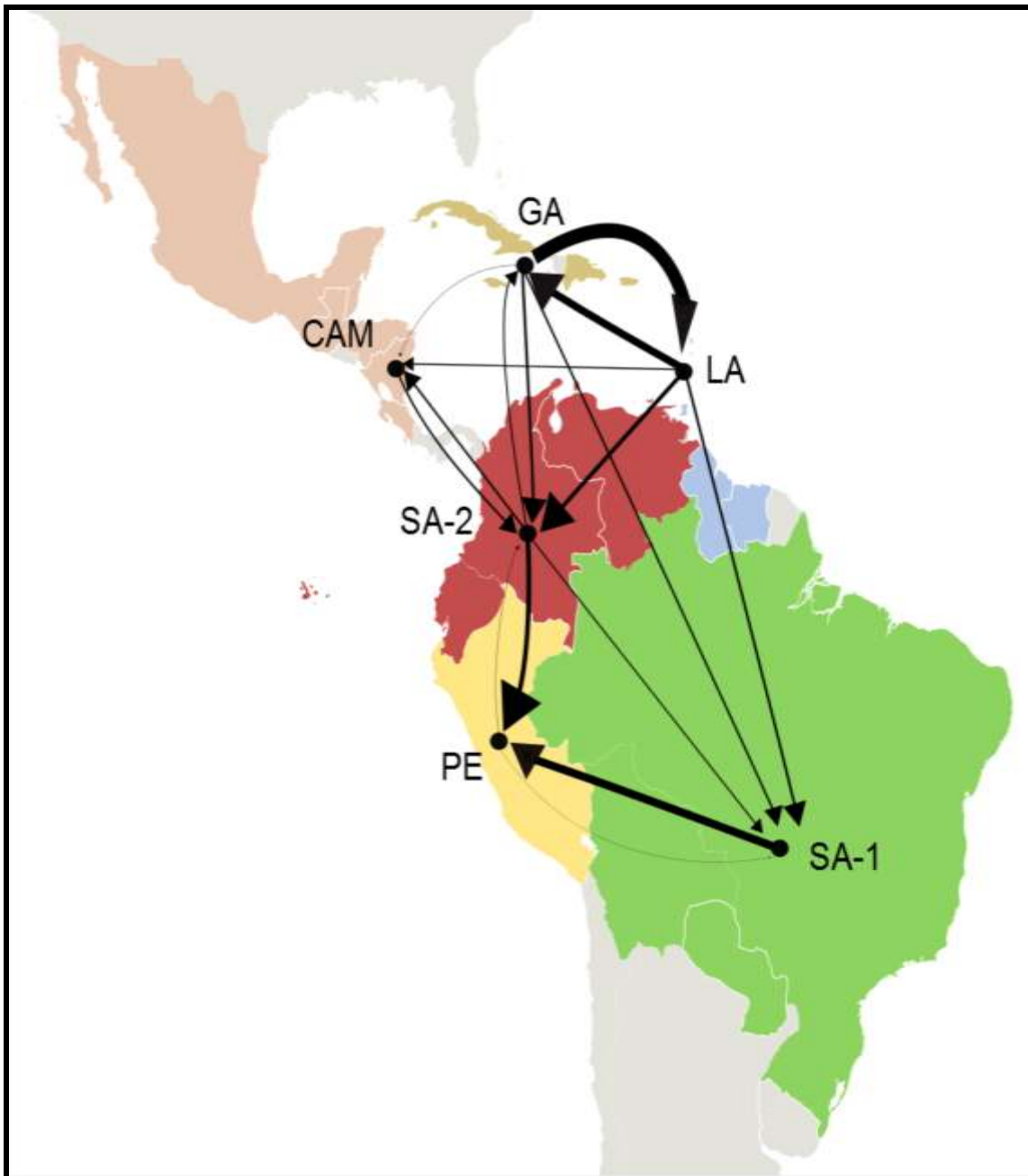
**Tabla 8** Tasas de migración viral entre estados geográficos

Desde	Hacia					
	GA	LA/SR/GY	SA-1	SA-2	PE	CEN
GA	-	7.26	1.14	1.52	0.03	0.21
LA/SR/GY	3.92	-	1.41	2.18	0.05	0.75
SA-1	0.08	0.07	-	0.08	4.13	0.03
SA-2	0.86	0.10	0.80	-	2.68	1.12
PE	0.05	0.02	0.13	0.24	-	0.02
CEN	0.06	0.05	0.03	1.11	0.04	-

**Tabla 9.** Distribuciones posteriores de probabilidad de estado para las raíces de los principales linajes de DENV-2 americanos, estimadas utilizando dos esquemas diferentes de agrupamiento de estados geográficos discretos.

Agrupamiento	MRCA	Probabilidad Posterior de Estado					
		GA	LA/SR/GY	SA1*	SA2*	CAM*	PE
6 estados geográficos	DENV-2 AS/AM (América)	0.71	0.29	0	0	0	0
	Linaje I	0	1	0	0	0	0
	Linaje II	1	0	0	0	0	0
	Linaje III	0.39	0.61	0	0	0	0
	Linaje IV	0.99	0.01	0	0	0	0
10 estados geográficos	DENV-2 AS/AM (América)	0.69	0.31	0	0	0	0
	Linaje I	0	1	0	0	0	0
	Linaje II	1	0	0	0	0	0
	Linaje III	0.36	0.63	0	0.01	0	0
	Linaje IV	0.98	0.02	0	0	0	0





**Figura 6:** Tasas de migración viral entre los lugares estimadas a través de conteo de saltos de Markov. El ancho de las flechas es proporcional a la tasa de transición viral. Las tasas de transición inferiores a 0,1 fueron excluidas por razones de claridad.

#### 4.5. Diversificación de DENV-2 genotipo AS/AM en América

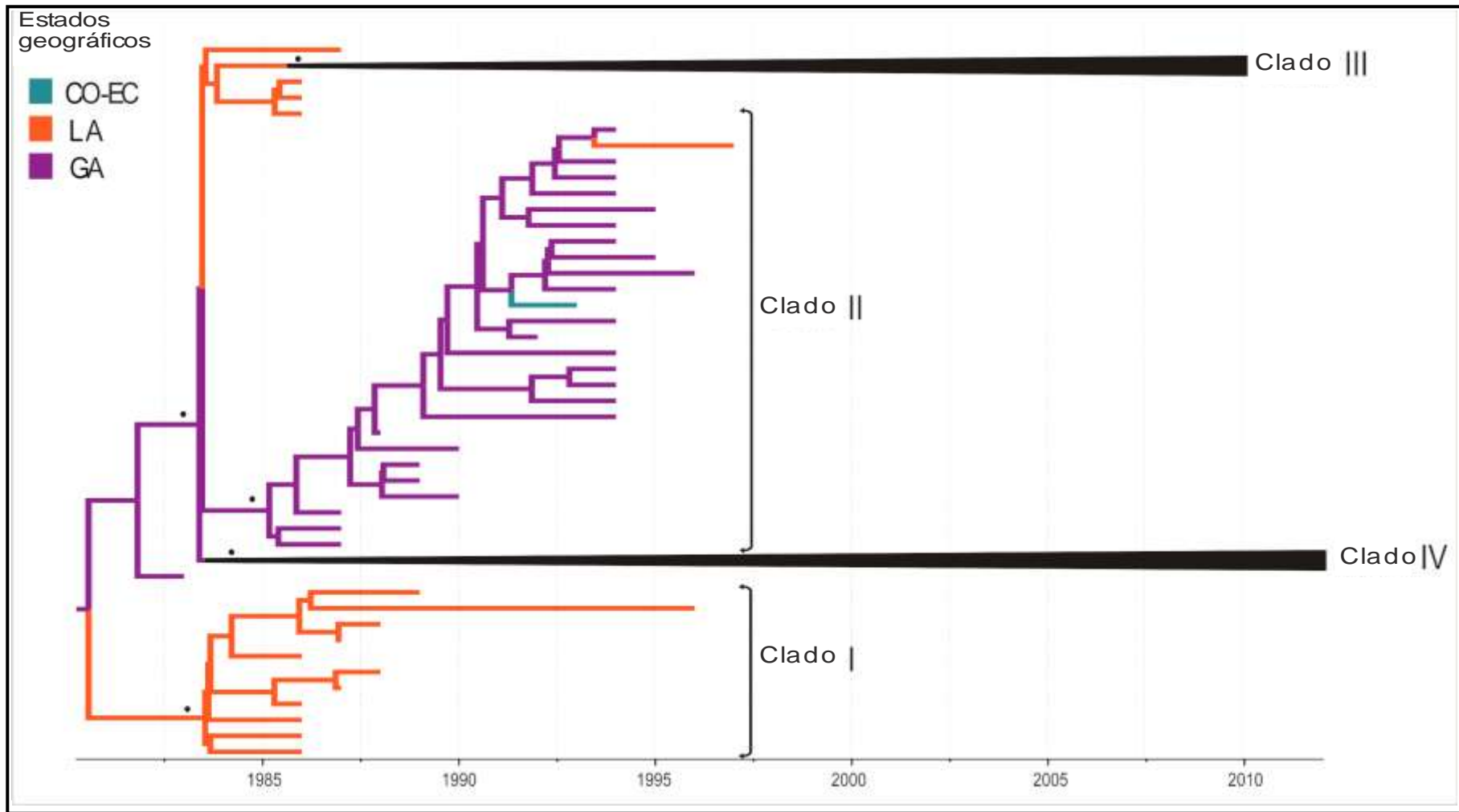
Los procesos evolutivos de DENV-2 genotipo AS/AM en América generaron al menos, cuatro grandes linajes altamente soportados (probabilidad posterior [PP]  $\geq 0,95$ ) linajes (I-IV) (Figura 7). Los linajes I y II fueron los clados más prevalentes en la región del Caribe durante la década de 1980 y principios de 1990. El Clado I probablemente surgió en LA/SR (PSP = 1) en 1984 (95% HPD: 1983-1985) y sólo comprende secuencias antiguas de Barbados, Trinidad y Tobago y Suriname aisladas durante 1986-1996. El Clado II probablemente surgió en Puerto Rico (PSP = 1) en 1985 (95% HPD: 1984-1986) y se compone casi exclusivamente de secuencias aisladas en esta isla durante 1987-1996. Los linajes I y II parecen extinguirse alrededor de la mitad de 1996 y fueron reemplazados por los linajes III y IV que fueron detectados por primera vez durante la década de los 90 y han sido responsables de las epidemias más importantes de DENV-2 en las Américas en los últimos 20 años.

#### 4.6. Escala de tiempo y rutas de migración del Clado III de DENV-2 genotipo AS/AM

El Clado III contiene secuencias de LA, PR, y América del Sur. Este clado muy probablemente surgió en el LA / SR / GY (PSP = 0,63) en el año 1986 ( 95 % HPD : 1985-1987) y se difundió por todo el Caribe y América del Sur, dando lugar a tres subclados específicos de la región ( III -LA , III -PR y III -SA ) ( Figura 8). El subclado III -LA surgió en 1988 . ( 95 % HPD : 1987-1990) y circuló en LA/GY entre 1990 y 2000 El subclado III- PR surgió en 1989 ( 95 % HPD : 1988-1991) y sólo contiene

secuencias aisladas en PR entre 1994 y 2010 . Este linaje co-circuló con los Clados II y IV- PR (ver abajo) en Puerto Rico durante el período de la alta prevalencia de DENV- 2 en 1994 y se convirtió en el clado viral dominante en el país desde mediados de 1990 (Bennett et al. 2006; McElroy et al. 2011).

El subclado III- SA comprende secuencias de América del Sur muestreadas entre 1990 y 2009 Este subclado probablemente se originó en VE en 1987 ( 95 % HPD : 1986-1988). y difundió en América del Sur a través de dos rutas principales concurrentes. En la ruta occidental, el virus emigró de VE en pasos secuenciales para llegar a CO en 1990 ( 95 % HPD : 1990-1991), EC en 1998 ( 95 % HPD : 1997-1999), y PE en el 2000 ( 95 % HPD : 1999 -2001 ). En la ruta este, el virus entró en la región sudeste de Brasil en 1988 ( 95 % HPD : 1986-1989) y fue también detectado en la region Norte/Nordeste de Brasil en 1991-1994 .Desde BR el virus migró al oeste siendo detectado en BO en 1997, en PE en el 2001 y en PY en el año 2005.



**Figura 7:** *Árbol bayesiano de máxima credibilidad de clado (MCC) para DENV-2 genotipo AS/AM. Se identifican cuatro grandes clados monofiléticos altamente apoyados (I-IV). El color de las ramas se corresponde con el estado geográfico más probable (la leyenda se muestra en el lado izquierdo) de su nodo parental inferido por análisis filogeográfico discreto. Para mayor claridad visual, los clados III y IV fueron colapsados (ver Fig.8 y Fig.9). Los valores de PP > 0,90 en los nodos principales están representados por (\*). Todas las longitudes de las ramas están dibujas a escala de años. La raíz del árbol se obtiene de forma automática bajo el supuesto de un reloj molecular relajado*

#### 4.7. *Escala de tiempo y rutas de migración del Clado IV de DENV-2 genotipo AS/AM*

El Clado IV es el linaje de DENV-2 más ampliamente difundido en la región y contiene secuencias del Caribe, América del Sur y América Central. Este clado muy probablemente se originó en PR (PSP = 0,95) en el año 1985 (95% HPD: 1984-1986) y fue exportado a LA/SR en el mismo año (95% HPD: 1984-1986). Desde esta ubicación, el virus se trasladó a Sudamérica y Centroamérica, dando lugar a cinco subclados regionales: cuatro de los cuales difundieron dentro de América del Sur a través de las rutas de migración oriental (IV-SA<sub>1</sub> y IV-SA<sub>4</sub>) y occidental (IV-SA<sub>2</sub> and IV-SA<sub>3</sub>) y uno difundió dentro de Centroamérica (IV-CAM) (Figura 9).

El subclado IV-SA<sub>1</sub> comprende secuencias aisladas de SR durante 1993-1999, el norte de Brasil en 2000-2006, PY durante el periodo 2001-2005, y en el BO durante 2003-2007. Este subclado probablemente surgió en el LA (PSP = 1) alrededor de 1992 (95% HPD: 1991-1993), se trasladó al norte de Brasil en 1999 (95% HPD: 1998-2000) y de BR a BO/PY en 2001 (95 % HPD: 2000-2001).

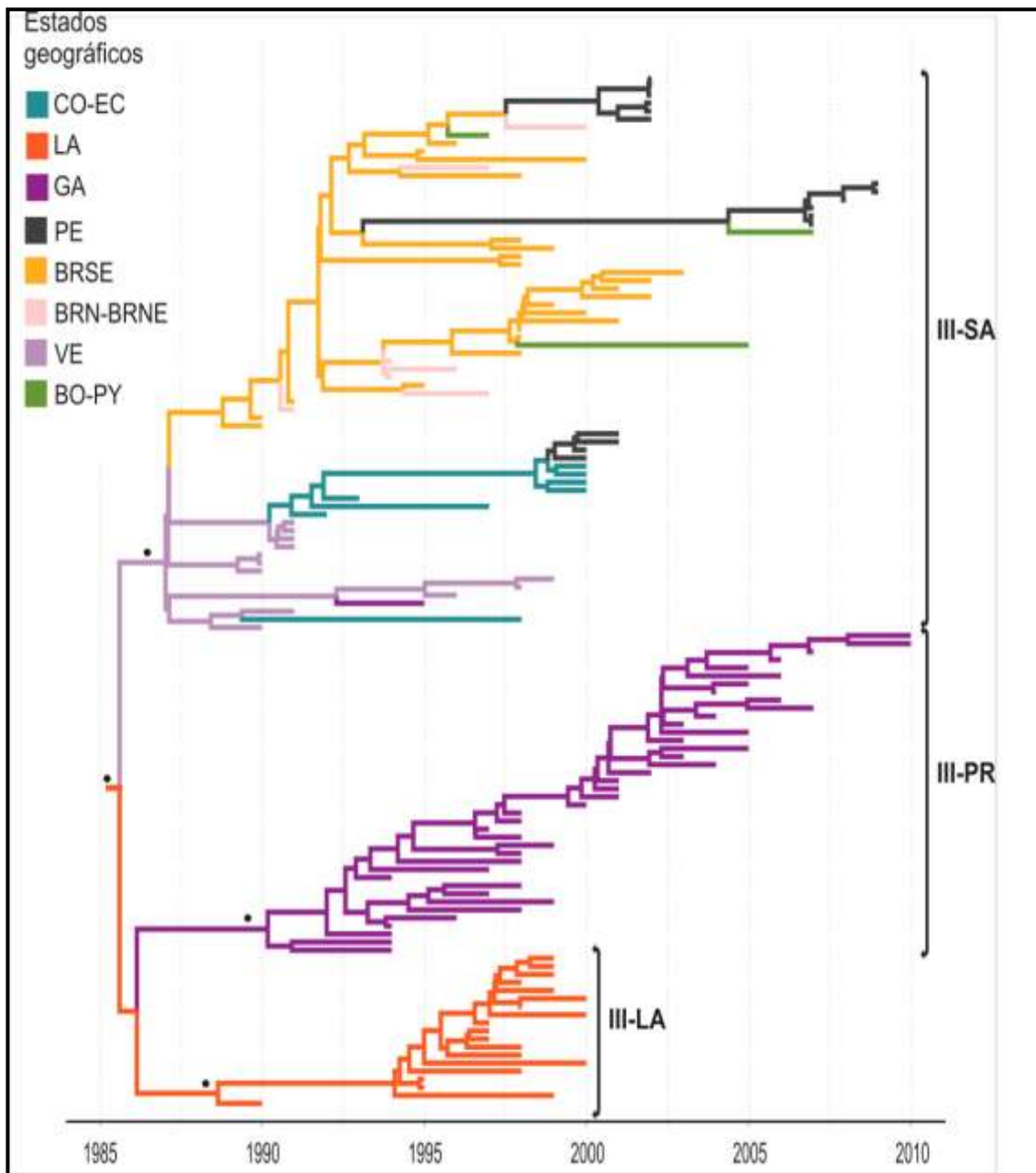
El subclado IV-SA<sub>4</sub> contiene secuencias aisladas en BR durante 2007-2011, en BO y PY en 2010 y en PE durante 2009-2012. Este subclado probablemente surgió con la introducción de virus desde GA (PSP = 0,98) a la región del sudeste brasileño (PSP = 0,55) en el año 2004 (95% HPD: 2003-2005). Desde esta región, el virus se trasladó a la región del noreste, así como a BO, PY y PE.

El subclado IV-SA<sub>2</sub> incluye secuencias aisladas en VE durante 1996-2008, en CO durante 1999-2004 y en PE durante 2011-2012. El origen de ésta subclado muy probablemente se remonta a VE

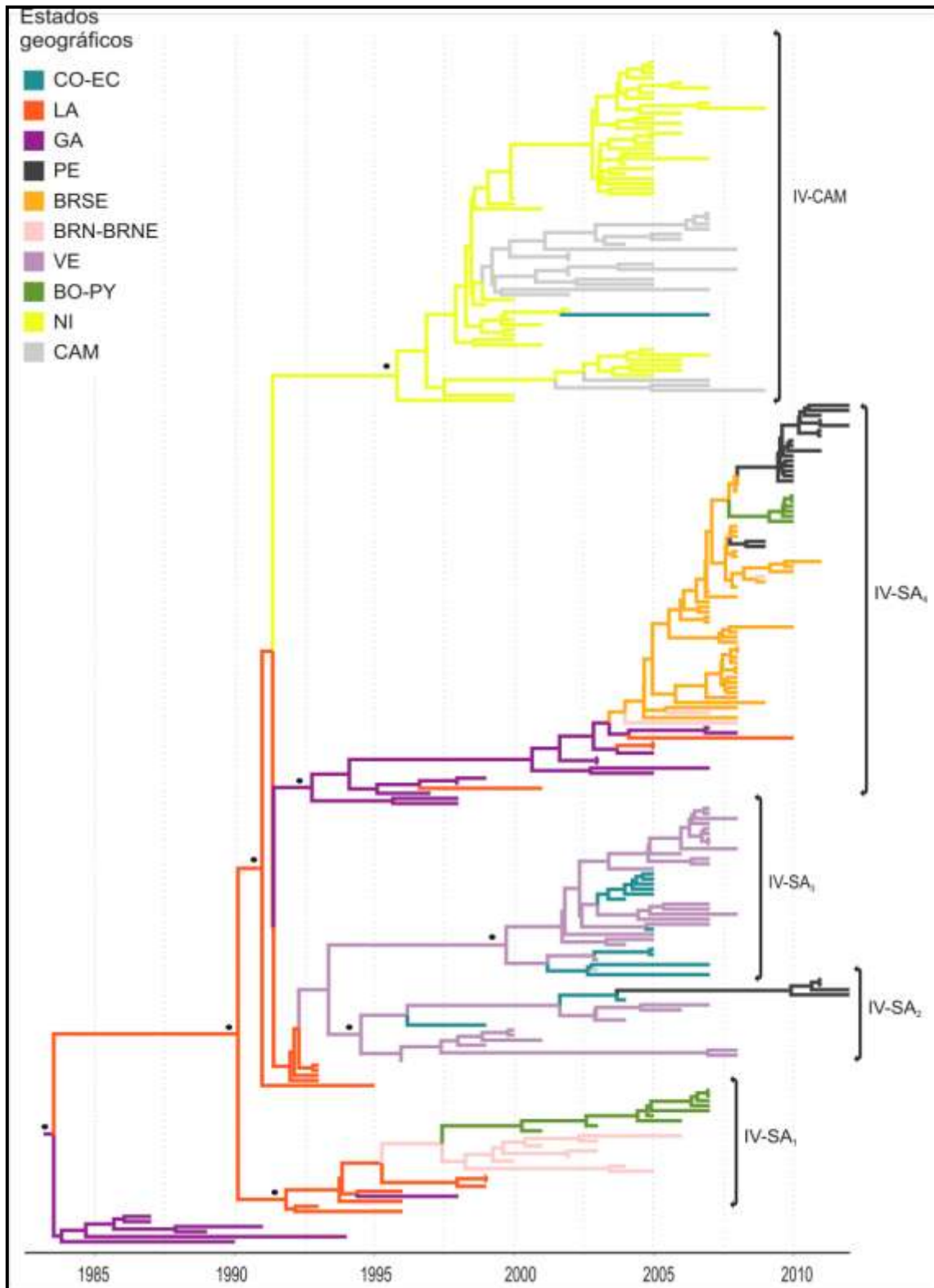
(PSP = 0,95) durante el año 1995 ( 95 % HPD : 1994-1996) . Desde VE el virus fue difundido a CO y desde CO el virus fue posteriormente introducido a PE .

El subclado IV-SA<sub>3</sub> incluye secuencias aisladas en VE durante 2003-2008 en CO durante 2004 y 2007 junto con una secuencia aislada en Costa Rica en 2003 . Este subclado tuvo su origen probablemente en VE (PSP = 0,78) en 1999 ( 95 % HPD : 1997-2001) y desde allí el virus difundió a CO y luego a Costa Rica .

Por último, el subclado IV-CAM contiene secuencias aisladas en Belice, Guatemala, Honduras, Nicaragua y México entre 1999 y 2009, junto con una secuencia muestreada en Colombia en el 2007 siendo el primer linaje de DENV- 2 AS/AM en establecerse y difundirse con éxito en Centroamérica. Este subclado fue probablemente el producto de la migración desde LA (PSP = 0,98) a NI (PSP = 0,97) en el año 1997 (95 % HPD : 1995-1998). Por su parte, Nicaragua contiene las secuencias más antiguas del subclado IV-CAM muestreadas en 1999-2000 y fue probablemente el epicentro de la difusión de éste linaje a otros países centroamericanos como México y Colombia. Existe evidencia de por lo menos una introducción exitosa de este linaje en México desde Nicaragua (PSP = 0,93) en torno a 1999 ( 95 % HPD : 1998-2000) .



**Figura 8:** Sub-árbol bayesiano de máxima credibilidad de clado (MCC) de DENV-2 genotipo AS/AM correspondiente al clado III. Se identifican tres grandes clados monofiléticos altamente apoyados dentro del clado III: III-PR, III-LA y III-SA. Para más detalles, véase la leyenda de la Figura 7.



**Figura 9:** Sub-árbol bayesiano de máxima credibilidad de clado (MCC) de DENV-2 genotipo AS/AM correspondiente al clado IV. Se identifican cinco grandes clados monofiléticos altamente apoyados dentro del clado IV: IV-SA<sub>1-4</sub> y IV-CAM. Para más detalles, véase la leyenda de la Figura 7.



## 5. Discusión

El análisis filogeográfico de 582 secuencias de DENV-2 genotipo AS / AM aisladas de 29 países de América en un período de 30 años confirma que la diversidad viral regional es resultado de una sola introducción de este genotipo en América alrededor de la década de 1980, seguido de una rápida dispersión espacial dentro del continente, de acuerdo con estudios anteriores (Allicock et al. 2012; Carrington et al. 2005). El análisis filogeográfico apoya un eje principal de difusión entre las Antillas Mayores y Menores y ejes secundarios que unen el Caribe con Sur y Centro América.

Las islas del Caribe también han sido declaradas la fuente inicial de las epidemias de DENV-1 y DENV-4 en las Américas (Allicock et al. 2012; Villabona-Arenas and Zanotto 2011; Villabona-Arenas and Zanotto 2013) y una etapa importante en la difusión de DENV-3 de América Central a América del Sur (Josélio M G Araújo et al. 2009; Josélio Maria Galvão de Araújo et al. 2012), lo cual indica que los eventos de migración DENV entre el Caribe y los territorios continentales son un fenómeno frecuente.

De acuerdo con los resultados presentados aquí, el Caribe ha actuado como un reservorio y fuente de todos los linajes de DENV-2 genotipo AS/AM que posteriormente difundieron a las regiones continentales; mientras que Brasil, Venezuela y Nicaragua se presentan como los principales centros de difusión secundaria de DENV-2 genotipo AS/AM a otros países del continente. Los resultados también indican una frecuente mezcla entre secuencias de las Antillas Menores y Surinam/Guyana lo que indica que éstos últimos países representan importantes puntos de tránsito para la difusión de DENV-2 desde el Caribe a América del Sur. El intenso flujo viral entre las Antillas Menores y Surinam/Guyana probablemente es facilitado por la proximidad geográfica de estas regiones (Allicock et al. 2012) así como por sus lazos lingüísticos y socio-económicos (Carrington et al. 2005). Por lo anterior, el patrón filogeográfico de DENV-2 en las Américas podría ser explicado por un modelo de transmisión fuente-sumidero de corta distancia en la que el virus se mueve hacia fuera desde un punto de partida que se encuentra en el Caribe

hacia regiones continentales cercanas que actúan como núcleos secundarios de diseminación, transmitiendo el virus a otros países continentales vecinos. Por el contrario, el movimiento en sentido opuesto de DENV-2 de la parte continental de América a los países del Caribe, parece ser muy reducido.

El análisis filogeográfico también reveló la existencia de dos rutas principales de difusión de DENV-2 genotipo AS/AM dentro de América del Sur. La primera ruta fue por Venezuela y el lado occidental de los Andes llegando a Colombia, Ecuador y Perú, mientras que la segunda ruta principalmente afectó el lado oriental de los Andes, con Brasil transmitiendo el virus a Bolivia, Paraguay y finalmente Perú.

Considerando que el intercambio viral entre Venezuela/Colombia/Ecuador y Brasil/Bolivia/Paraguay parece ser muy limitado, Perú es un importante sumidero y el punto de convergencia de las dos vías de difusión, recibiendo virus de Colombia/Ecuador a través de su frontera norte y de Brasil/Bolivia a través de su lado oriental. Un patrón muy similar de propagación viral se observó anteriormente para DENV-3 en América (Josélio M G Araújo et al. 2009; Josélio Maria Galvão de Araújo et al. 2012), apoyando la existencia de dos corredores preferenciales de difusión DENV dentro de Sudamérica comunes a todos los serotipos. Estas rutas pueden explicarse por la existencia de la cordillera de los Andes que corre de norte a sur a lo largo de la costa occidental del continente e impone una barrera geográfica importante para la difusión tanto humana como del vector entre los países de América del Sur que se encuentran en ambos lados.

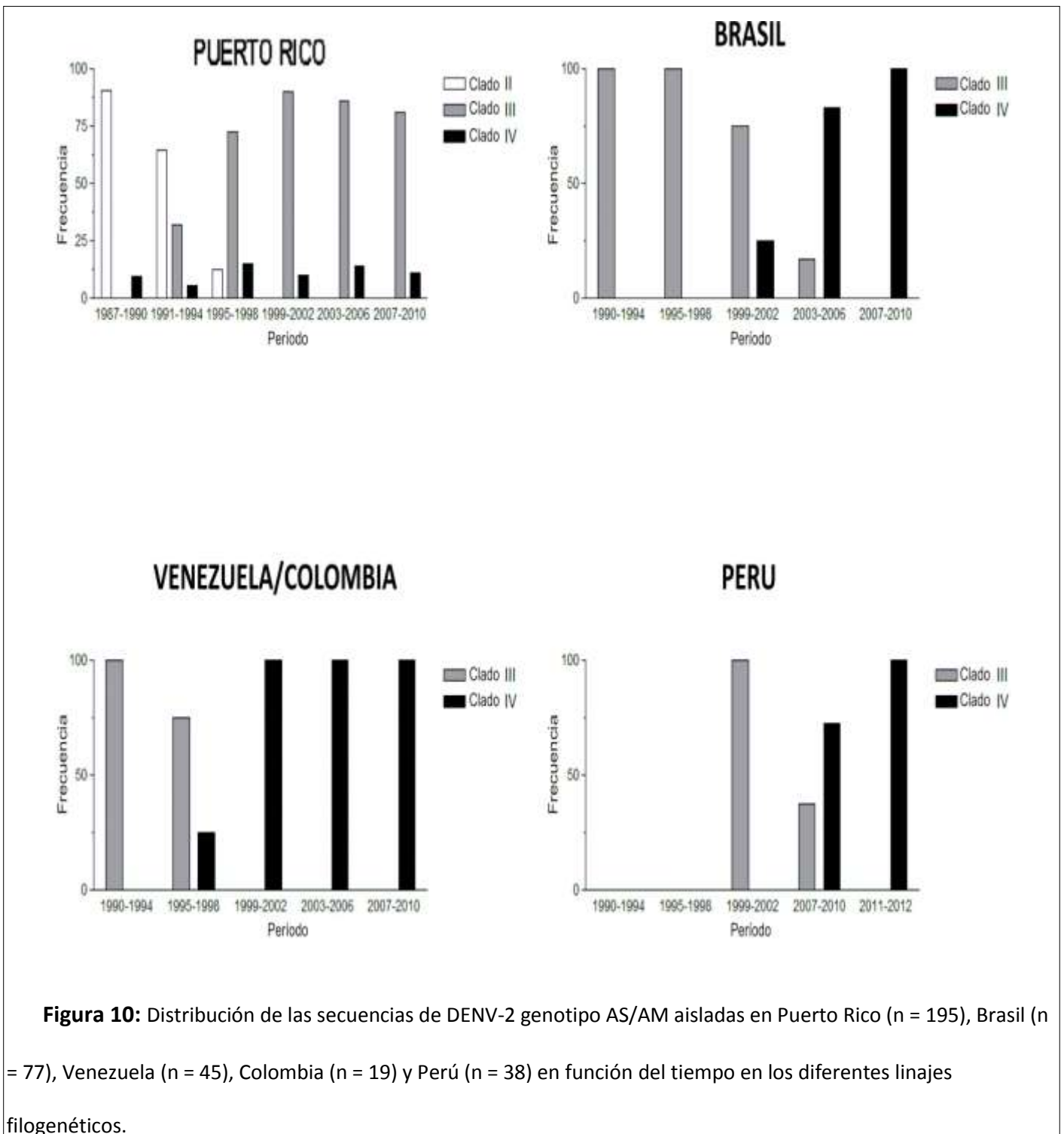
La diversidad genética de DENV-2 genotipo AS/AM que circula en las Américas puede ser organizada en cuatro grandes linajes genéticamente diferentes. Aunque todos los linajes surgieron en la misma región (Caribe) y en la misma época (~ 1985), difunden y se extinguen entre países y

regiones con dinámicas diferentes.. Los linajes I y II surgieron en las Antillas Menores y Puerto Rico, respectivamente, y fueron en su mayoría restringidos a la región del Caribe, donde predominaron hasta que fueron reemplazados por el Clado III en torno a la década de 1990. Este último clado probablemente surgió en las Antillas Menores, se convirtió en dominante en el Caribe y América del Sur durante la década de 1990 y persistió como el linaje predominante en Puerto Rico hasta el 2010. Por su parte, el Clado IV probablemente surgió en Puerto Rico y circuló en este país a bajo nivel hasta al menos 2007; momento en que se convirtió en el linaje dominante en América del Sur y Central desde principios/mitad de los años 2000 en adelante.

El fenómeno de reemplazo de linaje DENV-2 entre sucesivos brotes epidémicos ha sido una característica común en todos los países de América; sin embargo, se observa una diferencia clave entre Puerto Rico y los territorios continentales (Fig. 10). La evolución de DENV-2 en Puerto Rico se caracteriza por el largo período de co-circulación de dos o incluso tres linajes de genotipo AS/AM y esto se aprecia especialmente para los Clados III y IV los cuales fueron detectados simultáneamente en Puerto Rico por casi 15 años (1991-2007). La evolución de DENV-2 en los países de América del Sur, por el contrario, parece que caracterizarse por cortos periodos de superposición de clados virales y reemplazos de linaje más abruptos. Se encuentran pruebas de co-circulación de los Clados III y IV por sólo seis años en Venezuela (1993-1998), cinco años en Brasil (1999-2003), y un año en el Perú (2009); mientras que no existen indicios de co-circulación de diferentes linajes del genotipo AS/AM América Central.

Los resultados también sugieren que el tiempo de los eventos de reemplazo de linaje varían mucho entre los distintos países de América del Sur. El proceso de difusión los Clados III y IV de DENV-2 en América del Sur se inició en Venezuela y Brasil, y tomó unos 10 años hasta llegar a Perú por las rutas occidental y oriental. El Clado III probablemente llegó a Venezuela y Brasil alrededor de 1987-1989 y alcanzó Perú en 2000-2001; mientras que el Clado IV fue probablemente introducido en Venezuela y Brasil en torno a 1995-1997, llegando a Perú recién en el 2006-2009.

Una importante consecuencia de este lento proceso de difusión es que el reemplazo de linaje se produce mucho más tarde en Perú que en los países de origen (Venezuela y Brasil). Por lo anterior, Perú parecería ser un importante santuario de linajes de DENV-2 extinguidos en otros países de América del Sur. El Clado III, por ejemplo, no fue detectado en Perú hasta el año 2009, 6-10 años más tarde que en Venezuela (1999) y Brasil (2003). Es interesante resaltar que Perú fue también el último refugio del genotipo Americano de DENV-2 en las Américas, dónde se detectó hasta que año 2000 (Cruz et al. 2013).



Una cuestión fundamental es la contribución relativa de los procesos estocásticos y de las diferencias de aptitud entre las cepas virales en la difusión y extinción diferencial de los linajes de DENV-2. El Clado III se ha establecido como el linaje dominante de DENV-2 genotipo AS/AM en Puerto Rico en los últimos 15 años, desplazando al Clado II y prevaleciendo sobre el Clado IV; pero fue sustituido por el Clado IV en América del Sur desde la década del 2000 en adelante. Tal variación entre las regiones puede explicarse por procesos estocásticos a nivel poblacional asociados a las fluctuaciones temporales en la abundancia de los serotipos de DENV como se observa en Tailandia (Zhang et al. 2005). En Brasil, el Clado III se extinguió durante el período de predominancia de DENV-3 (2000-2006), mientras que el Clado IV fue probablemente introducido alrededor del 2005 y alimentó las epidemias en el próximo período de alta circulación de DENV-2 (2007-2011) (Drumond et al. 2013). En Puerto Rico, por el contrario, el Clado III fue capaz de persistir durante todo el período de alta circulación de DENV-3 (1999-2003) mediante su replicación en un área de refugio y volvió a surgir en la próxima temporada de alta circulación de DENV-2 (McElroy et al. 2011). Por lo tanto, los cuellos de botella poblacionales impuestos por las fluctuaciones temporales de la abundancia de los serotipos de DENV podría ser un factor importante que define la extinción de linajes intra-genotipo y los reemplazos, aunque sus efectos pueden variar según el país y el momento.

Una limitación importante de este tipo de estudios es el uso de un conjunto de datos muy sesgado dado que la población muestreada sólo comprende una pequeña fracción de todos los casos que ocurrieron de DENV-2 en las Américas en los últimos 30 años y los esfuerzos de muestreo responden a razones idiosincrásicas de los países que incluyen las políticas de salud pública y el interés en investigación lo cual conduce a desequilibrios importantes entre los países (Volz and Frost 2013).

Un muestreo adicional entre las localidades y a lo largo del tiempo permitiría estimaciones más precisas de: 1) la prevalencia, el momento de la introducción y la superposición temporal de

los diferentes clados virales en todos los países, y 2) la velocidad de los intercambios virales entre los países. Otros hallazgos del análisis, sin embargo, son bastante robustos a esta limitación, incluyendo: 1) el número y la ubicación de la raíz de los principales linajes de DENV-2 2) las principales vías de difusión y tasas de intercambio viral entre subregiones (Caribe, América del Sur y América Central), y 3) las diferencias de persistencia de los linaje de DENV-2 y la dinámica de sustitución a través de algunos países (Puerto Rico, Brasil, Perú y Venezuela).

En resumen, este trabajo muestra que la diversidad genética de DENV-2 genotipo AS/AM que circula en las Américas en los últimos 30 años se puede organizar en por lo menos cuatro grandes linajes genéticamente distintos. Las islas del Caribe, junto con Suriname y Guyana han sido la fuente principal de los linajes de DENV-2 difundidos en las Américas; mientras que Venezuela, Brasil y Nicaragua parecen ser centros importantes de la difusión viral a otros países del continente. Aunque todos los linajes de DENV-2 surgieron en la región del Caribe en torno a la década de 1980, se difundieron y se extinguieron con dinámicas muy diferentes. La vigilancia molecular continua de las epidemias de DENV en las islas del Caribe y la costa norte de América del Sur puede contribuir a identificar nuevos clados de DENV-2 con el potencial de causar futuras epidemias en la región.

## 6. Bibliografía

- Allicock, Orchid M, Philippe Lemey, Andrew J Tatem, Oliver G Pybus, Shannon N Bennett, Brandi A Mueller, Marc A Suchard, Jerome E Foster, Andrew Rambaut, and Christine V F Carrington. 2012. "Phylogeography and Population Dynamics of Dengue Viruses in the Americas." *Molecular Biology and Evolution* 29 (6): 1533–43. doi:10.1093/molbev/msr320.
- Altschul, S F, W Gish, W Miller, E W Myers, and D J Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Altschul, S F, T L Madden, A A Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and D J Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs." *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402.
- Añez, Germán, Maria E. Morales-Betoulle, and Maria Rios. 2011. "Circulation of Different Lineages of Dengue Virus Type 2 in Central America, Their Evolutionary Time-Scale and Selection Pressure Analysis." *PLoS ONE* 6 (11): e27459. doi:10.1371/journal.pone.0027459.
- Anisimova, Maria, and Olivier Gascuel. 2006. "Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative." *Systematic Biology* 55 (4): 539–52. doi:10.1080/10635150600755453.
- Aquino, Jose D J Diaz, Wei-Feng Tang, Ryoichi Ishii, Tetsuro Ono, Yuki Eshita, Hiroshi Aono, and Yoshihiro Makino. 2008. "Molecular Epidemiology of Dengue Virus Serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: The Association of Viral Clade Introductions with Shifting Serotype Dominance." *Virus Research* 137 (2): 266–70. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.011.
- Araújo, Josélio Maria Galvão de, Gonzalo Bello, Hector Romero, and Rita Maria Ribeiro Nogueira. 2012. "Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil." *PLoS Negl Trop Dis* 6 (9): e1784. doi:10.1371/journal.pntd.0001784.
- Araújo, Josélio M G, Rita M R Nogueira, Hermann G Schatzmayr, Paolo M de A Zanotto, and Gonzalo Bello. 2009. "Phylogeography and Evolutionary History of Dengue Virus Type 3." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 9 (4): 716–25. doi:10.1016/j.meegid.2008.10.005.
- Armstrong, P M, and R Rico-Hesse. 2001. "Differential Susceptibility of *Aedes Aegypti* to Infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 1 (2): 159–68.
- Ashburn, Percy Moreau, and Charles Franklin Craig. 1907. *Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue Fever*.



- Avice, J C, J Arnold, R M Ball, E Bermingham, T Lamb, J E Neigel, C A Reeb, and N C Saunders. 1987. "Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics." *Annual Review of Ecology and Systematics* 18 (1): 489–522. doi:10.1146/annurev.es.18.110187.002421.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography, the History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge, EUA.
- Ayala, F J. 1997. "Vagaries of the Molecular Clock." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15): 7776–83.
- Baele, Guy, Philippe Lemey, Trevor Bedford, Andrew Rambaut, Marc A. Suchard, and Alexander V. Alekseyenko. 2012. "Improving the Accuracy of Demographic and Molecular Clock Model Comparison While Accommodating Phylogenetic Uncertainty." *Molecular Biology and Evolution*, March, mss084. doi:10.1093/molbev/mss084.
- Beaumont, M A. 1999. "Detecting Population Expansion and Decline Using Microsatellites." *Genetics* 153 (4): 2013–29.
- Bennett, Shannon N, Edward C Holmes, Maritza Chirivella, Dania M Rodriguez, Manuela Beltran, Vance Vorndam, Duane J Gubler, and W Owen McMillan. 2003. "Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus." *Molecular Biology and Evolution* 20 (10): 1650–58. doi:10.1093/molbev/msg182.
- . 2006. "Molecular Evolution of Dengue 2 Virus in Puerto Rico: Positive Selection in the Viral Envelope Accompanies Clade Reintroduction." *The Journal of General Virology* 87 (Pt 4): 885–93. doi:10.1099/vir.0.81309-0.
- Benson, Dennis A, Ilene Karsch-Mizrachi, David J Lipman, James Ostell, and David L Wheeler. 2008. "GenBank." *Nucleic Acids Research* 36 (Database issue): D25–30. doi:10.1093/nar/gkm929.
- Bermingham, Eldredge, and John C. Avice. 1986. "Molecular Zoogeography of Freshwater Fishes in the Southeastern United States." *Genetics* 113 (4): 939–65.
- Bielejec, Filip, Andrew Rambaut, Marc A. Suchard, and Philippe Lemey. 2011. "SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics." *Bioinformatics* 27 (20): 2910–12. doi:10.1093/bioinformatics/btr481.
- Bloomquist, Erik W, Philippe Lemey, and Marc A Suchard. 2010. "Three Roads Diverged? Routes to Phylogeographic Inference." *Trends in Ecology & Evolution* 25 (11): 626–32. doi:10.1016/j.tree.2010.08.010.
- Britten, R J. 1986. "Rates of DNA Sequence Evolution Differ between Taxonomic Groups." *Science (New York, N.Y.)* 231 (4744): 1393–98.
- Calisher, C H, N Karabatsos, J M Dalrymple, R E Shope, J S Porterfield, E G Westaway, and W E Brandt. 1989. "Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-

- Neutralization Tests with Polyclonal Antisera." *The Journal of General Virology* 70 ( Pt 1) (January): 37–43.
- Carey, Donald E. 1971. "Chikungunya and Dengue: A Case of Mistaken Identity?" *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* XXVI (3): 243–62. doi:10.1093/jhmas/XXVI.3.243.
- Carrillo-Valenzo, Erik, Rogelio Danis-Lozano, Jorge X Velasco-Hernández, Gilma Sánchez-Burgos, Celia Alpuche, Irma López, Claudia Rosales, et al. 2010. "Evolution of Dengue Virus in Mexico Is Characterized by Frequent Lineage Replacement." *Archives of Virology* 155 (9): 1401–12. doi:10.1007/s00705-010-0721-1.
- Carrington, Christine V F, Jerome E Foster, Oliver G Pybus, Shannon N Bennett, and Edward C Holmes. 2005. "Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas." *Journal of Virology* 79 (23): 14680–87. doi:10.1128/JVI.79.23.14680-14687.2005.
- Chambers, T J, R C Weir, A Grakoui, D W McCourt, J F Bazan, R J Fletterick, and C M Rice. 1990. "Evidence That the N-Terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 from Yellow Fever Virus Is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (22): 8898–8902.
- Chang, Gwong-Jen J, Goro Kuno, David E Purdy, and Brent S Davis. 2004. "Recent Advancement in Flavivirus Vaccine Development." *Expert Review of Vaccines* 3 (2): 199–220. doi:10.1586/14760584.3.2.199.
- Chitophers, S. 1960. "Aedes Aegypti (L.) the Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure.", xii + 739 pp. CABDirect2.
- Cologna, Raymond, Philip M Armstrong, and Rebeca Rico-Hesse. 2005. "Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes." *Journal of Virology* 79 (2): 853–59. doi:10.1128/JVI.79.2.853-859.2005.
- Cologna, Raymond, and Rebeca Rico-Hesse. 2003. "American Genotype Structures Decrease Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells." *Journal of Virology* 77 (7): 3929–38.
- Cruz, Cristhopher D, Brett M Forshey, Diana S Juarez, Carolina Guevara, Mariana Leguia, Tadeusz J Kochel, and Eric S Halsey. 2013. "Molecular Epidemiology of American/Asian Genotype DENV-2 in Peru." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 18 (August): 220–28. doi:10.1016/j.meegid.2013.04.029.
- Diallo, Mawlouth, Amadou A Sall, Abelardo C Moncayo, Yamar Ba, Zoraida Fernandez, Diana Ortiz, Lark L Coffey, Christian Mathiot, Robert B Tesh, and Scott C Weaver. 2005. "Potential Role

of Sylvatic and Domestic African Mosquito Species in Dengue Emergence." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (2): 445–49.

DJ, Gubler. 1997. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem." In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, edited by Editors Gubler DJ, Kuno G, 1–22. New York: CAB International.

Drake, J W. 1993. "Rates of Spontaneous Mutation among RNA Viruses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9): 4171–75.

Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus. 2005. "Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences." *Molecular Biology and Evolution* 22 (5): 1185–92. doi:10.1093/molbev/msi103.

Drummond, Alexei J, Simon Y. W Ho, Matthew J Phillips, and Andrew Rambaut. 2006. "Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence." *PLoS Biol* 4 (5): e88. doi:10.1371/journal.pbio.0040088.

Drummond, Alexei J., and Andrew Rambaut. 2007. "BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees." *BMC Evolutionary Biology* 7 (1): 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214.

Drummond, Alexei, Oliver G Pybus, and Andrew Rambaut. 2003. "Inference of Viral Evolutionary Rates from Molecular Sequences." *Advances in Parasitology* 54: 331–58.

Drummond, Betânia Paiva, Adriano Mondini, Diane J. Schmidt, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni, Irene Bosch, and Maurício Lacerda Nogueira. 2013. "Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization." *PLoS ONE* 8 (3): e59422. doi:10.1371/journal.pone.0059422.

Edwards, Ceiridwen J., Marc A. Suchard, Philippe Lemey, John J. Welch, Ian Barnes, Tara L. Fulton, Ross Barnett, et al. 2011. "Ancient Hybridization and an Irish Origin for the Modern Polar Bear Matriline." *Current Biology* 21 (15): 1251–58. doi:10.1016/j.cub.2011.05.058.

Edwards, FW. *Genera Insectorum. Diptera, Fam. Culicidae*. Fascicle 194. Brussels: Desmet-Verteneuil.

Elena, S F, R Sanjuán, A V Bordería, and P E Turner. 2001. "Transmission Bottlenecks and the Evolution of Fitness in Rapidly Evolving RNA Viruses." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 1 (1): 41–48.

Faria, Nieli Rodrigues da Costa, Rita Maria Ribeiro Nogueira, Ana Maria Bispo de Filippis, Jaqueline Bastos Santos Simões, Fernanda de Bruycker Nogueira, Monique da Rocha Queiroz Lima, and Flavia Barreto dos Santos. 2013. "Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (3): e2095. doi:10.1371/journal.pntd.0002095.

- Faria, Nuno Rodrigues, Marc A Suchard, Andrew Rambaut, and Philippe Lemey. 2011. "Toward a Quantitative Understanding of Viral Phylogeography." *Current Opinion in Virology* 1 (5): 423–29. doi:10.1016/j.coviro.2011.10.003.
- Figueroa, R, and C Ramos. 2000. "Dengue Virus (serotype 3) Circulation in Endemic Countries and Its Reappearance in America." *Archives of Medical Research* 31 (4): 429–30.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory Of Natural Selection*. At The Clarendon Press. <http://archive.org/details/geneticaltheoryo031631mbp>.
- Foster, Jerome E, Shannon N Bennett, Christine V F Carrington, Helen Vaughan, and W Owen McMillan. 2004. "Phylogeography and Molecular Evolution of Dengue 2 in the Caribbean Basin, 1981-2000." *Virology* 324 (1): 48–59. doi:10.1016/j.virol.2004.03.020.
- Goncalvez, Ana P, Ananias A Escalante, Flor H Pujol, Juan E Ludert, Duilia Tovar, Rosa A Salas, and Ferdinando Liprandi. 2002. "Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1." *Virology* 303 (1): 110–19.
- Griffiths, R. C., and Simon Tavaré. 1994. "Ancestral Inference in Population Genetics." *Statistical Science* 9 (3): 307–19. doi:10.1214/ss/1177010378.
- Gubler, D J. 1989. "Aedes Aegypti and Aedes Aegypti-Borne Disease Control in the 1990s: Top down or Bottom Up. Charles Franklin Craig Lecture." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40 (6): 571–78.
- Gubler, Duane J. 2011. "Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century." *Tropical Medicine and Health* 39 (4 Suppl): 3–11. doi:10.2149/tmh.2011-S05.
- Gubler, Duane J. 1998. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (3): 480–96.
- Guindon, Stéphane, and Olivier Gascuel. 2003. "A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood." *Systematic Biology* 52 (5): 696–704.
- Guindon, Stephane, Franck Lethiec, Patrice Duroux, and Olivier Gascuel. 2005. "PHYML Online--a Web Server for Fast Maximum Likelihood-Based Phylogenetic Inference." *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue): W557–W559. doi:10.1093/nar/gki352.
- Guzman, María G, and Gustavo Kouri. 2003. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Lessons and Challenges." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 27 (1): 1–13.
- H. Shimodaira and M. Hasegawa. 1999. "Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference." *Molecular Biology and Evolution* 16 (8): 1114–16.
- Halstead, Scott B, and Jacqueline Deen. 2002. "The Future of Dengue Vaccines." *Lancet* 360 (9341): 1243–45. doi:10.1016/S0140-6736(02)11276-1.

- Halstead, Scott B. 2006. "Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do They Differ?" *Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health* 20 (6): 407–15.
- Hasegawa, M, and H Kishino. 1989. "Heterogeneity of Tempo and Mode of Mitochondrial DNA Evolution among Mammalian Orders." *Idengaku Zasshi* 64 (4): 243–58.
- Hasegawa, M, H Kishino, and T Yano. 1985. "Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA." *Journal of Molecular Evolution* 22 (2): 160–74.
- Heinz, Franz X, and Steven L Allison. 2001. "The Machinery for Flavivirus Fusion with Host Cell Membranes." *Current Opinion in Microbiology* 4 (4): 450–55. doi:10.1016/S1369-5274(00)00234-4.
- Henchal, E A, and J R Putnak. 1990. "The Dengue Viruses." *Clinical Microbiology Reviews* 3 (4): 376–96.
- Hirsch, A. 1883. "Dengue, a Comparatively New Disease: Its Symptoms." In *Handbook of Geographical and Historical Pathology* 1, 55–81.
- Holmes, E C, M Worobey, and A Rambaut. 1999. "Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus." *Molecular Biology and Evolution* 16 (3): 405–9.
- Holmes, Edward C, and S Susanna Twiddy. 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.
- Hotta, S. 1952. "Experimental Studies on Dengue. I. Isolation, Identification and Modification of the Virus." *The Journal of Infectious Diseases* 90 (1): 1–9.
- Howe, G. M. 1977. "A World Geography of Human Diseases." Academic Press Inc. (London) Ltd., 24-28 Oval Road, London NW1 7DX.
- Hudson, R. R. 1990. "Gene Genealogies and the Coalescent Process."
- Huhtamo, E, G Comach, G Sierra, D E Camacho, T Sironen, O Vapalahti, and N Y Uzcátegui. 2013. "Diversity and Composition of Dengue Virus Type 2 in Venezuela." *Epidemiology and Infection* 141 (9): 1816–22. doi:10.1017/S0950268812002324.
- Katoh, Kazutaka, and Hiroyuki Toh. 2008. "Recent Developments in the MAFFT Multiple Sequence Alignment Program." *Briefings in Bioinformatics* 9 (4): 286–98. doi:10.1093/bib/bbn013.
- Kimura, M. 1980. "A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences." *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–20.
- Kingman, J. F. C. 1982a. "The Coalescent." In *Stochastic Processes and Their Applications*, 13:235–48.

- . 1982b. "On the Genealogy of Large Populations." In *Journal of Applied Probability*, 19:27–43.
- . 1982c. "Exchangeability and the Evolution of Large Populations." *Exchangeability in Probability and Statistics, North-Holland, Amsterdam-New York*, 97–12.
- Kinney, R M, and C Y Huang. 2001. "Development of New Vaccines against Dengue Fever and Japanese Encephalitis." *Intervirology* 44 (2-3): 176–97. doi:50045.
- Kishino, H, J L Thorne, and W J Bruno. 2001. "Performance of a Divergence Time Estimation Method under a Probabilistic Model of Rate Evolution." *Molecular Biology and Evolution* 18 (3): 352–61.
- Klungthong, Chonticha, Chunlin Zhang, Mammen P Mammen Jr, Sukathida Ubol, and Edward C Holmes. 2004. "The Molecular Epidemiology of Dengue Virus Serotype 4 in Bangkok, Thailand." *Virology* 329 (1): 168–79. doi:10.1016/j.virol.2004.08.003.
- Konishi, Eiji, and Goro Kuno. 2013. "In Memoriam: Susumu Hotta (1918–2011)." *Emerging Infectious Diseases* 19 (5). doi:10.3201/eid1905.IM0986. [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/5/im-0986\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/5/im-0986_article.htm).
- Kouri, G. P., M. G. Guzman, J. R. Bravo, and C. Triana. 1989. "Dengue Haemorrhagic Fever/dengue Shock Syndrome: Lessons from the Cuban Epidemic, 1981." *Bulletin of the World Health Organization* 67 (4): 375–80.
- Lanciotti, R S, D J Gubler, and D W Trent. 1997. "Molecular Evolution and Phylogeny of Dengue-4 Viruses." *The Journal of General Virology* 78 ( Pt 9) (September): 2279–84.
- Lemey, Philippe, Andrew Rambaut, Alexei J. Drummond, and Marc A. Suchard. 2009. "Bayesian Phylogeography Finds Its Roots." *PLoS Comput Biol* 5 (9): e1000520. doi:10.1371/journal.pcbi.1000520.
- Lemey, Philippe, Andrew Rambaut, John J. Welch, and Marc A. Suchard. 2010. "Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time." *Molecular Biology and Evolution* 27 (8): 1877–85. doi:10.1093/molbev/msq067.
- Lemmon, Alan R., and Emily Moriarty Lemmon. 2008. "A Likelihood Framework for Estimating Phylogeographic History on a Continuous Landscape." *Systematic Biology* 57 (4): 544–61. doi:10.1080/10635150802304761.
- Levine, Bruce E. 2008. "How Teenage Rebellion Has Become a Mental Illness." *AlterNet*.
- Lewis, J A, G J Chang, R S Lanciotti, R M Kinney, L W Mayer, and D W Trent. 1993. "Phylogenetic Relationships of Dengue-2 Viruses." *Virology* 197 (1): 216–24. doi:10.1006/viro.1993.1582.
- Li, H, S Clum, S You, K E Ebner, and R Padmanabhan. 1999. "The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue

- Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids." *Journal of Virology* 73 (4): 3108–16.
- Li, Weizhong, and Adam Godzik. 2006. "Cd-Hit: A Fast Program for Clustering and Comparing Large Sets of Protein or Nucleotide Sequences." *Bioinformatics* 22 (13): 1658–59. doi:10.1093/bioinformatics/btl158.
- Lindenbach, Brett D, and Charles M Rice. 2003. "Molecular Biology of Flaviviruses." *Advances in Virus Research* 59: 23–61.
- Ma, Lixin, Christopher T. Jones, Teresa D. Groesch, Richard J. Kuhn, and Carol Beth Post. 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): 3414–19. doi:10.1073/pnas.0305892101.
- McElroy, Kate L., Gilberto A. Santiago, Niall J. Lennon, Bruce W. Birren, Matthew R. Henn, and Jorge L. Munoz-Jordan. 2011. "Endurance, Refuge, and Reemergence of Dengue Virus Type 2, Puerto Rico, 1986-2007." *Emerging Infectious Diseases* 17 (1): 64–71. doi:10.3201/eid1701.100961.
- Méndez, Jairo A., José A. Usme-Ciro, Cristina Domingo, Gloria J. Rey, Juan A. Sánchez, Antonio Tenorio, and Juan C. Gallego-Gomez. 2012. "Phylogenetic Reconstruction of Dengue Virus Type 2 in Colombia." *Virology Journal* 9 (1): 64. doi:10.1186/1743-422X-9-64.
- Minin, Vladimir N, and Marc A Suchard. 2008. "Counting Labeled Transitions in Continuous-Time Markov Models of Evolution." *Journal of Mathematical Biology* 56 (3): 391–412. doi:10.1007/s00285-007-0120-8.
- Muylaert, I R, R Galler, and C M Rice. 1997. "Genetic Analysis of the Yellow Fever Virus NS1 Protein: Identification of a Temperature-Sensitive Mutation Which Blocks RNA Accumulation." *Journal of Virology* 71 (1): 291–98.
- Myat Thu, Hlaing, Kym Lowry, Limin Jiang, Thaug Hlaing, Edward C Holmes, and John Aaskov. 2005. "Lineage Extinction and Replacement in Dengue Type 1 Virus Populations Are due to Stochastic Events rather than to Natural Selection." *Virology* 336 (2): 163–72. doi:10.1016/j.virol.2005.03.018.
- Nobuchi, H. 1979. "The Symptoms of a Dengue-like Illness Recorded in a Chinese Medical Encyclopedia." *Kanpo Rinsho* 26: 422–25.
- Nomaguchi, Masako, Matt Ackermann, Changsuek Yon, Shihyun You, and R. Padmanbhan. 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): 8831–42. doi:10.1128/JVI.77.16.8831-8842.2003.

- Nowak, Thomas, and Gerd Wengler. 1987. "Analysis of Disulfides Present in the Membrane Proteins of the West Nile Flavivirus." *Virology* 156 (1): 127–37. doi:10.1016/0042-6822(87)90443-0.
- O'Brien, John D., Vladimir N. Minin, and Marc A. Suchard. 2009. "Learning to Count: Robust Estimates for Labeled Distances between Molecular Sequences." *Molecular Biology and Evolution* 26 (4): 801–14. doi:10.1093/molbev/msp003.
- Oliveira, Michelli Faria, Josélio Maria Galvão Araújo, Orlando Costa Ferreira, Davis Fernandes Ferreira, Dirce Bonfim Lima, Flavia Barreto Santos, Hermann Gonçalves Schatzmayr, Amilcar Tanuri, and Rita Maria Ribeiro Nogueira. 2010. "Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil." *Emerging Infectious Diseases* 16 (3): 576–78. doi:10.3201/eid1603.090996.
- "OMS | Dengue Y Dengue Hemorrágico." 2014. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>.
- Pan American Health Organization (PAHO). 2002. "Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by Country and Subregion)." [http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2010/dengue\\_regional\\_data\\_2002.pdf](http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2010/dengue_regional_data_2002.pdf).
- . 2011. "Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue Hemorrhagic Fever (DS) in the Americas, by Country: Figures for 2010." [http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2011/dengue\\_cases\\_2010\\_May\\_20.pdf](http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2011/dengue_cases_2010_May_20.pdf).
- . 2014a. "Descripción de La Situación Epidemiológica Actual Del Dengue En Las Américas." March 13. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4494%3Adesc-ripciun-de-la-situaciun-epidemiologica-actual-del-dengue-en-las-americas&catid=1221%3Ahsd0103b-dengue-statistics-a-maps&Itemid=2481&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494%3Adesc-ripciun-de-la-situaciun-epidemiologica-actual-del-dengue-en-las-americas&catid=1221%3Ahsd0103b-dengue-statistics-a-maps&Itemid=2481&lang=es).
- . 2014b. "Statistics and Maps." April 29. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=1221&Itemid=2481&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=1221&Itemid=2481&lang=es).
- Pepper, Oliver Hazard Perry. 1941. *A Note on David Bylon and Dengue* /. s.n.],.
- Pinheiro, F P, and S J Corber. 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): 161–69.
- Posada, David. 2008. "jModelTest: Phylogenetic Model Averaging." *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253–56. doi:10.1093/molbev/msn083.
- Pybus, O G, A Rambaut, and P H Harvey. 2000. "An Integrated Framework for the Inference of Viral Population History from Reconstructed Genealogies." *Genetics* 155 (3): 1429–37.



- Pybus, Oliver G. 2006. "Model Selection and the Molecular Clock." *PLoS Biology* 4 (5): e151. doi:10.1371/journal.pbio.0040151.
- Rambaut A, Drummond A. 2009. *Tracer v1.5*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool. <http://treebioedacuk/software/figtree/>.
- Rambaut, A, and L Bromham. 1998. "Estimating Divergence Dates from Molecular Sequences." *Molecular Biology and Evolution* 15 (4): 442–48.
- Rambaut, Andrew, Oliver G. Pybus, Martha I. Nelson, Cecile Viboud, Jeffery K. Taubenberger, and Edward C. Holmes. 2008. "The Genomic and Epidemiological Dynamics of Human Influenza A Virus." *Nature* 453 (7195): 615–19. doi:10.1038/nature06945.
- Rico-Hesse, R. 1990. "Molecular Evolution and Distribution of Dengue Viruses Type 1 and 2 in Nature." *Virology* 174 (2): 479–93.
- Rico-Hesse, Rebeca. 2003. "MICROEVOLUTION AND VIRULENCE OF DENGUE VIRUSES." *Advances in Virus Research* 59: 315–41.
- Rico-Hesse, Rebeca, Lisa M. Harrison, Rosa Alba Salas, Duilia Tovar, Ananda Nisalak, Celso Ramos, Jorge Boshell, Maria Teresa R. de Mesa, Rita M. R. Nogueira, and Amélia Travassos da Rosa. 1997. "Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas." *Virology* 230 (2): 244–51. doi:10.1006/viro.1997.8504.
- Roca, Yelin, Cécile Baronti, Roberto Jimmy Revollo, Shelley Cook, Roxana Loayza, Laetitia Ninove, Roberto Torrez Fernandez, Jorge Vargas Flores, Jean-Pierre Herve, and Xavier de Lamballerie. 2009. "Molecular Epidemiological Analysis of Dengue Fever in Bolivia from 1998 to 2008." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 9 (3): 337–44. doi:10.1089/vbz.2008.0187.
- Rodrigo, A G, E G Shpaer, E L Delwart, A K Iversen, M V Gallo, J Brojatsch, M S Hirsch, B D Walker, and J I Mullins. 1999. "Coalescent Estimates of HIV-1 Generation Time in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5): 2187–91.
- Romano, Camila Malta, Andréia Manso de Matos, Evaldo Stanislau A. Araújo, Lucy Santos Villas-Boas, Wanessa Cardoso da Silva, Olímpia M. N. P. F. Oliveira, Karina I. Carvalho, et al. 2010. "Characterization of Dengue Virus Type 2: New Insights on the 2010 Brazilian Epidemic." *PLoS ONE* 5 (7): e11811. doi:10.1371/journal.pone.0011811.
- Rudnick, A. 1986. "Dengue Fever Epidemiology in Malaysia, 1901-1980." In *Dengue Fever Studies in Malaysia.*, 9–37. Institute for Medical Research, Malaysia.

- Russell, Colin A., Terry C. Jones, Ian G. Barr, Nancy J. Cox, Rebecca J. Garten, Vicky Gregory, Ian D. Gust, et al. 2008. "The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses." *Science* 320 (5874): 340–46. doi:10.1126/science.1154137.
- SABIN, A B. 1952. "Research on Dengue during World War II." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1 (1): 30–50.
- Salemi, Marco, and Anne-Mieke Vandamme. 2003. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press.
- San Martín, José Luis, Olivia Brathwaite, Betzana Zambrano, José Orlando Solórzano, Alain Bouckennooghe, Gustavo H Dayan, and María G Guzmán. 2010. "The Epidemiology of Dengue in the Americas over the Last Three Decades: A Worrisome Reality." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (1): 128–35. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0346.
- Sanmartín, Isabel, Paul Van Der Mark, and Fredrik Ronquist. 2008. "Inferring Dispersal: A Bayesian Approach to Phylogeny-Based Island Biogeography, with Special Reference to the Canary Islands." *Journal of Biogeography* 35 (3): 428–49. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.01885.x.
- Sittisombut, N, A Sistayanarain, M J Cardoso, M Salminen, S Damrongdachakul, S Kalayanaroj, S Rojanasuphot, J Supawadee, and N Maneekarn. 1997. "Possible Occurrence of a Genetic Bottleneck in Dengue Serotype 2 Viruses between the 1980 and 1987 Epidemic Seasons in Bangkok, Thailand." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57 (1): 100–108.
- Slatkin, M, and R R Hudson. 1991. "Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations." *Genetics* 129 (2): 555–62.
- Smith, C E G. 1956. "The History of Dengue in Tropical Asia and Its Probable Relationship to the Mosquito *Aedes Aegypti*." *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59 (10): 243–51.
- Stadler, K, S L Allison, J Schlich, and F X Heinz. 1997. "Proteolytic Activation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Furin." *Journal of Virology* 71 (11): 8475–81.
- Steinhauer, D A, E Domingo, and J J Holland. 1992. "Lack of Evidence for Proofreading Mechanisms Associated with an RNA Virus Polymerase." *Gene* 122 (2): 281–88.
- Strimmer, Korbinian, and Oliver G. Pybus. 2001. "Exploring the Demographic History of DNA Sequences Using the Generalized Skyline Plot." *Molecular Biology and Evolution* 18 (12): 2298–2305.
- Swofford, D. L., and G. J. Olsen. 1990. "Phylogeny Reconstruction." In *Molecular Systematics.*, 411–501. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.: D.M. Hillis and C. Moritz.
- Tan, B H, J Fu, R J Sugrue, E H Yap, Y C Chan, and Y H Tan. 1996. "Recombinant Dengue Type 1 Virus NS5 Protein Expressed in *Escherichia Coli* Exhibits RNA-Dependent RNA Polymerase Activity." *Virology* 216 (2): 317–25. doi:10.1006/viro.1996.0067.

- Tavaré, S. 1984. "Line-of-Descent and Genealogical Processes, and Their Applications in Population Genetics Models." *Theoretical Population Biology* 26 (2): 119–64.
- Tavaré, S. 1986. "Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences." *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57–86.
- Thorne, J L, H Kishino, and I S Painter. 1998. "Estimating the Rate of Evolution of the Rate of Molecular Evolution." *Molecular Biology and Evolution* 15 (12): 1647–57.
- Tolou, H J, P Couissinier-Paris, J P Durand, V Mercier, J J de Pina, P de Micco, F Billoir, R N Charrel, and X de Lamballerie. 2001. "Evidence for Recombination in Natural Populations of Dengue Virus Type 1 Based on the Analysis of Complete Genome Sequences." *The Journal of General Virology* 82 (Pt 6): 1283–90.
- Twiddy, S. Susanna, and Edward C. Holmes. 2003. "The Extent of Homologous Recombination in Members of the Genus Flavivirus." *Journal of General Virology* 84 (2): 429–40. doi:10.1099/vir.0.18660-0.
- Twiddy, S. Susanna, Edward C. Holmes, and Andrew Rambaut. 2003. "Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution." *Molecular Biology and Evolution* 20 (1): 122–29. doi:10.1093/molbev/msg010.
- Twiddy, S. Susanna, Christopher H. Woelk, and Edward C. Holmes. 2002. "Phylogenetic Evidence for Adaptive Evolution of Dengue Viruses in Nature." *Journal of General Virology* 83 (7): 1679–89.
- Uzcategui, N Y, D Camacho, G Comach, R Cuello de Uzcategui, E C Holmes, and E A Gould. 2001. "Molecular Epidemiology of Dengue Type 2 Virus in Venezuela: Evidence for in Situ Virus Evolution and Recombination." *The Journal of General Virology* 82 (Pt 12): 2945–53.
- Vasilakis, Nikos, and Scott C. Weaver. 2008. "Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence." In *Advances in Virus Research*, edited by Aaron J. Shatkin and Frederick A. Murphy Karl Maramorosch, Volume 72:1–76. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352708004016>.
- Villabona-Arenas, Christian Julián, and Paolo Marinho de Andrade Zanotto. 2011. "Evolutionary History of Dengue Virus Type 4: Insights into Genotype Phylodynamics." *Infection, Genetics and Evolution* 11 (5): 878–85. doi:10.1016/j.meegid.2011.02.007.
- . 2013. "Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1." *PLoS ONE* 8 (5): e62649. doi:10.1371/journal.pone.0062649.
- Volz, Erik M, and Simon D W Frost. 2013. "Inferring the Source of Transmission with Phylogenetic Data." *PLoS Computational Biology* 9 (12): e1003397. doi:10.1371/journal.pcbi.1003397.

- Wang, E, H Ni, R Xu, A D Barrett, S J Watowich, D J Gubler, and S C Weaver. 2000. "Evolutionary Relationships of Endemic/epidemic and Sylvatic Dengue Viruses." *Journal of Virology* 74 (7): 3227–34.
- Waterhouse, Andrew M, James B Procter, David M A Martin, Michèle Clamp, and Geoffrey J Barton. 2009. "Jalview Version 2--a Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench." *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (9): 1189–91. doi:10.1093/bioinformatics/btp033.
- Weaver, Scott C., and Nikos Vasilakis. 2009. "Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease." *Infection, Genetics and Evolution* 9 (4): 523–40. doi:10.1016/j.meegid.2009.02.003.
- Wilson, I J, and D J Balding. 1998. "Genealogical Inference from Microsatellite Data." *Genetics* 150 (1): 499–510.
- Winkler, G, F X Heinz, and C Kunz. 1987. "Studies on the Glycosylation of Flavivirus E Proteins and the Role of Carbohydrate in Antigenic Structure." *Virology* 159 (2): 237–43.
- Wittke, V, T E Robb, H M Thu, A Nisalak, S Nimmannitya, S Kalayanrooj, D W Vaughn, T P Endy, E C Holmes, and J G Aaskov. 2002. "Extinction and Rapid Emergence of Strains of Dengue 3 Virus during an Interepidemic Period." *Virology* 301 (1): 148–56.
- Worobey, M, and E C Holmes. 1999. "Evolutionary Aspects of Recombination in RNA Viruses." *The Journal of General Virology* 80 ( Pt 10) (October): 2535–43.
- Wright, S. 1931. "Evolution in Mendelian Populations." *Genetics* 16 (2): 97–159.
- Yang, Z. 1994. "Maximum Likelihood Phylogenetic Estimation from DNA Sequences with Variable Rates over Sites: Approximate Methods." *Journal of Molecular Evolution* 39 (3): 306–14.
- . 2006. *Computational Molecular Evolution*. Oxford: OUP Oxford.
- Zanotto, P M, E A Gould, G F Gao, P H Harvey, and E C Holmes. 1996. "Population Dynamics of Flaviviruses Revealed by Molecular Phylogenies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (2): 548–53.
- Zhang, Chunlin, Mammen P Mammen Jr, Piyawan Chinnawirotpisan, Chonticha Klungthong, Prinyada Rodpradit, Patama Monkongdee, Suchitra Nimmannitya, Siripen Kalayanarooj, and Edward C Holmes. 2005. "Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence." *Journal of Virology* 79 (24): 15123–30. doi:10.1128/JVI.79.24.15123-15130.2005.
- Zuckerandl, E. and Pauling, L.B. 1962. "Molecular Disease, Evolution, and Genetic Heterogeneity." In *Horizons in Biochemistry*, 189–225. New York: Kasha, M. and Pullman, B.

## Publicaciones derivadas en el marco de esta Tesis

Spatiotemporal dynamics of DENV-2 Asian-American genotype lineages in the Americas  
Daiana Mir<sup>1+\*</sup>; Hector Romero<sup>1+</sup>; Luiz Max Fagundes de Carvalho<sup>2</sup> and Gonzalo Bello<sup>3+</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma, Dpto. Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias CURE, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup> Programa de Computação Científica - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratorio de AIDS & Imunología Molecular. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Rio de Janeiro. Brazil.

*PLoS ONE en prensa*



# Spatiotemporal Dynamics of DENV-2 Asian-American Genotype Lineages in the Americas

Daiana Mir<sup>1\*</sup>, Hector Romero<sup>1</sup>, Luiz Max Fagundes de Carvalho<sup>2</sup>, Gonzalo Bello<sup>3</sup>

**1** Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma, Dpto. Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias CURE, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **2** Programa de Computação Científica - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratorio de AIDS & Inmunología Molecular. Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

The Asian/American (AS/AM) genotype of dengue virus type 2 (DENV-2) has been evolving in the Americas over the last 30 years, leading to several waves of dengue epidemics and to the emergence of different viral lineages in the region. In this study, we investigate the spatiotemporal dissemination pattern of the DENV-2 lineages at a regional level. We applied phylogenetic and phylogeographic analytical methods to a comprehensive data set of 582 DENV-2 E gene sequences of the AS/AM genotype isolated from 29 different American countries over a period of 30 years (1983 to 2012). Our study reveals that genetic diversity of DENV-2 AS/AM genotype circulating in the Americas mainly resulted from one single founder event and can be organized in at least four major lineages (I to IV), which emerged in the Caribbean region at the early 1980s and then spread and die out with different dynamics. Lineages I and II dominate the epidemics in the Caribbean region during the 1980s and early 1990s, lineage III becomes the prevalent DENV-2 one in the Caribbean and South America during the 1990s, whereas lineage IV dominates the epidemics in South and Central America during the 2000s. Suriname and Guyana seem to represent important entry points for DENV-2 from the Lesser Antilles to South America, whereas Venezuela, Brazil and Nicaragua were pointed as the main secondary hubs of dissemination to other mainland countries. Our study also indicates that DENV-2 AS/AM genotype was disseminated within South America following two main routes. The first route hits Venezuela and the western side of the Andes, while the second route mainly hits Brazil and the eastern side of the Andes. The phenomenon of DENV-2 lineage replacement across successive epidemic outbreaks was a common characteristic in all American countries, although the timing of lineage replacements greatly vary across locations.

**Citation:** Mir D, Romero H, Fagundes de Carvalho LM, Bello G (2014) Spatiotemporal Dynamics of DENV-2 Asian-American Genotype Lineages in the Americas. PLoS ONE 9(6): e98519. doi:10.1371/journal.pone.0098519

**Editor:** Lisa F. P. Ng, Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR), Singapore

**Received:** February 19, 2014; **Accepted:** May 3, 2014; **Published:** June 4, 2014

**Copyright:** © 2014 Mir et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Daiana Mir was supported by the programs "Movilidad" and "Posgrados Nacionales" of ANII (<http://www.anii.org.uy/web/>). Héctor Romero would like to thank the program PVE/CAPEs for economical support (<http://www.capes.gov.br/cooperacao-internacional/multinacional/pve>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: daianamir@gmail.com

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Dengue virus (DENV) is an archetypal emerging and re-emerging virus because it is an infection that appears as a new entity in certain areas where none has existed before and resurfaces in places where it already has existed [1]. There are four immunologically related single stranded RNA viruses that are classified as dengue serotypes (DENV-1 to 4). Each of the four DENV serotypes harbor extensive genetic diversity in the form of phylogenetically distinct clusters defined as genotypes and intra-genotype lineages that co-circulate with distinctive geographical and temporal patterns [2]. All these layers of viral diversity combined with host genetics and vector biology comprise the matrix responsible for the complex viral transmission dynamics of DENV at a global scale.

A common observation in phylogenetic studies of DENV is that of genotype replacement [3]. One of the best documented genotype replacement events occurred in the 1980s when the Asian/American (AS/AM) genotype of DENV-2 was introduced for the first time in the Americas, displacing the local American genotype [4]. Such replacement has been associated with a higher

fitness of DENV-2 AS/AM genotype in both, humans and mosquitoes [5,6,7]. Since its introduction, estimated in the late 1970s [8,9], the DENV-2 AS/AM genotype has been continuously circulating and evolving in the Americas leading to several waves of dengue hemorrhagic fever epidemics [10] and to the emergence of different viral lineages in the region. Phylogenetic analyses of the AS/AM genotype of DENV-2 in the Americas have identified the circulation of: three distinct clades in Puerto Rico (1986–2007) [11,12] and the Lesser Antilles [13], two lineages in Bolivia (1997–2006) [14], Paraguay (2001–2006) [15] and Peru (1999–2012) [16], up to three lineages in Brazil (1990–2010) [17,18,19,20] and Colombia (1988–2010) [21], up to six genetic clades in Venezuela (1991–2008) [22,23], and two clades in Mexico (1996–2000) [24] and Central America (1999–2009) [25].

Information about the spatiotemporal dispersion dynamics of DENV-2 at regional level is scarce. A recent comprehensive study that analyzed 191 DENV-2 Asian–American genotype sequences isolated from different American countries between 1981 and 2008 suggests that this genotype was introduced to the Greater Antilles around 1979 and later spreads to the Lesser Antilles and

northeastern coast of South America [8]. Dissemination within South America seems to have begun around 1992, and after 1995, Central America became involved as a result of the introduction from the islands. This study also indicates that gene flow between neighboring countries is more likely than between distant locales. Although this study provides an overall picture of the routes and the factors that influence the spread of DENV-2 AS/AM genotype in the Americas, there is no information about the spatiotemporal overlap and migration routes of the distinct genotype lineages previously described in the region.

The objective of this study was to reconstruct the origin and spatiotemporal dissemination dynamics of the major DENV-2 AS/AM lineages circulating in the Americas. To this end, we applied a model that combines DNA sequence data with its temporal and spatial information to a comprehensive data set of 582 DENV-2 E gene sequences of the AS/AM genotype isolated from 29 different American countries over a period of 30 years (1983 to 2012).

## Materials and Methods

### Sequence dataset

All complete (1,484 bp) DENV-2 and near complete (> 1,400 bp) DENV-2 AS/AM genotype E gene sequences with known location and sampling date available in the GenBank by December 2012 were downloaded. This resulted in a final data set of 1,932 sequences from 63 countries isolated during 1944–2012 (Table 1). GenBank accession number, country of origin, and year of isolation of every included sequence is shown in Table S1. Nucleotide sequences were aligned using MAFFT v6.902b program [26]. Alignment is available from the authors upon request.

### Phylogenetic analysis

Sequence genotypes were confirmed through maximum likelihood (ML) tree estimation. A ML phylogenetic tree was inferred for the complete data set of 1,932 DENV-2 E gene sequences with the PhyML program [27], using an online web server [28]. Phylogenetic tree was reconstructed under the GTR+I +  $\Gamma_4$  model of nucleotide substitution, selected using the jModelTest program [29]. Heuristic tree search was performed employing the SPR branch-swapping algorithm and the reliability of the phylogenies was estimated with the approximate likelihood-ratio test (*aLRT*) based on a Shimodaira–Hasegawa-like procedure.

### Analysis of spatiotemporal dispersion pattern

The rate of nucleotide substitution, the time to the most recent common ancestor ( $T_{MRC_A}$ ) and the spatial diffusion of the DENV-2 AS/AM genotype in the Americas were jointly estimated, using Bayesian methods, with the Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithms implemented in the BEAST v1.7.5 package [30,31]. In order to minimize the problem of over-representation of some countries, data sets were down-sampled to no more than 80 sequences per country. The temporal scale of evolutionary process was directly estimated from the sampling dates of the sequences using the GTR+I+  $\Gamma_4$  nucleotide substitution model, a relaxed uncorrelated lognormal molecular clock model [32], and a Bayesian Skyline coalescent tree prior [33]. Viral transmission pathways were reconstructed using a reversible discrete phylogeography model [34] and the rate of DENV-2 spread among locations was estimated using ‘Markov jump’ counts [35] of location-state transitions along the phylogeny as previously described [36,37]. The MCMC analysis was run for 100 million generations and convergence of parameters was assessed by calculating the Effective Sample Size (ESS) using TRACER v1.5

**Table 1.** Global DENV-2 data set.

Region	Country	<i>N</i>	Sampling dates
South America	Brazil	77	1990–2011
	Peru	40	2002–2012
	Venezuela	45	1990–2008
	Colombia	20	1944–2007
	Bolivia	12	1997–2010
	Suriname	11	1986–1999
	Others	10	1995–2010
Central America	Nicaragua	87	1999–2009
	Mexico	17	1992–2008
	Honduras	13	1984–2007
	Others	6	1987–2009
Caribbean	Puerto Rico	195	1977–2010
	Lesser Antilles	41	1981–2010
	Cuba	21	1997
	Other Greater Antilles	8	1983–2008
Asia	Singapore	475	2000–2011
	Vietnam	357	1988–2011
	Thailand	213	1964–2010
	Others	243	1956–2010
Others	-	51	1966–2011

Regions and countries within each region with the largest sampling size are indicated.  
doi:10.1371/journal.pone.0098519.t001

[38] program, after excluding the initial 10% of the run. Uncertainty in parameter estimates was reflected in the 95% Highest Probability Density (HPD) values. The programs TreeAnnotator v1.7.5 and FigTree v1.4.0 [39] were used to summarize the posterior tree distribution and to visualize the annotated Maximum Clade Credibility (MCC) tree, respectively.

## Results

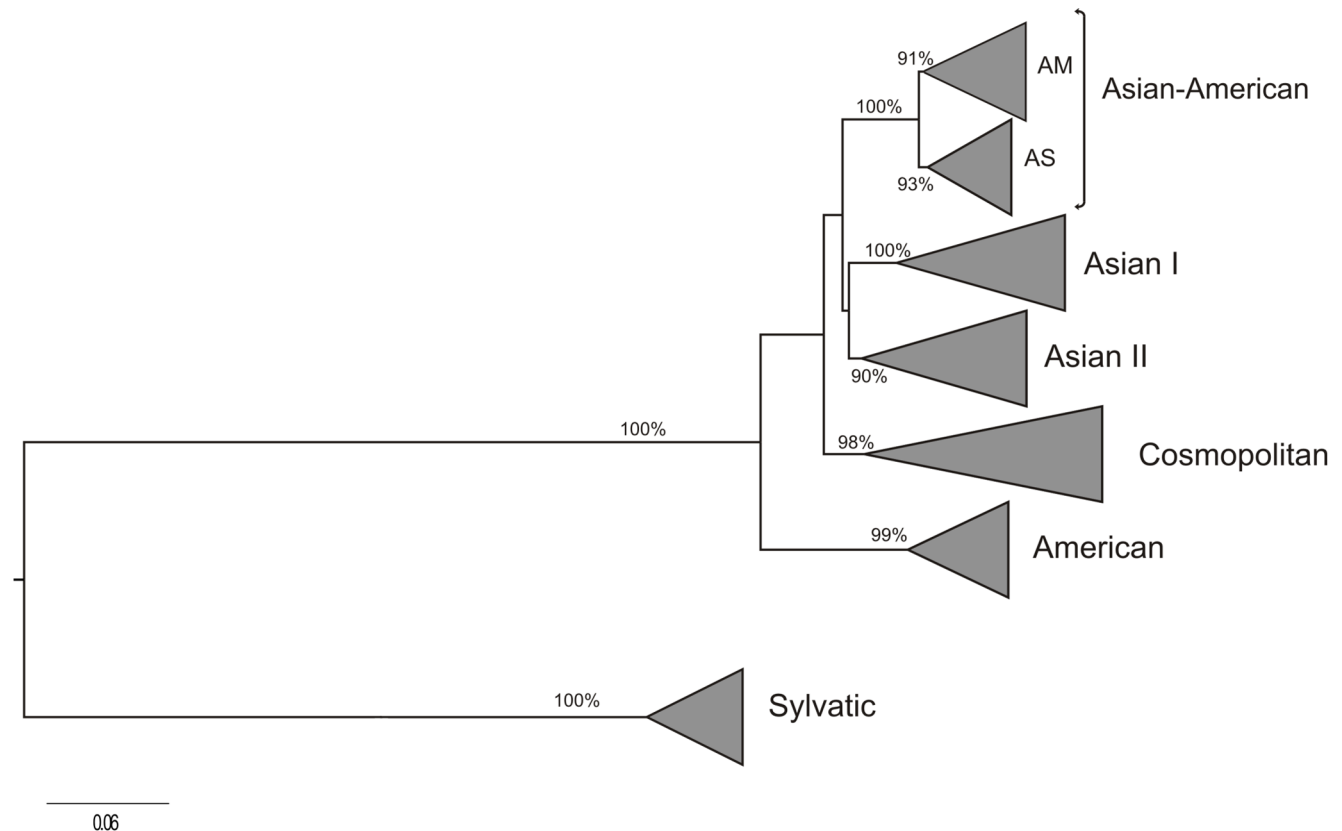
### Origin and dissemination of DENV-2 AS/AM genotype in the Americas

The ML tree of the complete data set of 1,932 DENV-2 E sequences, clearly shows the characteristic clustering of the non-sylvatic DENV-2 strains into five highly supported ( $aLRT \geq 0.90$ ) monophyletic genotypes (Fig. 1). All DENV-2 AS/AM genotype sequences of American origin ( $n = 582$ ) segregate in a highly supported ( $aLRT = 0.91$ ) monophyletic sub-group nested within sequences of Asian origin, thus supporting that current diversity of DENV-2 AS/AM genotype sequences in the Americas mainly resulted from a single founder event. After excluding highly similar ( $>99.5\%$ ) sequences from the most densely sampled ( $n > 80$  sequences) locations (Puerto Rico and Nicaragua) and identical sequences from Cuba, we obtained a subset of 406 DENV-2 AS/AM genotype sequences of American origin that was used for subsequent evolutionary and phylogeographic reconstructions (Table 2).

Ten discrete geographic states were initially assigned to DENV-2 American sequences (Table 2). The overall spatiotemporal

dissemination pattern inferred for the DENV-2 AS/AM genotype in the Americas was fully consistent with that previously described by Allicock *et al* (2012) (Fig. 2). According to our estimations, the evolutionary rate of DENV-2 AS/AM genotype in the Americas was  $9.5 \times 10^{-4}$  subs./site/year (95% HPD:  $8.5 - 10.7 \times 10^{-4}$  subs./site/year) and the  $T_{MRC}$  was the year 1981 (95% HPD: 1979–1983). Our analysis confirms that the DENV-2 AS/AM genotype was most probably introduced to the Greater Antilles (GA) (posterior state probability [PSP] = 0.69) and rapidly disseminated to the Lesser Antilles (LA) and the northeastern coast of South America (Suriname [SR] and Guyana [GY]). By the late 1980s the virus passed to Brazil and Venezuela and by the middle 1990s reached the other South American countries and entered into Central America from the Caribbean. Our phylogeographic analysis also reveals that viral dissemination within South America occurred following two major routes: the first one (western route) went through Venezuela (VE), Colombia (CO) and Ecuador (EC); whereas the second one (eastern route) began in Brazil (BR), continued to Bolivia (BO) and then Paraguay (PY) (Fig. 2). Both routes seem to finally converge in Peru (PE) that received viruses from both, western and eastern migration pathways.

In order to quantify the viral flux among regions and to reduce the potential impact of the unequal sampling size across locations, DENV-2 sequences were subdivided into six major locations with more homogenous sampling sizes named: GA ( $n = 86$ ), LA/SR/GY ( $n = 51$ ), SA<sub>1</sub> (BR/BO/PY) ( $n = 95$ ), SA<sub>2</sub> (VE/CO/EC) ( $n = 68$ ), PE ( $n = 38$ ) and CAM (Central America and Mexico) ( $n = 68$ ). Migration rates between those regions were estimated



**Figure 1. ML tree of 1,932 DENV-2 E gene sequences circulating globally.** DENV-2 genotypes (Sylvatic, American, Asian I and II, Cosmopolitan and Asian/American) are identified. For visual clarity, strains from each genotype are shown collapsed. Only aLTR support values of major branching are shown. All horizontal branch lengths are drawn to a scale of nucleotide substitutions per site. doi:10.1371/journal.pone.0098519.g001



**Table 2.** DENV-2 AS/AM genotype sequences of American origin.

Discrete geographic state <sup>a</sup>	Country	Complete dataset	Representative subset <sup>b</sup>	Sampling dates <sup>c</sup>
GA	Puerto Rico	192	79	1987–2010
	Cuba	21	1	1997
	Dominican Republic	3	3	1990–2003
	Jamaica	3	3	1983–2008
LA/SR/GY	Trinidad and Tobago	15	15	1986–2000
	Suriname	11	11	1986–1999
	Saint Vincent and the Grenadines	5	5	1998–2010
	Saint Lucia	4	4	1999
	Virgin Islands	4	4	1987–2005
	Barbados	3	3	1987–1998
	Dominica	3	3	1995
	Curacao	2	2	1993–1996
	Aruba	1	1	1996
	Grenada	1	1	1999
	Guyana	1	1	2000
NI	Saint Kitts and Nevis	1	1	2001
	Nicaragua	87	47	1999–2009
CAM/MX	Mexico	15	15	2002–2008
	Guatemala	2	2	2007–2009
	Honduras	2	2	2007
	Belize	1	1	2002
	Costa Rica	1	1	2003
VE	Venezuela	45	45	1990–2008
PE	Peru	38	38	2002–2012
CO/EC	Colombia	19	19	1992–2007
	Ecuador	4	4	2000
BR-SE	Brazil Southeastern region	59	59	1990–2011
BR-N/NE	Brazil Northern region	11	11	2000–2008
	Brazil Northeastern region	7	7	1991–2009
BO/PY	Bolivia	12	12	1997–2010
	Paraguay	6	6	2001–2010
TOTAL	-	582	406	1983–2012

<sup>a</sup>Neighboring countries with few sequences ( $n \leq 15$ ) were merged in a single discrete geographic state. <sup>b</sup>Generated by removing highly similar ( $>99.5\%$ ) sequences from the most represented countries (Puerto Rico = 113 and Nicaragua = 40) and identical sequences from Cuba ( $n = 20$ ). <sup>c</sup>Sampling dates of sequences were the same for both complete dataset and representative subset.

doi:10.1371/journal.pone.0098519.t002

using Markov jump counts. The *PSP* distributions for the roots of major DENV-2 AS/AM lineages in the Americas obtained from the phylogeographic analyses with six and 10 geographic states were almost identical (Table S2). The highest viral transitions rates were: between GA and LA/SR/GY, from the Caribbean to both SA<sub>1</sub> and SA<sub>2</sub>, from both SA<sub>1</sub> and SA<sub>2</sub> to PE and between SA<sub>2</sub> and CEN (Fig. 3 and Table S3). The highest net viral migration rate (efflux minus influx) was for the Caribbean region (6.01), followed by SA<sub>1</sub> (0.88), SA<sub>2</sub> (0.40), CEN (−0.84) and PE (−6.45) regions.

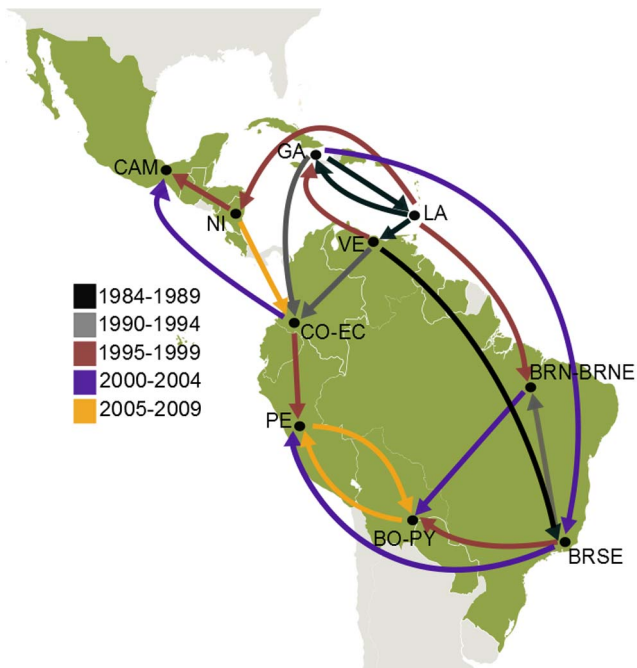
### Diversification of DENV-2 AS/AM genotype in the Americas

The evolutionary processes of DENV-2 AS/AM genotype in the Americas generated at least four major highly supported (posterior probability [*PP*]  $\geq 0.95$ ) lineages (I–IV) (Fig. 4). Lineages I and II were the most prevalent clades in the Caribbean region

during the 1980s and early 1990s. Clade I probably emerged in the LA/SR (*PSP* = 1) in 1984 (95% HPD: 1983–1985) and only comprise older sequences from Barbados, Trinidad and Tobago and Suriname isolated during 1986–1996. Clade II probably arises in Puerto Rico (*PSP* = 1) in 1985 (95% HPD: 1984–1986) and was almost exclusively made up of sequences isolated in this island during 1987–1996. Lineages I and II appeared to become extinct around the middle 1996 and were replaced by lineages III and IV that were detected for the first time during the early 90s and have been responsible for the most dramatic DENV-2 epidemics in the Americas over the last 20 years.

### Time-scale and migration routes of DENV-2 AS/AM clade III

Clade III contains sequences from the LA, PR, and South America. This clade most likely emerged in the LA/SR/GY



**Figure 2. Spatiotemporal dynamics of dissemination of DENV-2 AS/AM genotype in the Americas.** Viral dispersal pattern between 1984 and 2009. Lines between locations represent branches in the Bayesian MCC tree along which location transitions occurs. The color of lines informs the date of the earliest viral migrations among each pair of locations. (BO-PY: Bolivia-Paraguay, BRN-BRNE: Brazil Northern-Brazil Northeastern, BRSE: Brazil Southeastern, CAM: Central America-Mexico, CO-EC: Colombia-Ecuador, GA: Greater Antilles, LA: Lesser Antilles, NI: Nicaragua, PE: Peru, VE: Venezuela)  
doi:10.1371/journal.pone.0098519.g002

( $PSP=0.63$ ) in 1986 (95% HPD: 1985–1987) and was disseminated throughout the Caribbean and South America, giving rise to three region-specific subclades (III-LA, III-PR, and III-SA) (Fig 5). The subclade III-LA emerged in 1988 (95% HPD: 1987–1990) and circulated in LA/GY between 1990 and 2000. The subclade III-PR arose in 1989 (95% HPD: 1988–1991) and only contains sequences isolated in PR between 1994 and 2010. This lineage co-circulated with clades II and IV-PR (see below) in Puerto Rico during the period of high prevalence of DENV-2 in 1994 and turned into the dominant viral clade in that country since mid 1990s [11,12]. The subclade III-SA comprises South American sequences sampled between 1990 and 2009. This subclade probably originated in VE in 1987 (95% HPD: 1986–1988) and was disseminated in South America following two major concurrent routes. In the western route, the virus migrated from VE in sequential steps reaching CO in 1990 (95% HPD: 1990–1991), EC in 1998 (95% HPD: 1997–1999), and PE in 2000 (95% HPD: 1999–2001). In the eastern route, the virus entered the Southeastern Brazilian region in 1988 (95% HPD: 1986–1989) and was already detected in the North/Northeast Brazilian regions at 1991–1994. From BR the virus moved west being detected in BO in 1997, in PE in 2001 and in PY in 2005.

#### Time-scale and migration routes of DENV-2 AS/AM clade IV

Clade IV is the most widely disseminated DENV-2 lineage in the region and contains sequences from the Caribbean, South America and Central America. This clade most likely originated in PR ( $PSP=0.95$ ) in 1985 (95% HPD: 1984–1986) and was



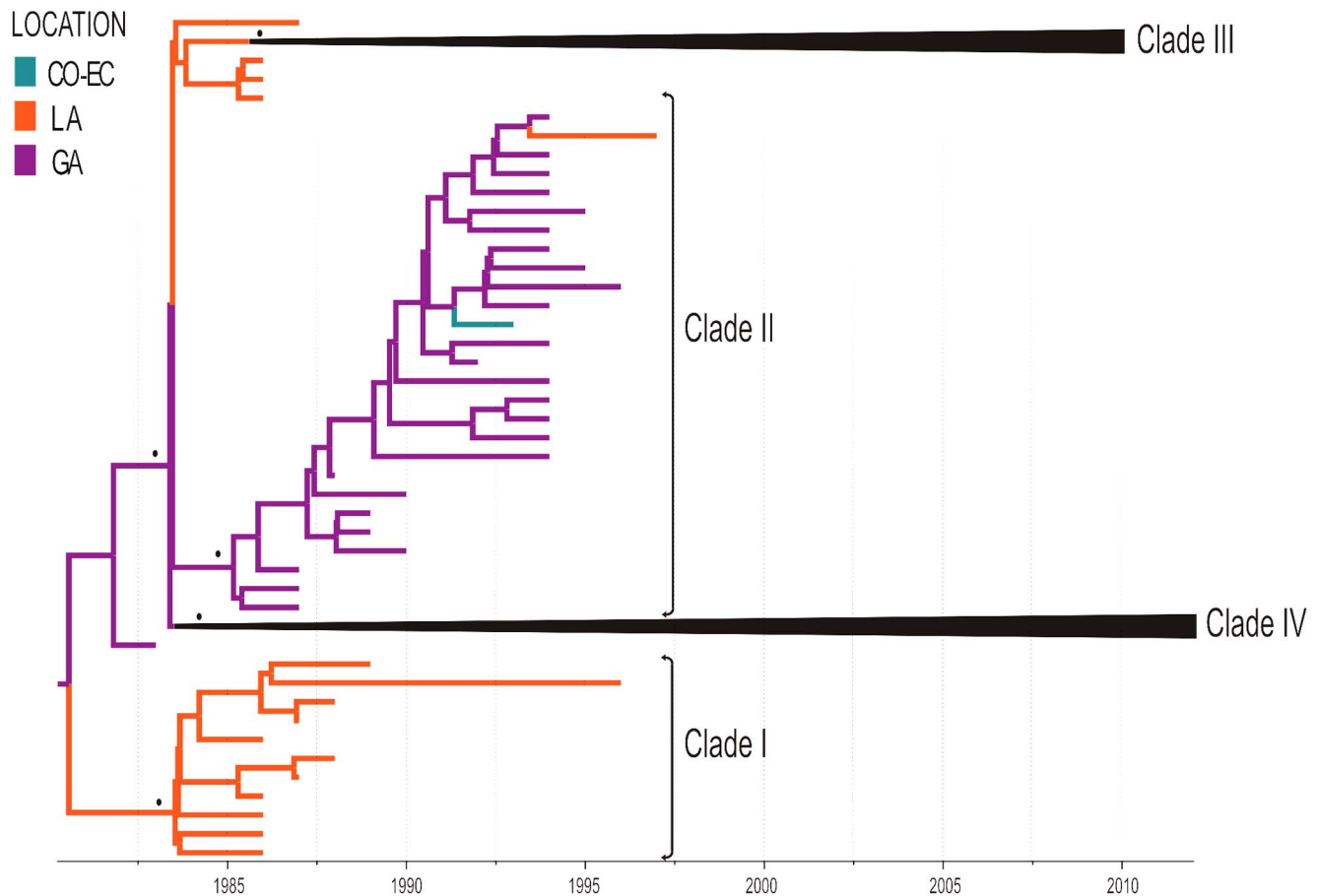
**Figure 3. Major estimated viral migration rates among locations as measured using 'Markov jump' counts.** The width of the arrows is proportional to the viral transition rates. Transition rates lower than 0.1 were excluded for clarity. (CAM: Central America-Mexico, GA: Greater Antilles, LA: Lesser Antilles, PE: Peru, SA-1: South America 1, SA-2: South America 2)  
doi:10.1371/journal.pone.0098519.g003

exported to the LA/SR in the same year (95% HPD: 1984–1986). From this location, the virus moved to South and Central America, giving rise to five regional subclades: four were disseminated within South America through the eastern (IV-SA<sub>1</sub> and IV-SA<sub>4</sub>) and western (IV-SA<sub>2</sub> and IV-SA<sub>3</sub>) migration routes and one was disseminated within Central America (IV-CAM) (Fig 6).

The subclade IV-SA<sub>1</sub> comprises sequences isolated in SR during 1993–1999, in Northern Brazil during 2000–2006, in PY during 2001–2005, and in BO during 2003–2007. This subclade probably emerged in the LA ( $PSP=1$ ) around 1992 (95% HPD: 1991–1993), moved to Northern Brazil in 1999 (95% HPD: 1998–2000) and from BR to BO/PY in 2001 (95% HPD: 2000–2001). The subclade IV-SA<sub>4</sub> contains sequences isolated in BR during 2007–2011, in BO and PY in 2010 and in PE during 2009–2012. This subclade probably arose with the introduction of a virus from the GA ( $PSP=0.98$ ) into the Southeastern Brazilian region ( $PSP=0.55$ ) in 2004 (95% HPD: 2003–2005). From this region, the virus moved to the Northeastern region as well as to BO, PY and PE.

The subclade IV-SA<sub>2</sub> includes sequences isolated in VE during 1996–2008, in CO during 1999–2004, and in PE during 2011–2012. The origin of this subclade was traced back most probably to VE ( $PSP=0.95$ ) during 1995 (95% HPD: 1994–1996). From VE the virus was disseminated to CO and from CO the virus was later introduced into PE. The subclade IV-SA<sub>3</sub> includes sequences isolated in VE during 2003–2008, in CO during 2004–2007, along with one sequence isolated in Costa Rica in 2003. This subclade most probably had an origin in VE ( $PSP=0.78$ ) in 1999 (95% HPD: 1997–2001) and from there the virus was disseminated to CO and then to Costa Rica.

Finally, the subclade IV-CAM contains sequences isolated in Belize, Guatemala, Honduras, Nicaragua (NI) and Mexico (MX)



**Figure 4. Time-scaled Bayesian Maximum Clade Credibility tree for the DENV-2 AS-AM genotype.** Four major highly supported monophyletic clades (I-IV) are identified. Branches are colored according to the most probable location (legend shown on the left side) of their parental node inferred by discrete phylogeographical analysis. For visual clarity, clades III and IV has been collapsed (see Fig.5 and Fig.6). PP values  $>0.90$  at key nodes are represented by (\*). All horizontal branch lengths are drawn to a scale of years. The tree is automatically rooted under the assumption of a relaxed molecular clock. (CO-EC: Colombia-Ecuador, LA: Lesser Antilles, GA: Greater Antilles)  
doi:10.1371/journal.pone.0098519.g004

between 1999 and 2009, together with one sequence sampled in CO in 2007, being the first DENV-2 AS/AM lineage to become successfully established and disseminated in Central America. This subclade most probably was product of a migration from the LA ( $PSP=0.98$ ) into NI ( $PSP=0.97$ ) in 1997 (95% HPD: 1995–1998). NI contains the oldest sequences of subclade IV-CAM sampled in 1999–2000 and was probably the epicenter of the dissemination to other Central American countries, MX and CO, of this lineage. We found evidence of at least one successful introduction of this lineage into MX from NI ( $PSP=0.93$ ) around 1999 (95% HPD: 1998–2000).

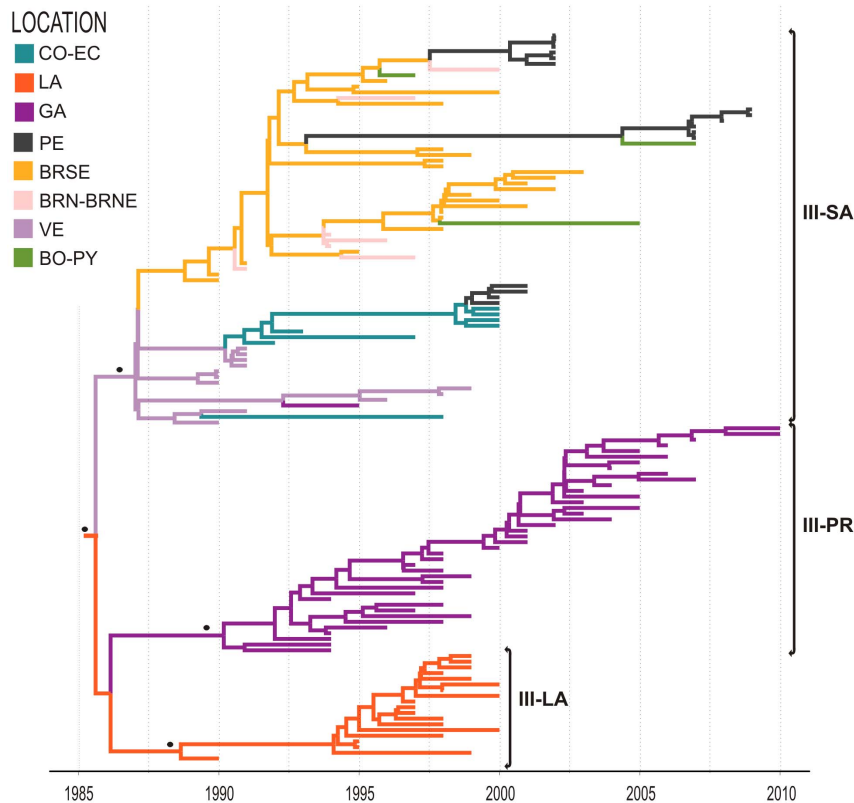
## Discussion

The phylogeographic analysis of 582 DENV-2 AS/AM genotype sequences isolated from 29 American countries over a 30-year period confirms that regional viral diversity resulted from a single introduction of this genotype into the Americas around the early 1980s, followed by rapid spatial dispersion within the continent, in agreement with previous studies [8,9]. Our phylogeographic analysis supports a primary spread axis between Greater and Lesser Antilles and secondary axes linking the Caribbean with both, South and Central America, also consistent with Allcock *et al* (2012). Caribbean islands have been also pointed

as the initial source of DENV-1 and DENV-4 epidemics in the Americas [8,40,41] and as an important staging post in the dissemination of DENV-3 from Central to South America [42,43], indicating that DENV migration events between the Caribbean and mainland regions are a frequent phenomenon in the Americas.

One important limitation of our study is the use of a highly biased dataset because sampled population only comprise a minor fraction of all DENV-2 cases occurred in the Americas over the last 30 years and sampling efforts respond to idiosyncratic reasons including countries' specific public health policies and diverse research interests leading to important unbalances between countries [42]. Despite some limitations regarding both sampling procedures and model simplifications, this approach has proven to be rather robust for the study of DENV dissemination at regional level when data was interpreted cautiously within a sound biological framework [8,9,40,41,42,43,44,45,46,47].

According to the results presented here, the Caribbean acted as a primary source of all DENV-2 lineages that were subsequently disseminated to continental regions; whereas Brazil, Venezuela and Nicaragua were pointed as the main secondary hubs of DENV-2 spreading to other mainland countries. Our results also point to a frequent intermix between sequences from the Lesser Antilles, Surinam, and Guyana, indicating that these latter



**Figure 5. Time-scaled Bayesian Maximum Clade Credibility sub-tree corresponding to the Clade III.** Three major highly supported monophyletic clades: III-PR, III-LA and III-SA are identified within clade III. For further details see legend of Fig 4. (CO-EC: Colombia-Ecuador, LA: Lesser Antilles, GA: Greater Antilles, PE: Peru, BRSE: Brazil Southeastern, BRN-BRNE: Brazil Northern-Brazil Northeastern, VE: Venezuela, BO-PY: Bolivia-Paraguay)

doi:10.1371/journal.pone.0098519.g005

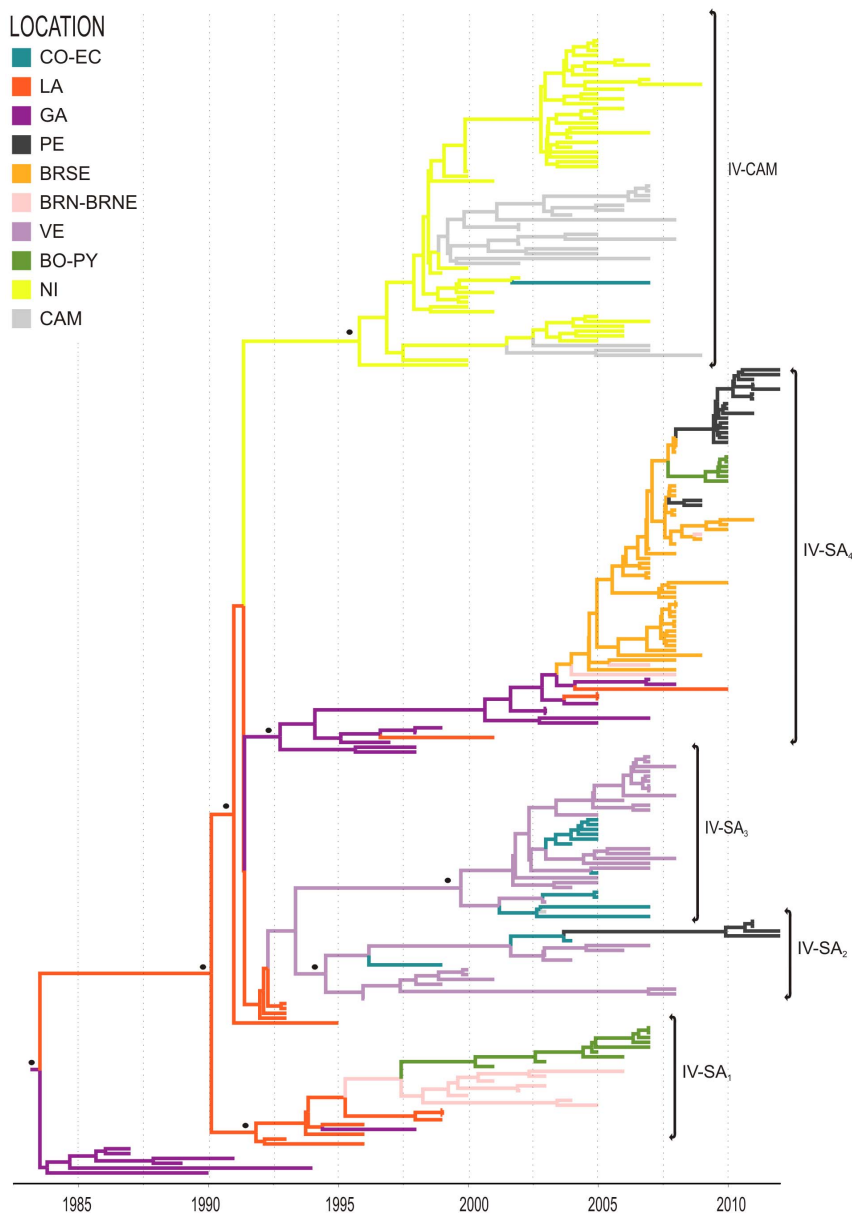
countries represent important transit points for DENV-2 dissemination from the Caribbean to South America. The intense viral flux between the Lesser Antilles and Surinam/Guyana is probably facilitated by the close geographic proximity of those regions [8] as well as by linguistic and socioeconomic ties [9]. Thus, the phylogeographic pattern of DENV-2 in the Americas could be explained by a short-distance transmission model in which the virus moved outward from a central starting point located in the Caribbean to near continental regions which behave as secondary hubs of dissemination, transmitting the virus to other neighboring mainland countries. The backward movement of DENV-2 from mainland American countries to the Caribbean, by contrast, seems to be very reduced.

Our phylogeographic analysis also revealed the existence of two main routes of dissemination of DENV-2 AS/AM genotype within South America. The first route went to Venezuela and the western side of the Andes hitting Colombia, Ecuador and Peru, while the second route mainly hit the eastern side of the Andes, with Brazil passing the virus to Bolivia, Paraguay and finally Peru. Whereas viral exchanges between Venezuela/Colombia/Ecuador and Brazil/Bolivia/Paraguay seem to be very limited, Peru appears to be a confluence point of both dissemination routes, receiving viruses from Colombia/Ecuador through the northern border and from Brazil/Bolivia through the eastern one. A very similar pattern of viral spread was previously observed for DENV-3 in the Americas [42,43], supporting the existence of two preferential corridors of DENV dissemination within South America common to all serotypes. These routes may be explained by the existence of

the Andes Mountains that run north to south along the western coast of the continent and impose an important geographical barrier to both human and vector dissemination between South American countries located on both sides.

The genetic diversity of DENV-2 AS/AM genotype circulating in the Americas can be organized in four major genetically distinct lineages. Although all lineages arose in the same region (Caribbean) and around the same time (~1985), they spread and die out with different dynamics across countries and regions. Lineages I and II arose in Lesser Antilles and Puerto Rico, respectively, and were mainly restricted to the Caribbean region where predominated until being replaced by clade III around the early 1990s. This latter clade probably emerged in the Lesser Antilles, became dominant in the Caribbean and South America during the 1990s and persisted as the prevalent lineage in Puerto Rico up to 2010. Clade IV probably arose in Puerto Rico and circulated in this country at low level until at least 2007; while became the dominant lineage in South and Central America from the early/middle 2000s onwards.

The phenomenon of DENV-2 lineage replacement across successive epidemic outbreaks was a common characteristic in all American countries; nevertheless, one fundamental difference was observed between Puerto Rico and the mainland regions (Fig. 7). DENV-2 evolution in the former was characterized by the long-term co-circulation of two or even three different AS/AM genotype lineages over time and this was particularly noticeable for clades III and IV that were simultaneously detected in Puerto Rico for nearly 15 years (1991–2007). The evolution of DENV-2



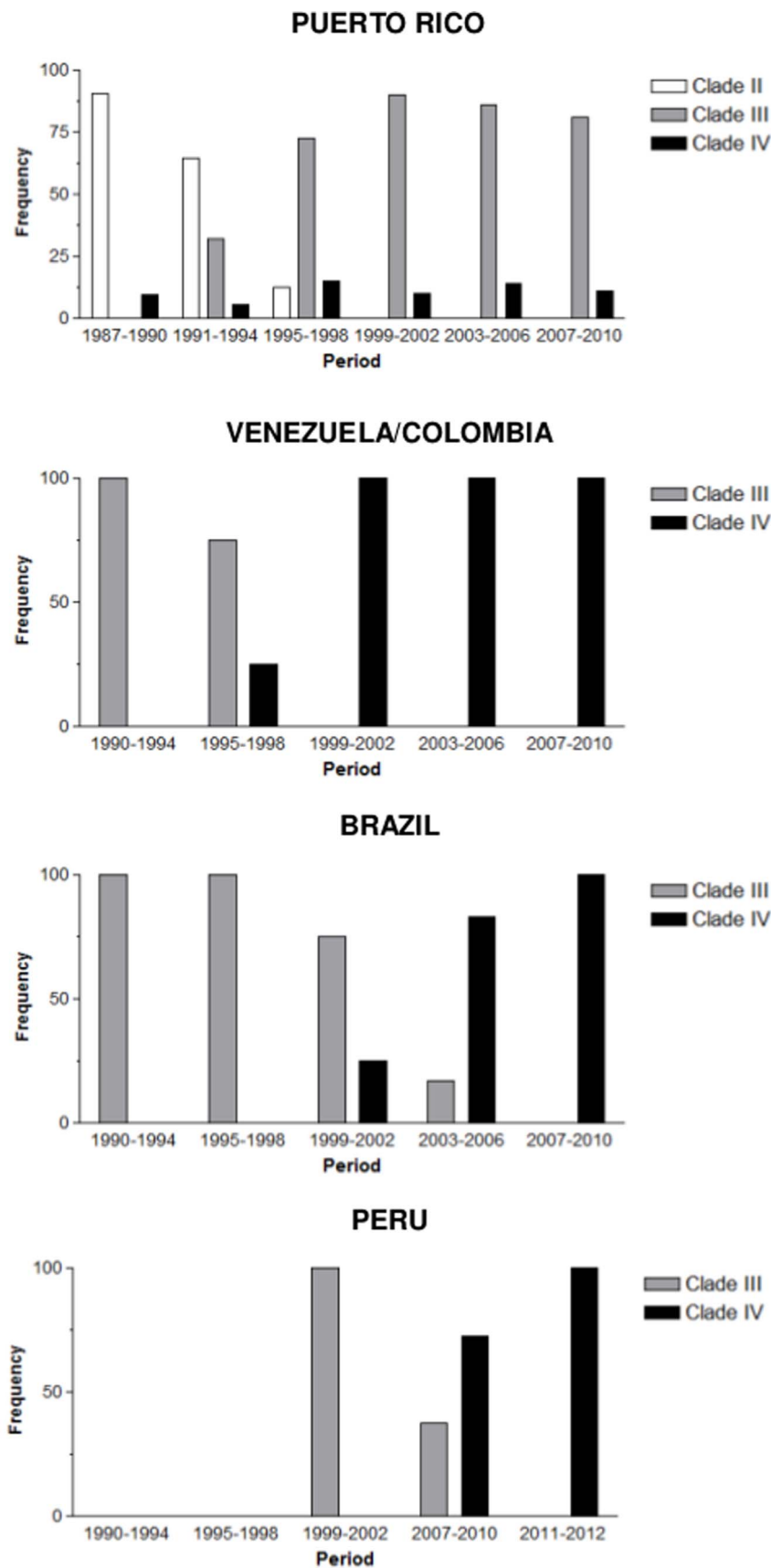
**Figure 6. Time-scaled Bayesian Maximum Clade Credibility sub-tree corresponding to the Clade IV.** Five major highly supported monophyletic clades: IV-SA<sub>1-4</sub> and IV-CAM are identified within clade IV. For further details see legend of Fig 4. (CO-EC: Colombia-Ecuador, LA: Lesser Antilles, GA: Greater Antilles, PE: Peru, BRSE: Brazil Southeastern, BRN-BRNE: Brazil Northern-Brazil Northeastern, VE: Venezuela, BO-PY: Bolivia-Paraguay, NI: Nicaragua, CAM: Central America-Mexico)  
doi:10.1371/journal.pone.0098519.g006

in South American countries, by contrast, seems to be characterized by short periods of overlap of distinct viral clades and more abrupt lineage replacements. We found evidence of co-circulation of clades III and IV for only six years in Venezuela (1993–1998), five years in Brazil (1999–2003), and one year in Peru (2009); while no evidence of co-circulation of different AS/AM genotype lineages was found in Central America.

Our study also suggests that timing of lineage replacements events greatly vary across South American countries. The dissemination process of DENV-2 clades III and IV in South America started in Venezuela and Brazil and took about 10 years to reach Peru by the western and eastern routes. Clade III probably arrived at Venezuela and Brazil around 1987–1989 and reached Peru in 2000–2001; whereas clade IV was probably

introduced in Venezuela and Brazil around 1995–1997 and only hit Peru at 2006–2009. An important consequence of this rather slow dissemination process is that lineage replacement occurs in Peru much later than in the source countries (Venezuela and Brazil). In this same line of reasoning, Peru becomes an important sanctuary of DENV-2 lineages that become extinct in other South American countries. Clade III, for example, was detected in Peru until 2009, 6–10 years later than in Venezuela (1999) and Brazil (2003). It is interesting to note that Peru was also the last refuge of the DENV-2 American genotype in the Americas, being detected until the year 2000 [16].

One fundamental question is the relative contribution of stochastic processes and fitness differences among viral strains to DENV-2 lineage dissemination and turnover. Clade III has been



**Figure 7. Distribution of DENV-2 AS/AM genotype sequences isolated in Puerto Rico ( $n=195$ ), Brazil ( $n=77$ ), Venezuela/Colombia ( $n=64$ ), and Peru ( $n=38$ ) at different time periods across the major phylogenetic lineages.**  
 doi:10.1371/journal.pone.0098519.g007

established as the dominant DENV-2 lineage over the last 15 years in Puerto Rico, displacing clade II and prevailing over clade IV; but was replaced by clade IV in South America since the early 2000s onwards. Such variation across regions may be explained by population-specific stochastic process associated to temporal fluctuations in DENV serotype abundance as observed in Thailand [48]. In Brazil, clade III become extinct during the period of DENV-3 predominance (2000–2006), while clade IV was probably introduced around 2005 and fueled epidemics in the next period of high DENV-2 circulation (2007–2011) [20]. In Puerto Rico, by contrast, clade III was able to persist throughout the period of high DENV-3 circulation (1999–2003) by replicating in a refuge area and reemerged in the next season of high DENV-2 circulation [12]. Thus, population bottlenecks imposed by temporal fluctuations in DENV serotype abundance may be an important factor shaping within-genotype lineage extinctions and replacements, although their impact may vary across countries and time.

As we have mentioned before, the process of data collecting is an important limitation of our study and additional sampling among the locations and over time would allow more precise estimations of: 1) the prevalence, timing of introduction and temporal overlap of different viral clades across countries, and 2) the rate of viral exchanges among countries. Other findings of our study, however, are more robust to this limitation. First, the root location and dissemination routes of major DENV-2 American lineages inferred from different phylogeographic analyses were almost identical irrespective of the number and sampling size of locations assigned to South and Central American regions. Second, only estimates of rates of viral spread between major well sampled sub-regions were obtained, and not between countries with large differences in sampling sizes. Third, differences in DENV-2 lineage dynamics were detected across the most heavily sampled countries of our study (Puerto Rico, Brazil, Peru and Venezuela).

In summary, this study shows that the genetic diversity of DENV-2 AS/AM genotype circulating in the Americas over the last 30 years can be organized in at least four major genetically

distinct lineages. The Caribbean islands together with Suriname and Guyana have been the primary source of DENV-2 lineages disseminated in the Americas; whereas Venezuela, Brazil and Nicaragua seem to be important hubs of viral dissemination to other mainland countries. Although all DENV-2 lineages emerged in the Caribbean region around the middle 1980s, they were disseminated and became extinct with very different dynamics. Continuous molecular surveillance of DENV epidemics in the Caribbean islands and northern coast of South America may contribute to identify new DENV-2 clades with potential to cause future epidemics in the region.

## Supporting Information

**Table S1 GenBank accession number, country of origin, and year of isolation of every sequence included in the analysis.**

(PDF)

**Table S2 Posterior state probability distributions for the roots of major DENV-2 American lineages estimated using two different schemes of grouping of discrete geographic states.**

(PDF)

**Table S3 Viral migration rates between locations.**

(PDF)

## Acknowledgments

LMFC would like to thank Mauricio de Oliveira (UFRJ) for operational support.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DM HR GB. Performed the experiments: DM HR LMFC GB. Analyzed the data: DM HR LMFC GB. Contributed reagents/materials/analysis tools: DM HR LMFC GB. Wrote the paper: DM HR GB.

## References

1. Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW (2003) Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 61: 235–289.
2. Vasilakis N, Weaver SC (2008) The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 72: 1–76.
3. Holmes EC, Twiddy SS (2003) The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 3: 19–28.
4. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, et al. (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244–251.
5. Armstrong PM, Rico-Hesse R (2001) Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 1: 159–168.
6. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R (2005) Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 79: 853–859.
7. Cologna R, Rico-Hesse R (2003) American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 77: 3929–3938.
8. Allicock OM, Lemey P, Tatem AJ, Pybus OG, Bennett SN, et al. (2012) Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol Biol Evol* 29: 1533–1543.
9. Carrington CV, Foster JE, Pybus OG, Bennett SN, Holmes EC (2005) Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas. *J Virol* 79: 14680–14687.
10. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckennooghe A, et al. (2010) The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82: 128–135.
11. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, et al. (2006) Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol* 87: 885–893.
12. McElroy KL, Santiago GA, Lennon NJ, Birren BW, Henn MR, et al. (2011) Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986–2007. *Emerg Infect Dis* 17: 64–71.
13. Foster JE, Bennett SN, Carrington CV, Vaughan H, McMillan WO (2004) Phylogeography and molecular evolution of dengue 2 in the Caribbean basin, 1981–2000. *Virology* 324: 48–59.
14. Roca Y, Baronti C, Revollo RJ, Cook S, Loayza R, et al. (2009) Molecular epidemiological analysis of dengue fever in Bolivia from 1998 to 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 337–344.
15. Aquino JD, Tang WF, Ishii R, Ono T, Eshita Y, et al. (2008) Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001–2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res* 137: 266–270.
16. Cruz CD, Forshey BM, Juarez DS, Guevara C, Leguia M, et al. (2013) Molecular epidemiology of American/Asian genotype DENV-2 in Peru. *Infect Genet Evol*.
17. Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC Jr, Ferreira DF, Lima DB, et al. (2010) Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis* 16: 576–578.
18. Romano CM, de Matos AM, Araujo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, et al. (2010) Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One* 5: e11811.
19. Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simoes JB, Nogueira Fde B, et al. (2013) Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2095.
20. Drummond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Moraes Bronzoni RV, Bosch I, et al. (2013) Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One* 8: e59422.
21. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, et al. (2012) Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virol J* 9: 64.

22. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, et al. (2001) Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 82: 2945–2953.
23. Huhtamo E, Comach G, Sierra G, Camacho DE, Sironen T, et al. (2012) Diversity and composition of dengue virus type 2 in Venezuela. *Epidemiol Infect*: 1–7.
24. Carrillo-Valenzo E, Danis-Lozano R, Velasco-Hernandez JX, Sanchez-Burgos G, Alpuche C, et al. (2010) Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol* 155: 1401–1412.
25. Anez G, Morales-Betoulle ME, Rios M (2011) Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. *PLoS One* 6: e27459.
26. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30: 3059–3066.
27. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.
28. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33: W557–559.
29. Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256.
30. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
31. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969–1973.
32. Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4: e88.
33. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22: 1185–1192.
34. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol* 5: e1000520.
35. Minin VN, Suchard MA (2008) Counting labeled transitions in continuous-time Markov models of evolution. *J Math Biol* 56: 391–412.
36. Talbi C, Lemey P, Suchard MA, Abdelatif E, Elharrak M, et al. (2010) Phylodynamics and human-mediated dispersal of a zoonotic virus. *PLoS Pathog* 6: e1001166.
37. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, et al. (2012) Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerg Infect Dis* 18: 1858–1864.
38. Rambaut A, Drummond A (2009) Tracer v1.5. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> Accessed 2013 September 10.
39. Rambaut A (2012) FigTree 1.4.0. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Accessed 2013 September 10.
40. Villabona-Arenas CJ, Zlotoff PM (2011) Evolutionary history of Dengue virus type 4: insights into genotype phylodynamics. *Infect Genet Evol* 11: 878–885.
41. Villabona-Arenas CJ, Zlotoff PM (2013) Worldwide spread of dengue virus type 1. *PLoS One* 8: e62649.
42. Araujo JM, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Zlotoff PM, Bello G (2009) Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol* 9: 716–725.
43. Araujo JM, Bello G, Romero H, Nogueira RM (2012) Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1784.
44. Volz EM, Frost SDW (2013) Inferring the Source of Transmission with Phylogenetic Data. *PLoS Comput Biol* 9: e1003397. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003397
45. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, et al. (2012) Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerg Infect Dis* 18: 1858–1864.
46. Patil JA, Cherian S, Walimbe AM, Bhagat A, Vallentyne J, et al. (2012) Influence of evolutionary events on the Indian subcontinent on the phylogeography of dengue type 3 and 4 viruses. *Infect Genet Evol* 12: 1759–1769.
47. Sun Y, Meng S. (2013) Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of dengue virus type 1 in Asia. *Infect Genet Evol* 16: 19–26.
48. Zhang C, Mammen MP Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, et al. (2005) Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 79: 15123–15130.