



Diversidad genética del virus dengue serotipo-1 de Colombia en el periodo 1998-2017

María Fernanda Carreño

Trabajo de grado como requisito para optar el título de  
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Orientadora:

Raquel E. Ocazonez J.

Ph.D. Inmunología Básica y Aplicada

Universidad industrial de Santander

Facultad de salud

Departamento de ciencias básicas

Maestría en ciencias básicas biomédicas

Bucaramanga

2018

**Dedicatoria**

A Ismenia Carreño y Paola Carreño mi familia, mi motor de vida.

Y a Carlos A. Sanchez.

**Tabla de contenido**

Introducción .....	11
1. Objetivos.....	15
1.1 Objetivo General .....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2. Cuerpo del Trabajo .....	15
2.1 Marco Referencial .....	15
2.1.2 Estructura viral .....	15
2.1.2 Definición de serotipos de DEN.....	20
2.1.3 Eventos evolutivos ligados a diversidad genética de DENV.....	20
2.1.4 Mutación.....	21
2.1.5 Recombinación.....	23
2.1.6 Dispersión espacial del virus.....	23
2.1.7 Diversidad de DENV-1.....	24
2.1.8 Utilidad del conocimiento de la diversidad genética de DENV.....	26
2.1.8.1 Vigilancia epidemiológica.....	26
2.1.8.2 Desarrollo de vacunas.....	27
3. Materiales y métodos.....	30
4. Resultados.....	35
4.1 Genotipificación.. ..	35

4.2	Diversidad genética.....	36
4.3	Análisis evolutivo.....	40
4.4	Análisis demográfico.....	47
4.5	Secuencia de la proteína E-DENV-1 de Colombia versus virus CYD-TDY..	48
5.	Discusión.....	52
6.	Conclusiones.....	57
	Referencias Bibliográficas .....	59

**Lista de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Oligómeros usados para amplificar el gen E-DENV-1 en el ensayo de la RT-PCR.....	31
<b>Tabla 2.</b> Valores del estimador de log Likelihood Marginal para diferentes combinaciones de modelos en DENV-1 .....	34
<b>Tabla 3.</b> Valores de diferenciación genética (FST) entre haplogrupos DENV-1 de Colombia.....	41
<b>Tabla 4.</b> Sustituciones no homólogas de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 de Colombia (1998-2017).....	44
<b>Tabla 5.</b> Sustituciones homologas de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 de Colombia (1998-2017).....	45
<b>Tabla 6.</b> Parámetros evolutivos y de diversidad de los linajes DENV-1 de Colombia.....	46
<b>Tabla 7.</b> Pruebas de neutralidad estimadas para DENV-1 Colombia. ....	46
<b>Tabla 8</b> Epitopes lineares en la proteína E-DENV-1 de reconocimiento por linfocitos B con sustituciones de aminoácidos .....	51

### Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Proteínas del virus dengue derivadas del marco de lectura del RNA .....	16
<b>Figura 2.</b> Componentes proteicos de la superficie de DENV.....	17
<b>Figura 3.</b> Distribución temporal y geográfica de cepas DENV-1 de Colombia usadas en el estudio. .....	30
<b>Figura 4.</b> Amplificación por RT-PCR del gen E de DENV-1.. .....	35
<b>Figura 5.</b> Genotipificación de virus DENV-1 incluidos en el estudio. ....	38
<b>Figura 6.</b> Relaciones filogenéticas de DENV-1 de Colombia.. .....	39
<b>Figura 7.</b> Diversidad genética de DENV-1 de Colombia – Análisis filogenético. ....	42
<b>Figura 8.</b> Diversidad genética de DENV-1 de Colombia - Red de haplotipos. ....	43
<b>Figura 9.</b> Análisis de presión de selección en secuencias de la proteína E de DENV-1 de Colombia. .....	46
<b>Figura 10.</b> Demografía de DENV-1 de Colombia e incidencia del dengue.. .....	47
<b>Figura 11.</b> Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la proteína E de DENV-1 de Colombia y del virus CYD-TDV1.....	49
<b>Figura 12.</b> Análisis comparativo de las regiones inmunogénicas a lo largo de la proteína E de DENV-1. ....	50
<b>Figura 13.</b> Estructura 3D de la proteína E de DENV-1 de Colombia.....	51

**TÍTULO: DIVERSIDAD GENETICA DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO-1 DE COLOMBIA EN EL PERIODO 1998-2017**AUTORES: CARREÑO, María F.; OCAZIO NEZ JIMÉNEZ, Raquel E<sup>2</sup>

PALABRAS CLAVE: dengue, DENV-1, linajes, diversidad genética, sustituciones, epitopes

**RESUMEN**

El dengue es una de las enfermedades virales más frecuentes en Colombia, las últimas epidemias ocurrieron en 2001-3, 2009-10 y 2013-4. Aunque los cuatro serotipos del virus han estado circulando por años, se desconoce la relación entre dinámica evolutiva de cada uno y el ciclo epidémico. El conocimiento es necesario para el entendimiento global de la transmisión del dengue. En este trabajo se estudió la diversidad genética de una población del serotipo 1 (DENV-1) que circuló en el país durante 19 años (1998-2017). Se hicieron análisis filogenéticos, de polimorfismo y demográfico comparando 246 secuencias del gen E (168 virus de Colombia) con variados enfoques y herramientas de bioinformática. Los análisis revelaron un linaje del genotipo V, filogenéticamente cercano a virus de Venezuela, Brasil y Argentina, el cual diverge en cinco variantes genéticas (V1-V5). V1, incluye las cepas de la primera epidemia y otras de 1998-2004; V2 y V4 incluyen cepas de la segunda epidemia que circularon por 13-15 años (tMRCA alrededor de 1997 y 2002); y V5 cepas de tercera epidemia y las más recientes (2014-7) que han estado presentes 13 años (tMRCA alrededor de 2004). Cepas de años inter-epidémicos fueron de todas las variantes. No se observó estructura temporal indicando co-circulación de variantes genéticas del serotipo entre 1998-2017. La red de haplotipos reveló cuatro haplogrupos ( $p < 0.01$ , AMOVA;  $F_{st} = 0.39548$ ;  $p = 0.00$ ) similares a las variantes. El análisis evolutivo indicó selección purificadora ( $dN/dS < 1$ , Tajima's  $D < -1$ , Fu's  $FS < -1$ ) y diversificación *in situ* como los eventos más probables que dirigieron la diversidad genética viral. Se detectaron siete sustituciones de aminoácidos en la proteína de los virus de Colombia respecto al homólogo del virus CYD-TDV1 de la vacuna Dengvaxia, las cuales se localizan en epítopes para reconocimiento de linfocitos B. El análisis demográfico evidenció incremento constante y oscilante de la diversidad genética ( $N_e$ ) coincidiendo con co-circulación de linajes, dos mayores incrementos precedieron las epidemias de 2010 y 2013. Los datos confirman la alta diversidad genética de DENV-1 como factor que contribuye a su propagación. Los hallazgos aclaran parte de la dinámica de DENV de la región, conocimiento necesario para soportar el programa estatal para el control y prevención del dengue.

---

1 Trabajo de grado

2 Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Tesis RAQUEL E. OCAZIO NEZ PhD.

**TITLE: GENETIC DIVERSITY OF DENGUE VIRUS SEROTYPE-1 OF COLOMBIA IN THE PERIOD 1998-2017****AUTHORS:** CARREÑO, María F.; OCAZIO NEZ JIMÉNEZ, Raquel E<sup>4</sup>**KEYWORDS:** dengue, DENV-1, lineages, genetic diversity, substitutions, epitopes**SUMMARY**

Dengue is one of the most frequent diseases in Colombia, the last epidemics occurred in 2001-3, 2009-10 and 2013-4. Although the four types of virus have been circulating for years, the relationship between the evolutionary dynamics of each and the epidemic cycle is unknown. Knowledge is necessary for the global knowledge of dengue transmission. In this work, the genetic diversity of a population of serotype 1 (DENV-1) that circulated in the country during 19 years (1998-2017) was studied. Phylogenetic, polymorphism and demographic analyzes were made comparing 246 sequences of the E gene (168 Colombian viruses) with variants and bioinformatics tools. The analyzes indicate a genotype V, a virus phylogenetically close to Venezuela, Brazil and Argentina, which diverges in five genetic variants (V1-V5). V1, includes the strains of the first epidemic and others from 1998-2004; V2 and V4 include strains of the second epidemic that circulate for 13-15 years (tMRCA around 1997 and 2002); and V5 strains of the third and the most recent epidemics (2014-7) that have been present for 13 years (tMRCA around 2004). Strains of inter-epidemic years were of all variants. It has not been temporally structured indicating co-circulation of the genetic variants of the serotype between 1998-2017. The haplotype network revealed four haplogroups ( $p < 0.01$ , AMOVA,  $F_{st} = 0.39548$ ,  $p = 0.00$ ) similar to the variants. Evolutionary analysis received purified selection ( $dN / dS < 1$ , Tajima's  $< 1$ , D Fu's  $FS < 1$ ) and in situ diversification as the most likely events that led to viral genetic diversity. Seven protein substitutions of the Colombian viruses are detected next to the homolog of the CYD-TDV1 virus of the Dengvaxia vaccine, which are located in the epitopes for the recognition of B lymphocytes. The demographic analysis evidences the constant and oscillating increase of the genetic diversity ( $N_e$ ) coinciding with the circulation of liquids, two major increases preceded the epidemics of 2010 and 2013. The data confirm the high genetic diversity of DENV-1 as a factor that contributes to its spread. The findings clarify the part of the DENV dynamics of the region, the knowledge necessary to support the state program for the control and prevention of dengue.

---

3 Degree work

4 Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Tesis RAQUEL E. OCAZIO NEZ PhD

## Introducción

El virus Dengue (DENV) existe con cuatro serotipos (DENV-1,-2,-3 y-4) filogenéticamente y antigénicamente distintos (Chen & Vasilakis., 2011; Holmes., 2007). El virión posee membrana externa (envoltura) y la proteína E es el componente mayor. Por su localización, la proteína es vital para la infección de la célula hospedera y es el antígeno que induce una respuesta inmune de defensa robusta (Modis et al.,2003). La proteína E se ha usado para desarrollar vacunas con diversas tecnologías (Allison et al., 2001). El genoma del virus es de RNA que acumula mutaciones en cada ciclo de replicación generando variantes genéticas. En consecuencia, cada serotipo es altamente diverso desde el punto de vista genético (Waman et al., 2016).

En países endémicos la vigilancia virológica de DENV está orientada a monitorear las dinámicas evolutivas y espaciales de cada serotipo y a identificar la manera como se conectan con el patrón epidemiológico (Afreen et al., 2016; Hapuarachchi et al., 2016). Existe suficiente evidencia científica que demuestra que la diversidad genética fortalece la capacidad del virus para transmitirse: se ha observado que ciertas variantes genéticas causan epidemias de mayor magnitud (Abraham et al., 2016; Afreen et al., 2016; Moore et al., 2017) y/o poseen mayor habilidad para replicarse en el mosquito (Helt & Harris, 2005). La filodinámica combina la genealogía del virus y datos epidemiológicos brindando información de patrones de transmisión para mejor comprensión de transmisión del dengue (Eyboosh et al., 2017). La información generada en los estudios de diversidad genética soporta el desarrollo de vacunas y el desarrollo de antivirales (Afreen et al., 2016; Waman, et al., 2016).

Evidencia reciente indica que la eficacia de una vacuna depende de la cepa del virus usada para desarrollarla (Khan et al., 2017; Pollett et al., 2018). En el 2016 la OMS licenció la primera vacuna conocida comercialmente como Dengvaxia.

La cual es un preparado que consiste en cuatro virus quiméricos del virus 17D de la vacuna contra fiebre amarilla, cada quimera expresa en su superficie las proteínas (E y M) de la envoltura de DENV (Guy et al., 2011). En Colombia se llevaron a cabo parte de los estudios fase III de Dengvaxia (Rabaa et al., 2017; Villar et al., 2015). La vacuna mostró eficacia media protectora aceptable (100-75%) contra DENV-4 y DENV-3 baja (50-56%) contra DENV-1 y no protege (9-42%) contra DENV 2 (Aguiar et al., 2016; Hernández & Santos., 2016; Villar et al., 2015), además se encontró que la eficacia de la vacuna para individuos seronegativos al inicio del estudio era considerablemente menor que la eficacia para los individuos que eran seropositivos, al igual hubo mayor incidencia de hospitalización en individuos menores de 9 años (1.4%) con respecto al grupo control (0.1%) (Aguiar et al., 2016).

El dengue es la enfermedad transmitida por un mosquito más frecuente en Colombia. En los últimos 15 años ocurrieron tres epidemias (Brathwaite et al., 2012; Padilla et al., 2012). en 2001-3 cuando se notificaron 199,632 casos (tasa: 372 casos por 100.000 habitantes); en 2009-10 con 192,624 casos notificados (tasa: 577) de los cuales 16,866 fueron dengue grave; y en 2013-4 con 247,075 casos (tasa: 973.4) de los cuales 16.472 fueron graves. Santander ha ocupado por décadas primeros lugares en el listado del número de casos por departamento (Castrillón et al., 2015; Padilla et al., 2012).

Colombia es un país endémico, se le otorga esta característica debido a que varios serotipos han estado presentes desde los años 70 y desde 2001 co-circulan los cuatro en todo el territorio (Villabona et al. 2016; Villar et al. 2015; Ocazonez et al., 2006; Padilla et al., 2012). Colombia adoptó la Estrategia de Gestión Integrada para la Prevención y Control del Dengue de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009) la vigilancia virológica o monitoreo de DENV es uno de sus componentes. Aunque en Colombia co-circulan los cuatro serotipos de DENV desde hace varios años, la vigilancia virológica oficial ha estado enfocada mayoritariamente a determinar el serotipo predominante en la epidemia. Hoy día se desconoce la relación entre dinámica evolutiva de cada serotipo y ciclo epidémico.

Para el presente trabajo se seleccionó DENV-1, ya que es el serotipo que ha causado la mayoría de casos severos y fatales (Villar et al., 2015) en el país; en Santander ha sido el prevalente en los últimos 10 años correspondiendo al 50% de los aislados (Villabona et al., 2016) con respecto a los otros tres serotipos, y adicionalmente DENV-1 resultó de baja eficacia 56% a la vacuna Dengvaxia. Por otra parte al revisar secuencias del gen E-DENV disponibles en la base de datos GenBank se encontró mayor número de estas para el serotipo 1 proporcionando un escenario apropiado para este estudio.

Las dinámicas espacial y evolutiva de DENV se ha estudiado comparando secuencias del genoma viral (Pollett et al., 2018; Rasmussen et al, 2014). Los árboles filogenéticos que se generan proveen información sobre: la fecha de origen de la población viral (ancestro común más reciente), diversidad genética y relaciones de parentesco entre cepas. Al igual que análisis demográficos

informan sobre: la relación entre el tamaño efectivo de la población viral (diversidad genética), la incidencia de casos y el patrón de predominancia del serotipo.

En el presente estudio se usaron diversos análisis de secuencias para estudiar la diversidad genética de una población de DENV-1 de Colombia que circuló en un periodo de 19 años entre 1998 y 2017.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Evaluar la variabilidad genética del gen que codifica para la proteína E de DENV-1 y las fuerzas evolutivas que la dirigen en una población viral de Colombia aislada durante 19 años.

### 1.2 Objetivos Específicos

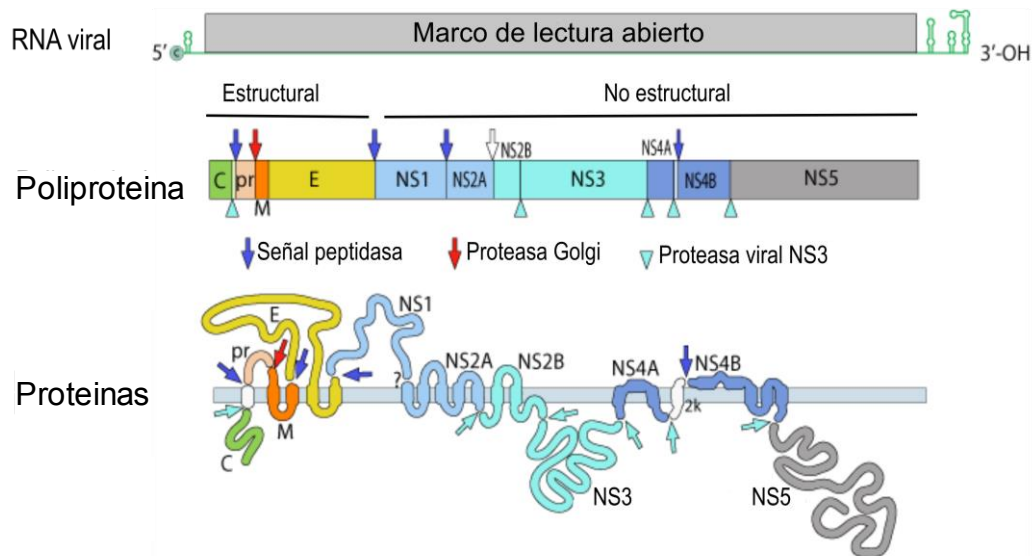
- Determinar la diversidad genética de la población viral con base en la filogenia y diversidad haplotípica
- Identificar las causas más probables de la diversidad genética
- Establecer el tipo de relación entre el patrón temporal de la diversidad genética, predominancia del serotipo e incidencia de casos de dengue
- Caracterizar la variabilidad del gen E de las cepas de Colombia respecto al homólogo en el virus CYD-TDV/1 de la vacuna Dengvaxia.

## 2. Cuerpo del Trabajo

### 2.1 Marco Referencial

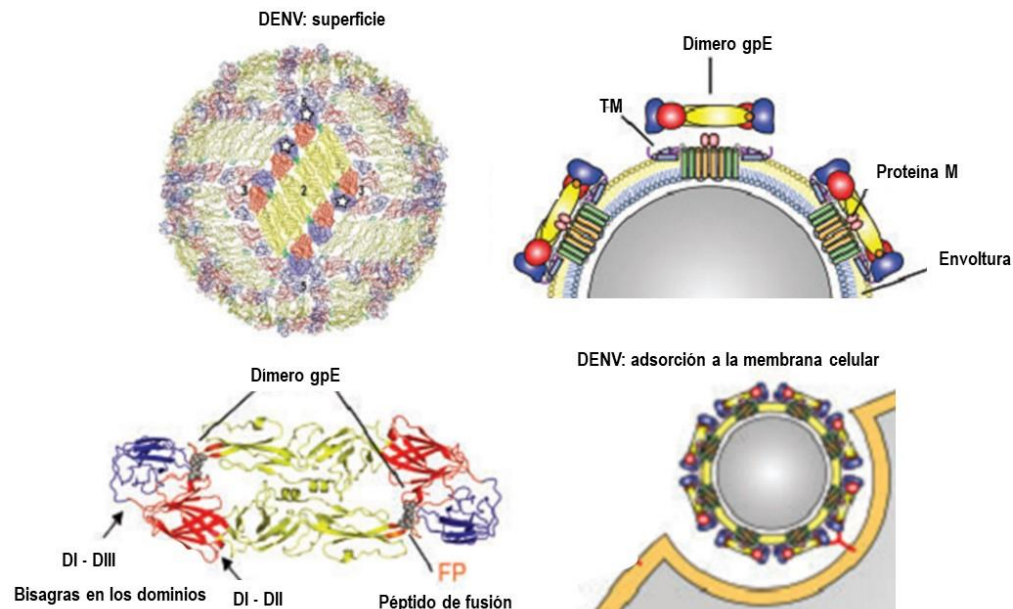
**2.1.2 Estructura viral.** DENV es un arbovirus de la familia *Flaviviridae* y género *Flavivirus*, el virión tiene un diámetro de 40-60 nm, posee envoltura lipoprotéica, cápside icosaédrica y su genoma es ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (Afreem et al., 2016; Clyde et al., 2006). El ARN, de 11.000 pares de bases (pb), posee un único marco de lectura que

traduce en una poliproteína la cual es fragmentada por enzimas virales y celulares en 10 proteínas individuales en el siguiente orden: NH<sub>2</sub>-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH (Figura1). Las tres primeras proteínas conforman la estructura del virión y las siete restantes participan en su morfogénesis. Los extremos 5' y 3' del ARN tienen forma de horquilla y son indispensables para la replicación del virus ( Zhang et al., 2004)



**Figura 1. Proteínas del virus Dengue derivadas del marco de lectura del RNA**  
[https://viralzone.expasy.org/24?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species)

Las proteínas E y M son los componentes de la envoltura viral. El virus maduro tiene una superficie lisa ensamblada a partir de 90 dímeros de proteína E organizados en un patrón característico de "espina de pescado" con la proteína M debajo, ambas proteínas participan en los procesos que internalizan el virus en su célula hospedera (Liao & Kielian, 2005; Y. Zhang et al., 2004). La Figura 2 muestra la localización y organización de las proteínas en el virión maduro.



**Figura 2. Componentes proteicos de la superficie de DENV.** El dominio I en rojo, el dominio II en amarillo y el dominio III en azul. Modificado de Stiasny & Heinz (2006)

La proteína E es una glicoproteína de ~54 KDa (495 aminoácidos), el monómero posee tres dominios conectados por enlaces flexibles que le permiten reorganizarse para el ensamblaje de la partícula viral, liberación de la célula hospedera y entrada a otra (Nayak et al., 2009). El dominio I (D1) está en la parte central, está conformado de ocho cadenas  $\beta$  y dos  $\alpha$  hélices que funcionan como una bisagra la cual facilita la interacción del virión con la superficie de la célula (Nayak et al., 2009). El dominio II (DII) posee dos protrusiones y el péptido hidrofóbico requerido para la fusión de las membranas viral y celular. El dominio III (DIII) posee conformación semejante a una inmunoglobulina y se cree que interactúa con un receptor celular que aún no está caracterizado (Moi et al., 2016). El ectodominio de la proteína E está conectado a un tallo que es una región formada por hélices anfipáticas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  que se anclan a la membrana lipídica del virus por dos hélices  $\alpha$  transmembrana (Liao & Kielian, 2005).

El conocimiento a nivel estructural de la proteína E ha permitido el desarrollo de vacunas y el descubrimiento de antivirales, debido a que porta los principales determinantes antigénicos y participa en las etapas iniciales del ciclo de vida del virus (Allison et al., 2001; Kuhn et al., 2002). El DIII es de gran interés, posee el sitio de unión con los receptores celulares y se le reconoce como el dominio diana de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo (Pitcher et al., 2015) y epítopes que generan anticuerpos de reacción cruzada con otros *Flavivirus* (Modis et al., 2003).

Determinantes antigénicos se han detectado también en la interfase (bucle de fusión y cadenas de glucano) del dímero que es la región de unión con la proteína M. Estos determinantes generan potentes anticuerpos neutralizantes común a los cuatro serotipos en individuos infectados (Rouvinski et al., 2015). Varias partes de la proteína E se han tenido en cuenta para blanco de fármacos, entre estas, el tallo, bolsillo hidrofóbico y el sitio de unión al receptor celular en el DIII. El bloqueo de cualquiera de estas regiones de la proteína puede interferir con el proceso de entrada del virus a la célula huésped (Alen & Schols, 2012).

La proteína M es una glicoproteína de ~18kDa (166 aminoácidos) posee un dominio  $\alpha$ -helicoidal N-terminal y dos dominios trans-membrana en la región C-terminal y puede formar dímeros como la proteína E (Wong, et al., 2012; Zhang et al., 2003) La proteína M sirve como chaperona de la E en los cambios conformacionales durante el ensamblaje, maduración e infección del virus (Zhang et al., 2013)

La proteína de la cápside (C) es de ~12kDa con afinidad por ácidos nucleicos y membranas lipídicas genera lo que se conoce como la nucleocápside viral y actuando como chaperona del ARN (Byk & Gamarnik, 2016). La mitad de los residuos básicos se localizan en el lado que interactúa con el ARN mientras que los hidrofóbicos forman una superficie apolar extensa en el lado opuesto del dímero que interactúa con la membrana viral (Ma et al., 2004).

Las proteínas no estructurales (NS) tienen diferentes estructuras y funciones: NS1 es de 41 kDa se encuentra intracelular, sobre la superficie de la célula y es secretada; la forma intracelular participa en la replicación del ARN viral (Clyde et al., 2006; Lindenbach & Rice, 1997), la forma secretada interactúa con células vecinas y se considera que tiene papel preponderante en la patogénesis del virus (Alcon-Lepoder et al., 2005). NS3 (69 kDa) posee función de fosfatasa y helicasa durante la síntesis de ARN viral y de serin-proteasa cuando la NS2B actúa como cofactor (Arias et al., 1993). NS5 (105 kDa) es una ARN polimerasa dependiente de ARN con acción de metil-transferasa (Sahili & Lescar, 2017) y se ha descrito como proteína que puede inducir la transcripción y traducción de IL-8; una citoquina que activa monocitos y neutrófilos para la defensa contra la invasión del virus (Medin et al., 2005). Las proteínas NS2A, NS4A y NS4B participan en la localización adecuada de otras proteínas NS para síntesis de ARN y ensamblaje de nuevas partículas (Lindenbach & Rice, 2007) al igual que tienen papel como reguladores de la respuesta inmune mediada por el interferón (Muñoz-Jordan et al., 2003).

**2.1.2 Definición de serotipos de DENV.** Los cuatro serotipos de DENV se definen según reacciones cruzadas limitadas en pruebas serológicas. Inicialmente las caracterizaciones genéticas de DENV en todos los serotipos se determinaban por " Topotipos " o variantes geográficas por fingerprinting de T1 RNasa (Weaver & Vasilakis, 2013) Más tarde, la secuenciación de ácidos nucleicos confirmó la homología de los cuatro serotipos como una organización genética conservada, lo que permitió una clasificación precisa y amplia de DENV en grupos o genotipos genéticamente distintos dentro de cada serotipo (Rico-Hesse, 1990). Rico-Hesse definió los "genotipos" de DENV como grupos de DENV con divergencia de secuencia no mayor que 6% dentro de la región elegida del genoma (unión E / NS1), en las cuales se basó la agrupación de cepas para las asociaciones que podrían inferirse por motivos epidemiológicos (Rico-Hesse, 1990).

**2.1.3 Eventos evolutivos ligados a diversidad genética de DENV.** Varios estudios sugieren que DENV endoepidémico evolucionó de progenitores selváticos y que cada serotipo lo hizo de manera independiente por una serie de eventos de divergencia. Estos eventos ocurrieron después que se conformaron poblaciones humanas en áreas urbanas suficientemente grandes para mantener la transmisión del virus (Chen & Vasilakis, 2011). Esta divergencia genética también se facilitó por intercambio del mosquito vector de especies de *Aedes* arbóreas a peri-domesticas (*Ae. albopictus*) y domésticas (*Ae. aegypti*).

No obstante la alta divergencia genética, 65-70% de aminoácidos son similares entre cepas del mismo serotipo. Análisis de secuencias del gen E sugieren que los cambios evolutivos tienden a

ser tipo reloj molecular aunque con baja frecuencia de tasas evolutivas distintas (Twiddy et al., 2003). La tasa evolutiva de DENV se ha estimado en  $7.5 \times 10^{-4}$  sustituciones por sitio cada año (s/s/y; IC:  $6.6-8.7 \times 10^{-4}$ ) y los análisis de secuencias genómicas indican que los cuatro serotipos están evolucionando a tasas con incertidumbres superpuestas siendo mayor para DENV-3 (Pollett et al., 2018).

La diversidad genética de DENV se atribuye mayoritariamente a eventos tales como:

**2.1.4 Mutación.** Se estima que se produce aproximadamente una mutación por ronda de replicación del genoma y esto se atribuye a que la RNA polimerasa viral carece de función correctora (Sim & Hibberd, 2016; Weaver & Vasilakis, 2009). Las mutaciones resultan en una acumulación de genomas genéticamente diferentes dentro de un mismo hospedero (humano o mosquito) originando poblaciones virales genéticamente distintas (Sim & Hibberd, 2016); aunque solo algunas persisten debido a cuellos de botella y esto limita la transmisión de variantes genéticas entre los hospederos (Vasilakis et al., 2007). Las tasas evolutivas (sustituciones por sitio cada año), basadas en el gen E, se han estimado desde  $4.55 \times 10^{-4}$  para DENV-1 hasta  $11.58 \times 10^{-4}$  para DENV-3. (Allicock et al., 2012).

La mayoría de las mutaciones en DENV son deletreas, sometidas a selección purificante ( $dN/dS < 1$ ), y son mayores cuanto más el virus alterna entre el mosquito y humanos como ocurre durante epidemias en localidades hiperendémicas (Weaver & Vasilakis, 2009). A la selección purificante se le atribuye la extinción y reemplazo de variantes genéticas o linajes (reveladas en árboles

filogenéticos) del genotipo de un serotipo, aunque aún persiste controversia debido a que no siempre se ha podido demostrar (Hapuarachchi et al., 2016). Algunas mutaciones pueden incrementar la eficacia biológica del virus en términos de mayor habilidad para ocupar y adaptarse a nuevos nichos ecológicos (Allicock et al., 2012; Sim & Hibberd, 2016; Villabona-Arenas & Zanotto, 2013) y evadir la respuesta inmune llevando a la generación de mutantes de escape (Bennett et al., 2010).

El papel de la selección positiva ( $dN/dS > 1$ ) o evolución adaptativa en la generación de diversidad de DENV permanece sin clarificarse (Pollett et al., 2018)(Pollett et al., 2018). Este tipo de selección por mutación A811V en la proteína NS5 se ha asociado con generación de linajes epidémicos de DENV-2 genotipo A/A en Puerto Rico (Bennett et al., 2006) y Perú (Williams et al., 2014).

Varios estudios indican que la carga inmune contra DENV de la población humana, principalmente en áreas donde co-circulan múltiples serotipos y genotipos, puede contribuir a la diversidad genética viral (de Alwis et al., 2014; Rasmussen et al., 2014). La inmunidad ejerce presión de selección favoreciendo la generación de mutantes que escapan a la acción de los anticuerpos neutralizantes y que interaccionan mejor con anticuerpos de reactividad cruzada entre serotipos y *Flavivirus* filogenéticamente cercanos (de Alwis et al., 2014).

**2.1.5 Recombinación.** La co-circulación de distintos serotipos y genotipos en una misma área geográfica posibilita la co-infección de humanos y mosquitos con cepas genéticamente distantes (Chen & Vasilakis, 2011). La recombinación se ha reportado para DENV-1, DENV-2 y DENV-3 (Abreu et al., 2016; Afreen et al., 2015; Waman et al., 2016). Hasta la fecha no existe evidencia de recombinación entre serotipos a pesar que las co-infecciones son eventos frecuentes en áreas hiperendémicas (Tazeen et al., 2017). Pese a lo anterior la expansión y persistencia de viriones recombinantes no se ha evidenciado, al parecer poseen poca aptitud biológica y por lo mismo tienen papel limitado en generación de diversidad genética comparado con otros virus RNA (De Graaf, Van Beek, & Koopmans, 2016; Simmonds & Welch, 2006).

**2.1.6 Dispersión espacial del virus.** La dispersión geográfica del virus en un mundo altamente globalizado lleva a introducciones repetidas de cepas virales de los cuatro serotipos que ocupan nuevos nichos ecológicos donde han estado circulando cepas genéticamente distantes (Aquino et al., 2008; Twiddy et al., 2003). Estas introducciones resultan en nuevos linajes que se propagan compitiendo con los que han estado presentes llevando a co-circulación de varios, reemplazos y/o extinciones (Pollett et al., 2018). Esta alta carga viral favorece los cuellos de botella y la diversidad genética viral favoreciendo la persistencia de un linaje con mayor aptitud biológica (Añez & Rios, 2013).

**2.1.7 Diversidad de DENV-1.** El serotipo fue reportado por primera vez en la Polinesia Francesa, Japón y Hawai entre 1943-1945 (Gubler, 1997). En América se reportó por primera vez en 1977 en algunos pocos países (Barbados, Cuba, Antillas Francesas, Granada, Paraguay y Puerto Rico); el virus se dispersó a países de la región entre 1980 y 1990 cuando se aisló por primera vez en Costa Rica, Guyana Francesas, Paraguay, Perú y Venezuela; y para 2005-2006 todos los países de Las Américas y El Caribe habían reportado la presencia del serotipo (Bhatt et al., 2013).

Análisis filogenéticos del gen E apoyan la existencia de cinco genotipos de DENV-1 (Chen & Vasilakis, 2011): (i) genotipo I, incluye cepas del sudeste de Asia, China y África oriental; (ii) genotipo II, cepas de Tailandia de 1950 y 1960; (iii) genotipo III, la cepas selváticas de Malasia; (iv) genotipo IV, cepas de las islas del Pacífico Occidental y Australia; y (v) genotipo V, cepas de Las Américas y El Caribe, África occidental y algunas de Asia.

Hasta la fecha, el genotipo V es el único que ha sido detectado en países de Las Américas y El Caribe y ha estado presente por cerca de 40 años (de Bruycker-Nogueira et al., 2015; Ramos-Castañeda et al., 2017; Villabona-Arenas & Zanotto, 2013). Análisis filogeográficos basados en la secuencia del gen E indican que han ocurrido dos introducciones independientes desde la India. La primera hacia las Antillas Menores en el inicio de la década de los 70 de donde el virus se dispersó a Centroamérica, Suramérica y El Caribe causando epidemias. La segunda introducción también hacia las Antillas Menores en los años 80, el linaje permaneció casi indetectable por cerca de 15 años y luego apareció en Brasil y de aquí se dispersó a otros países de Suramérica y Centroamérica. Desde entonces varios linajes de DENV-1 se originaron, propagaron y extinguieron con dinámicas muy diferentes, el fenómeno del reemplazo del linaje en sucesivos

brotos epidémicos ha sido una característica común del serotipo (de Bruycker-Nogueira et al., 2016; Villabona-Arenas & Zanotto, 2013).

Un estudio en Singapur reporta relación recíproca entre la dinámica evolutiva de DENV-1 y la transmisión de la enfermedad (Hapuarachchi et al., 2016). Se hizo análisis filogenético a micro-escala encontrándose generación constante de variantes genéticas que correlacionó con la dinámica de casos. La estrecha interacción entre evolución viral y la intensidad de la transmisión indicaron que el seguimiento de la diversidad genética a través del tiempo es una herramienta útil para inferir la dinámica de transmisión del dengue, lo cual sirve para evaluar el riesgo de una epidemia desde una perspectiva de control de la enfermedad.

La extinción y recambio de linajes de DENV-1 se ha relacionado con mutaciones del gen E (de Bruycker-Nogueira et al., 2015), algunas de las cuales resultaron en sustituciones de aminoácidos en la proteína. Estas sustituciones pueden modificar la antigenicidad de la proteína ya que reducen la accesibilidad de epítopes para anticuerpos neutralizantes e incrementar la de epítopes para anticuerpos no-neutralizantes (Dowd et al., 2015; Dowd & Pierson, 2011). Los anticuerpos no-neutralizantes ligados al virión favorecen su entrada al citoplasma de la célula favoreciendo la invasión viral en el infectado (Dejnirattisai et al., 2010).

Sobre la diversidad de DENV-1 de Colombia la información es muy limitada. Mendez et al (2010), compararon una pequeña porción del genoma (235 nt) de cepas aisladas en varios departamentos entre 1978 y 2007. Encontraron que las cepas analizadas pertenecen al genotipo V, aunque

detectaron una cepa del genotipo I que los autores consideran representa una introducción que no se propagó generando un linaje. El estudio identificó también dos linajes del serotipo que evolucionaron independientemente aunque el número de sustituciones de aminoácidos fue bajo. Ocazonez et al (2013) compararon la secuencia completa del gen E de 12 cepas aisladas en Bucaramanga y Ocaña, encontraron que las cepas fueron genotipo V pero no se pudo concluir sobre la diversidad genética debido al escaso número de cepas analizadas.

## **2.1.8 Utilidad del conocimiento de la diversidad genética de DENV**

**2.1.8.1 Vigilancia epidemiológica.** El estudio de la diversidad genética sirve para fortalecer actividades del programa del control dengue y aminorar el efecto devastador de una epidemia (de Souza et al., 2011; Mondini et al., 2009). El monitoreo del ancestro común más reciente de la población viral que está circulando informa la fecha probable de introducción en la localidad de un nuevo linaje del virus y el tiempo que ha estado circulando sin ser detectado por la vigilancia virológica rutinaria. El estudio también permite concluir si están ocurriendo múltiples introducciones de cepas virales genéticamente distintas a las que se están propagando, lo cual favorece el mantenimiento y expansión del virus y en consecuencia incrementa el riesgo de epidemia. Adicionalmente el uso de análisis bayesianos para calcular el tamaño efectivo de la población viral, que refleja su diversidad genética, puede servir como alarma de brote (Pollett et al., 2018). Por ejemplo el estudio de Bennett et al (2003) de DENV-4 muestreado por 17 años en Puerto Rico, se demostró que incrementos del tamaño efectivo precedieron al incremento de casos.

**2.1.8.2 Desarrollo de vacunas.** Un estudio reciente resalta que la inmunidad a DENV no depende solamente del serotipo sino también de las cepas a las cuales el individuo se ha expuesto (Katzelnick et al., 2015; Moi et al., 2017). Por lo tanto, la elección de la cepa para desarrollar una vacuna puede tener papel determinante en el éxito de proporcionar inmunidad de larga duración para cualquier cepa de los cuatro serotipos (Pollett et al., 2018).

Sin embargo, la relación entre distancia genética y distancia antigénica no se ha clarificado. Adicionalmente los análisis filogenéticos de DENV pueden apoyar el desarrollo de vacunas y la evaluación de su eficacia, ya que se pueden identificar sitios que contienen epítopes de reconocimiento por células B y T comunes a todas las cepas y esta información puede servir para dirigir la síntesis de péptidos inmunogénicos. Los análisis también pueden identificar mutaciones de escape a los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna, lo cual sirve para complementar el análisis de la eficacia en programas de inmunización masiva (Khan et al., 2017; Pollett et al., 2018).

El descubrimiento de una vacuna para el dengue se viene intentando hace varias décadas y se han desarrollado varios candidatos (Yauch & Shresta, 2014). Hasta la fecha la vacuna Dengvaxia es la única con licencia para aplicación masiva en áreas endémicas de dengue en Asia y América (WHO, 2017). La vacuna contiene cuatro virus quiméricos, cada uno corresponde al virus atenuado de la fiebre amarilla YF17D (vacuna) al cual le reemplazaron los genes de las proteínas E y M por sus homólogos de cada serotipo de DENV (Guy et al., 2011). Las cepas DENV usadas para la construcción de la vacuna son: DENV-1, Thai PUO-359/TVP-1140 genotipo I; DENV-2, Thaistrain PUO-218; DENV-3, Thai PaH881/88; DENV-4, Indonesia 1228 (TVP-980)

Los resultados de estudios de eficacia de Dengvaxia indican que la vacuna protege (80-100%) contra los cuatro serotipos a individuos que poseen inmunidad a DENV por una infección natural previa. No obstante, la protección es parcial en individuos sin historia de infección en el pasado con alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Sridhar et al., 2018): protege contra DENV-4 y DENV-3 pero no (50-9%) DENV-1 y DENV-2 a pesar de la presencia de anticuerpos en el torrente sanguíneo (Aguar et al., 2016; Hernández-Ávila & Santos-Preciado, 2016; Villar et al., 2015). Recientemente se informó que niños vacunados sin inmunidad previa desarrollaron dengue grave cuando se infectaron naturalmente, sugiriendo que la protección parcial inducida por Dengvaxia es un factor que favorece el desarrollo de la enfermedad (Halstead, 2017). En consecuencia, la aplicación de la vacuna se suspendió para individuos no-inmunes y está en controversia la aplicación masiva (WHO 2017). Colombia fue uno de los países donde se llevaron a cabo ensayos clínicos fase III de Dengvaxia (Villar et al., 2015).

**2.1.2.1 Diversidad genética y patogenicidad del virus.** Estudios indican que cepas del serotipo varían en patogenicidad. Con DENV-2, el genotipo Asiático-Americano se ha asociado con mayor frecuencia a enfermedad grave comparado con el genotipo Americano (R Rico-Hesse et al., 1997; Watts et al., 1999) lo mismo con respecto a mayor replicación en el mosquito *Aedes* y células dendríticas humanas (Armstrong & Rico-Hesse, 2003; Cologna et al., 2005).

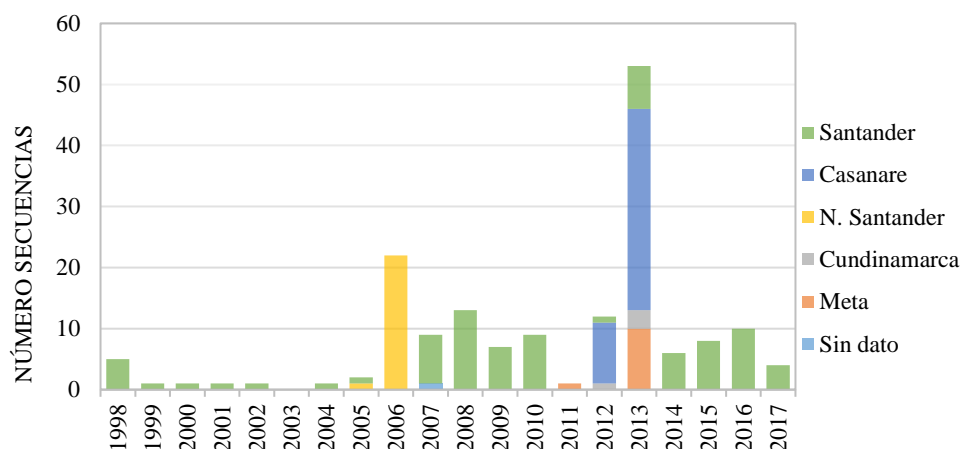
Hallazgos similares están documentados para DENV-3 entre linajes del mismo genotipo (OhAinle et al., 2011). Si bien tales discrepancias en la patogenicidad de las cepas se pueden atribuir a la

virulencia intrínseca diferencial, la patogenicidad puede estar determinada por factores individuales y ambientales que favorecen la invasión viral (Pollett et al., 2018).

La diversidad genética de DENV en el individuo infectado se ha evidenciado analizando muestras de sangre (Ke et al., 2013), aunque los datos actuales son insuficientes para concluir que es un factor determinante de la severidad de la enfermedad. En otros virus de RNA la diversidad genética dentro del hospedero se ha asociado con patogenicidad, pero para DENV se encontró que la diversidad es significativamente menor en casos de enfermedad grave (Descloux, Cao-Lormeau, Roche, & De Lamballerie, 2009). El tema ha merecido atención en los últimos años ya que puede tener implicaciones sobre la evaluación de la inmunogenicidad de un preparado candidato a vacuna y el diagnóstico por laboratorio. Particularmente, la medición de anticuerpos neutralizantes en sangre mediante la prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT), considerada un estándar de diagnóstico serológico, puede verse significativamente influenciada por la proporción de viriones genéticamente distintos (Mukherjee et al., 2014).

### 3. Materiales y métodos

**4.1 Población DENV-1 de Colombia.** La población está conformada por 166 cepas virales que circularon en un lapso de 19 años consecutivos entre 1998 y 2017, en Santander (n=84), Casanare (n=43), Norte de Santander (n=23), Meta (n=11), Cundinamarca (n=4) y otros lugares sin dato (n=1). La Figura 3 presenta la distribución temporal y geográfica de la población viral. Adicionalmente, se incluyeron dos cepas antiguas 1985 y 1996 como referencia.



**Figura 3. Distribución temporal y geográfica de cepas denv-1 de Colombia usadas en el estudio.**

**4.2 Amplificación y secuenciación de gen E.** De las cepas de Santander que conforman la población viral estudiada se incluyeron 26 en este estudio; estas cepas fueron colectadas durante un periodo de 19 años, en los casos de baja predominancia del serotipo todas las cepas aisladas por año fueron tenidas en cuenta, mientras que 3e periodos de alta predominancia del serotipo se tomaron entre 6-12 cepas por año, esto con el fin de que existiera homogeneidad en el número de cepas representantes por año. Las cepas se seleccionaron de la colección de DENV del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP).

Las cepas fueron aisladas en células de mosquitos *Ae.albopictus* (clon C6/36) de pacientes con dengue incluidos en estudios previos del Grupo de Arbovirus del CINTROP (Gomez-Rangel et al., 2008; Ocazonez-Jiménez et al., 2012; Ocazonez-Jiménez et al., 2006; Villabona-Arenas et al., 2016) y un estudio que se llevó a cabo durante la ejecución de este proyecto (Proyecto No. 2013000100011, FCTel-SGR). Las cepas se replicaron en células C6/36 y se usó el pase 3 como máximo.

El ARN viral se extrajo directamente de sobrenadantes de células C6/36 infectadas con virus usando el mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen). El ARN se transcribió a ADNc usando la transcriptasa inversa RevertAid (Thermo Scientific, EE. UU.) y cebadores hexámeros aleatorios (Thermo Scientific). La secuencia completa del gen E (~1485 pb) se amplificó por PCR convencional usando cebadores específicos del serotipo diseñados previamente en el CINTROP (Tabla 1) y ADN polimerasa Taq (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada reacción de amplificación de ADN produjo amplicones superpuestos de 1086-1336 nucleótidos de longitud. Los amplicones se secuenciaron utilizando un servicio comercial (Macrogen DNA Sequencing Service, Seoul Korea) y las secuencias se depositaron en la base de datos GenBank ([http:// www. Ncbi.nlm.nih.gov](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov)).

**Tabla 1.** Oligómeros usados para amplificar el gen E-DENV-1 en el ensayo de la RT-PCR

Cebador	Secuencia 5'-3'	Producto (nucleótidos)
D1-Fwd1-E	CCAGATGACGTTGACTGCTGGTG	1086
D1-Rev1-E	CGCAGTGTGCATTGCTCCTTC	
D1-Fwd2-E	GGAACAGACAAGATTTGCTGGT	1336
D1-Rev2-E	GCTTTTCCCCAGCTTTTCCA	

**4.3 Selección de secuencias del gen E.** Se descargaron 976 secuencias E de GenBank de DENV-1 de Las Américas y El Caribe y del Asia representantes de cada genotipo y del virus CYD-TDV1 de la vacuna Dengvaxia. Las secuencias idénticas del mismo año y país se eliminaron utilizando el algoritmo UCLUST en el paquete USEARCH v10.0.240 (Edgar, 2010). Los datos filtrados correspondieron a 246 secuencias de las cuales 168 son de Colombia.

**4.4 Análisis de secuencias.** Los diversos análisis se realizaron con 246 secuencias de las cuales 168 son de virus de Colombia (69 de GenBank y 97 obtenidas en este y otros estudios del grupo CINTROP). La presencia de secuencias recombinantes se evaluó en el programa RDP4 (Martin et al., 2015), el cual incluye varios métodos (RDP, GENCONV, BOOTSCAN, MAXCH, CHIMERA, 3SEQ). Una secuencia se considera recombinante si en al menos dos de los métodos mencionados existe recombinación y esta fuera significativa con un valor de restringencia de  $p=0.00001$  (Waman et al., 2016).

Las secuencias de virus de Colombia se alinearon con tres secuencias representantes de cada uno de los cinco genotipos del serotipo utilizando el programa MUSCLE v3.8.31. Se estimó el modelo de sustitución nucleotídica para el conjunto de datos con el paquete APE (Paradis et al., 2004) implementado en el programa R y se seleccionó el modelo con menor valor del criterio de Akaike (Posada & Thomas, 2004). El modelo GTR+G+I o general tiempo reversible más invariantes y distribución gamma fue el que mejor se ajustó a los datos. La reconstrucción filogenética se realizó bajo el criterio de Máxima Verosimilitud empleando el programa PhyML 3.1 (Guindon & Gascuel,

2003) con bootstrap no paramétrico de 100 réplicas. La topología del árbol filogenético se visualizó y editó con el programa Figtree 1.4.2 (A. Rambaut, s.f.).

Las secuencias de Colombia se combinaron con secuencias de DENV-1 genotipo V de Las Américas y El Caribe. El análisis con la herramienta Temp-Est V1.5 (Rambaut et al., 2016) indicó suficiente señal temporal (Coeficiente de correlación = 0.915) para implementar un análisis filogenético con reloj molecular. El mejor modelo de reloj molecular (estricto vs relajado) y modelo demográfico (tamaño constante, crecimiento exponencial, crecimiento en expansión, skygrid, skyline) que se ajustaron a los datos se seleccionaron por los métodos PS (path sampling) y SS (stepping-stone) usando 100 mil pasos con 100 millones de iteraciones en cada uno. Los modelos de reloj molecular relajado no-correlacionado log-normal y skygrid mostraron el mayor ajuste a los datos (Tabla 2). Todos los análisis se implementaron en el programa BEAST v1.8.3 (Drummond et al., 2012). Las muestras se combinaron y se diagnosticaron mediante inspección visual y se calcularon tamaños de muestra efectivos con el programa Tracer v1.6 (Rambaut & Drummond, 2013). El tamaño de muestra efectivo (ESS) fue superior a 200 para todos los parámetros. Los árboles de credibilidad de clado máximo (MCC) se resumieron utilizando TreeAnnotator 1.8.1.

El análisis de evolución se hizo con los programas DNAsp v.5 (Librado & Rozas, 2009) y Mega 7.0.9 (Kumar et al., 2016), se estimaron la diversidad haplotípica y nucleotídica y los valores de las pruebas de neutralidad de Tajima y Fu. Se consideraron los sitios de la secuencia con significancia estadística ( $p < 0.1$ ) por los métodos SLAC (Single likelihood ancestro counting), FEL (Fixed effects likelihood) y MEME (Mixed Effect Model Evolution). El análisis de codones se hizo

utilizando el servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>). Se evaluó evolución adaptativa usando el método aBSRELL (algoritmo adaptive branch-site random effects likelihood). Se determinaron los haplotipos y su frecuencia en la muestra, al igual que se validó estructura genética empleando un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) usando el programa ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) La red de haplotipos se construyó con el programa Network V.4.6.1.2 bajo el modelo de MJN (Median-Joining Network).

**Tabla 2.** Valores del estimador de log Likelihood Marginal para diferentes combinaciones de modelos en DENV-1

Modelo	Reloj estricto		Reloj log normal		Reloj exponencial	
	SS	PS	SS	PS	SS	PS
Coalescent bayesian skygrid	-10339,20	-10337,45	-10125,76*	10123,58*	-10451,50	10448,70
Coalescent exponential growth	-19430,30	-10048,92	-10467,34	-10950,38	-10469,00	10466,40
Coalescent expansion Growth	-18942,29	-19568,80	-10411,78	-10412,23	-10595,76	10576,70
Coalescent Constant size	-17970,24	-19511,41	-10295,80	-10396,71	-10580,00	10590,03
Coalescent Bayesian skyline	-17690,99	-10144,11	-10699,40	-10521,85	-10509,05	10574,01

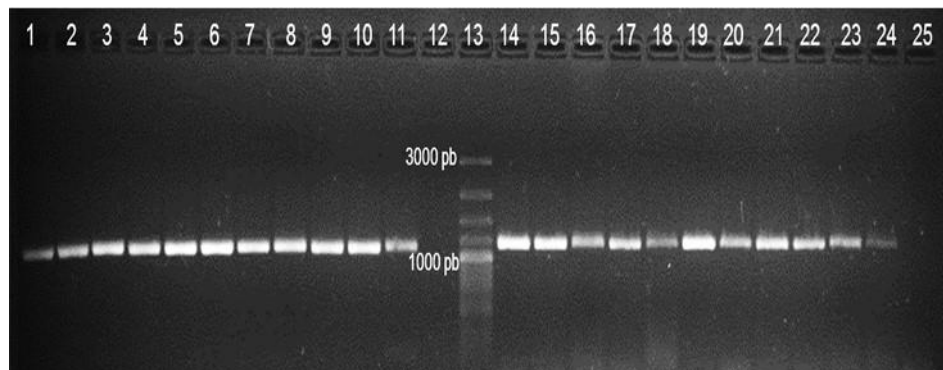
SS: selección de modelo por Stepping-stone, PS: selección de modelo Path-sampling, \* Mejor valor de *log Likelihood Marginal*.

Las secuencias de aminoácidos de la proteína E se derivaron de las secuencias nucleotídicas con el programa Mega 7.0.9 (Kumar et al., 2016) y las de Colombia se alinearon con la del virus quimérico homólogo de la vacuna Dengvaxia (GenBank= KX239894). La inferencia de epítopes lineares de células B se hizo con el programa BepiPred (<http://tools.iedb.org/bcell/>) (Larsen et al.,

2006), el método combina las predicciones del modelo de Hidden Markova y la escala de propensión de Parker (1986). Las estructuras 3D de las proteínas fueron obtenidas por modelamiento de homología (herramienta ExPasy) usando la estructura 3J2P (código PDB) como referencia, las estructuras se visualizaron en Pymol Version 1.8 Schrödinger, LLC. Al igual que el mapeo de las mutaciones de aminoácidos.

#### 4. Resultados

4.1 **Genotipificación.** El gen E completo se amplificó de 26 cepas de Santander de 2000, 2009, 2010, 2013, 2015, 2016 y 2017 (Figura 4) y se obtuvo la secuencia completa del gen E por servicio comercial (Macrogem). Las secuencias de Colombia se combinaron con secuencias representantes de cada genotipo de DENV-1. Se recuperaron los cinco genotipos, todas las cepas de Colombia incluidas en el estudio se agruparon en el genotipo V como virus de Las Américas El Caribe (Figura 5).



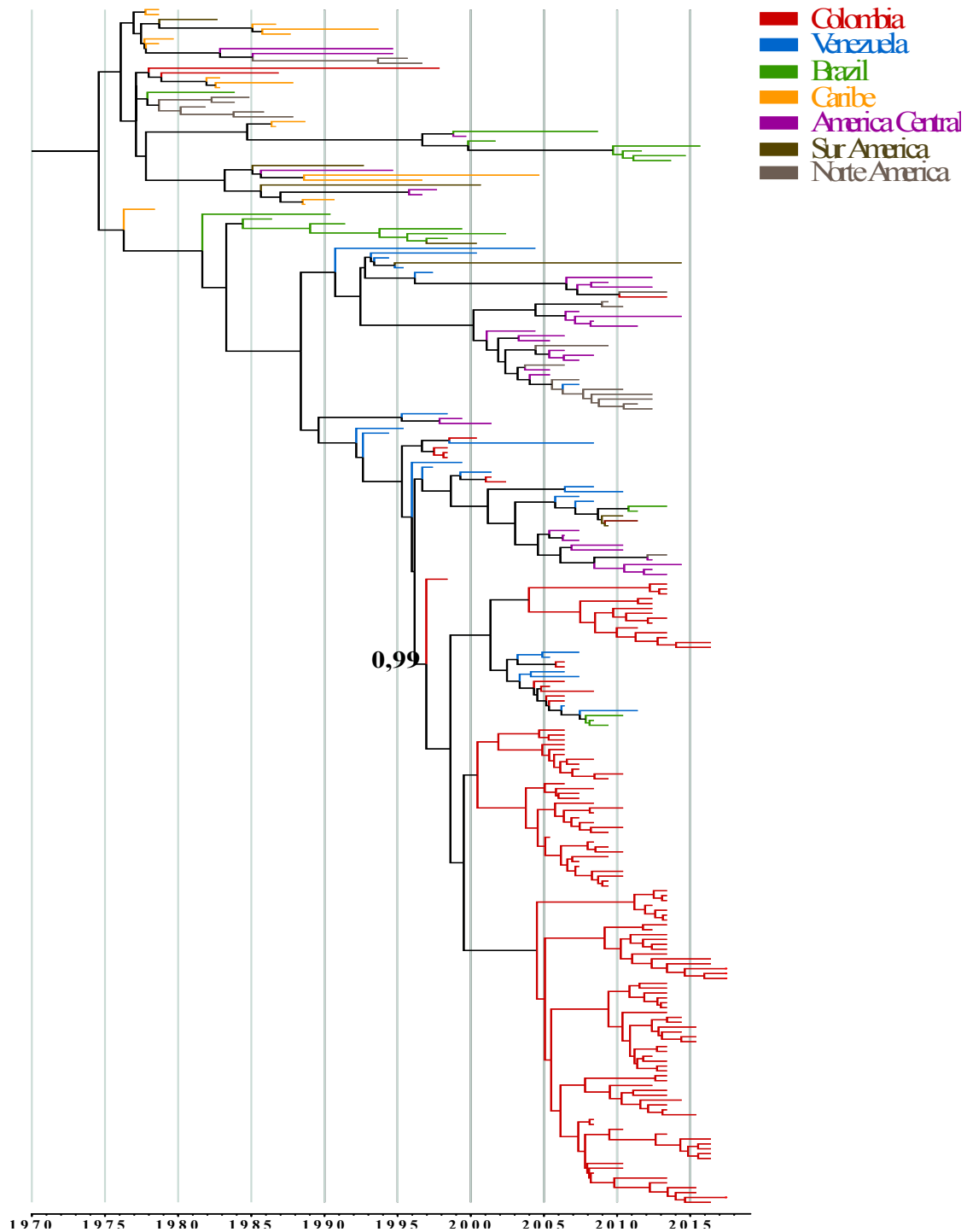
**Figura 4. Amplificación por RT-PCR del gen E de DENV-1.** Fotografía del gel de agarosa mostrando dos fragmentos del tamaño esperado: 1,143 pb (carriles 1-10) y 1,155 pb (carriles 14-23). Se muestran controles: DENV-1 Hawaii (carriles 11 y 24); no-virus (carril 25).

**4.2 Diversidad genética.** Secuencias DENV-1 de Colombia se combinaron con secuencias homólogas de virus de países de América (Figura 6). El análisis reveló un linaje (PP=0.99) de las cepas locales con variantes genéticas. Las cepas más antiguas (1985 y 1996) aparecen cercanas a virus de El Caribe, algunas 1998-2002 a virus de Venezuela, la de 2013 a virus de Centroamérica y Venezuela, y algunas del 2005-9 a virus de Suramérica (Venezuela, Brasil y Argentina). Las relaciones filogenéticas reveladas sugieren tráfico de virus de Colombia con otros países de América.

Las secuencias DENV-1 de Colombia se combinaron entre sí y el análisis reveló agrupación en cinco variantes genéticas (Figura 7). Una agrupación se consideró grupo no-monofilético (V1; PP=0.50) y las otras tres monofiléticas (V2, V3, V4, y V5; PP=1.0). V1 incluye las cepas más antiguas (1983 y años 90; 2000-2) y una cepa de Casanare de 2013; V2 agrupa la mayoría de cepas del período 2007-10 y unas más antiguas (1998, 2004-6) y parece haber circulado 13 años (tMRCA alrededor de 1997); V3 agrupa cepas antiguas (2005-6) y recientes (2011-6) y parece haber estado presente 15 años (tMRCA alrededor de 2002); V4 incluye cepas antiguas (2006-10) y parece haber iniciado su circulación hace 15 años (tMRCA alrededor de 2002); y V5 agrupa la mayoría de cepas recientes (2012-7) y al parecer inicio su circulación hace 13 años (tMRCA alrededor de 2004). No se observó estructura temporal entendida como la agrupación de secuencias de un mismo año en una misma variante, sin embargo si se evidencio co-circulación de variantes genéticas del serotipo entre 1998-2017.

La red de haplotipos reveló 128 haplotipos conformando cuatro haplogrupos (H1-H4) de la población viral, ninguno haplotipo se presenta como núcleo central (Figura 8). H1, agrupa la mayoría de cepas de 2007-10 y cepas antiguas (1998, 2004-6); H2, cepas antiguas (2002-6) y algunas de las recientes (2012-6); H3, la mayoría de cepas recientes (2013-6) y algunas del 2010-1; y H4, agrupa las cepas más antiguas (1985 y años 90; 2000-2) y la cepa del 2013 de Casanare. Las pruebas de AMOVA (0.51;  $p < 0.0001$ ) y FST (Tabla 3) soportan la agrupación en haplogrupos. Se identificaron 11 mutaciones (posiciones 309, 399, 423, 543, 582, 706, 885, 1011, 1017, 1314, y 1387) que podrían estar ligadas a la diversificación en haplogrupos. Estas mutaciones resultaron en sustitución sinónima del aminoácido excepto en las posiciones 706: N-S y 1017: T-I. No se observó temporalidad en la agrupación en haplogrupos.





**Figura 6. Relaciones filogenéticas de DENV-1 de Colombia.** El árbol fue construido con 236 secuencias del gen E de cepas de Las Américas (168 de Colombia) y El Caribe. Se muestra el linaje (PP=0,99) de Colombia y cepas relacionadas con las otras.

**4.3 Análisis evolutivo.** La diversidad haplotípica se encontró como  $h=0,9930 \pm 0,0022$  y la diversidad nucleotídica como  $\pi= 0,01293 \pm 0,00043$ . Las secuencias DENV-1 de Colombia se compararon con la secuencia de la cepa más antigua del país que se aisló en 1985 (AF425616\_1985). Se evidenciaron 277 sustituciones nucleotídicas de las cuales 54 resultaron en sustitución del aminoácido de las cuales 10 (posiciones 51, 222, 225, 230, 256, 271, 274, 383, 384 y 474) están en epítopes que reconocen linfocitos B (tabla 4 y 5).

Las tasas evolutivas calculadas de las variantes genética V4 y V5 están cercanas a las reportadas por Costa et al (2012) para DENV-1 ( $7,5 \times 10^{-4}$ , HPD 95% =  $6.6 \times 10^{-4}$ - $8.4 \times 10^{-4}$ ), mientras que las tasas de las V2 y V3 son mayores (Tabla 6).

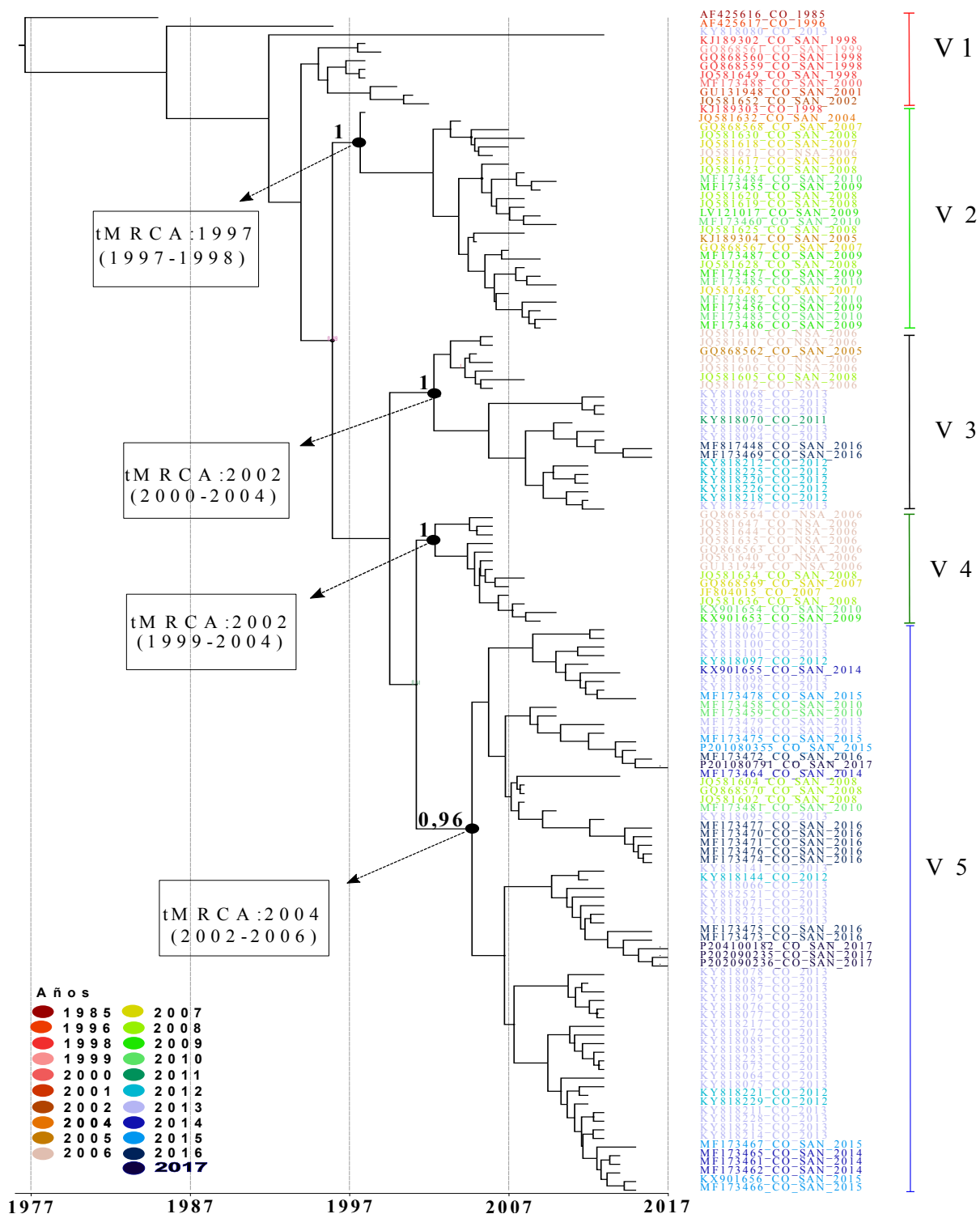
Las pruebas de neutralidad (Tabla 7) indicaron que la selección purificante suprimió cambios deletéreos en la población total DENV-1 y en las variantes genéticas, un evento que favorece el mantenimiento y expansión del virus (Lourenço & Recker, 2010). Es plausible que esta expansión se favorezca por la variabilidad genética observada. Los valores  $d_N/d_S$  por los métodos FEL y SLAC para todos codones, excepto 248, oscilaron entre -0.0 y -0.1 ( $p < 0.01$ ) en 45 estimaciones (Figura 9), indicando que la población viral estuvo sometida a presión de selección negativa o purificadora (Holmes, 2007). En cepas de V2, V4 y V5 del 2009, 2014, 2015, los valores  $d_N/d_S$  para el codón 248 resultaron positivos por los tres métodos (FEL: 299.793,  $p= 0.0085$ ; SLAC: 158.635,  $p= 0.0595$ ; MEME: 757.943,  $p=0.0047$ ), con tres sustituciones Q248H, Q248R y Q248P. Esta posición no está en epítopes para reconocimiento por células B. El análisis por el método ABSREL no encontró evidencia de selección diversificante episódica, un total de 255 ramas fueron

evaluadas, la significancia se evaluó usando Likelihood Ratio de en un umbral de  $p \leq 0.05$ , lo anterior indica que la evolución adaptativa no parece haber dirigido la diversificación genética observada.

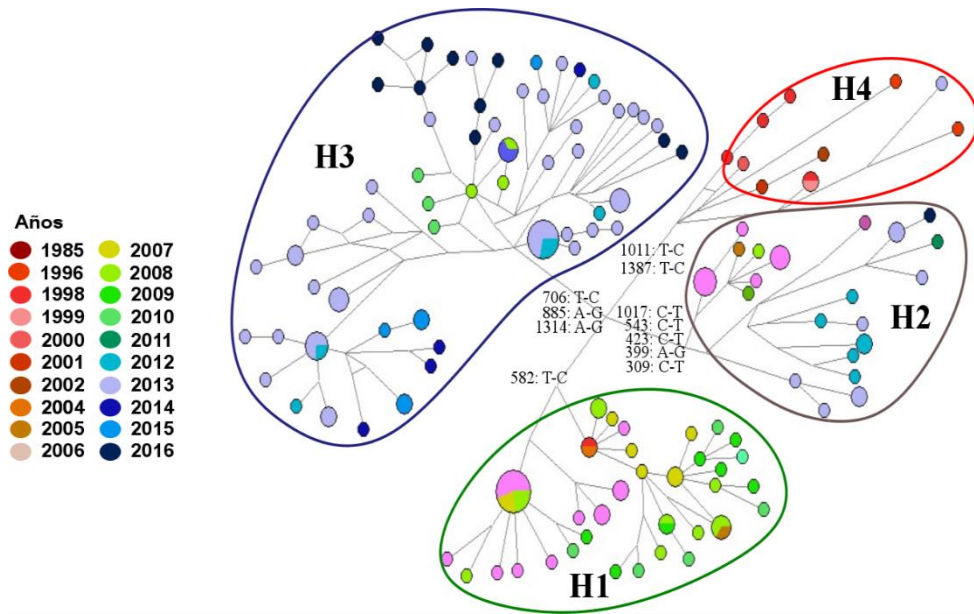
Tabla 3. Valores de diferenciación genética (FST) entre haplogrupos DENV-1 de Colombia

Haplogrupo	H2	H3	H4
H1	0.48200	0.41073	0.37600
H2	-	0.39182	0.36006
H3	-	-	0.29274

Valores cercanos a 1.0 indican alta diferenciación genética.



**Figura 7. Diversidad genética de DENV-1 de Colombia – Análisis filogenético.** El árbol fue construido con 136 secuencias del gen E de cepas del 1998-2017 (95secuencias son de virus de los Santanderes). Se presentan las variantes genéticas (VI – V5) y el ancestro común más reciente (tMRCA) para cada grupo monofilético.



**Figura 8. Diversidad genética de DENV-1 de Colombia - Red de haplotipos.** La red fue construida con 168 secuencias del período 1998-2016. Se revelan cuatro haplogrupos, H1 y H4 contienen la mayoría de cepas antiguas; H3 y H2 la mayoría de las recientes. Se muestran nueve sustituciones sinónimas.

**Tabla 4. Sustituciones no homólogas de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 de Colombia (1998-2017).**

Posición				Posición			
Gen	Proteína	Cambio	Cepas: #	Gen	Proteína	Cambio	Cepas: #
151	51	T-A	1	768	256	Q-P	2
336	112	S-G	1	813	271	Q-R	1
384	128	K-E	1	822	274	G-E	1
396	132	Y-H	3	879	293	T-A	1
414	138	S-L	1	891	297	M-T	1
513	171	S-A	4	1014	338	S-L	10
666	222	S-P	2	1017	339	T-I	1
675	225	S-L	3	1092	364	P-S	1
690	230	T-P	1	1149	383	G-S	1
723	241	K-I	1	1152	384	E-G	2
726	242	T-A/S	2	1326	442	T-A	1
744	248	Q- H/R/P	6	1362	454	T-I	30
747	249	E- G/V	3	1422	474	S-P	1
762	254	G-R	4				

Sustituciones en 167 cepas respecto a la cepa de Colombia más antigua (1985).

**Tabla 5. Sustituciones homólogas de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 de Colombia (1998-2017).**

Posición		Cambio.	Cepas: #	Posición		Cambio	Cepas: #
Gen	Proteína			Gen	Proteína		
<b>16</b>	<b>6</b>	<b>V-I</b>	<b>171</b>	<b>1026</b>	<b>342</b>	<b>E-D</b>	<b>1</b>
23	8	N-S	6	1095	365	V-I	1
100	34	M-I	1	1134	378	I-L	2
165	55	V-I	2	1140	380	V-L	1
279	96	F-L	5	1146	382	A-V	1
462	154	E-D	1	1161	387	L-W	1
696	232	N-S	1	1275	425	M-I	164
720	240	F-L	3	1290	430	T-S	4
729	243	A-V	1	1296	432	M-V	171
750	250	V-L/M	4	1308	436	V-L	4
834	278	I-F	1	1329	443	A-V	4
867	289	M-I	1	1371	457	I-V	21
1011	337	F-I	1	1446	482	V-I	1

Sustituciones en 167 cepas respecto a la cepa de Colombia más antigua (1985)

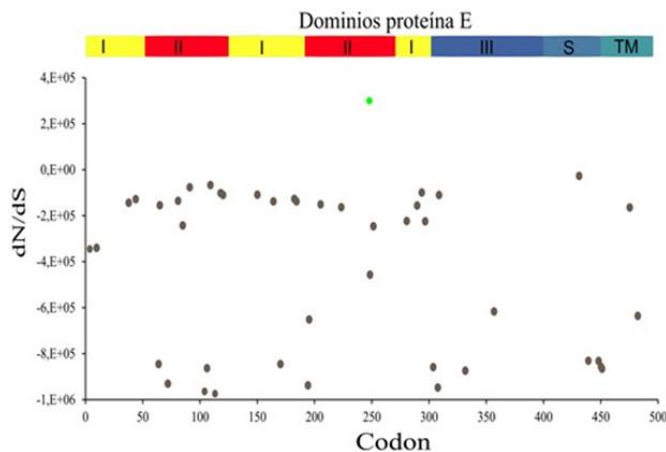
**Tabla 6.** Parámetros evolutivos y de diversidad de los linajes DENV-1 de Colombia

Variante	tMRCA (95% HPD)	TE (95% HPD)	Haplotipos	
			Número	H ±DS
V2	1997 (1997-1998)	1.66x10 <sup>-3</sup> (1.85x 10 <sup>-4</sup> - 3.83x 10 <sup>-3</sup> )	21	0.986±0.018
V3	2002 (2000-2004)	2.86x10 <sup>-3</sup> (6.64x10 <sup>-4</sup> -5.91x10 <sup>-3</sup> )	35	0.994±0.009
V4	2002 (1999-2004)	9.07x10 <sup>-4</sup> (1.95x10 <sup>-6</sup> -2.47x10 <sup>-3</sup> )		0.983±0.006
V5	2004 (2002-2006)	7.29x10 <sup>-4</sup> (5.79x10 <sup>-5</sup> -1.89x10 <sup>-3</sup> )	56	0.994±0.009

tMRCA:ancestro común más reciente. TE: tasa evolutiva promedio; HPD (*highest probability density*): intervalo de credibilidad. h±DS: diversidad haplotípica - desviación estándar.

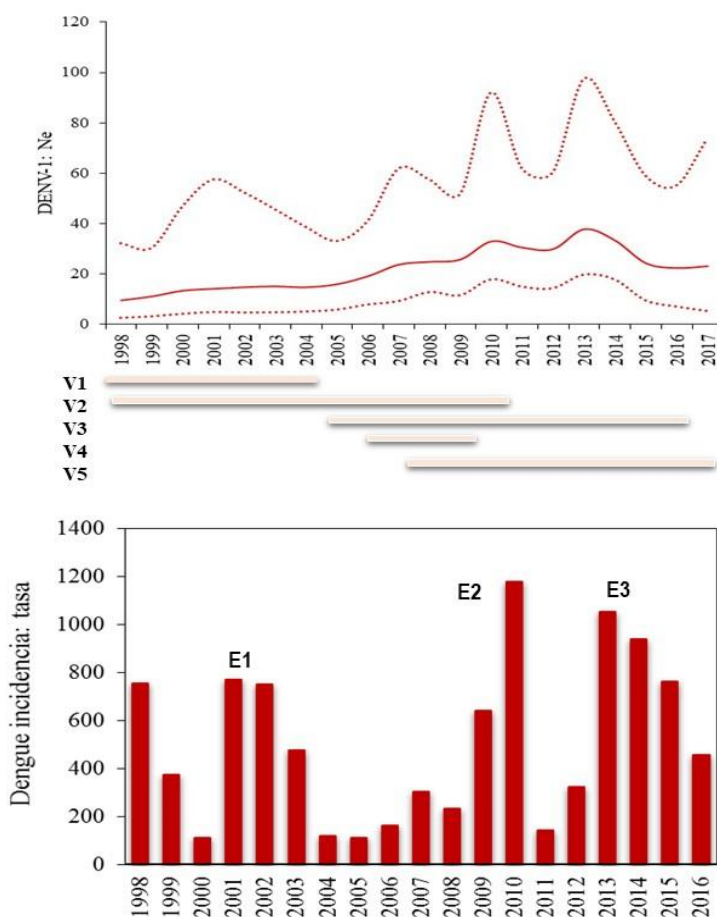
**Tabla 7.** Pruebas de neutralidad estimadas para DENV-1 de Colombia.

Población	dN/dS	p	Tajima's D	p	Fu's FS	p
Total	-9.387	<0.001	-2.018	<0.05	-23.780	<0.001
V2	-5.464	<0.001	-1.594	<0.05	-2.895	<0.05
V3	-6.916	<0.001	-1.449	<0.05	-19.518	<0.001
V4	-2.375	<0.012	-1.129	<0.05	-1.721	<0.05
V5	-7.265	<0.001	-1.691	<0.01	-24.208	<0.001



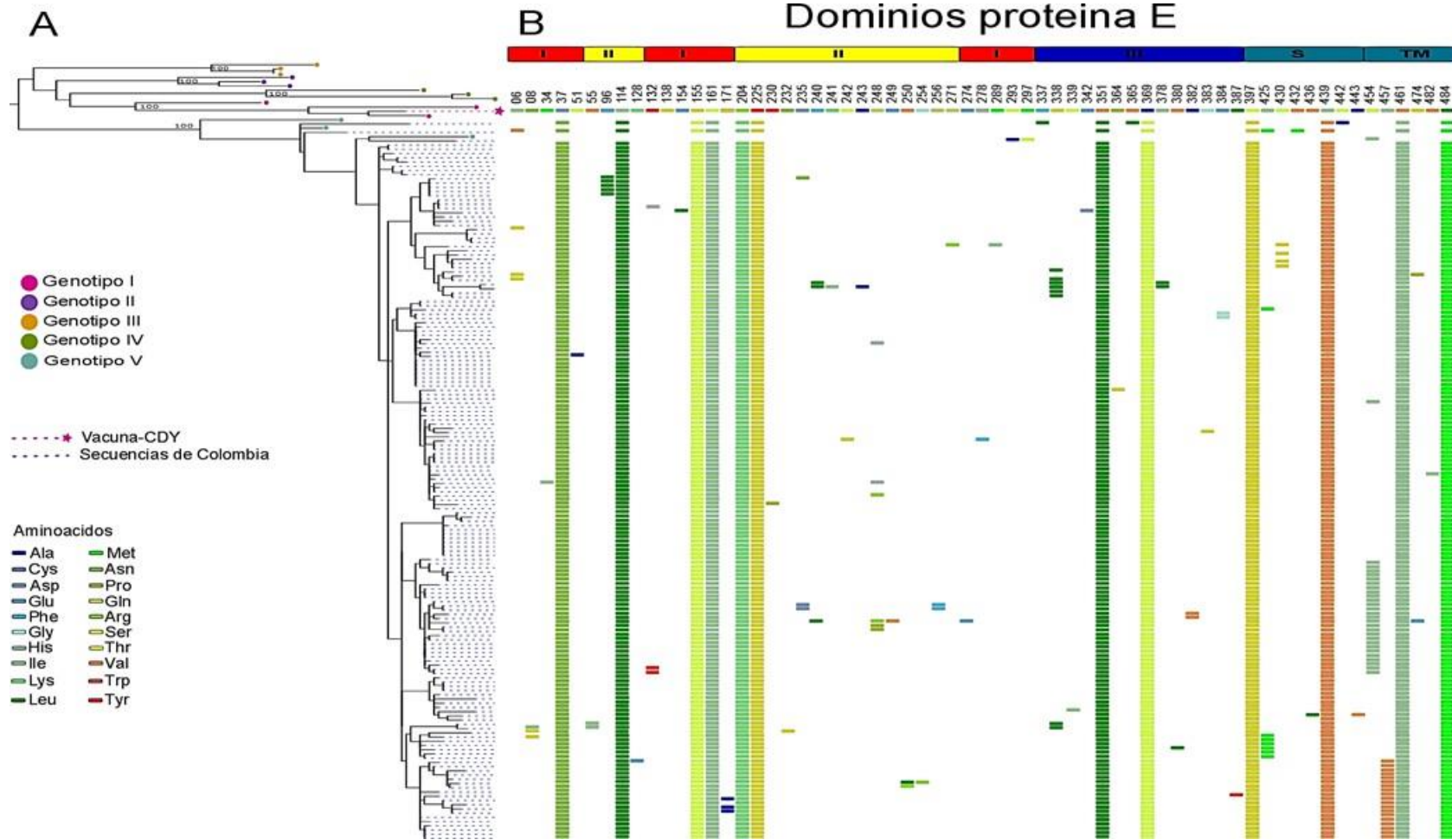
**Figura 9.** Análisis de presión de selección en secuencias de la proteína E de DENV-1 de Colombia. Dominio: DI (Amarillo), DII (Rojo), DIII (Azul). En verde codón bajo presión de selección positiva, en gris codones bajo presión de selección negativa ( $p < 0.1$ ).

**4.4 Análisis demográfico.** La reconstrucción reveló incremento constante y de tipo oscilante de la diversidad genética, expresada como el tamaño efectivo de la población viral ( $N_e$ ) (Figura 10). fue mayor a partir de 2009, antes de la epidemia de 2010, coincidiendo con co-circulación de cuatro variantes genéticas (V2, V3, V4 y V5); se redujo en 2011 cuando cepas de la variante V2 no se detectaron; un segundo incremento se reveló antes de la epidemia de 2013 coincidiendo con co-circulación de las variantes V3 y V5; y luego se redujo en 2015-7.



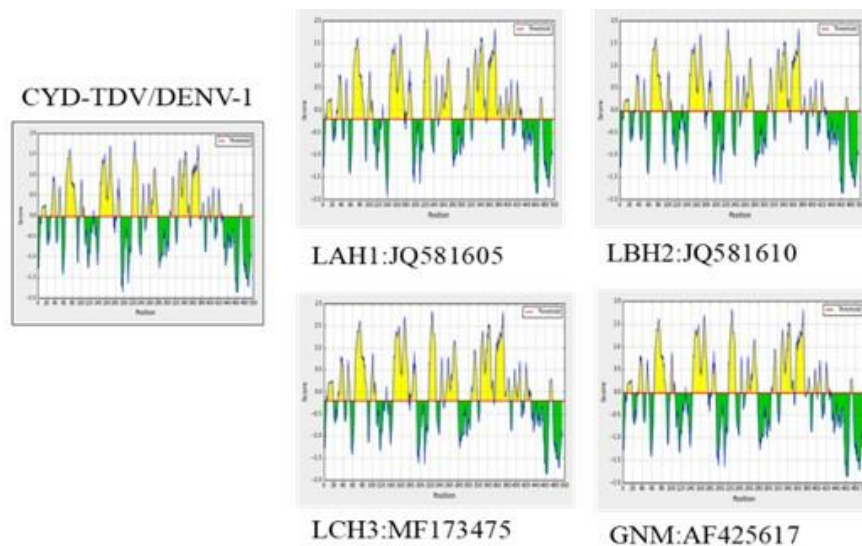
**Figura 10. Demografía de DENV-1 de Colombia e incidencia del dengue.** Reconstrucción del tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) usando inferencia bayesiana coalescente (Bayesian Skygrid), incluye cepas de 1998-2017 ( $n=168$ ). Las barras horizontales representan las variantes genéticas (V1-V5) del serotipo. E1-E3 son años epidémicos.

**4.5 Secuencia de la proteína E-DENV-1 de Colombia versus virus CYD-TDV1.** Se encontraron 63 sustituciones de aminoácidos en cepas de Colombia de las cuales 12 fueron comunes en todas (Figura 11). El mayor número de sustituciones (28 de 63) se encontraron en el dominio DIII, la mayoría (n=21) sinónimas. En los dominios DI y DII se encontraron respectivamente, 9 y 10 sustituciones no-sinónimas y son de baja frecuencia en la población viral. Del total de sustituciones, cuatro son no-sinónimas en el dominio III en las posiciones: 39 (Acido aspártico-Asparagina), 161 (Adenina-treonina), 369 (Adenina-treonina) y 494 (Glutamina-Glicina), la sustitución 369 se encontró en todas las cepas de Colombia. En un intento de evidenciar si las sustituciones modifican la estructura 3D de la proteína, se hizo modelamiento por homología con la proteína 3J2p, sin embargo no se encontraron diferencias entre cepas locales y el virus de la vacuna Dengvaxias (RMSD < 0.3Å).



**Figura 11. Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la proteína E de DENV-1 de Colombia y del virus CYD-TDV1.** A, árbol filogenético ML mostrando los virus de Colombia (azul, genotipo V) y el virus vacunal (\*rosado, genotipo I). B, alineamiento de aminoácidos de cada dominio (I, rojo; II, amarillo; III, azul) de la proteína realizado con el programa Mega 7: los colores indican aminoácidos disímiles y la carencia de color aminoácidos iguales.

El análisis de predicción de epítopes reveló un número similar de regiones inmunogénicas en los virus de Colombia y el CYD-TDV1: 16-18 versus 18 (Figura 12). Las sustituciones (n=6) comunes en las cepas de Colombia están en epítopes de reconocimiento por linfocitos B (Tabla 8, Figura 13). Los epítopes predichos fueron comparados con epítopes reportados en la base de datos Immune Epitope Database And Analysis Resource (Blast del 70%) y se encontraron varios reportados para DENV-2. Se destacan los epítopes en las regiones 33-41, 144-176 y 218-233 para interacción con anticuerpos neutralizantes con sustituciones no-sinónimas.

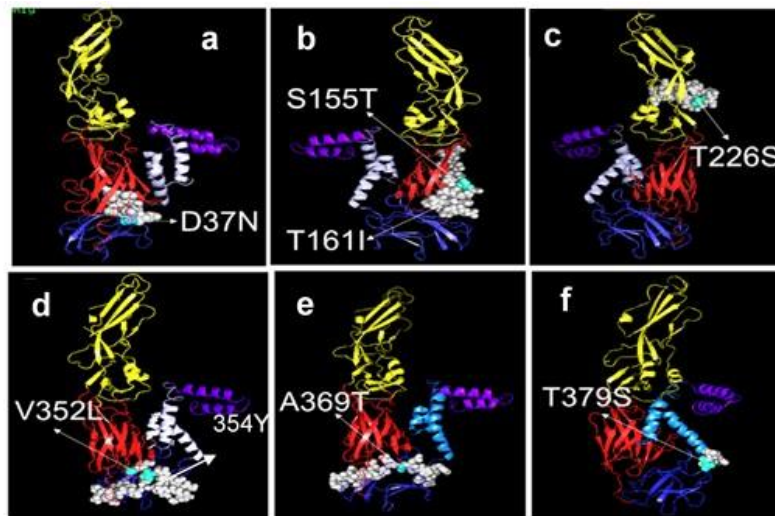


**Figura 12. Análisis comparativo de las regiones inmunogénicas a lo largo de la proteína E de DENV-1.** Se incluyeron cepas locales representantes de cada subpoblación viral. Regiones predichas con base en el índice de propensión en amarillo y regiones no inmunogénicas en verde.

**Tabla 8 Epítopes lineares en la proteína E-DENV-1 de reconocimiento por linfocitos B con sustituciones de aminoácidos**

Epítope	Posición	Virus CDY-TDV1	Virus de Colombia
A	33-41*	TTMAKNKPTL	TTMAKDKPTL
B	144-176*	HTGDQHQVGNETTEHGTIA TITPQAPTSEIQLT	HTGDQHQVGNESTEHTTATI TPQAPTSEIQLT
C	218-233	LPWTSGASTSQETWNR	LPWTSGATTSQETWNR
D	326-352*	YEGTDAPCKIPFSTQDEKG VTQNGRLI	YEGTDAPCKIPFSTQDEKGV QNGRVIT
E	356-376	PIVTDKEKPVNIETEPFGE S	PIVTDKEKPVNIEAEPFGE
f	394-399	KGSSIG	KGSTIG

\*: Reportados por (Thirawuth et al., 1989) Sustituciones en rojo.



**Figura 13. Estructura 3D de la proteína E de DENV-1 de Colombia.** Se presentan sustituciones de aminoácidos respecto al virus CYD-TDV1: D: ácido aspártico; T: treonina; S: serina; V: valina, A: alanina. El análisis se hizo usando Phymol

**5. Discusión.** El patrón epidemiológico del dengue en Colombia se caracteriza por ciclos epidémicos con oscilaciones del serotipo dominante (Villar et al. 2015; Padilla et al. 2010). En Santander entre 1998-2017, DENV-1 tuvo un patrón oscilante en predominancia hasta 2010: 54%, 5.1%; 50.0% y en los siguientes años continuó como el dominante (48.1%) hasta 2017. En los períodos de dominancia ocurrieron epidemias. El presente trabajo documenta la diversidad genética de la población de DENV-1, presente en el período 1998-2017, basada en el polimorfismo del gen de la proteína de la envoltura viral.

DENV-1 es altamente diverso y una expresión es su agrupación en cinco genotipos (Chen & Vasilakis 2011). La población viral analizada en este estudio resultó genotipo V como el de otras cepas aisladas en el país (Mendez et al., 2010; Ocazonez et al., 2013). Varios análisis filogenéticos bien soportados demuestran que el genotipo V es el serotipo que se ha reportado en Las Américas y El Caribe (de Bruycker-Nogueira et al., 2016; Villabona et al. 2013; Allicock et al. 2012). No es posible descartar que otro genotipo esté presente, esto podría explicarse debido a que los viajes desde Colombia hacia países asiáticos se han incrementado, proporcionando el escenario para introducciones de cepas que no se han detectado por la vigilancia rutinaria, ya que esta solo reporta el número de casos de DENV y el serotipo más frecuente.

Existe evidencia suficiente soportando el concepto de que la diversidad genética de DENV es una característica que configura su patrón de propagación (Costa et al., 2012; Hapuarachchi et al., 2016; Lee et al., 2012). La diversidad genética le permite al virus responder y adaptarse a cambios de los hospederos y del ambiente que pueden resultar en su extinción por lo general genera un linaje de cepas con mayor aptitud biológica (Hapuarachchi et al., 2016. Pollett et al.,

2018). En este estudio se evidencia la alta diversidad de DENV-1 de Colombia, el análisis filogenético reveló cinco grupos genéticos distintos cuatro de los cuales se pueden considerar linajes con base en la topología del árbol y probabilidad posterior mayor a 0.9. Con los mismos parámetros usados en estudio, la presencia de varios linajes de DENV-1 se documentó en Brasil (de Bruycker-Nogueira et al., 2015, 2016) y otros países de América (Allicock et al. 2012 ).

Los linajes de DENV-1 de Colombia pueden ser producto de introducciones de cepas genéticamente distintas que establecieron propagación. El análisis filogenético combinando secuencias de Colombia y América sugiere introducciones: las cepas del V3 aparecen agrupadas con cepas de Venezuela y Brasil, algunas cepas antiguas aparecen mezcladas con cepas de otros países. Esta distribución sugiere tráfico de virus entre varios países y Colombia. En un análisis filogeográfico realizado en el laboratorio (Jiménez et al., 2017) se evidenciaron tres introducciones, la más reciente en 1993 que podría corresponder a cepas del V2 (tMRCA alrededor de 1997) y del V1 (las más antiguas) de este estudio. Este flujo viral de DENV-1 entre países vecinos también ha sido documentado en otros estudios (de Bruycker-Nogueira et al., 2016; Villabona-Arenas et 2013)

El análisis filogenético combinando secuencias de Colombia y América reveló que los V3 y V5 agrupan cepas exclusivas de Colombia. Los linajes podrían ser producto de otras dos introducciones alrededor de 2002 (tMRCA 2001-4), algo que no fue posible evaluar debido a la carencia de secuencias de otros países de América (no disponibles en GenBank) del período

2014-7. Otra posibilidad es que la población diversificó *in situ* ya que los linajes agrupan cepas recientes (2011-7) cuando el serotipo fue más predominante y ocurrió una epidemia mayor. Este evento está documentado con poblaciones DENV-1 de otros países (de Bruycker-Nogueira et al., 2016; Hapuarachchi et al., 2016; Lee et al., 2012; Schmidt et al., 2011; Tang et al., 2010; Villabona-Arenas et al., 2013). Existe evidencia suficiente soportando el concepto que la diversificación *in situ* es una característica de DENV que le permite responder y adaptarse a cambios del hospedero (hombre y mosquito) y del ambiente que pueden limitar su propagación y mantenimiento en la naturaleza (Costa et al., 2012; Hapuarachchi et al., 2016; Lee et al., 2012). Otro hallazgo en este estudio es que las cepas de 1998-2002 (excepto una), las dos más antiguas (1985 y 1996) y una de 2013 conforman el grupo no-monofilético. Es plausible que correspondan a introducciones esporádicas o que se propagaron por un límite de tiempo. El análisis filogeográfico del laboratorio que se mencionó, revela dos introducciones entre 1969 y 1973.

La tasa evolutiva refleja la magnitud de la diversidad genética de DENV y la población de Colombia ( $7.5 \times 10^{-4}$  s/n/y) analizada está en el rango de poblaciones de otros países (Costa et al., 2012; Allicock et al., 2012). No obstante, la tasa del V3 fue superior y una explicación posible es que agrupa cepas de varios países lo cual lleva a mayor diversidad genética. Un hallazgo similar documentado con DENV-1 de Brasil (de Bruycker-Nogueira et al., 2016). En cuanto V4 y V5, donde se encuentran cepas que circularon entre los años 2005 y 2010, coincidiendo con la epidemia del 2009-2010, esto podría estar sugiriendo que DENV-1 en estos periodos epidémicos evoluciona potencialmente más rápido (Hapuarachchi et al., 2016). El análisis evolutivo de la población DENV-1 del estudio usando aBSREL no reveló

diversificación episódica (selección adaptativa). La generación de linajes se explican por mutaciones mayormente silenciosas y quizás tengan valor adaptativo y pueden contribuir potencialmente a la evolución del virus como se ha observado en otros virus ARN (Novella, et al., 2004).

El análisis demográfico (*Skygride*) reveló incremento de la diversidad genética ( $N_e$ ) de DENV-1 coincidiendo con co-circulación de dos o los tres linajes y precediendo las epidemias en 2010 y 2013. Esta coincidencia está documentada para DENV-2, -3 y -4 de Puerto Rico (Bennett et al., 2010; Santiago et al., 2012). En este estudio no se pudo conocer si esa coincidencia es significativa o no debido a que no se cuenta con datos oficiales del número de infecciones por DENV-1 que ocurrieron en el período del estudio. Esto debido a que el sistema de vigilancia actual se basa en informar el número de casos de DENV y el serotipo de los casos febriles reportados después del quinto día de inicio de síntomas, lo que reduce el muestreo solo a los pacientes con sintomatología que acuden al sistema de salud. Los períodos de reducción de  $N_e$  observados en el análisis podrían explicarse por presión inmune del huésped, lo cual genera cuellos de botella que puede llegar a generar pérdida de la aptitud biológica. La proteína E es el principal blanco de la respuesta inmune y puede estar sujeta a cambios adaptativos para evadirla, favoreciendo la diversidad genética (Hapuarachchi et al., 2016; Clarke et al., 1993).

El análisis comparativo de secuencias E-DENV-1 de Colombia respecto al homólogo en la vacuna Dengvaxia reveló 7 sustituciones de aminoácidos comunes en todas las cepas, cuatro cambios aminoacídicos homólogos, dos cambios de un aminoácido hidrófobo a uno polar (161

I-T, 369 T-A y un cambio de aminoácido polar por uno cargado negativamente (37 N-D). El epítipo TTMAKDKPTL (33-41) que se ubica en el DI de la proteína E es reconocido por el mAbIF4 (Fibriansah et al., 2014; Rabaa et al., 2017), esta región inmunogénica con respecto a la vacuna cambia en un aminoácido de diferente naturaleza (37N-D), se ha demostrado que aminoácidos cargados son importantes ya que favorecen la interacción de epítipos con los anticuerpos (Strauss et al., 1991).

El Epítipo HTGDQHQVGNETTEHGITATITPQAPTSEIQLT (144-176) se ubica en la región bisagra DI-DII de la proteína E, esta zona es uno de los principales epítipos de esta proteína que provoca una respuesta de Ab neutralizantes tipo específica (Fibriansah et al., 2014), este Epítipo es reconocido por los anticuerpos neutralizantes para DENV-1 mAb19c10-I, mAb19c10-II y mAbIF4 (Rabaa et al., 2017), este epítipo con respecto a la población de virus de Colombia presenta dos cambios, uno homólogo y otro donde hay un cambio de un aminoácido hidrófobo a uno polar, los aminoácidos polares tiene un papel importante en las estructuras, ya que hacen parte de centros funcionales.

Hasta donde la autora ha revisado la literatura, este es el primer estudio en Colombia sobre DENV-1 que usa el mayor número (n=168) de secuencias del gen E y del mayor período de tiempo (19 años; 1998-2017) que están disponibles a la fecha. Sin embargo no existe un muestreo homogéneo en el número de secuencias en todos los departamentos, como se pudo observar el departamento de Santander es quien aporta mayor número de secuencias durante la mayoría del periodo del estudio, al igual que la incapacidad de secuenciar todas las cepas

disponibles en el CINTROP y la utilización de genomas completos, ya que se está obviando la información que otros genes, por otro lado la falta de secuencias de cepas virales que no se captan con el monitoreo convencional del virus (PCR y aislamiento primario) limita las conclusiones; esto debido a que pueden estar circulando otras variantes genéticas que aporten datos que desvirtúen las conclusiones de este estudio.

## 6. Conclusiones

- La población DENV-1 de Colombia del período 1998-2017 corresponde a cepas del genotipo V, posee estructura genética conformada por cinco grupos co-temporales de los cuales cuatro son linajes que evolucionaron de manera independiente a partir de ancestros comunes alrededor de 1999, 2002 y 2004.
- Los hallazgos del estudio sugieren que la propagación de DENV-1 en Colombia es facilitada por incremento de su diversidad genética, favorecida en mayor proporción probablemente por diversificación *in situ* mas no por diversificación adaptativa, esta diversidad genética parece haber contribuido al mantenimiento y expansión del serotipo.
- La población DENV-1 analizada siguió el modelo evolutivo purificante con tasa de sustitución nucleotídica semejantes a las de poblaciones del mismo y otros serotipos de países de América y El Caribe.

- No se pudo establecer el tipo de relación entre el patrón temporal de la diversidad genética, la predominancia del serotipo e incidencia de casos.
- La proteína E de DENV-1 de Colombia difiere en aminoácidos de epítopes para linfocitos B respecto al homólogo de la vacuna Dengvaxia, lo que podría cambiar la reactividad de los anticuerpos inducidos por vacunación. Para evaluar esto se requiere análisis usando varios ensayos biológicos.
- Se requiere investigación para precisar la contribución de DENV-1 al mantenimiento de la endemia y ocurrencia de epidemias de dengue en Colombia.

### Referencias Bibliográficas

- Abraham, R., Manakkadan, A., Mudaliar, P., Joseph, I., Chandrika, K., Reghunathan, R., & Sreekumar, E. (2016). Infection , Genetics and Evolution Correlation of phylogenetic clade diversi fication and in vitro infectivity differences among Cosmopolitan genotype strains of Chikungunya virus, *37*, 174–184. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.019>
- Abreu, C., Silva-Pinto, A., Lazzara, D., Sobrinho-Simões, J., Guimarães, J. T., & Sarmiento, A. (2016). Imported dengue from 2013 Angola outbreak: Not just serotype 1 was detected. *Journal of Clinical Virology*. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.04.011>
- Afreen, N., Naqvi, I. H., Broor, S., Ahmed, A., Kazim, S. N., Dohare, R., ... Parveen, S. (2016). Evolutionary Analysis of Dengue Serotype 2 Viruses Using Phylogenetic and Bayesian Methods from New Delhi, India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004511>
- Afreen, N., Naqvi, I. H., Broor, S., Ahmed, A., & Parveen, S. (2015). Phylogenetic and Molecular Clock Analysis of Dengue Serotype 1 and 3 from New Delhi, India. *PLOS ONE*, *10*(11), e0141628. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141628>
- Aguiar, M., Stollenwerk, N., & Halstead, S. B. (2016). The Impact of the Newly Licensed Dengue Vaccine in Endemic Countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(12), e0005179. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005179>
- Alcon-Lepoder, S., Marie-Thérèse Drouet, §, Roux, P., Frenkiel, M.-P., Arborio, M., Durand-Schneider, A.-M., ... Flamand, M. (2005). The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity †. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *79*(17), 11403–11411. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11403-11411.2005>
- Alen, M. M. F., & Schols, D. (2012). Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *Journal of Tropical Medicine*, *2012*, 13. <http://doi.org/10.1155/2012/628475>
- Allicock, O. M., Lemey, P., Tatem, A. J., Pybus, O. G., Bennett, S. N., Mueller, B. a., ... Carrington, C. V. F. (2012). Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(6), 1533–1543.

<http://doi.org/10.1093/molbev/msr320>

- Allison, S. L., Schlich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., & Heinz, F. X. (2001). Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. *Journal of Virology*, 75(9), 4268–4275. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4268-4275.2001>
- Añez, G., & Rios, M. (2013). Dengue in the united states of america: A worsening scenario? *BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2013/678645>
- Aquino, J. D. J. D., Tang, W. F., Ishii, R., Ono, T., Eshita, Y., Aono, H., & Makino, Y. (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), 266–270. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.011>
- Arias, carlos F., Preugschat, F., & Strauss, J. H. (1993). Dengue 2 Virus NS2B and NS3 Form a Stable Complez That Can Cleave NS3 within The Helicase Domain. *Virology*, 193, 888–899.
- Armstrong, P. M., & Rico-Hesse, R. (2003). Efficiency of Dendue Serotype 2 Virus strains to Infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.*, 68(5), 539–544. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>
- Bennett, S. N., Drummond, A. J., Kapan, D. D., Suchard, M. A., Munoz-Jordán, J. L., Pybus, O. G., ... Gubler, D. J. (2010). Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 27(4), 811–818. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp285>
- Bennett, S. N., Holmes, E. C., Chirivella, M., Rodriguez, D. M., Beltran, M., Vorndam, V., ... McMillan, W. O. (2006). Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *Journal of General Virology*, 87(4), 885–893. <http://doi.org/10.1099/vir.0.81309-0>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <http://doi.org/10.1038/nature12060>
- Brathwaite, D. O., San Martín, J., Montoya, R., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. (2012, October 3). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>

- Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2016). Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual Review of Virology*, 3(1), 263–281. <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042334>
- Castrillón, J. C., Carlos, J., & Urcuqui, S. (2015). Dengue en Colombia: diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, 32(2), 142–149.
- Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*. <http://doi.org/10.3390/v3091562>
- Clarke, D. K., Duarte, E. A., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., & Holland, J. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *Journal of Virology*, 67(1), 222–8.
- Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23), 11418–11431. <http://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>
- Cologna, R., Armstrong, P. M., & Rico-Hesse, R. (2005). Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Journal of Virology*, 79(2), 853–9. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.2.853-859.2005>
- Costa, R. L., Voloch, C. M., & Schrago, C. G. (2012). Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 309–314. <http://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2011.12.011>
- de Alwis, R., Williams, K. L., Schmid, M. A., Lai, C.-Y., Patel, B., Smith, S. A., ... de Silva, A. M. (2014). Dengue Viruses Are Enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. *PLoS Pathogens*, 10(10), e1004386. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004386>
- de Bruycker-Nogueira, F., Mir, D., dos Santos, F. B., & Bello, G. (2016). Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 454–460. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.025>
- de Bruycker-Nogueira, F., Nogueira, R. M. R., Faria, N. R. da C., Simões, J. B. S., Nunes, P. C. G., de Filippis, A. M. B., & dos Santos, F. B. (2015). Insights of the genetic diversity of

- DENV-1 detected in Brazil in 25years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 126–136. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.007>
- De Graaf, M., Van Beek, J., & Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*. <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
- de Souza, R. P., Rocco, I. M., Maeda, A. Y., Spenassatto, C., Bisordi, I., Suzuki, A., ... Santos, C. L. S. (2011). Dengue virus type 4 phylogenetics in brazil 2011: Looking beyond the veil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12), e1439. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001439>
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010). Enhancing cross-reactive anti-prM dominates the human antibody response in dengue infection Europe PMC Funders Group, 328(5979). <http://doi.org/10.1126/science.1185181>
- Descloux, E., Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., & De Lamballerie, X. (2009). Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001-2006: Connection with epidemiology and clinics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(8), e493. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000493>
- Dowd, K. A., DeMaso, C. R., & Pierson, T. C. (2015). Genotypic differences in dengue virus neutralization are explained by a single amino acid mutation that modulates virus breathing. *MBio*, 6(6), 1–11. <http://doi.org/10.1128/mBio.01559-15>
- Dowd, K. A., & Pierson, T. C. (2011). Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology*, 411(2), 306–15. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.020>
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973. <http://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to

- perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Eybpoosh, S., Haghdoost, A. A., Mostafavi, E., Bahrapour, A., Azadmanesh, K., & Zolala, F. (2017). Molecular epidemiology of infectious diseases. *Electronic Physician*, 9(8), 2008–5842. <http://doi.org/10.19082/5149>
- Fibriansah, G., Tan, J. L., Smith, S. A., de Alwis, A. R., Ng, T. S., Kostyuchenko, V. A., ... Lok, S. M. (2014). A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Molecular Medicine*, 6(3), 358–371. <http://doi.org/10.1002/emmm.201303404>
- Gomez-Rangel, S. Y., Villabona-Arenas, C. J., Torres Pimiento, F. A., Miranda-Esquivel, D. R., & Ocazonez-Jimenez, R. R. (2008). Dengue virus serotype 3 (genotype III) from Colombia: A perspective of its pathogenic potential. *Dengue Bulletin* –, 32.
- Gubler, D. J. (1997). Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. *Dengue Bulletin*, 21, 1–14.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. <http://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teyssou, R., & Lang, J. (2011). From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*, 29, 7229–7241. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.094>
- Halstead, S. B. (2017). Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*, 35(47), 6355–6358. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.089>
- Hapuarachchi, H. C., Koo, C., Kek, R., Xu, H., Lai, Y. L., Liu, L., ... Ng, L. C. (2016). Intra-epidemic evolutionary dynamics of a Dengue virus type 1 population reveal mutant spectra that correlate with disease transmission. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 22592. <http://doi.org/10.1038/srep22592>
- Helt, A.-M., & Harris, E. (2005). S-Phase-Dependent Enhancement of Dengue Virus 2 Replication in Mosquito Cells, but Not in Human Cells. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 79(21), 13218–

13230. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13218-13230.2005>

- Hernández-Ávila, M., & Santos-Preciado, J. I. (2016). Análisis de la evidencia sobre eficacia y seguridad de la vacuna de dengue CYD-TDV y su potencial registro e implementación en el Programa de Vacunación Universal de México. *Salud Pública de México*, 58(1), 71–83.
- Holmes, E. C. (2007). The Evolution and Epidemiology of Dengue Virus. *Salud Pública de México*, 49.
- Jiménez-Silva, C. L., Ocazonez-Jiménez, R. E., & Villabona-Arenas, C. J. (2017). *DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VIRUS DEL DENGUE EN SANTANDER I Dinámica espacio-temporal del virus del dengue en Santander, un área endémica de Colombia*. Universidad Industrial de Santander.
- Katzelnick, L. C., Fonville, J. M., Gromowski, G. D., Arriaga, J. B., Green, A., James, S. L., ... Smith, D. J. (2015). Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*, 349(6254), 1338–1343. <http://doi.org/10.1126/science.aac5017>
- Ke, R., Aaskov, J., Holmes, E. C., & Lloyd-Smith, J. O. (2013). Phylodynamic Analysis of the Emergence and Epidemiological Impact of Transmissible Defective Dengue Viruses. *PLoS Pathogens*, 9(2), 1003193. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003193>
- Khan, A. M., Hu, Y., Miotto, O., Thevasagayam, N. M., Sukumaran, R., Syahirah, H., ... August, J. T. (2017). Analysis of viral diversity for vaccine target discovery. *BMC Medical Genomics*, 10(Suppl 4), 1–15. <http://doi.org/10.1186/s12920-017-0301-2>
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., ... Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717–725. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., & Dudley, J. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Downloaded from. *Mol. Biol. Evol.*, 33(7), 1870–1874. <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Larsen, J. E. P., Lund, O., & Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes, 7, 1–7. <http://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>

- Lee, K. S., Lo, S., Tan, S. S. Y., Chua, R., Tan, L. K., Xu, H., & Ng, L. C. (2012). Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(1), 77–85. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.012>
- Liao, M., & Kielian, M. (2005). Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J Cell Biol*, *171*(1), 111–120. <http://doi.org/10.1083/JCB.200507075>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal Virology*, *71*, 9608–9617.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2007). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. *Fields Virology*. [http://doi.org/10.1016/0038-092X\(88\)90131-4](http://doi.org/10.1016/0038-092X(88)90131-4)
- Lourenço, J., & Recker, M. (2010). Viral and epidemiological determinants of the invasion dynamics of Novel Dengue Genotypes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000894>
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(10), 3414–3419. <http://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, M. B. 2015. (2015). RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, *1*. <http://doi.org/DOI.10.1093/ve/vev003>
- Medin, C. L., Fitzgerald, K. A., & Rothman, A. L. (2005). No Title. *Journal of Virology*, *79*, 11053–11061.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(12), 6986–91. <http://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>

- Moi, M. L., Takasaki, T., & Kurane, I. (2016). Human antibody response to dengue virus : implications for dengue vaccine design. *Tropical Medicine and Health*, 1–6. <http://doi.org/10.1186/s41182-016-0004-y>
- Mondini, A., de Moraes Bronzoni, R. V., Nunes, S. H. P., Chiaravalloti Neto, F., Massad, E., Alonso, W. J., ... Nogueira, M. L. (2009). Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in São Paulo, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(5), e448. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000448>
- Moore, P. R., Van Den Hurk, A. F., Mackenzie, J. S., & Pyke, A. T. (2017). Dengue viruses in Papua New Guinea: evidence of endemicity and phylogenetic variation, including the evolution of new genetic lineages, 6. <http://doi.org/10.1038/emi.2017.103>
- Mukherjee, S., Dowd, K. A., Manhart, C. J., Ledgerwood, J. E., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., & Pierson, T. C. (2014). Mechanism and significance of cell type-dependent neutralization of flaviviruses. *Journal of Virology*, 88(13), 7210–20. <http://doi.org/10.1128/JVI.03690-13>
- Munoz-Jordan, J. L., Sanchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle., M., & Garcia-Sastre, A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl Acad. Sci*, 100, 14333–14338.
- Nayak, V., Dessau, M., Kucera, K., Anthony, K., Ledizet, M., & Modis, Y. (2009). Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *Journal of Virology*, 83(9), 4338–44. <http://doi.org/10.1128/JVI.02574-08>
- Novella, I. S., Zárate, S., Metzgar, D., & Ebendick-Corpus, B. E. (2004). Positive Selection of Synonymous Mutations in Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Molecular Biology*, 342(5), 1415–1421. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.003>
- Ocazonez-Jiménez, R. E., Cortés, F. M., Villar, L. A., & Gómez, S. Y. (2006). Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7), 725–731. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700004>
- Ocazonez-Jiménez, R. E., Ortiz-Baez, A. S., Gomez Rangel, S. Y., & Miranda-Esquivel, D. R.

- (2012). Virus dengue serotipo 1 (VDEN-1) de Colombia: su contribución a la ocurrencia del dengue en el departamento de Santander. *Biomédica*, 33, 22–30. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.717>
- OhAinle, M., Balmaseda, A., Macalalad, A. R., Tellez, Y., Zody, M. C., Saborio, S., ... Harris, E. (2011). Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity. *Science Translational Medicine*, 3(114), 114ra128-114ra128. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003084>
- Padilla, J., Rojas, D., & Sáezn, R. (2012). Dengue en Colombia, Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. *Guías de Impresión Ltda, Primera Ed*, 281. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- Parker, J. M. R., Guo, D., & Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, 25(19), 5425–5432. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1021/bi00367a013>
- Pitcher, T. J., Sarathy, V. V., Kiyohiko, M., Gromowski, G. D., Huang, C. Y. H., & Barrett, A. D. T. (2015). Functional analysis of dengue virus (DENV) type 2 envelope protein domain 3 type-specific and DENV complex-reactive critical epitope residues. *Journal of General Virology*, 96(2), 288–293. <http://doi.org/10.1099/vir.0.070813-0>
- Pollett, S., Melendrez, M. C., Maljkovic Berry, I., Duchêne, S., Salje, H., Cummings, D. A. T., & Jarman, R. G. (2018). Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infection, Genetics and Evolution*, 62, 279–295. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.032>
- Posada, D., & Thomas, B. (2004). Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics : Advantages of Akaike. *Society of Systematic Biologists*, 53(5), 793–808. <http://doi.org/10.1080/10635150490522304>
- Rabaa, M. A., Girerd-chambaz, Y., Duong, K., Hue, T., Tuan, T. V., Wills, B., ... Wartel-tram, A.

- (2017). Genetic epidemiology of dengue viruses in phase III trials of the CYD tetravalent dengue vaccine and implications for efficacy. *ELife*, 6, 1–22. <http://doi.org/10.7554/eLife.24196>
- Rabaa, M. A., Girerd-Chambaz, Y., Duong Thi Hue, K., Vu Tuan, T., Wills, B., Bonaparte, M., ... Simmons, C. P. (2017). Genetic epidemiology of dengue viruses in phase III trials of the CYD tetravalent dengue vaccine and implications for efficacy. *Elife*, 6(e24196), 1–22. <http://doi.org/10.7554/eLife.24196>
- Rambaut, A. (n.d.). FigTree v. 1.4.2. Retrieved July 7, 2018, from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2013). Tracer v1.6. Available from <Http://Tree.Bio.Ed.Ac.Uk/Software/Tracer/>.
- Rambaut, A., Lam, T. T., Carvalho, L. M., & Oliver, G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen), 2(October), 1–7. <http://doi.org/10.1093/ve/vew007>
- Ramos-Castañeda, J., dos Santos, F. B., Martínez-Vega, R., de Araujo, J. M. G., Joint, G., & Sarti, E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, 1–24. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005224>
- Rasmussen, D. A., Boni, M. F., & Koelle, K. (2014). Reconciling phylodynamics with epidemiology: The case of dengue virus in southern Vietnam. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 258–271. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst203>
- Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174(2), 479–493. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90102-W](http://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90102-W)
- Rouvinski, A., Guardado-Calvo, P., Barba-Spaeth, G., Duquerroy, S., Vaney, M. C., Kikuti, C. M., ... Rey, F. A. (2015). Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature*, 520(7545), 109–113. <http://doi.org/10.1038/nature14130>
- Sahili, A. El, & Lescar, J. (2017, April 24). Dengue virus non-structural protein 5. *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <http://doi.org/10.3390/v9040091>

- Santiago, G. A., Mcelroy-horne, K., Lennon, N. J., Santiago, L. M., Birren, B. W., Henn, M. R., & Muñoz-jordán, J. L. (2012). Reemergence and Decline of Dengue Virus Serotype 3 in Puerto Rico. *The Journal of Infectious Diseases*, 206, 893–901. <http://doi.org/10.1093/infdis/jis426>
- Schmidt, D. J., Pickett, B. E., Camacho, D., Comach, G., Xhaja, K., Lennon, N. J., ... Bosch, I. (2011). A phylogenetic analysis using full-length viral genomes of South American dengue serotype 3 in consecutive Venezuelan outbreaks reveals a novel NS5 mutation. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 2011–2019. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.010>
- Sim, S., & Hibberd, M. L. (2016). Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. *Genome Biology*, 17(1), 38. <http://doi.org/10.1186/s13059-016-0907-2>
- Simmonds, P., & Welch, J. (2006). Frequency and Dynamics of Recombination within Different Species of Human Enteroviruses. *Journal of Virology*. <http://doi.org/10.1128/JVI.80.1.483-493.2006>
- Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., ... DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine*, NEJMoa1800820. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>
- Strauss, E. G., Stec, D. S., Schmaljohn, A. L., & Strauss, J. H. (1991). Identification of antigenically important domains in the glycoproteins of Sindbis virus by analysis of antibody escape variants. *Journal of Virology*, 65(9), 4654–64.
- Tang, Y., Rodpradit, P., Chinnawirotpisan, P., Mammen, M. P., Li, T., Lynch, J. A., ... Zhang, C. (2010). Comparative analysis of full-length genomic sequences of 10 dengue serotype 1 viruses associated with different genotypes, epidemics, and disease severity isolated in Thailand over 22 years. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), 1156–1165. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0052>
- Tazeen, A., Afreen, N., Abdullah, M., Deeba, F., Haider, S. H., Kazim, S. N., ... Parveen, S. (2017). Occurrence of co-infection with dengue viruses during 2014 in New Delhi, India. *Epidemiology and Infection*, 145(1), 67–77. <http://doi.org/10.1017/S0950268816001990>

- Thirawuth, V., Innis, B. L., & Hemachudha, C. (1989). Identification of Continuous Epitopes of the Envelope Glycoprotein of Dengue Type 2 Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *40*(6), 676–687. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.676>
- Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Vinh Chau, N., Wills, B., Gould, E. a, Gritsun, T., ... Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*, *298*(1), 63–72. <http://doi.org/10.1006/viro.2002.1447>
- Twiddy, S. S., Pybus, O. G., & Holmes, E. C. (2003). Comparative population dynamics of mosquito-borne flaviviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, *3*(2), 87–95. [http://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00153-3](http://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00153-3)
- Vasilakis, N., Holmes, E. C., Fokam, E. B., Faye, O., Diallo, M., Sall, A. a, & Weaver, S. C. (2007). Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. *Journal of Virology*, *81*(17), 9591–9595. <http://doi.org/10.1128/JVI.02776-06>
- Villabona-Arenas, C. J., Ocazonez Jimenez, R. E., & Silva Jimenez, C. L. (2016). Dengue Vaccine : Considerations before Rollout in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(6), 5–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004653>
- Villabona-Arenas, C. J., & Zanotto, P. M. de A. (2013). Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1. *PLoS ONE*, *8*(5), e62649. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062649>
- Villar, L. A., Rojas, D. P., Besada-Lombana, S., & Sarti, E. (2015). Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(3), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499>
- Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M., Cunha, R., Deseda, C., ... Noriega, F. (2015). Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, *372*(2), 141103114505002. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1411037>
- Waman, V. P., Kasibhatla, S. M., Kale, M. M., & Kulkarni-Kale, U. (2016). Population genomics of dengue virus serotype 4: insights into genetic structure and evolution. *Archives of Virology*. <http://doi.org/10.1007/s00705-016-2886-8>
- Waman, V. P., Kolekar, P., Ramtirthkar, M. R., Kale, M. M., & Kulkarni-Kale, U. (2016). Analysis

- of genotype diversity and evolution of Dengue virus serotype 2 using complete genomes. *PeerJ*, 4, e2326. <http://doi.org/10.7717/peerj.2326>
- Watts, D. M., Porter, K. R., Putvatana, P., Vasquez, B., Calampa, C., Hayes, C. G., & Halstead, S. B. (1999). Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 354(9188), 1431–1434. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)04015-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04015-5)
- Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 523–540. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>
- Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2013). Molecular Evolution of Dengue Virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009(4), 523–540. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>.Molecular
- Williams, M., Mayer, S. V., Johnson, W. L., Chen, R., Volkova, E., Vilcarrromero, S., ... Halsey, E. S. (2014). Lineage II of southeast Asian/American DENV-2 is associated with a severe dengue outbreak in the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 611–620. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0600>
- Wong, S.-S., Haqshenas, G., Gowans, E. J., & Mackenzie, J. (2012). The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers. *FEBS Letters*, 586(7), 1032–1037. <http://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2012.02.047>
- World Health Organization. (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, x, 147. <http://doi.org/WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1>
- World Health Organization. (2016). Summary of the April 2016 meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization (SAGE). Retrieved from <http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/april/en/>
- World Health Organization. (2017, March 1). Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016 – recommendations. *Vaccine*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.070>
- Yamanaka, A., Moi, M. L., Takasaki, T., Kurane, I., & Konishi, E. (2017). Neutralizing and

- enhancing antibody responses to five genotypes of dengue virus type 1 (DENV-1) in DENV-1 patients. *Journal of General Virology*, 98(2), 166–172. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000669>
- Yauch, L. E., & Shresta, S. (2014). Dengue virus vaccine development. *Advances in Virus Research*, 88, 315–372. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00007-6>
- Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., ... Hong Zhou, Z. (2013). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), 105–110. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2463>
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., ... Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal*, 22(11), 2604–13. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg270>
- Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J. H., Baker, T. S., ... Rossmann, M. G. (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*, 12(9), 1607–1618. <http://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.019>