

Epidemiología molecular de los virus Dengue

Molecular epidemiology of Dengue virus

Daríá E. Camacho-García¹, Elizabeth Ferrer², Antonio Tenorio³, Leticia Franco³ & Guillermo Comach¹

RESUMEN

El dengue es la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos a humanos por su alta morbilidad y el potencial de diseminación de su vector *Aedes aegypti*. Además, la falta de una vacuna y medicamentos antivirales específicos, así como el incremento progresivo de las infecciones secundarias y la hiperendemicidad en diferentes países, hacen de esta enfermedad un problema de salud pública. Existen cuatro serotipos del virus del dengue (DENV), dentro de cada serotipo se han descrito varios genotipos, constituidos a su vez por diferentes linajes o clados. La epidemiología molecular combina los análisis filogenéticos de los DENV detectados en un área geográfica, en un tiempo definido, con la información clínica y epidemiológica disponible. El objetivo de estos estudios es tratar de establecer asociaciones entre genotipos o linajes virales con el origen (ancestros), procedencia geográfica, ruta de transmisión viral, severidad de la enfermedad, grupos poblacionales afectados, y la intensidad y extensión de los brotes epidémicos. La epidemiología molecular ha generado información relevante como la etiología del DENV genotipo Asiático en los casos graves de dengue de la epidemia ocurrida en Venezuela en 1989, y la identificación de cambios nucleotídicos puntuales en el genoma viral asociados a propiedades biológicas fundamentales. En la actualidad se hace necesario realizar análisis exhaustivos del genoma viral completo, conjuntamente con el análisis bioinformático, biológico, clínico y epidemiológico de los cuatro serotipos circulantes en los países endémicos, así como instaurar en los laboratorios adscritos a los sistemas de vigilancia epidemiológica del dengue, la vigilancia molecular para la identificación de genotipos (o linajes) circulantes, lo que contribuiría entre otros aspectos al control efectivo de la enfermedad por DENV.

Palabras clave: Epidemiología Molecular, virus Dengue, Venezuela.

SUMMARY

*Dengue is the most important viral disease transmitted by mosquitoes to humans in tropical and subtropical regions of the world. This is the result of its high morbidity and mortality, the spread potential of the vector *Aedes aegypti*, the lack of effective vaccines and specific antiviral drugs, the gradual increase in secondary infections and hyperendemicity differences in distinct countries. There are four serotypes of dengue virus which are phylogenetically grouped in genotypes and subdivided in lineages or clades. Molecular epidemiology combines phylogenetic analysis of DENV detected in particular geographic areas within a defined time with the available clinical and epidemiologic information. The objective of these studies is to look for relationships between genotypes or lineages, viral origin, geographical spreading and routes of viral transmission, disease severity, population groups affected, and the intensity, speed and extent of outbreaks. Also, molecular epidemiology has generated relevant information such as the Asian genotype DENV etiology in cases of the severe dengue epidemic in Venezuela in 1989, and the identification of specific nucleotide changes in the viral genome associated with its fundamental biological properties. However, analysis of the complete viral genome, together with bioinformatic, biological, clinical and epidemiological analysis corresponding to the four serotypes circulating in endemic countries should be performed. Molecular surveillance for the identification of genotypes (or strains) circulating should be implemented in the laboratories responsible for the epidemiological surveillance of dengue, which would improve the effective control of DENV.*

Key words: Molecular epidemiology, dengue virus, Venezuela.

¹ Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales. Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (LARDIDEV/BIOMED-UC). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo Sede Aragua. Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

² Sección de Parasitología Molecular. Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo Sede Aragua. Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

³ Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Majadahonda, Madrid, España.

*Autor de correspondencia: darycamacho@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por virus dengue (DENV) se han incrementado dramáticamente en las últimas dos décadas. Así mismo, su expansión geográfica a otros países, lo que hace de este virus uno de los patógenos transmitidos por artrópodos más importantes (Rico-Hesse, 2007). Se estima que anualmente ocurren 50 millones de casos y aproximadamente 2.500 millones de personas viven en zonas endémicas (WHO, 2008). La enfermedad puede ser causada por cualquiera de los serotipos que conforman el complejo dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (Henchal & Putnak, 1990). Filogenéticamente, para cada uno de los serotipos se han identificado distintos genotipos (término genérico asignado a grupos por diferencias en su secuencia nucleotídica) (Holmes & Twiddy, 2003; Rico-Hesse, 1990). El genoma del DENV es un ARN de 11 Kb aproximadamente, cuyo marco abierto de lectura da lugar a una poliproteína única que es posteriormente clivada por proteasas virales y del hospedador. Este procesamiento post-traducciona da lugar a tres proteínas estructurales (Cápside-preMembrana/Membrana-Envoltura; C-prM/M-E) y siete no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Chambers *et al.*, 1990).

La infección es transmitida a los humanos fundamentalmente por el mosquito *Aedes aegypti* y se presenta de forma asintomática, o sintomática como fiebre por dengue (FD), fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y/o síndrome de choque por dengue (SCD). Sin embargo, recientemente la Organización Mundial de la Salud reporta una nueva forma de clasificación clínica al establecer cuadros de dengue grave y no grave, éste último a su vez segregado en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de signos de alarma (WHO, 2009).

En relación a la patogénesis de las infecciones por DENV, poco se conoce hasta ahora, particularmente por la falta de un modelo animal que desarrolle los síntomas de la enfermedad (Rico-Hesse, 2007). Un individuo puede infectarse hasta cuatro veces por serotipos heterólogos, y se ha descrito que aquellos que han experimentado infección previa son mucho más propensos a desarrollar enfermedad hemorrágica (Halstead, 2003). Sin embargo, hay estudios que indican diferencias en la virulencia como factor determinante de la patogénesis de la enfermedad por DENV (Rico-Hesse, 2007). De

cualquier manera, es evidente que la enfermedad ha sufrido cambios en torno a su expresión clínica, hecho evidenciado en la década de los 80s con la emergencia de las formas hemorrágicas de la enfermedad, cuyo inicio se registró en las Antillas, luego en Suramérica y más tarde en Centroamérica y México, convirtiéndose desde entonces en un grave problema de salud pública (Guzmán & Kourí, 2002).

En la región de las Américas, la emergencia de la FHD estuvo marcada por dos eventos epidemiológicos de gran impacto, la epidemia cubana ocurrida en 1981 (Gubler & Clark, 1995) y el segundo brote de importancia de la región acaecido en Venezuela entre 1989 y 1990, donde se registraron más de 6000 casos de FHD con 73 fallecidos. Los casos graves se asociaron al serotipo DENV-2 (PAHO, 1990). Posteriormente, se demostró el desplazamiento del genotipo Americano por el genotipo Asiático y la relación de éste último con la emergencia de los casos severos (Rico-Hesse, 1990; Salas *et al.*, 1998).

La combinación entre análisis filogenético y epidemiológico ha indicado la existencia de tres a seis genotipos dentro de cada uno de los serotipos de DENV asociados con las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad (Camacho *et al.*, 2003; Holmes & Twiddy, 2003; Messer *et al.*, 2003; Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse *et al.*, 1997). En ésta revisión se muestran los resultados de diversos trabajos relacionados con la epidemiología molecular del DENV en diferentes zonas del mundo, y de forma particular todos los realizados en Venezuela hasta el presente. En los mismos, se podrá observar como los diferentes enfoques han dado lugar a la identificación de diferentes genotipos asociados a situaciones epidemiológicas particulares; mientras que otros trabajos hacen análisis más detallados determinando cambios en algunos sitios nucleotídicos asociados a propiedades biológicas de las cepas virales. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, no resultan contundentes los estudios de genotipificación más que para establecer por los momentos, origen viral, introducción en determinadas zonas geográficas y posible impacto epidémico.

Epidemiología molecular de DENV-1

Para el serotipo DENV-1 se ha propuesto la existencia de tres a cinco genotipos. Chu *et al.* (1989) describieron tres tipos distintos de este serotipo

que agrupaban cepas provenientes de Tailandia, Filipinas y el Caribe, mientras que Rico-Hesse (1990) analizó cepas de DENV-1 aisladas de diferentes hospedadores y zonas geográficas para definir cinco grupos genotípicos sobre un valor de divergencia de 6% en la región de unión de los genes que codifican las proteínas E y NS1(E/NS1). Estos fueron: (1) América, África y Sudeste Asiático; (2) Sri Lanka; (3) Japón (1943); (4) Sudeste Asiático, Australia y México; y (5) Taiwán y Tailandia.

Por otra parte, la determinación de la variación en el gen que codifica la proteína E (52-288 nt) en aislados de mosquitos y humanos de DENV-1, colectadas un periodo de más de 50 años alrededor del mundo, permitió la definición de tres grupos genotípicos para DENV-1. El genotipo I conformado por virus aislados entre 1974 y 1978 en Naurú, Polinesia Francesa, Nueva Caledonia, Nuevas Hébridas, Fiji, Tonga, Tailandia, Singapur e Indonesia; el genotipo II constituido por aislados de la Polinesia Francesa y Nueva Caledonia (1988-1989), Islas Comoro (1993), Guinea Francesa, Guadalupe, Puerto Rico, Brasil, Perú, Nicaragua y Cuba y el genotipo III que agrupa aislados de Filipinas (1984) y Tailandia (1971). Esta clasificación sugería que las epidemias por DENV-1 en zonas del Pacífico habían sido causadas por la introducción de nuevas variantes virales, representada en éste caso por las cepas del genotipo II, las cuales habían circulado previamente en Centroamérica y Suramérica demostrando así la diseminación de éste genotipo (Chungue *et al.*, 1995).

Además de la clasificación genotípica, se identificó un proceso de recombinación intragenómica para la cepa S275/90 (Singapur), ya que en la secuencia nucleotídica de la misma se evidenció el producto de la recombinación entre virus provenientes de distintos linajes. El primer linaje correspondiente a una cepa africana aislada en Abidjan (Costa de Marfil) y un segundo linaje que incluyó aislados de Djibouti y Cambodia. De forma particular pudo observarse como las regiones no traducibles (UTR, del inglés *Untranslated Regions*) ubicadas en los extremos 5' y 3' de la cepa S275/90 correspondían al linaje Djibouti/Cambodia, mientras que un fragmento localizado a nivel de E/NS1 se mostraba igual al ancestral Abidjan. Por otra parte, aunque las implicaciones precisas relacionadas con los aspectos clínicos y epidemiológicos de este evento fueron desconocidas, no se descartaba el mayor potencial patogénico para

recombinantes considerando el aislamiento de la cepa Singapur a partir de un caso severo de dengue. Un hecho que si quedaba claro era la importancia en la selección de la región genómica secuenciada para clasificar genéticamente cualquiera de los serotipos de DENV (Tolou *et al.*, 2001).

En este mismo orden de ideas, la secuenciación nucleotídica del gen E de aislados virales venezolanos y de otras regiones del mundo colectados entre 1994 y 1997, permitió una clasificación diferente a la propuesta por Rico-Hesse en 1990. Los genotipos ahora descritos serían: (I) Hawaii, sudeste Asiático, China y este de África; (II) Tailandia; (III) Malasia; (IV) Indonesia, Pacífico Oeste y Australia; y (V) América, Oeste de África y Asia. Este último, circulante en las Américas desde que ocurriera la introducción de DENV-1 en 1977. Así mismo, la estimación de la tasa de evolución para este serotipo indicaba la circulación del mismo en varios lugares del mundo en la primera mitad del siglo XX, lo que sugería que una cepa viral asociada a una pandemia mundial era el único linaje ancestral que diera origen a los genotipos de DENV-1 presentes en Asia, Oceanía y África en los últimos 50 años.

Por otro lado, el análisis a nivel de la secuencia de aminoácidos deducida de las cepas americanas, demostraba ausencia de cambios en los aminoácidos ocurridos en un periodo de 20 años, demostrando evolución de las cepas americanas bajo el modelo de la teoría neutral (Goncálvez *et al.*, 2002), según la cual los cambios que pueden ocurrir en las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos son adaptativamente neutras, es decir tienen poco o ningún efecto en la función de la molécula (Kimura, 1983). Bajo este mismo esquema de clasificación, Avilés *et al.* (2003) secuenciaron el genoma completo de virus circulantes en Paraguay y Argentina durante el año 2000. Los virus correspondieron al genotipo V, el cual se subdividió en dos linajes. El linaje I estrechamente relacionado con aislados brasileños en 1997 y el linaje II asociado a una cepa peruana aislada en 1991 (DEI 0151) lo que hacía presumir diseminación viral a lo largo del tiempo entre países latinos.

Posteriormente, Zhang *et al.* (2005) publican un reporte donde analizan el proceso evolutivo de DENV-1 colectados en un periodo de más de 30 años mediante el análisis del gen E. El primer hallazgo fue el establecimiento de una clasificación filogenética

correspondiente a tres genotipos: (I) Cambodia, China, Taiwán y Tailandia y Djibouti de África del Este; (II) Pacífico y Asia (Australia, Indonesia, Filipinas y Tahití); (III) Asia, África y América Latina. Asimismo se observó como el genotipo I se subdividió en dos linajes, el primero correspondiente a virus aislados durante la década de los 80s y entre 1990-1994, denominados linaje “1980-1994”; mientras que los virus obtenidos durante los 90s, incluyendo aislados posteriores a 1994, conformaron el linaje “1990-2002”. En relación a estos grupos se observó el fenómeno denominado reemplazo de linajes debido a que el grupo del linaje “1980-1994” fue sustituido por el linaje “1990-2002”, lo que favorecía la presencia de patrones de diversidad genética intraserotípica variables en el tiempo, es decir persistencia temporal de determinados linajes con posibilidades de desaparecer producto de la interacción entre fuerzas selectivas y estocásticas.

En 2006, Domingo *et al.* describen un método rápido y sensible para la genotipificación de DENV-1. Los resultados indicaron la clasificación de DENV-1 en los genotipos: América-África (AMAF), Malasia (MAL), Tailandia (THAI), Asia (ASIA) y Pacífico Sur (SP), así mismo dentro del genotipo AMAF se observó la presencia de dos linajes para cepas provenientes de India, el linaje India-1 relacionado con cepas americanas e India-2 agrupado con cepas africanas y del sudeste asiático. Estos resultados sugirieron amplia circulación de cepas pertenecientes al genotipo AMAF, así como la utilidad de la región carboxilo terminal del gen E para la identificación de genotipos de DENV. Posteriormente, la secuenciación del gen de unión C/prM (208–561 nt) de cepas de DENV-1 aisladas durante más de 50 años en India, evidenció el agrupamiento de las cepas dentro de un mismo genotipo denominado III, exceptuando la cepa Delhi 2 (1997) y algunos otros aislados en 1998 que se agruparon con la cepa japonesa Mochizuki (1943).

Así mismo, estos virus mostraron una elevada variabilidad intragenotípica en India, debido a la presencia de cuatro linajes (India 1-4) (Kukreti *et al.*, 2009). Ese mismo año, Camacho *et al.*, reportan el análisis filogenético de 18 genomas completos y 25 secuencias parciales (E/NS1) de aislados de DENV-1 circulantes en una zona endémica venezolana (estado Aragua) para DENV durante el período 1997-2007. El hallazgo más relevante

correspondió al agrupamiento de los DENV-1 como genotipo V de acuerdo a la clasificación reportada por Goncálvez *et al.* (2002).

De igual forma, se observó la presencia de dos linajes que incluyeron cepas aisladas en periodos diferentes, sugiriendo reemplazo de linaje de los aislados virales circulantes en 1997 y 1998 por el linaje de virus aislados entre 2004 y 2007, además de algunos obtenidos en 1998 y 1999, sin que este hecho pudiese asociarse a la gravedad de los casos. Por otra parte, el uso de secuencias parciales demostró una vez más la utilidad de regiones, como E/NS1, para identificar de manera precisa la circulación temprana de genotipos emergentes. Asimismo, de forma reciente la reconstrucción de la historia filogenética de DENV-1 permitió establecer la introducción y tasa de evolución de éste serotipo en Colombia. Tal como había sido reportado previamente para otros países americanos (Camacho *et al.*, 2009; Goncálvez *et al.*, 2002) en este país las cepas se agruparon dentro del genotipo V. Adicionalmente, se observó un marcado proceso de cladogénesis, considerado así por la separación evolutiva de los genotipos en ramas más pequeñas conformando clados, éstos últimos denominados también linajes.

Tal proceso fue observado alrededor de 1992, por la presencia de dos linajes, hecho que ocurrió probablemente por la elevada tasa de evolución ($8,58 \times 10^{-4}$ sustituciones por sitio, por año) de la región estudiada (fragmento carboxilo terminal del gen E), sin que ello fuese un hallazgo concluyente. El hecho que sí resultaba evidentemente claro fue la necesidad de realizar estudios posteriores, que incluyeran la incorporación de metodologías moleculares en el marco de los programas de vigilancia epidemiológica (Méndez *et al.*, 2010). Otro país afectado por la circulación de DENV-1 fue Brasil, donde ocurrió la reemergencia del mismo en 2009 causando una gran epidemia entre 2010 y 2011. Los resultados del estudio filogenético de secuencias del gen E de aislados de DENV-1 permitieron corroborar la clasificación de DENV-1 como genotipo V, tal como había ocurrido en otros países latinoamericanos, sin embargo en esta oportunidad DENV-1 se mostraba segregado en múltiples linajes (I, II y III) lo que evidenciaba una vez más la necesidad de monitorear la diseminación de cepas potencialmente virulentas (dos Santos *et al.*, 2011).

Epidemiología molecular de DENV-2

El serotipo 2 del complejo de DENV es uno de los más estudiados, hecho que probablemente se deba a su elevada diseminación, así como a su potencial de causar epidemias asociadas en muchas oportunidades a la presencia de casos graves de la enfermedad. Desde el punto de vista molecular, uno de los reportes que dio inicio a investigaciones relacionadas con la epidemiología molecular de DENV-2 fue el realizado por Rico-Hesse (1990) quienes secuenciaron el fragmento de E/NS1 del mencionado serotipo a partir de virus aislados de diferentes hospedadores y zonas geográficas, lo que permitió sentar bases de estudios posteriores gracias a la región genómica escogida para la secuenciación nucleotídica y a la definición de cinco grupos filogenéticamente distintos. El primero de ellos conformado por aislados del Caribe y Pacífico Sur; el segundo por cepas de Taiwán, Filipinas, la cepa prototipo Nueva Guinea "C" y la antigua cepa Thai; el tercero grupo se constituyó por cepas vietnamitas, jamaicanas y tailandesas; el cuarto por aislados de Indonesia, Seychelles, Burkina Faso y Sri Lanka y el quinto grupo que solo incluyó aislados de África rural. En el año 2007, Rico-Hesse, quien reportara la clasificación anteriormente mencionada, publicó un árbol filogenético donde definió cuatro genotipos para DENV-2.

En 1995, Thant *et al.* secuenciaron aislados de DENV-2 provenientes del Noreste de Tailandia haciendo uso de la misma región empleada por Rico Hesse (1990), pero estableciendo una clasificación genotípica ligeramente diferente, dentro de la cual el genotipo I estuvo conformado por aislados del Caribe, Pacífico Sur, América Central y América Latina; el genotipo II por virus Asiáticos y del Pacífico Oeste; el genotipo III conformado por virus asiáticos y del Caribe, el IV constituido por aislados afroasiáticos, y finalmente el grupo V cuyos representantes eran exclusivamente africanos. Las cepas analizadas en éste estudio se agruparon dentro del genotipo II en una relación muy estrecha con la cepa de referencia Nueva Guinea "C". Por otra parte, los aislados tailandeses mostraron variaciones nucleotídicas que permitieron la segregación de dos aislados de FHD (ThNH-28/93 y ThNH-52/93), los cuales presentaron una diferencia nucleotídica respecto al aislado de SCD (ThNH-7/93), mientras que el aislado de FD (ThNH-p11/93) mostró seis diferencias nucleotídicas en relación a

la cepa causante de SCD. Este hallazgo sugería una correlación entre diferencias genéticas como posibles factores de virulencia y la presentación clínica de la enfermedad, destacando así la complejidad de la patogénesis de DENV y el origen multifactorial de la misma.

En el año siguiente, estos mismos autores (Thant *et al.* 1996), ampliaron la región de secuenciación de las mismas cepas tailandesas secuenciadas previamente al incluir todos los genes codificantes de las proteínas estructurales y la proteína no estructural NS1. El objetivo del estudio era tratar de identificar con mayor precisión diferencias moleculares que pudieran ser asociadas a factores de virulencia y severidad de la enfermedad. La comparación de las secuencias tailandesas con virus aislados en Puerto Rico (S1) y Jamaica (JAM), así como con la cepa NG^{SC} permitió una vez más establecer una elevada homología con esta última, asimismo se observó una alta conservación en las proteínas M y C. En otras secuencias de aminoácidos, como prM, se evidenció un único sitio potencial de glicosilación (posición 183-185), seis residuos de cisteína conservados y una sustitución de aminoácidos en la posición 130 de arginina en NG^{SC}, JAM, S1 y ThNH-p11/93 a isoleucina en ThNH-7/93, ThNH-28/93 y ThNH-52/93, hallazgo que fue implicado en cambios de carácter hidrofílico a hidrofóbico del mencionado residuo de aminoácido, lo que implicaría una sustitución única en cepas causantes de FHD. Los hallazgos moleculares obtenidos demostraron en este caso que la gravedad clínica puede asociarse a variaciones en sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidas, dando lugar a distintos grados de virulencia. De todos modos, los autores sugirieron el análisis de una región genómica de mayor longitud, así como la inclusión de mayor número de aislados.

El estudio pionero en Venezuela fue realizado por Rico-Hesse *et al.* en el año 1997, cuando también se analizaron cepas de diferentes orígenes geográficos, incluyendo 16 aislados obtenidos de pacientes con FD y/o FHD. El análisis de la región nucleotídica correspondiente a unión E/NS1 mostró idéntica secuencia para algunos virus del mismo país y de igual periodo, en el caso de los virus venezolanos se agruparon en genotipos Americanos y Asiáticos. Específicamente, los aislados del periodo 1990-1995 se distribuyeron entre grupos genotípicos del sudeste asiático, dejando ver un progenitor común que

sugirió una ruta de transmisión desde el sudeste de Asia hasta las Américas. Estos hallazgos mostraron gran variabilidad genética de las cepas de DENV-2 venezolanas, lo que recordaba las características de transmisión descritas para Tailandia en años anteriores (Trent *et al.*, 1989). Esta investigación mostró la asociación directa entre la introducción de cepas importadas y la gravedad de la enfermedad, y la identificación del sudeste Asiático como fuente de nuevos genotipos virales para las Américas.

En 1997, Rico-Hesse *et al.*, secuencian la región E/NS1 de DENV-2 aislados en el sudeste Asiático y cuatro países americanos (Venezuela, Brasil, Colombia y México). El árbol filogenético permitió evidenciar como virus caribeños y suramericanos aislados antes de 1990, así como virus mexicanos aislados en 1992 correspondían a un mismo grupo filogenético. Las cepas de DENV-2 de Puerto Rico, Colombia, Venezuela y México aisladas en distintos años se asociaron estrechamente al genotipo Americano representado por la cepa Trinidad/1954, mientras que otros virus suramericanos aislados durante y después de 1990 y en México en 1995 se asociaban con aislados del sudeste Asiático o Jamaica. Este hecho apoyó la idea de que la epidemia cubana de FHD del año 1989, había sido producida por virus provenientes del sudeste asiático, los cuales además causaron brotes en Brasil, Colombia, México y Venezuela.

Esta genotipificación demostraba de forma contundente el origen asiático de los virus causantes de FHD y el subsecuente desplazamiento del genotipo Americano circulante hasta ese momento en la región de las Américas. Adicionalmente, con este estudio quedaba demostrada la situación de hiperendemicidad presente en Venezuela por el elevado número de casos de FD y FHD, así como una variabilidad genética semejante a la grave situación epidemiológica descrita previamente en Tailandia (Trent *et al.*, 1989). En ese mismo orden de ideas, Salas *et al.* (1998) evidenciaron la endemicidad de los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en Venezuela y la circulación simultánea en las grandes ciudades del país con predominio de DENV-2. Así mismo, observaron incremento en la gravedad de los casos clínicos producto de la mencionada introducción de una cepa de DENV-2 correspondiente al genotipo Asiático.

Igualmente, Miagostovich *et al.* (1998) secuenciaron el gen E de DENV-2 aislados entre

1990 y 1995 en diferentes zonas de Brasil observando agrupamiento de los virus autóctonos con cepas asiáticas asociadas previamente con la gravedad de la enfermedad, hecho alarmante debido a que gran parte de la población portaba anticuerpos contra los tipos DENV-1 y DENV-4 lo que la predisponía a formas graves de la enfermedad. De igual manera, se consideraron virus colombianos circulantes antes y después de la aparición de casos hemorrágicos en 1989. Una vez más, empleando la región E/NS1, se observó la presencia de dos genotipos diferentes, uno asociado a cepas nativas americanas aisladas antes de la aparición de FHD y otras correspondientes al genotipo asiático, indicando el desplazamiento de las cepas autóctonas por genotipos agresivos, producto de la importación e introducción de virus que no habían circulado previamente (Méndez *et al.*, 2003).

Por otra parte, con el fin de entender la naturaleza de las epidemias venezolanas causadas por DENV-2, Uzcátegui *et al.* (2001) secuenciaron el gen completo de E de virus aislados entre 1997 y 2000 con diferencias en la severidad clínica. Los autores demostraron cómo los virus circulantes provenían de Asia y cómo se habían introducido en América Latina durante los 70s y 80s, además se observó la evolución *in situ* de las cepas de DENV-2 a consecuencia de la circulación viral entre Venezuela y países circunvecinos. De igual manera, la cepa Ven2 se asoció con una de baja virulencia (IQT2913) causante de brotes de FD en Perú entre 1993 y 1997. Un hallazgo interesante estuvo representado por la evidencia de recombinación de la cepa venezolana Mara4, emparentada con virus asiáticos y americanos.

Otro análisis filogenético de interés fue reportado por Cardoso *et al.* (2009) donde se demostró el origen selvático de un aislado humano de DENV-2, causante de FHD grado II, cuya secuencia nucleotídica se relacionó con el aislado de un mono en la península de Malasia en 1970. La teoría del reloj molecular sugería que los virus selváticos tenían un ancestro común de aproximadamente 63 años, lo que indicaba circulación de DENV-2 en primates no humanos durante todo ese tiempo en Malasia con el agravante de que esa cepa fue capaz de generar enfermedad grave dando como resultado la reintroducción de virus ancestrales en poblaciones humanas.

Por otro lado, Oliveira *et al.* (2010) clasificaron aislados brasileños de DENV-2 como

genotipo Asiático/Americano, los que a su vez se subdividieron en dos grupos, el linaje I (1990 y 1998) y el linaje II (2007 y 2008), hecho que sugería la circulación temporal de grupos genéticamente distintos producto de la evolución local de DENV-2 o causada por la introducción del linaje II en la zona, el cual además causó enfermedad grave incluyendo deceso de algunos pacientes. Por otra parte, la evolución de DENV-2 en Puerto Rico fue analizada ampliamente en un trabajo en el cual se estudiaron cepas circulantes durante 22 años consecutivos. Entre los hallazgos destacados se mostró un reemplazo de linajes entre 1994 y 1997, periodo en el cual se observó incidencia de DENV-2 autóctonos, así como reintroducciones de DENV-2 foráneos confirmando la necesidad de realizar muestreos sistemáticos y de instaurar sistemas de vigilancia molecular que permitan dilucidar aspectos relacionados con la dinámica de la transmisión por DENV (McElroy *et al.*, 2011).

Epidemiología molecular de DENV-3

DENV-3 fue detectado por primera vez en las Américas en 1963 y aislado en 1977 (Pinheiro & Corber, 1997). Este serotipo se consideró ausente hasta el año 1994 cuando se aisló en Nicaragua y Panamá en 1994. Posteriormente (1995-2001) circuló en países de América Central y el Caribe causando brotes de FD con algunos casos severos (Gubler, 2005, Pinheiro & Corber, 1997). En el año 2000, se detectó en países suramericanos (Brasil, Ecuador, Venezuela y Perú) (Kochel *et al.*, 2008; Uzcátegui *et al.*, 2003). Posteriormente, fue causa de epidemias de FHD/SCD en Colombia y Venezuela (Ocazonez *et al.*, 2006) así como en Paraguay, Argentina y Bolivia (2002 y 2007).

Filogenéticamente, ha sido dividido en cuatro genotipos (Chungue *et al.*, 1993; Holmes & Twiddy, 2003; Lanciotti *et al.*, 1994; Messer *et al.*, 2003) aunque Díaz *et al.* (2006) han incorporado un quinto genotipo. El primero de estos reportes fue realizado por Chungue *et al.* (1993) quienes secuenciaron fragmentos correspondientes a la región 5' del gen E con el fin de genotipificar y a su vez analizar la relación genética y la patogenicidad de cepas de DENV-3. Considerando un valor de 6% de divergencia dentro de la región, tal como se había reportado previamente para DENV-2 (Rico-Hesse, 1990), los resultados indicaron la presencia de cuatro

grupos filogenéticos. El primer grupo se conformó por aislados del Pacífico Sur (1988-1992), Singapur (1973) e Indonesia (1973 a 1991); el segundo comprendía virus asiáticos (1956-1989) incluyendo la cepa de referencia H-87; el tercero se conformó por un aislado tailandés (1971) y finalmente el cuarto grupo constituido por cepas de la Polinesia Francesa (1964-1969) y Puerto Rico (1963). Esta clasificación filogenética evidenció estrechas relaciones entre aislados recientes y otros más lejanos, como fue el caso de las cepas del Pacífico Sur (por ejemplo: Nueva Caledonia/1988, Polinesia Francesa/1992), que se agruparon con virus más antiguos (Singapur/1973, Indonesia/1973/1974).

Así mismo, se evidenció cómo una cepa tailandesa aislada en 1971 se agrupó como genotipo asiático, mientras que otra cepa obtenida de esa misma región geográfica, pero en 1974, se conformó en un grupo independiente. Este evento confirmaba la diversidad presente entre cepas circulantes de forma simultánea en áreas endemo-epidémicas, igualmente la clasificación que mostraron estos autores demostró la introducción de nuevas variantes virales como responsable de las epidemias ocurridas para ese entonces en la región del Pacífico.

Posteriormente, Lanciotti *et al.* (1994) mediante el análisis de los genes estructurales prM/M y E de cepas de DENV-3 aisladas en diferentes regiones del mundo, al igual que Chungue *et al.* (1993) lograron establecer cuatro genotipos con algunas diferencias en la clasificación, así como identificar patrones epidemiológicos que asociaron genotipos virales con diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad. Los genotipos descritos en este reporte fueron: I) Indonesia, Malasia y Filipinas, así como algunos aislados del Pacífico Sur; II) Tailandia; III) Sri Lanka, India, África y una cepa aislada en Samoa (1986) y IV) Puerto Rico y un aislado tahitiano (1965).

Esta descripción permitió entender el patrón epidemiológico y la circulación mundial de DENV-3, por ejemplo, fue posible observar como aislados de Puerto Rico en años distantes (1963 y 1977) tenían una estrecha relación entre sí, sugiriendo el mantenimiento de un ciclo de transmisión silenciosa asociado solo a casos no graves de la enfermedad. Por otra parte, los virus pertenecientes al genotipo I protagonizaron epidemias de FHD en Tahití y algunas

islas del Pacífico Sur, lo que mostraba una vez más la relación entre la introducción de un genotipo (Gubler *et al.*, 1978) y cambios en la gravedad de la enfermedad, sugiriendo diferencias en las propiedades biológicas entre los genotipos I y IV. De este modo, los autores mostraban la utilidad de la genotipificación para clasificar virus responsables de brotes epidémicos, lo que junto a observaciones epidemiológicas sugeriría que las diferencias genéticas entre y dentro de cada genotipo podrían asociarse con la virulencia y/o el potencial epidémico de DENV-3. De forma particular, la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen E se asoció con cambios en la replicación y con la gravedad de la enfermedad.

En 2001, Usuku *et al.* reportaron los resultados de la secuenciación nucleotídica de la región del genoma constituida por los genes prM, M y parte de E de DENV-3 aislados durante 1996-1998 en una epidemia ocurrida en Guatemala. El análisis filogenético indicó el agrupamiento de las cepas dentro del genotipo III, donde se ubicaban aislados panameños causantes de la epidemia ocurrida en ese país en 1994, así como aislados de Sri Lanka, Samoa y Mozambique. Este agrupamiento dejó ver dos hechos de interés, el primero asociado a la introducción de cepas como causa de epidemias y el segundo representado por la rápida diseminación viral en América Central. En ese mismo orden de ideas, Messer *et al.* (2003) publican el análisis filogenético de DENV-3 aislados en Sri Lanka, luego de que ocurriera en esa zona la emergencia de FHD en 1988.

El hecho de mayor interés resultó ser la introducción de DENV-3 (genotipo III) en América Latina en 1994, y los sucesivos aislamientos a partir de brotes de FD y FHD ocurridos en otros países de Centroamérica y Suramérica. Los resultados expresados a través de árboles filogenéticos permitieron la identificación de cuatro genotipos semejantes a la descripción realizada previamente por Lanciotti *et al.* (1994). El genotipo I incluyó aislados del sudeste Asiático e islas del Pacífico Sur; genotipo II por aislados de Tailandia; genotipo III por aislados de India subcontinental, este de África y un aislado único de Samoa y genotipo IV que incluyó virus de Puerto Rico y Tahití. De acuerdo a ésta clasificación, los aislados de DENV-3 de Sri Lanka antes y después de la emergencia de FHD mostraban una estrecha relación, lo que indicaba que la gravedad de la enfermedad no había sido producto de la introducción

de nuevos genotipos. Sin embargo, resultó de interés la segregación observada para el genotipo III (excepto 93SriLan1) en dos linajes designados como grupos A y B. El grupo A incluía aislados entre 1981 y 1989, mientras que el grupo B se integraba por los obtenidos entre 1989 y 1998. Este hecho mostraba en principio la posibilidad de introducción desde la India o este de África, considerando la estrecha relación entre aislados de estas regiones y el grupo B y la posibilidad de que ambos grupos circularan de forma simultánea en Sri Lanka en la década de los 80s con una menor proporción del grupo B.

El predominio posterior del grupo B se atribuyó a fuerzas selectivas presentes en la última porción de los 80s que favoreció la emergencia de un grupo B en Sri Lanka asociado a las formas severas de la enfermedad. Sin embargo, dada la circulación simultánea de DENV-2 y DENV-3 en Sri Lanka se vislumbró la posibilidad de que personas con infecciones primarias por DENV-2 pudieran neutralizar virus del grupo A de DENV-3 mejor que virus del grupo B de este serotipo, este hecho también fue considerado como una posible explicación a la emergencia de FHD a causa del grupo B.

Otro estudio de interés fue realizado por Peyrefitte *et al.* (2003) para caracterizar genéticamente aislados de DENV-3 circulantes en Martinica en 1999-2001, una región que no había padecido infecciones por DENV-3 en los últimos 20 años. La comparación nucleotídica de los genes prM/M y parte de E mostró un alto nivel de identidad entre las cepas de Martinica y Sri Lanka logrando agruparlas como genotipo III, el cual incluía además aislados provenientes de India, Samoa, Mozambique, Brasil, Guatemala y México. Estas observaciones indicaban, una vez más, que el ancestro común de las cepas circulantes en las Américas y el Caribe tenía su origen en el sudeste Asiático, tal como había sido demostrado previamente (Messer *et al.*, 2003; Usuku *et al.*, 2001).

Otro estudio que analizó cepas americanas correspondió al realizado por Uzcátegui *et al.* (2003), quienes a través de la secuenciación del gen de E de aislados colectados en 2000 y 2001, revelaron la asociación de los mismos con aislados de DENV-3 circulantes en países como Panamá y Nicaragua en 1994, mostrando nuevamente la introducción en la región americana del genotipo III a partir de Sri

Lanka e India. Adicionalmente, la introducción de éste genotipo en tierras colombianas entre 2001 y 2007 desde Venezuela, Ecuador y Perú fue demostrado mediante el análisis filogenético del gen E (Villabona-Arenas *et al.*, 2009).

En Tailandia, el análisis del proceso evolutivo del gen E de cepas de DENV-3 colectadas en un periodo de más de 30 años permitió su clasificación como genotipo II lo que evidenciaba principalmente una prolongada circulación viral en esa zona. Esta clasificación fue lograda luego que los autores identificaran cuatro genotipos virales, específicamente el I con virus del Sudeste de Asia y el Pacífico; genotipo II conformado por virus de Malasya, Myanmar y Tailandia; genotipo III con aislados de Asia (Sri Lanka, India), el Pacífico (Samoa), y América Latina (Brasil, Martinica, México y Venezuela); y el genotipo IV que agrupaba virus de Puerto Rico considerados para ese momento extintos por la falta de aislamiento (60s y 70s), así mismo virus ancestrales como los de Filipinas (1956) y Tailandia (1962) no pudieron ser clasificados (Zhang *et al.*, 2005).

El análisis filogenético de DENV-3 aislados en las Américas reveló tres linajes (A, B y C) dentro del genotipo III. El linaje A compuesto en su totalidad por cepas venezolanas, el linaje B por aislados de Martinica, Brasil, Bolivia, Paraguay y el linaje C que agrupó virus ecuatorianos y peruanos. Esta segregación sugirió un alto nivel de variación genética que destacaba la necesidad de caracterizar DENV-3 circulantes en la región de las Américas (Ramírez *et al.*, 2010). Posteriormente, Schmidt *et al.* (2011) analizaron la distribución espacial y temporal de DENV-3 aislados en dos brotes ocurridos de forma consecutiva en Venezuela (2001 y 2007-2008), así como secuencias de DENV-3 asiáticas y americanas. Los virus evaluados en este estudio fueron clasificados como genotipo III, lo que sugirió un predominio de este genotipo y su asociación a un elevado proceso de adaptación que permitiría su persistencia dentro de una subpoblación de especies.

Por otra parte, el análisis de las variaciones en las secuencias de las regiones E y NS5 evidenciaron sustituciones aminoacídicas relacionadas con diferentes eventos epidémicos en Venezuela. En relación a este hecho, los autores pudieron detectar diferencias entre secuencias, específicamente en

aislados del brote venezolano de 2001 se observó un residuo de glicina en la posición 374, mientras que en las secuencias del brote 2007-2008 se presentó en esa misma posición un residuo de ácido glutámico, diferencias que podrían asociarse a procesos de patogénesis viral cuando son evaluadas en determinados contextos epidemiológicos. Los resultados sugirieron la necesidad de seguir analizando patrones de diversidad genética de DENV en futuras investigaciones con el fin de detectar características de protección y eficacia de vacunas asociadas al estudio de determinados aislados virales.

Epidemiología molecular de DENV-4

Desde que este serotipo se introdujo en el hemisferio occidental en 1981, ha estado circulando de forma continua en el Caribe (Bennett *et al.*, 2003) y al norte de Suramérica, con escasas evidencias de diseminación y asociación a casos de FHD/SCD (Pinheiro & Nelson, 1997). La variación entre cepas de DENV-4 fue reportada en 1986 por Henschel *et al.*, quienes diferenciaron aislados caribeños de la cepa prototipo H-241 (Filipinas/1956). Posteriormente, aislados de DENV-4 se agruparon en tan solo un genotipo asociado a epidemias de FD (Lanciotti *et al.*, 1994).

Así mismo, Chungue *et al.* (1995) determinaron la variación genética de DENV-4 obtenidos durante más de 33 años mediante el análisis filogenético de secuencias nucleotídicas de la región 5' terminal del gen E, lo que permitió identificar solo un genotipo en el mundo, lo que en ese momento se asoció con propiedades biológicas, tales como las bajas tasas de replicación descritas en hospedadores humanos y a cuadros clínicos benignos. Sin embargo, cuando Lanciotti *et al.* (1997) realizaron el análisis de la región completa del gen E, demostraron la existencia de dos genotipos para DENV-4, el genotipo I que incorporaba cepas de Tailandia, Sri Lanka y Filipinas (incluyendo la cepa prototipo H-241) y el genotipo II conformado por virus provenientes de Indonesia, Nueva Caledonia, Tahití, Caribe y Suramérica.

Con esta clasificación se podía presumir una ruta de diseminación de DENV-4 desde Indonesia hacia las Islas del Pacífico y la posterior introducción hacia el occidente en 1981. En 2009, Forshey *et al.* describieron la emergencia de cepas de DENV-4 identificadas como genotipo II

en bosques y regiones costeras del norte de Perú donde se observó un bajo nivel de transmisión para DENV-4 entre 2006 y 2007, sin embargo en octubre de 2008, DENV-4 desplazó por completo a DENV-3, el cual había sido el único serotipo detectado en la región. Ahora bien, a pesar de la identificación del genotipo II dentro de los DENV-4, se observó un patrón de segregación de aislados entre 2006 y 2009 en un linaje totalmente diferente al grupo de cepas del año 2000, el cual se relacionaba estrechamente con un aislado ecuatoriano (1994) asociado a la introducción de DENV-4 en el Caribe. En 2011, Villabona-Arenas *et al.* reportan cuatro genotipos para DENV-4, el primero de ellos (Genotipo I) conformado por virus provenientes de Filipinas, Tailandia y Sri Lanka, el segundo (Genotipo II) por aislados de Indonesia, Polinesia Francesa y Latinoamérica, el tercero (Genotipo III) que agrupa cepas tailandesas aisladas en la década de los 90s y el genotipo IV constituido por aislados denominados selváticos. De igual forma, se identificaron dos subgrupos del genotipo II divididos geográfica y temporalmente, el primer subgrupo conformado por todos los aislados americanos y virus asiáticos aislados antes del año 2000 y el segundo subgrupo constituido por virus asiáticos aislados después del año 2000, así como virus de Indonesia y China.

En lo que se refiere a los posibles lugares de origen y diseminación de los DENV-4 (Genotipo II) circulantes en las Américas, el estudio reportado por Villabona-Arenas *et al.* (2011) corrobora teorías previas que indicaban asociación entre virus del Pacífico y aislados caribeños (Henchal *et al.*, 1986), que a su vez se diseminaron hacia países americanos, tales como Colombia, Ecuador, Guinea Francesa, Perú, Surinam y Venezuela (Forshey *et al.*, 2009). De forma reciente (Naveca *et al.*, 2012) reportan la secuencia de genoma completo de DENV-4 (Br246RR/10) obtenido a partir de un paciente con FD en Boa Vista (Brasil), el resultado obtenido permitió la clasificación de este DENV-4 como el clásico genotipo II, cuya historia de circulación en el Caribe y países suramericanos está bien documentada (Forshey *et al.* 2009; Lanciotti *et al.*; 1997; Villabona-Arenas *et al.*, 2011), incluyendo regiones como la Isla de Pascua (Chile) donde por primera vez se reportó la introducción de DENV-4 (Genotipo II) (Fernández *et al.*, 2011) y Honduras (Tang *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Esta revisión destaca la importancia que representa la epidemiología molecular en la identificación de los distintos genotipos virales, y su asociación con la situación epidemiológica particular de cada región. De igual forma, se observó la determinación del origen viral, introducción en determinadas zonas geográficas y el impacto epidémico de los diferentes genotipos de DENV. Una perspectiva de gran interés en relación a los estudios de epidemiología molecular de DENV, es la posibilidad de un mayor alcance como por ejemplo los estudios de propiedades biológicas asociadas a los genotipos circulantes, considerando la asociación de los mismos a características muy específicas, como podría ser la presentación clínica de la enfermedad. Asimismo, de gran impacto epidemiológico sería también la incorporación de herramientas moleculares en el marco de los sistemas de vigilancia epidemiológica de las regiones afectadas por la circulación de DENV.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los Autores declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Avilés G, Meissner R, Mantovani R & Jeor S St. (2003). Complete coding sequences of dengue-1 viruses from Paraguay and Argentina. *Virus Res.* **98**: 75-82.
- Bennett S., Holmes E., Chirivella M., Rodriguez D., Beltran M., Vorndam V., *et al.* (2003). Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol. Biolo. Evol.* **20**: 1650-58.
- Camacho D. E., Álvarez M., Soler M., de Quintana M., Chiarello A., Sierra G., *et al.* (2003). Diagnóstico de laboratorio de infecciones por el virus dengue en el Estado Aragua; Venezuela: Octubre 1997-Diciembre 1998. *Invest. Clín.* **44**: 91.
- Camacho D. E., Ferrer E., Rodríguez-Henríquez F., Sierra G., Bosch I., Schmidt D., *et al.* (2009). Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el periodo 1997-2007. *Salus.* **1**: 73.

- Cardosa J., Ooi M. H., Tio P. H., Perera D., Holmes E. C., Khatijar B. & Manap Z. A. (2009). *Dengue Virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with Dengue Hemorrhagic Fever. PLoSNegl. Trop. Dis.* **3**(4): e423 [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.plosntds.org> [Consulta: 2010, Marzo 16].
- Chambers H., Galler R. & Rice C. (1990). Flavivirus genome, organization, expression, & replication. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**: 649- 88.
- Chu M., O'Rourke E. & Trent D. (1989). Genetic Relatedness among Structural Protein Genes of Dengue 1 Virus Strains. *J. Gen. Virol.* **70**: 1701-1712.
- Chungue E., Cassar O., Drouet M. T., Guzmán M. G., Laille M., Rosen L. & Deubel V. (1995). Molecular epidemiology of dengue-1 y dengue-4 viruses. *J. Gen. Virol.* **76**:1877.
- Chungue E., Deubel V., Cassar O., Laille M. & Martin M. V. (1993). Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *J. Gen. Virol.* **74**: 2765-70.
- Díaz F. J., Black W. C., Farfan-Ale J. A., Lorono-Pinto M. A., Olson K. E. & Beaty B. J. (2006). Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch. Med. Res.* **37**: 760-773.
- Domingo C., Palacios G., Jabado O., Reyes N., Niedrig M., Gascón J., et al. (2006). Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1519-1529.
- dos Santos F., Nogueira F., Castro M., Nunes P., de Filippis A., Faria N., et al. (2011). First report of multiple lineages of dengue virus type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol. J.* **8**: 387.
- Fernández J., Vera L., Tognarelli J., Fasce R., Araya P., Villagra E., et al. (2011). Detection of dengue virus type 4 in Eastern Island, Chile. *Arch. Virol.* **156**: 1865-1868.
- Forshey B., Morrison A., Cruz C., Rocha C., Vilcarramero S., Guevara C., et al. (2009). Dengue Virus Serotype 4, Northeastern Peru, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **15**.
- Goncálvez A., Escalante A., Pujol F., Ludert J., Tovar D., Salas R. & Liprandi F. (2002). Diversity and evolution of the envelope gene of Dengue virus type 1. *Virology.* **303**: 110.
- Gubler D. J., Reed D., Rosen L. & Hitchcock J. R. Jr. (1978). Epidemiologic, clinical and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:581.
- Gubler D. & Clark G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* **1**: 55-7.
- Gubler D. (2005). The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. *Rev Panam Salud Pública.* **17**: 221-224.
- Guzmán M. G. & Kourí G. (2002). Dengue: an update. *Lancet.* **2**: 33-42.
- Halstead S. B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* **60**: 421-467
- Henchal E. A. & Putnak J. R. (1990). The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 376
- Henchal E. A., Repik P. M., McCown J. M. & Brandt W. E. (1986). Identification of an antigenic and genetic variant of dengue-4 virus from the Caribbean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 393-400.
- Holmes E. C. & Twiddy S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* **3**: 19.
- Kimura M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Kochel T., Aguilar P., Felices V., Comach G., Cruz C., Alava A., et al. (2008). Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000-2005. *Infect Genet Evol.* **8**:682-688.

- Kukreti H., Kumar P., Parida M., Chaudhary A., Saxena P., Rautela R. S., *et al.* (2009). Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. *J. Virol.* **6**: 1.
- Lanciotti R. S., Lewis J. G., Gubler D. J. & Trent D. W. (1994). DW: Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol.* **75**: 65-75.
- Lanciotti R. S., Gubler D. J. & Trent D. W. (1997). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* **78**: 2279-86.
- McElroy K., Santiago G., Lennon N., Birren B., Henn M. & Muñoz-Jordán J. (2011). Endurance, Refuge, and Reemergence of Dengue Virus Type 2, Puerto Rico, 1986-2007. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 64-71.
- Méndez J., Bernal M. del P., de Calvache D. & Boshell J. (2003). Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus Dengue tipo 2. *NOVA.* **1**: 1794.
- Mendez J., Usme-Ciro J., Domingo C., Rey G., Sanchez J., Tenorio A. & Gallego-Gomez J. (2010). Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virol. J.* **7**: 226.
- Messer W. B., Gubler D. J., Harris E., Sivananthan K. & de Silva A. M. (2003). Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 800-809.
- Miagostovich M., Nogueira R., Schatzmayr H. & Lanciotti R. (1998). Molecular Epidemiology of Den-2 Virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**: 625.
- Naveca F., Souza V., Silva G., Maito R., Granja F., Siqueira T. & Acosta P. (2012). Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Roraima, Brazil. *J. Virol.* **86**: 1896-1898.
- Ocazonez R. E., Cortes F. M., Villar L. A. & Gómez S. Y. (2006). Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Reintroduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* **101**:725-731.
- Oliveira M. F., Galvão J. M., Costa Ferreira Jr., Fernandes D., Bonfi D., Barreto F., *et al.* (2010). Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:576-578.
- PAHO (1990). Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol. Bull.* **11**: 7-9.
- Peyrefitte C., Couissinier-Paris P., Mercier-Perennec V., Bessaud M., Martial J., Kenane N., *et al.* (2003). Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). *J. Clin. Microbiol.* **41**:5195.
- Pinheiro F. & Nelson M. (1997). Re-emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. *Dengue Bull.* **21**: 16-24.
- Pinheiro F. P. & Corber S. J. (1997). Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.* **50**: 161-169.
- Ramírez A., Fajardo A., Moros Z., Gerder M., Caraballo G., Camacho D., *et al.* (2010). Evolution of Dengue Virus Type 3 Genotype III in Venezuela: Diversification, Rates and Population Dynamics. *Virol. J.* **7**: 329
- Rico-Hesse R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* **174**: 479.
- Rico-Hesse R., Harrison L. M., Salas R. A., Tovar D., Nisalak A., Ramos C., *et al.* (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* **230**:244.
- Rico-Hesse R. (2007). Dengue Virus Evolution and Virulence Models. *Clin Infect Dis.* **44**: 1462–1466.
- Salas R. A., Tovar D., Barreto A., de Miller E., Leitmeyer K. & Rico-Hesse R. (1998). Serotypes and genotypes of dengue virus circulating in Venezuela, 1990-1997. *Acta Cient. Venez.* (**Suppl 49**): 33.
- Schmidt D., Pickett B., Camacho D., Comach G., Xhaja K., Lennon N., *et al.* (2011). A phylogenetic

- analysis using full-length viral genomes of South American dengue serotype 3 in consecutive Venezuelan outbreaks reveals novel NS5 mutation. *Infect. Genet. Evol.* **11**: 2011-2019.
- Tang Y., Quintana M., Zhang C., Li T., Sauls D., Putnak R., *et al.* (2011). Letter to the editor: molecular genotyping of Dengue Virus Types 2 and 4 from Guatemalan and Honduran Epidemics of 2007 using the envelope glycoprotein gene. *Virus Genes.* **42**: 200-203.
- Thant K., Morita K & Igarashi A. (1995). Sequences of E/NS1 gene junction from four dengue-2 viruses of Northeastern Thailand and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. *Microbiol. Immunol.* **39**: 581.
- Thant K., Morita K. & Igarashi A. (1996). Detection of the disease severity-related molecular differences among New Thai dengue-2 isolates in 1993, based on their structural proteins and major non-structural protein NS1 sequences. *Microbiol. Immunol.* **40**: 205.
- Tolou H. J. G., Couissinier-Paris P., Durand J. P., Mercier V., de Pina J. J., de Micco P., *et al.* (2001). Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J Gen. Virol.* **82**: 1283-90.
- Trent D. W., Grant J. A., Monath T. P., Manske C. L., Corina M. & Fox G. E. (1989). Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus en Southeast Asia. *Virology.* **172**: 523.
- Usuku S., Castillo L., Sugimoto C., Noguchi Y., Yogo Y. & Kobayashi N. (2001). Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch. Virol.* **146**: 1381.
- Uzcátegui N. Y., Camacho D., Comach G., Cuello de Uzcátegui R., Holmes E. C. & Gould E. (2001). Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for *in situ* virus evolution and recombination. *J. Gen. Virol.* **82**: 2945.
- Uzcátegui N. Y., Comach G., Camacho D., Salcedo M., Cabello de Quintana M., Jiménez M., *et al.* (2003). Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J. Gen. Virol.* **84**:1569
- Villabona-Arenas C., Miranda-Esquivel D. & Ocazone Jimenez R. (2009). Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Int Health.* **14**:1241-50.
- WHO (2008). *Guidelines for the Clinical Evaluation of Dengue Vaccines in Endemic Areas.* 2008. Documento en línea: www.who.int/vaccines-documents/ (Consultado: 2009, Septiembre 07).
- WHO (2009). *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition.* France.
- Zhang C., Mammen M., Chinnawirotpisan P., Klungthong C., Rodpradit P., Monkongdee P., *et al.* (2005). Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J. Virol.* **79**: 15123.

Recibido el 06/09/2011
Aceptado el 14/03/2012

