



**Dinámica espacio-temporal del virus del dengue en Santander, un área endémica de  
Colombia.**

**Cinthy Lorena Jiménez Silva**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magíster en  
Ciencias Básicas Biomédicas**

**Directora**

**Raquel Elvira Ocazonez. Ph.D.**

**Doctora en Inmunología Básica e Aplicada**

**Asesor**

**Christian Julián Villabona Arenas. Ph.D.**

**Doctor en Ciências Biológicas (Microbiologia)**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de salud**

**Departamento de ciencias básicas**

**Maestría en ciencias básicas biomédicas**

**Bucaramanga**

**2017**

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción .....	11
1. Objetivos .....	8
1.1 Objetivo general .....	15
1.2 Objetivos específicos .....	151
2. Marco de referencia .....	16
3. Metodología .....	16
3.1 Cepas de DENV .....	25
3.2 Región del genoma viral .....	25
3.3 Obtención de secuencias del gen E .....	27
3.4 Análisis y limpieza de secuencias .....	28
3.5 Análisis filogenético .....	28
3.5.1 Genotipificación .....	33
3.5.2 Historia evolutiva y de dispersión .....	34
3.5.3 Filogeografía .....	34
3.6 Diversidad Genética .....	28
3.7 Historia demográfica y prevalencia del serotipo .....	428
4. Resultados .....	37

4.1 Matrices de secuencias.....	37
4.2 Genotipo del serotipo .....	40
4.3 Filogeografía.....	44
4.4 Linajes establecidos en AMB-Santander de cada serotipo .....	52
4.5 Diversidad genética del gen E.....	60
4.6 Historia demográfica y prevalencia del serotipo en el AMB-Santander .....	69
5. Discusión.....	74
6. Conclusiones.....	81
Referencias bibliográficas.....	82

**LISTADO DE FIGURAS**

Figura 1. Distribución temporal de casos de dengue en Santander de 1998-2015. ....	35
Figura 2. El AMB-Santander. ....	35
Figura 3. Amplificación del gen E de DENV. ....	38
Figura 4. Genotipo del DENV-1 de Colombia.. ....	41
Figura 5. Genotipo del DENV-2 de Colombia.. ....	42
Figura 6. Genotipo del DENV-3 de Colombia. ....	43
Figura 7. Genotipo del DENV-4 de Colombia. ....	44
Figura 8. Dispersión del DENV-1 de Colombia. ....	47
Figura 9. Dispersión del DENV-2 de Colombia. ....	48
Figura 10. Dispersión del DENV-3 de Colombia. ....	49
Figura 11. Dispersión del DENV-4 de Colombia. ....	50
Figura 12. Probables rutas geográficas de intercambio de DENV con Colombia y países de América. ....	51
Figura 13. Filogenia del DENV-1 de Colombia (1998 – 2015). ....	56

Figura 14. Filogenia del DENV-2 de Colombia (1998 – 2015). . . . .	57
Figura 15. Filogenia del DENV-3 de Colombia (2001 – 2015) . . . . .	58
Figura 16. Filogenia del DENV-4 de Colombia (2000 – 2015). . . . .	59
Figura 17. Frecuencia y distribución de los polimorfismos del gen E en poblaciones virales del AMB-Santander (1998 - 2015). . . . .	67
Figura 18. Sustituciones de aminoácidos de la proteína E en poblaciones virales de AMB- Santander (1998-2015). . . . .	68
Figura 19. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-1 y tamaño efectivo de la población (Ne) - AMB- Santander. . . . .	69
Figura 20. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-2 y tamaño efectivo de la población (Ne) - AMB- Santander. . . . .	70
Figura 21. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-3 y tamaño efectivo de la población (Ne) - AMB- Santander. . . . .	71
Figura 22. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-4 y tamaño efectivo de la población (Ne) - AMB- Santander. . . . .	72

**LISTADO DE TABLAS**

Tabla 1. Cepas de DENV incluidas en el estudio .....	26
Tabla 2. Oligómeros usados para amplificar y secuenciar el gen E. ....	28
Tabla 3. Programas y herramientas de bioinformática usadas en el estudio. ....	31
Tabla 4. Distribución temporal de serotipos del DENV en el AMB-Santander.....	36
Tabla 5. Secuencias E de DENV-1 usadas en el estudio. ....	37
Tabla 6. Secuencias E de DENV-2 usadas en el estudio. ....	39
Tabla 7. Secuencias E-DENV-3 usadas en el estudio.....	39
Tabla 8. Secuencias E-DENV-4 usadas en el estudio.....	40
Tabla 9. Codones E sometidos a presión de selección negativa en virus DENV-1 del AMB-Santander.....	61
Tabla 10. Codones E sometidos a presión de selección negativa en virus DENV-2 del AMB-Santander.....	63
Tabla 11. Codones E sometidos a presión de selección negativa en virus DENV-3 del AMB-Santander.....	64
Tabla 12. Codones E sometidos a presión de selección en virus DENV-4 del AMB-Santander. ....	66

**RESUMEN**

**TÍTULO:** DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL VIRUS DEL DENGUE EN SANTANDER, UN AREA ENDEÉMICA DE COLOMBIA.<sup>i</sup>

**AUTOR:** Cinthy Lorena Jimenez Silva<sup>ii</sup>

**PALABRAS CLAVES:** DENV, filogenia, filodinamica, diversidad genética

**DESCRIPCIÓN:**

Conocer la dinámica espacio – temporal del Virus Dengue (DENV) es indispensable para comprender el patrón epidemiológico del dengue en Colombia. El objetivo de este trabajo fue inferir la diversidad genética, evolución, fitogeografía del virus del dengue en AMB- Santander y relacionar cambios en la diversidad genética con el patrón de prevalencia en Santander. Se incluyeron virus de 13 años (1998 – 2015). Se obtuvieron 76 secuencias del gen E y junto con secuencias representativas descargadas de GenBank. Se reconstruyó la historia evolutiva y de dispersión usando modelos coalescentes y filogeográficos discretos. Se estimó la diversidad genética de la población viral local y se relacionó con el patrón de prevalencia. Con cada serotipo han ocurrido varias introducciones de cepas pero solo una estableció transmisión. La frontera Colombo –Venezolana y la región del Caribe se identificaron como orígenes geográficos de los cuatro serotipos. De DENV-1, -2, y -4 se recuperaron un linaje de un único genotipo que estableció transmisión, los cuales se introdujeron con mayor probabilidad en los años 80 y 90. La selección purificadora ( $Tajima < 1.0$ ;  $dN/dS < 1.0$ ) ha actuado sobre las cuatro poblaciones a tasas de evolución esperadas ( $1 \times 10^{-3} - 9 \times 10^{-4}$  s/s/a) y solo en DENV-4 se evidenció selección positiva en los codones 64 y 309 del gen. DENV-1 presentó incremento del tamaño de la población ( $N_e$ ) y esto correlacionó ( $r\text{-Sperman} = 0.73$ ,  $p < 0.05$ ) con prevalencia. La introducción de otro linaje DENV-3 incremento  $N_e$  pero no se correlacionó con incremento de la prevalencia. DENV-2 y DENV-4 presento un leve incremento de  $N_e$  pero sin correlación con prevalencia del virus. El estudio muestra un constante intercambio de virus y una a alta y sostenida transmisión local en AMB- Santander de 1998 al 2015 por lo que es necesario una continua y efectiva vigilancia del DENV siendo critica para el control del dengue.

---

<sup>i</sup> Trabajo de grado

<sup>ii</sup> Facultad de salud. Departamento de ciencias básicas. Maestría en ciencias básicas biomédicas. Directora: Raquel Elvira Ocazonez. Ph.D. Asesor: Christian Julián Villabona Arenas. Ph.D.

**ABSTRACT**

**TITLE:** SPACE-TEMPORAL DYNAMICS OF THE DENGUE VIRUS IN SANTANDER, A ENDEMIC AREA OF COLOMBIA<sup>iii</sup>

**AUTHOR:** Cinthy Lorena Jimenez Silva<sup>iv</sup>

**KEYWORDS:** Dengue virus, serotypes, phylogeny, filodynamics, genetic diversity

**DESCRIPTION:**

To know spatial-temporal dynamics of Dengue Virus (DENV) is crucial to understand the epidemiological pattern of dengue in Colombia. The aim of this work was to study evolution and dispersal aspects of all four dengue serotypes, and to relate the findings to virus predominance in Santander. The E gene of 76 DENV strains isolated from 1998 - 2015 were sequenced. New sequences were combined with representative time-stamped sequences retrieved from GenBank<sup>®</sup>: Phylogenetic and phylogeographic methods were used. For all serotypes, introductions of strains occurred more than once but only one established transmission. The Colombian – Venezuelan border and the Caribbean region were evidenced as geography origins of all serotypes. For DENV-1, -2, and -4 one genotype and one lineage were recovered, which were most likely to be introduced in the 80's (tMRAC) and 90's (tMRAC: DENV-1 1986 (95 % BCI: 1986 -1988), DENV-2 1986 (95 % BCI: 1985-1988) y DENV-4 1989 (95 % BCI 1989-1994). For DENV-3 one genotype and two lineages were recovered, which was most likely to be imported in the 90's (tMRCA: 1991 (95 % BCI: 1991-1992) y 1992 (95 % BCI: 1991-1994)). Purifying selection (Tajima <1.0; dN / dS <1.0) has acted on all four serotypes, evolution rates were inferred between  $1 \times 10^{-3}$  -  $9 \times 10^{-4}$  s/s/y. Positive selection was detected only for DENV-4 on 64 and 309 codons of gene E. DENV-1 diversified into five genetic variants that co-circulated with a rise in population size ( $N_e$ ) that correlated with virus predominance ( $r$ -Sperman = 0.73,  $p < 0.05$ ). The introduction of a new DENV-3 lineage was associated with a rise in  $N_e$  but correlation with predominance was not evidenced. DENV-4 and DENV-2 diversified into three genetic variants and slight rise of  $N_e$  but not correlation with virus predominance were evidenced. The findings of this work can be explained the transmission patters of serotypes in Santander, and they could be considered for making decisions in dengue control.

---

<sup>iii</sup> Degree work

<sup>iv</sup> Faculty of Health, Department of Basic Sciences, Master of Science in Biomedical Sciences. Director: Raquel Elvira Ocazonez. Ph.D. Assessor: Christian Julián Villabona Arenas. Ph.D.

## Introducción

El virus del dengue (DENV) es un virus que pertenece al género *flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* y se transmite a los humanos a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Posee cápside icosaédrica rodeada por una envoltura lipoproteica y genoma de ARN de tipo mensajero (~11,000 nts) que codifica para una poliproteína. La poliproteína es fragmentada en 10 proteínas y una de ellas es la E el principal componente de la envoltura (Lai & Putnak, 2006). Se reconocen cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) del virus en base a la variación de la antigenicidad y varios genotipos de cada serotipo en base a la diversificación del gen E (Chen & Vasilakis, 2011a).

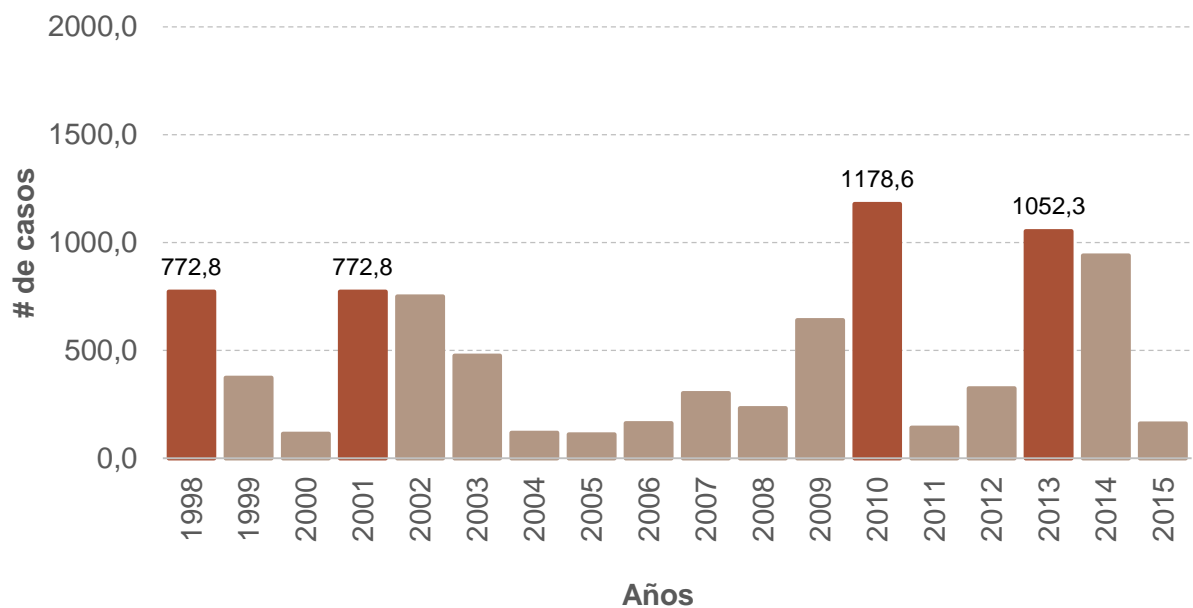
El estudio de la genética del virus es indispensable para comprender la ocurrencia del dengue. Los análisis de secuencias nucleotídicas proveen información sobre la filogenia (relaciones evolutivas), variabilidad genética, demografía y filogeografía (movimiento geográfico). Esta información sirve para explicar la prevalencia (abundancia / escasas), identificar rutas de dispersión hacia y dentro del país e identificar variabilidad entre cepas con respecto a inmunogenicidad y virulencia (Grenfell *et al.*, 2004; Holmes, 1998). El análisis que relaciona simultáneamente las filogenias de los serotipos, número de casos, carga inmune al dengue y abundancia del mosquito se conoce como filodinámica. La filodinámica se considera el abordaje más robusto para explicar el patrón epidemiológico del dengue en una localidad.

En Colombia la circulación de DENV-1, -2, y -3 fue documentada por primera vez en los años 70 y la de DENV-4 en 1982 (Boshell *et al.*, 1986). Aislamientos del DENV-3 no se reportaron al menos en 24 años (1976 – 2000), pero el serotipo se reintrodujo en 2001 con trasmisión sostenida desde entonces (Ocazonez *et al.*, 2004). Actualmente co-circulan los cuatro serotipos en 24 de los 32 departamentos y esto se conoce como escenario hiperendémico (Villabona *et al.*, 2016). El control del dengue se ha enfocado al *Aedes aegypti* y atención médica de los casos pero ha sido insuficiente, la incidencia ha incrementado (de 65.6 por 100,000 habitantes en los 80's a más de 577 por 100,000 habitantes en el 2010) y más municipios se vuelven endémicos (Castrillón *et al.*, 2015). Con respecto al virus la vigilancia virológica se limita a la proporción relativa de cada serotipo (Ministerio de Salud y Protección Social, INS, & SIGIVILA, 2010), pero esta información es de poca utilidad para la toma de decisiones en el programa de control de la enfermedad.

El conocimiento de cada serotipo de Colombia es limitado (siete publicaciones versus docenas de Brasil). Los escasos estudios (Mendez *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2012; Ocazonez *et al.*, 2013; Ospina *et al.*, 2010; Usme-Ciro *et al.*, 2008; Villabona *et al.*, 2009) abordan la filogenia y algunos aspectos evolutivos de un serotipo, de una población limitada de cepas y en algunos casos comparando una secuencia de pocos nucleótidos. Desde los 90's está documentada la presencia de un único genotipo de cada serotipo, pero se desconoce si otros se han introducido recientemente. Los estudios no aportan información para un abordaje filodinámico que permita comprender más precisamente el patrón epidemiológico del dengue en el país.

Santander es uno de los departamentos de Colombia con mayor endemia de dengue, entre 2010 - 2015 se reportaron 66.054 casos la mayoría residentes en el Área Metropolitana de

Bucaramanga- Santander (AMB) (INS: boletines epidemiológicos, 2010-2015) (figura 1). El grupo CINTROP de la Universidad Industrial de Santander monitoreó la distribución temporal de los serotipos en un periodo de 13 años y un hallazgo significativo es que oscilaciones del serotipo predominante coinciden con incremento de casos. En las epidemias de 2001, 2010 y 2013 se observó predominio de DENV-3, DENV-4 y DENV-2, respectivamente; el incremento de casos severos en 2007 - 2009 coincidió con predominio de DENV-1 (Gómez *et al.*, 2007; Ocazonez *et al.*, 2006; Villabona *et al.*, 2016)



**Figura 1.** Distribución temporal de casos de dengue en Santander de 1998-2015. Se señalan años epidémicos que se presentaron en este intervalo de tiempo. (Fuente: Sivigila)

El presente estudio aporta nuevo conocimiento sobre cada uno de los serotipos del DENV de Colombia con respecto a filogenia, filogeografía, aspectos evolutivos y diversidad

genética. Adicionalmente, se exploró la relación de estos aspectos de cada serotipo con el patrón de prevalencia relativa en el AMB-Santander.

## **1. Objetivos**

### **1.1 Objetivo general**

Inferir la diversidad genética, evolución y filogeografía del virus del dengue en AMB- Santander.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Identificar genotipos de cada serotipo
- Reconstruir la historia evolutiva y de dispersión de cada genotipo
- Estimar la diversidad genética de cada serotipo y relacionarla con la prevalencia de cada serotipo

## 2. Marco teórico

### Virus del Dengue

El DENV es un arbovirus que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Posee genoma ARN mono-catenario en sentido positivo de aproximadamente 11 kilobases (Chen & Vasilakis, 2011). El ARN tiene un único marco abierto de lectura (ORF) flanqueado por dos regiones no traducidas (UTRs) en la región 5' (de aprox. 100 nts) y 3' (de aprox. 400-800 nts) (Lindenbach & Rice, 2003). La traducción del fragmento ORF resulta en una única poliproteína que es fragmentada en tres proteínas estructurales (C, prM/M, E) y siete no estructurales (*NS1*, *NS2A*, *NS2B*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B*, *NS5*). El DENV tiene cápside icosaédrica rodeada por una membrana lipoprotéica o envoltura.

La proteína de la envoltura es traducida por el gen E (Modis *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 1995). Es el principal componente de la superficie del virión donde se encuentra formando heterodímeros con la proteína M. La proteína E es de aproximadamente 500 aminoácidos, glicosilada, de 53 KDa y contiene tres dominios: uno es la parte central de hoja plegada (I), que por un extremo se une a una región altamente conservada en los *flavivirus* que contiene el péptido de fusión (II) y por el otro a una región tipo inmunoglobulina (III). El dominio III es el más expuesto sobre la superficie del virión y por esto tiene varias funciones: contiene los aminoácidos que interactúan con los del receptor celular para la adsorción del virus; aminoácidos que determinan rango de huésped, tropismo celular y virulencia de los *flavivirus*; epitopes más inmunogénicos que inducen anticuerpos neutralizantes y reconocimiento de célula T. Mutaciones en el dominio III han sido asociadas a virulencia y ventaja evolutiva (Simmons *et al.*, 2005; Twiddy *et al.*, 2002). El dominio II es la parte de la proteína que participa en la fusión de envoltura viral con membrana celular y durante el proceso de endocitosis que lleva a la liberación del

virus en el citoplasma. Recientemente se identificaron epítopes en este dominio que inducen anticuerpos neutralizantes específicos del serotipo 2 (Rouvinski *et al.*, 2015)

### **Serotipos y genotipos del virus del Dengue**

El DENV está agrupado en cuatro serotipos diferenciados antigénicamente y filogenéticamente (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Análisis filogenéticos de secuencias nucleotídicas confirmaron la homología de la población viral de cada serotipo y permitieron agrupar cada uno en variantes genéticas. Rico-Hesse (1990) definió por primera vez un genotipo: un grupo de cepas virales con un máximo 6% de divergencia en la región carboxilo terminal que une los genes E y NS1. Los genotipos reconocidos de cada serotipo se han propuesto en base a la divergencia de secuencias del gen E y estos grupos genéticos se han considerado como grupos mono fileticos (Villabona-Arenas & Zanotto, 2013; Chen & Vasilakis, 2011; Rico-Hesse *et al.*, 1997; Weaver & Vasilakis, 2009).

El DENV-1 ha sido agrupado en cinco genotipos. El genotipo I contiene cepas del sur de Asia, China y África; el genotipo II de Tailandia de los años cincuenta y sesenta; el genotipo III cepas selváticas de Malasia; el genotipo IV de Australia e islas del Pacífico; el genotipo V cepas de América, algunas del este de África y de Asia.

El DENV-2 ha sido agrupado en cinco genotipos E. El genotipo Asiático I agrupa cepas de Malasia y Tailandia; el genotipo Asiático II de Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas; el genotipo Asiático/Americano de Tailandia, Vietnam y de América desde los años

80; el genotipo Cosmopolita cepas del este y oeste de África, islas de Pacífico, Australia e India; el genotipo Americano de América e Islas del Pacífico del periodo 1957 – 2002; el genotipo Selvático cepas de humanos, mosquitos y monos de selvas del sur de Asia y oeste de África.

El DENV-3 ha sido clasificado en cinco genotipos. El genotipo I agrupa cepas de Indonesia, Malasia, Filipinas y de islas del Pacífico de años recientes; el genotipo II de Tailandia, Vietnam y Bangladesh; e genotipo III cepas de Sri Lanka, India, África y Samoa; el genotipo IV de Puerto Rico, América y una cepa de Tahití de 1965; el genotipo V cepas de Filipinas y algunos países de América. De este serotipo no se han aislado hasta la fecha cepas selváticas, se cree que circulan en Malasia ya que se ha encontrado seroconversión en monos centinelas (Rudnick., 1984).

El DENV-4 ha sido agrupado en cuatro genotipos. El genotipo I agrupa cepas de Tailandia, Filipinas, Sri Lanka y Japón; el genotipo II de Indonesia, Malasia, Tahití, el Caribe y países de América; el genotipo III cepas de Tailandia; el genotipo IV cepas selváticas de Malasia.

### **Evolución del virus del Dengue**

Los mecanismos evolutivos que aportan a la diversidad genética del DENV son; selección natural, mutación, recombinación y flujo genético (Holmes, 2006; King *et al.*, 2008). La presión de selección dominante que actúa sobre DENV es la selección purificadora. Las proteínas virales han evolucionado proporcionando a la población mayor *fitness* para lograr

infectar mosquitos y primates. Así, la mayoría de los cambios de aminoácidos sean deletéreos y se eliminen rápidamente de la población mediante la selección.

Twiddy y colb. (2002) mostraron que poblaciones DENV-2 han experimentado selección positiva: en el genotipo cosmopolita, en el codón 390 de la proteína E y puede favorecer la transmisibilidad de la población viral. Otros estudios también identificaron otros codones en DENV-2, -3 y -4 pero no DENV-1 (Twiddy *et al.*, 2002). La mayoría de los codones están localizados en o cerca de epítopes de células T o B, lo que sugiere una selección inmune positiva. Varios codones con presión de selección positiva también se han identificado en los genes NS2B y NS5.

Un factor determinante de la diversidad genética es la alta tasa de sustitución, producto de errores intrínsecos de la RNA polimerasa viral que carece de actividad correctora (Foster *et al.*, 2003). Las tasas estimadas para los serotipos van desde  $4,55 \times 10^{-4}$  para DENV-1 hasta  $11,58 \times 10^{-4}$  para el genotipo III de DENV-3. Los análisis sugieren que el DENV-3 está evolucionando significativamente más rápido que el DENV-1 y el DENV-2. Las diferencias en las tasas de sustitución reflejan la diversidad genética en una población viral, las tasas altas abundante variación genética (Holmes, 2006).

El crecimiento de la población viral se ha considerado un factor que favorece la diversidad genética de cada serotipo. Sittisombut y Colb. (1997) sugirieron, por primera vez el cuello de botella genético y posterior expansión de una variante genética (Bangkok, 1980 -

1987). El incremento de la diversidad genética del DENV ha sido asociado con la expansión geográfica de las poblaciones virales (Holmes & Burch, 2000).

Otro factor que contribuye a la diversidad genética es la recombinación (Holmes, 2006; Holmes & Twiddy, 2003). Sin embargo el rol de la recombinación en la evolución del DENV sigue siendo controvertido. La condición ecológica que favorece la recombinación es la co-circulación en una localidad de dos o más genotipos y variantes genéticas de estos. En este escenario, un mosquito puede ingerir cepas distintas al alimentarse sobre varios individuos y/o un individuo puede ser picado simultáneamente por mosquitos infectados con cepas distintas (Holmes *et al.*, 1999). El flujo de virus favorece la diversidad genética de una población viral. Algunos estudios indican que serotipos y genotipos a menudo han recorrido grandes distancias por la movilidad de los huéspedes y el mosquito. Por tanto, una mayor circulación de cepas aumenta el chance de recombinación y generación de novedades evolutivas.

### **Historia del DENV en América**

Con respecto a introducción y dispersión de serotipos en América, a continuación se describen los hallazgos más relevantes (revisado en: Allicock *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2017):

DENV-1 se reportó por primera vez en las Américas en 1977, en Barbados, Cuba, Las Antillas Francesas, Granada, Paraguay y Puerto Rico. En las siguientes décadas, en Brasil, México y Puerto Rico, Colombia, Costa Rica, Guayana Francesa, Paraguay, Perú y Venezuela. En 2005 – 2006 se reportó el mayor número de casos en América por el serotipo.

DENV-2 se reportó por primera vez en 1953 en Trinidad y Tobago. Sin embargo, el reporte de casos infectados por este serotipo fue a finales de los años sesenta y comienzo de los setenta. En los años noventa se reportó aumento en el número de casos severos, posiblemente debido a la introducción del genotipo Asiático/Americano (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Este aumento en los casos puede ser la causa del incremento del reporte de casos.

DENV- 3 se reportó por primera vez en las Américas en Puerto Rico en 1963 y se continuó reportando DENV3 hasta 1978. Este serotipo reemergió en 1994 debido a la introducción de un nuevo genotipo (III) (Messer *et al.*, 2003). En la mayoría de países de América la introducción se reportó desde el 2000.

DENV4 se reportó por primera vez en las Américas en 1981, cuando se informó en Brasil, Cuba, Dominica, Puerto Rico y las Islas Vírgenes de los Estados Unidos. Desde entonces, ha permanecido en la región con reportes frecuentes de Puerto Rico desde los años ochenta-1990, Venezuela desde los años noventa, y Nicaragua, Brasil y Perú desde fines de los años noventa y mediados del 2000.

### **Historia del DENV en Colombia**

En Colombia la circulación de DENV-1, -2, y -3 fue documentada por primera vez en los años 70 y la de DENV-4 en 1982 (Boshell *et al.*, 1986). Aislamientos del DENV-3 no se reportaron al menos en 24 años (1976 – 2000), pero el serotipo se reintrodujo en 2001 con trasmisión sostenida desde entonces (Ocazonez *et al.*, 2004). Actualmente co-circulan los

cuatro serotipos en 24 de los 32 departamentos y esto se conoce como escenario hiperendémico (Villabona *et al.*, 2016). Algunos estudios filogenéticos evidencian la diversidad genética de cada serotipo en el país. Tres de ellos comparan la secuencia completa del gen E de virus de Santander (Ocazonez *et al.*, 2013; Villabona *et al.*, 2009) y Antioquia (Ospina *et al.*, 2010). Otros cuatro comparan una porción pequeña del genoma (220 pb de la unión E/NS1) de virus de varios departamentos (Mendez *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2012; Méndez & Calvache, 2003; Usme-Ciro *et al.*, 2008). Los resultados de estos estudios mostraron que la población de cada serotipo que ha estado presente en Colombia desde el inicio de los años 90, estaba conformado por un único genotipo. También, es posible inferir sobre posibles rutas de entrada de virus al país desde países de Centroamérica, Venezuela, Ecuador y Perú.

### **Epidemiología del dengue**

Alrededor de 2.5 billones de personas o el 40% de la población mundial vive en áreas tropicales y subtropicales, donde se da la mayor transmisión de dengue. La organización mundial de la salud (WHO, 2014) estima que aproximadamente entre 50 y 100 millones de infecciones ocurren anualmente, incluyendo 500,000 casos severos y 22000 muertes, afectando en su gran mayoría a niños. Bath *et al.*, 2013 usando un enfoque cartográfico se estimaron 390 millones (95% Intervalo de credibilidad: 284-548) de infecciones de dengue por año, de las cuales 96 millones( 67-136) manifestaron aparentemente algún nivel de severidad.

El número de casos de dengue en América incremento cinco veces entre el 2003 y el 2013. Al menos un millón de casos fueron reportados en el periodo del 2009 al 2012, con más de 33,900 casos severos y 835 muertes. En el 2013, 2.3 millones de casos fueron reportados en

comparación a el número de casos reportados en el 2013 que fue de 517,617 casos ( PAHO, 2014).

### **Dengue en Colombia**

En los últimos diez años Colombia ha sido el segundo país en América en reportar el mayor número de casos después de Brasil (PAHO. 2014, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2014). En el 2010 fue el año en el cual se presentó la mayor epidemia en el país con 151.774 casos y muertes reportadas a causa de la enfermedad. El segundo año con mayor número de eventos relacionados con la enfermedad fue el 2002 con más de 70.000 casos notificados. En el 2015 se han reportado en el país 20.066 casos totales de dengue, de los cuales 19.782 (98,5 %) corresponden a dengue y 284 (1,5%) a dengue grave. Adicionalmente, se han notificado 76 muertes a causa de esta enfermedad (Boletín epidemiológico semana 30, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2015). La abundancia de casos reportados en el país a lo largo del tiempo han sido cíclicos, en el que se observan repeticiones de 3 a 4 años. Por otro lado, Santander y Norte de Santander han sido los departamentos más afectados por la presencia del virus en el país(Castrillón *et al.*, 2015; Ocazonez-jiménez *et al.*, 2013)

Desde 1998 Santander ha sido uno de los departamentos que presenta mayor número de casos en el país (Castrillón *et al.*, 2015). En el área metropolitana de Bucaramanga el DENV-1 fue predominante en los años de 1998 – 1999 y una vez más en 2007 – 2008, el DENV-4 ha sido el serotipo menos predominante y ha sido aislado en los periodos en los cuales el serotipo 1 ha presentado baja prevalencia de casos. Con respecto a DENV-2, este siempre ha estado

presente en el área metropolitana y sus picos de mayor prevalencia fueron en los periodos de 1998 al 2001 y posteriormente del 2004 al 2007. Este es el serotipo que más ha causado casos de dengue severo en Santander (Ocazonez, 2007). Para el 2015, en la semana epidemiológica #30, Santander era el cuarto departamento en el país con mayor número de casos confirmados (1.676) por laboratorio después de Valle del Cauca con 3.947 casos, Tolima con 2.537 casos y Meta con 1.707, el Área metropolitana de Bucaramanga era la región que más casos reporta (Boletín epidemiológico semana 09, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2015).

### 3. Metodología

#### 3.1 Cepas de DENV

Un total de 68 cepas del AMB-Santander (21 de DENV-1, 29 de DENV-2, 9 de DENV-3 y 9 de DENV-4) y 8 cepas de otros departamentos (3 de DENV-2, 3 de DENV-3 y 2 de DENV-4) fueron incluidas en este estudio (Tabla 1), las cuales se seleccionaron de la Colección de Virus Dengue del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP (Edificio de Investigaciones, sede Guatiguará, UIS). Las cepas fueron obtenidas de sueros de pacientes incluidos en proyectos de investigación previos (ver fuentes Tabla 1). Los aislamientos se hicieron en células de mosquito *Ae. aegypti* (C6/36) y la identificación del serotipo se hizo con anticuerpos monoclonales (IFI) o amplificando un fragmento específico del genoma (Ocazonez *et al.* 2013). Para este estudio se incluyeron cepas con 1 – 2 pases en células C6/36.

#### 3.2 Región del genoma viral

Se usó la secuencia completa del gen E (1485 nts; 13.9% del genoma) que codifica la proteína del mismo nombre. La secuencia del gen E ha sido usada, ya que dado el objetivo del estudio era necesario una región del genoma que presentara representatividad espacio-temporal; así, el número de secuencias disponibles en el banco de genes (GenBank) con mayor información de cepas antiguas es mayor para el gen E que para otros genes y genoma. Adicionalmente, La proteína de la envoltura de fusión que es la que codifica el gen E es un importante factor que media la unión del virus, la fusión de acoger la membrana celular y el tropismo del virus (Johnson *et al.*, 1994; Modis *et al.*, 2004; Rey, 1995) y es el principal objetivo de anticuerpos neutralizantes del virus (Messer *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Cepas de DENV incluidas en el estudio.

Serotipo	Año	No	Identificador	
DENV-1	2015	6	P201080355, F15030291, F15040302, P204100029, P201080126, F15032187	
	2014	6	F14080018, F14090026, P201080030, P204100023, P201080016, P204100018	
	2010	4	LV-121086, LV-141040, LV-151031, LV-151032	
	2009	5	LV-122007, LV-122008, LV-121017, LV-121016, LV-122004	
DENV-2	2015	7	F15050329, P204100030, P204100028, F15020239, P204100046, F15070429, P200120378*	
	2014	8	P201080044, F14080014, P201080038, F14102012, P204100021, F14122077, F14102011, F14110114	
	2010	2	LV-111137-14, LV-141242-14	
	2008	1	08-017	
	2007	2	07-040, 07-282	
	2006	1	OC-314*	
	2005	1	OC-053*	
	2004	2	04-080, LV-353	
	2003	1	G-025	
	2001	3	01-220, 01-270, 01-363	
	2000	1	00-325	
	1998	3	98-020, 98-205, 98-218	
	DENV-3	2015	7	P202090044, P201080356, F15072352, F15030270, F15042228, P201080215*, P200120402*
		2014	5	F14080012, P201080069, P201080081, P201080061, P200120019*
DENV-4	2015	3	P202090076, P201080317*, P200120105*	
	2014	1	F14100091	
	2010	5	LV_111117_14, LV_141010_14, LV_141021_14, LV_121101_14, LV_141007_14	
	2009	2	LV_122006_14, LV_192075_14	

\* Otros departamentos: Norte de Santander (n=2), Valle del Cauca (n=4), Bolívar (n=1), Cesar (n=1); **Fuentes:** Proyectos de investigación de la UIS apoyados por Colciencias (1102-04-16376 y 1102-04-13042), la Gobernación de Santander (2007-068000-0070) y Sanofi Pasteur (BPIN # 2013-0001-00011-P2).

### 3.3 Obtención de secuencias del gen E

Para cada serotipo se diseñaron dos juegos de oligómeros solapados con el fin de amplificar el gen E y un juego para secuenciarlo (Tabla 2). Para esto, se descargó la secuencia del genoma completo y se extrajo la región M-E-NS1 la cual se analizó con el programa IDT primer (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). La validación y especificidad de cada oligómero se hizo con el programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Cada cepa viral se amplificó previamente en células C6/36. El RNA fue extraído de 140  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo utilizando el estuche comercial QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Para amplificar el gen E, se siguió el protocolo rutinario del Laboratorio como fue descrito (Villabona *et al.*, 2009). Brevemente, el RNA fue retrotranscrito a cDNA empleando hexámeros aleatorios (Random Hexamer Primer, Thermo Scientific) y la enzima retro-transcriptasa RevertAid Reverse transcriptasa, (Thermo Scientific. USA). La PCR se hizo en un volumen de reacción de 50  $\mu$ L que contenía cDNA, Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), oligómeros, de  $MgCl_2$  (25 mM) y dNTPs (2 mM cada uno); la amplificación se hizo en 40 ciclos. El producto de la PCR fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa teñida con EZ – visión de Amresco y la amplificación exitosa se confirmó al identificar el fragmento de DNA del tamaño esperado (Tabla 2). La mezcla de reacción de la PCR se almacenó a  $-70^{\circ}C$  hasta por 30 días antes de usarse para secuenciación. Para obtener la secuencia se usó el servicio de la compañía Macrogen DNA Sequencing Service (Seul, Corea), que incluyó además la purificación previa del DNA amplificado. La reacción de la PCR (50  $\mu$ l) se envió por vía aérea siguiendo las indicaciones de la compañía.

### 3.4 Análisis y limpieza de secuencias

Las secuencias obtenidas en el trabajo se ensamblaron con el programa DNASTAR (DNASTAR, 2013). Se descargaron las secuencias disponibles del gen E y las regiones del genoma que contuvieran ese gen de los cuatro serotipos hasta octubre 2016, del banco de genes Genbank. Se eliminaron manualmente aquellas que no presentaran el dato de localidad y año; las 100% idénticas, quiméricas y clones empleando el algoritmo de agrupamiento del programa USEARCH v.9.2.64 (Edgar, 2010) obteniéndose matrices de datos de cada serotipo. Las matrices se alinearon a partir de un algoritmo de alineamiento múltiple empleado en el programa MUSCLE v3.8 (Edgar, 2004), se hizo una inspección manual con el programa Bioedit (Hall, 1999) y se extrajo el gen E. La calidad de la información contenida en cada matriz se estimó mediante la señal filogenética usando Tree-puzzle 5.2 (Schmidt *et al.*, 2002); se descartó la presencia de recombinantes (Splits Tree) basado en el algoritmo PHI (Índice *de* homoplasia *par-a-par*) y se estimaron los haplotipos para las secuencias locales obtenidas con el programa DNAsp V5 (Librado & Rozas, 2009). La Tabla 3 presenta las herramientas y programas de bioinformática usados para los análisis, todos son de acceso libre en internet.

### 3.5 Análisis filogenéticos

Para todo análisis se estimó el modelo de sustitución nucleotídica que mejor ajustara a los datos (matrices empleadas) usando el criterio de información de Akaike (AIC), con el paquete ape (Paradis *et al.*, 2004), desde la plataforma R v.3.3.0 (R Core team, 2015). El análisis filogenético en este estudio se enfocó principalmente en inferir las relaciones filogenéticas, historia de dispersión y demográfica para entender la dinámica espacio -temporal y la prevalencia (abundancia / escasez) de cada serotipo en el AMB-Santander.

**3.5.1 Genotipificación.** Se identificó el genotipo de cada secuencia teniendo en cuenta su posición en la filogenia reconstruida por máxima verosimilitud (Maximum Likelihood en la literatura en inglés) usando el programa PhyML v.3.1 (Guindon *et al.*, 2010); se emplearon secuencias de referencia ya clasificadas según artículos científicos para identificar grandes grupos monofiléticos como serotipos y genotipos (Chen & Vasilakis, 2011; Vasilakis *et al.*, 2007; Villabona & Zanotto, 2011; Villabona & Zanotto, 2013). Con este análisis se determinó el genotipo de las secuencias locales obtenidas en el estudio y se empleó como criterio de selección, de las matrices de secuencias usadas para inferir la historia evolutiva (genotipo y monófila). Para el análisis de genotipificación de las secuencias de Colombia se calculó el soporte de cada nodo del árbol a partir de 100 réplicas usando *bootstrap* no paramétrico. Las topologías fueron enraizadas con tres terminales, correspondientes al gen E de flavivirus (fiebre Amarilla (JX949181), zika (KY317937) y encefalitis japonesa (NC\_001437).

**Tabla 2.** Oligómeros usados para amplificar y secuenciar el gen E.

Identificador	Posición	Secuencia	Pb*
D1-Fwd1-E	618	5'-CCAGATGACGTTGACTGCTGGTG-3'(S)	1143
D1-Rev1-E	1704	5'-CGCAGTGTGCATTGCTCCTTC-3')	
D1-Fwd2-E	1627	5'-GGAACAGACAAGATTTGCTGGT-3'(S)	1155
D1-Rev2-E	2763	5'-GCTTTTCCCCAGCTTTTCCA-3'	
D1-MA-E	1422	5'-GGAGCTTGAGGTGTTATGGT-3'(S)	1017
D1-MB-E	2439	5'-AGTTCTCTGCCCTTCCAGTT-3''	
D2-Fwd1-E	723	5'-TCTTGAGACATCCAGGCTTTAC-3'(S)	863
D2-Rev1-E	1586	5'-GAGACCCTAAGACAACGACATC -3'	
D2-Fwd2-E	1476	5'-GGTTCCTAGACCTGCCATTAC -3'(S)	851
D2-Rev2-E	2327	5'-TCACAACGCAACCACTATC -3'	
D2-MA-E	990	5'-CCAAACAACCTGCCACTCTAA-3'(S)	1337
D2-MB-E	2420	5'-GGGATTCTGGTTGGAACCTTGTA-3'	
D3-Fwd1-E	787	5'-GACCCAGAAGGCGGTTATTT -3'(S)	1260
D3-Rev1-E	2026	5'-GCCTCGAACATCTTCCCAATA -3'	
D3-Fwd2-E	1915	5'-GAAGGAGGAGCCTGTCAATAT -3'(S)	1175
D3-Rev2-E	3068	5'-TGTAGTTGTGTTGCGAGATAGG -3'	
D3-MA-E	951	5' - ACAAGCCCACGTTGGATATAG - 3' (S)	1520
D3-MB-E	2471	5' - ATTCCGCACACTCCATTCTC- 3'	
D4-Fwd1-E	854	5'-ATCCAGCGAACTGTCTTCTT -3' (Se)	1078
D4-Rev1-E	1912	5'- GCTCCAGCACCTTCATACTT -3')	
D4-Fwd2-E	1498	5'-CCCAGGTCTGGAATTGACTT -3'(S)	1300
D4-Rev2-E	2825	5'-AGGTGTCTGGTCCGTCTAT -3'	
D4-MA-E	938	5'-GAATGCGATGCGTAGGAGTAG-3'(S)	1438
D4-MB-E	2376	5'-AGTGATTCCTCCAACAGCTATG -3' )	

Pb: pares de bases del producto amplificado. Fwd1, Rev1, Fwd2, Rev2: para amplificación y secuenciación; MA, MB: para secuenciación. Rew: oligómeros antisense

**Tabla 3.** Programas y herramientas de bioinformática usadas en el estudio.

Sigla	Utilidad
DNASTAR Lasergene (Madison, WI) USEARCH (Edgar, 2010)	Ensamblar secuencias. Eliminar secuencias idénticas, clones y quimeras; extraer secuencias por criterio de identidad nucleotídica.
MUSCLE v3.8 (Edgar, 2004)	Alineamiento múltiple de secuencias
SplitsTree v.4.2 (Bruen <i>et al.</i> , 2006)	Identificar de secuencias recombinantes
Tree-puzzle 5.2 (Schmidt <i>et al.</i> , 2002)	Determinar la señal filogenética
DNAsp V5 (Librado & Rozas, 2009)	Estimar los haplotipos e índices de diversidad nucleotídica
R v.3.3.0 (R Core team, 2015) + paquete APE (Paradis <i>et al.</i> , 2004)	Estimar el modelo de sustitución nucleotídica que mejor ajuste a los datos bajo el criterio AIC. Estimar los polimorfismos
PhyML v.3.1 (Guindon <i>et al.</i> , 2010)	Reconstruir árboles filogenéticos empleando el método de máxima verosimilitud y estimar el valor bootstrap no paramétrico.
BEAST v1.8.1 (Drummond <i>et al.</i> , 2012)	Reconstruir las relaciones filogenéticas usando inferencia bayesiana, inferir linajes, estimar el ancestro común más reciente (tMRCA), la tasa de cambio evolutivo (sustituciones/sitio/año) y la diversidad genética relativa (Ne). Realizar análisis filogeográfico.
Figtree 1.4.	Visualizar y editar árboles filogenéticos.
Winclada + Nona (Nixon, 2002)	Mapear caracteres e identificar las sinapomorfias y homoplasias para cada nodo.
Tracer v1.6 (Rambaut, 2007)	Evaluar la convergencia de los parámetros en el análisis bayesiano (BEAST v1.8.1).
Spread v1.0.4 (Bielejec <i>et al.</i> , 2011), Plataforma Datamonkey.org (Delpont <i>et al.</i> , 2010)	Visualizar el análisis filogeográfico. Estimar la proporción entre las tasas de sustitución sinónima (dS) y no sinónima (dN).
R v.3.3.0 (R Core team, 2015) + paquete "tseries" (Trapletti & Hornik, 2017)	Aplicar pruebas de correlación y auto-correlación para series temporales: Sperman y Durbin-Watson.

**3.5.2 Historia evolutiva y de dispersión.** Para la reconstrucción de la historia evolutiva y de dispersión o filogeografía se incluyeron las secuencias Americanas del genotipo circulante en el AMB-Santander de cada serotipo; usando análisis bayesiano con el programa BEAST v1.8.1 (Drummond *et al.*, 2012). Para todos los análisis que se hicieron bajo este enfoque se realizó una previa exploración de priores para determinar el modelo coalescente que mejor se ajusta al comportamiento de los datos. Se evaluaron dos modelos paramétricos y dos no paramétricos: tamaño constante (Kingman, 1982), crecimiento exponencial (Griffiths & Tavaré, 1994), skyride (Minin, Bloomquist, & Suchard, 2008) y skygrid (Gill *et al.*, 2013). Para

seleccionar el modelo, se hizo el cálculo por el método de path Sampling (PS) y stepping - stone (SS) (Baele *et al.*, 2013), a partir de la estimación de los likelihood marginales (MLE).

**3.5.3 Filogeografía.** El análisis se enfocó en modelar la difusión espacial de la genealogía escalada en el tiempo a través de una reconstrucción ancestral de estados discretos. Se evaluaron 5 diferentes esquemas de unidades geográficas partiendo de país hasta grandes regiones en América, asumiendo los siguientes criterios: (1) dada las agrupaciones en la filogenia; (2) la relación de parentesco con (Colombia); (3) el esquema de unidades que mantuvieran mayor homogeneidad en número de secuencias. Asumiendo finalmente: Centroamérica [Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá], Norteamérica [Estados Unidos y México], Antillas Mayores [Cuba, Haití, Jamaica, Republica Dominicana y Puerto rico], Antillas menores [Barbados, Dominica, Granada, San Cristóbal, San Vicente, Granadinas, Santa Lucia, Trinidad y Tobago, Islas Vírgenes, Curazao, Aruba y Bonaire], Colombia, Venezuela y Sur América [Brasil, Paraguay, Argentina, Chile, Bolivia, Ecuador y Perú]; Con lo cual se hizo la reconstrucción con un modelo de sustitución discreto asimétrico, que es un modelo de mutación o sustitución usado para analizar tasas de dispersión entre la totalidad de los estados discretos (Lemey *et al.*, 2009). Este análisis usa el proceso del tiempo continuo de la cadena de Markov en el que el espacio de estados consta de las localidades de las secuencias y se empleó un método estocástico para la selección de variables de búsquedas bayesianas (BSSVS) para inferir las rutas migratorias dominantes. Pruebas de factores de Bayes (BF) se usaron para identificar y contrastar las tasas que contribuyen a la ruta de dispersión usando el programa Spread v1.0.4 (Bielejec *et al.* 2011).

Los árboles de máxima credibilidad se infirieron a partir de conjuntos de árboles muestreados en la fase estacionaria de cinco cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Las MCMC fueron ejecutadas de forma independiente, con 100 millones de generaciones cada una; usando el modelo de sustitución nucleotídica estimado previamente; se utilizó un reloj molecular relajado de tipo logaritmo normal no correlacionado (Drummond *et al.*, 2006). La convergencia de los parámetros se estimó con un tamaño de muestra efectivo mayor que 200 con Tracer v1.6 (Rambaut, 2007).

### 3.6 Diversidad Genética

Se evaluaron dos aproximaciones estadísticas diferentes las cuales hacen uso de las predicciones del modelo neutral y un enfoque cladístico para describir la diversidad genética de la población viral que circula en el AMB-Santander. Se estimó la distribución de polimorfismo en el total de la población usando el índice de Tajima ( $T_D$ ), como promedio de diferencia de los indicadores de diversidad  $\pi$  (nucleótidos por sitio entre dos secuencias) (Li & Wu, 1985) y  $\Theta$  (número de sitios segregativos en un grupo de secuencias) usando el programa DNAsp V5 (Librado & Rozas, 2009). Se determinó la proporción entre las sustituciones sinónimas y no-sinónimas, utilizando el codón como mínima unidad evolutiva. Se emplearon tres enfoques diferentes (Kosakovsky & Frost, 2005): single likelihood ancestor counting (SLAC), es el más eficiente y conservativo empleando un árbol inicial y partiendo de una secuencia ancestral; fixed effects likelihood (FEL), realiza la estimación a través de cada posición de codón en un alineamiento, y random effects likelihood (REL) es el menos conservativo y asume que la selección ocurre como eventos esporádicos localizados en pocos sitios de un gen.

Se estimó la frecuencia de sitios polimórficos a lo largo del gen E empleando el paquete APE (Paradis *et al.*, 2004) en la plataforma R v.3.3.(R Core team, 2015). Dado que la inmunogenicidad de la proteína de la envoltura puede variar debido a cambios de aminoácidos (Simmons *et al.*, 2005), se hizo alineamiento de secuencia de aminoácidos y se identificaron cambios que fueron reportados previamente en la literatura con respecto a la localización y función de sitios de la proteína de la envoltura (Howard, 2006; Mason *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 2005; Twiddy *et al.*, 2002).

Para evaluar si cambios (caracteres) encontrados a lo largo de la proteína eran propios de la población de AMB-Santander se usó un enfoque cladístico (Brower *et al.*, 1999). Asumiendo como hipótesis filogenética el árbol reconstruido a partir de inferencia bayesiana, se hizo un mapeo de caracteres para identificar cambios de nucleótidos sinapomórficos en cada nodo, para esto se realizó una búsqueda heurística por defecto y se seleccionó el árbol entre los de mejor costo que presentara las mismas agrupaciones recuperadas, se empleó el programa Winclada + Nona (Nixon, 2002).

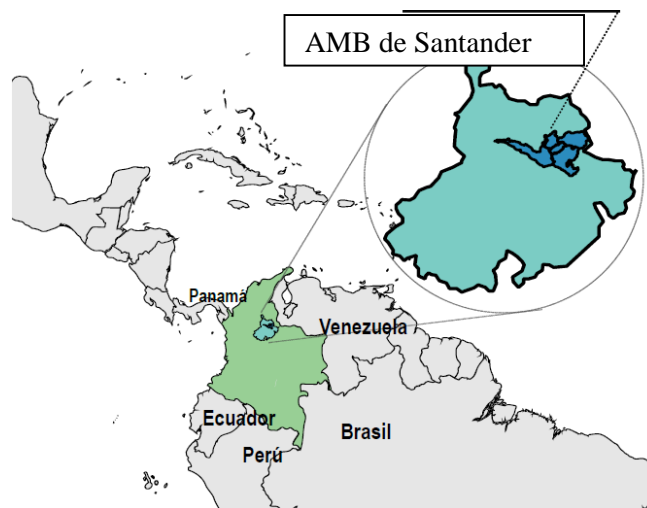
### **3.7 Historia demográfica y prevalencia del serotipo**

Se usaron las secuencias E y datos de prevalencia relativa de virus que han circulado en el AMB-Santander (Figura 2; Tabla 4). Se estimó el tamaño efectivo de la población viral ( $N_e$ ), un parámetro dependiente de la diversidad genética relativa, usando un modelo demográfico coalescente no paramétrico Skygrid (Gill *et al.*, 2013), usando el programa BEAST v 1.8 (Drummond *et al.*, 2012). Este modelo recupera los eventos de cladogenesis en la genealogía, permitiendo identificar cambios en la diversidad genética relativa a lo largo del tiempo ( $N_e$ ). La relación entre  $N_e$  y prevalencia del serotipo se estableció aplicando pruebas de correlación

de Sperman para exploración inicial de los datos y dado que se trataba de una serie temporal se uso el método de auto correlación con el estimativo de Durbin-Watson empleando el paquete "tseries" (Trapletti & Hornik, 2017) en la plataforma R v.3.3.0 (R Core team, 2015).

Fuentes de los datos sobre la distribución temporal de serotipos (Tabla 4):

Período 1998 – 2004 y 2007 – 2008 y 2014 – 2015: Gómez *et al.*, 2008; Ocazonez *et al.*, 2013; Ocazonez *et al.*, 2007; Ocazonez *et al.*, 2006; Villabona *et al.* 2016. período 2009 – 2010: obtenidos del documento " *Filodinámica del virus dengue serotipo 3 en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander, durante el periodo 2001 a 2010*", que corresponde al informe de resultados de un proyecto de maestría reciente (Rey, *et al.* 2016).



**Figura 2.** El AMB-Santander está conformado por Bucaramanga, la capital del departamento, y los municipios de Floridablanca, Girón y Piedecuesta. Del total de casos de dengue en Santander, el 75% son del AMB (Padilla *et al.*, 2012)

**Tabla 4.** Distribución temporal de serotipos del DENV en el AMB-Santander.

Año	Cepas	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
1998	14	8	6	0	0
1999	4	2	2	0	0
2000	10	1	7	0	2
2001	26	1	10	9	6
2002	15	1	1	13	0
2003	38	0	1	37	0
2004	21	1	2	15	3
2007	35	12	7	14	2
2008	20	17	2	1	0
2009	17	8	1	4	4
2010	73	24	2	26	21
2014	59	22	24	8	5
2015	30	12	8	7	3

## 4. Resultados

### 4.1 Bases de secuencias

Se amplificó el gen E completo de las 76 cepas incluidas en el estudio: se obtuvieron los dos fragmentos de DNA del tamaño esperado (Figura 3).

DENV-1: se usó una matriz de 216 secuencias (Tabla 5): 78 de Colombia (21 obtenidas en este estudio y 57 en trabajos previos del grupo (Ortiz *et al.*, 2012; Henn *et al.* 2005) y 138 de virus de otros países de América y Asia disponibles en GenBank.

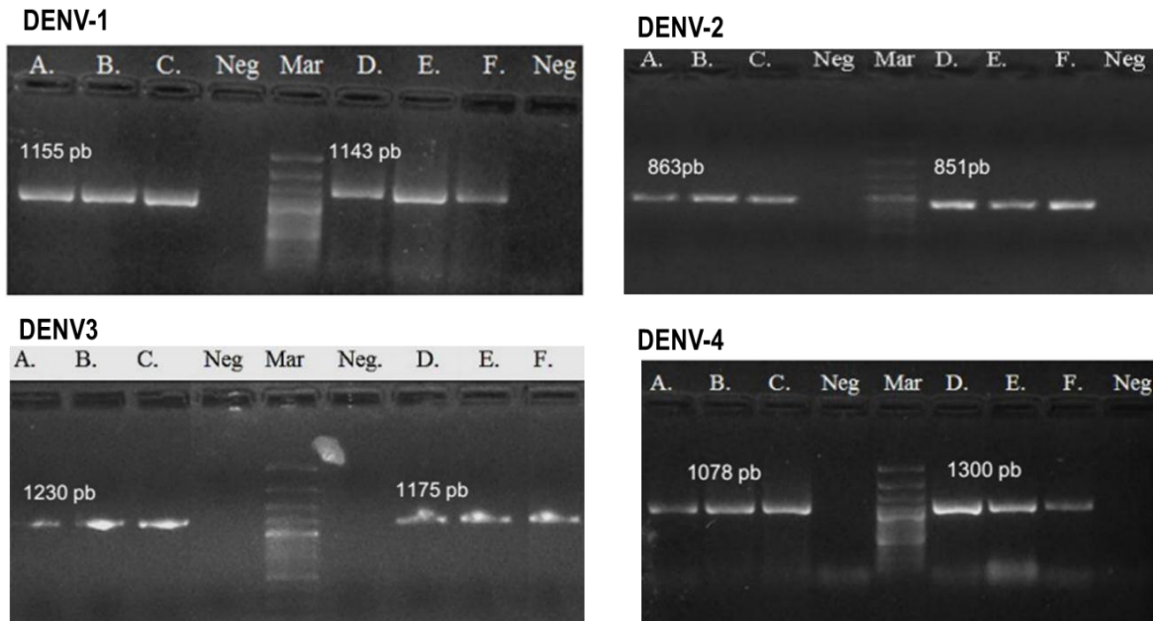
**Tabla 5.** Secuencias E de DENV-1 usadas en el estudio.

Período	Colombia		América	Asia	Total
	SAN	¶			
2014 - 2015	12	0	2	0	14
2011 - 2013	0	0	12	0	12
2007 - 2010	32	1*	28	2	63
2006 – 2005	1	23	12	1	37
1998 - 2004	7	0	23	2	32
Antes 1998	0	2	47	9	58
Total	52	26	124	14	216

Colombia: departamentos de Santander (SAN) y ¶: Norte de Santander (NSAN). \*: Cepas sin dato de origen geográfico.

DENV-2: se usó una matriz de 182 secuencias (Tabla 6): 41 de Colombia (29 obtenidas en este estudio, 10 en un trabajo previo (Henn *et al.* 2005) y 2 del GenBank y 141 de virus de países de América y Asia que fueron descargadas de GenBank.

DENV-3: se usó una matriz de 171 secuencias (Tabla 7): 95 de Colombia (12 obtenidas en este estudio, 34 en estudios previos del grupo (Villabona *et al.*, 2009; Henn *et al.* 2005) y 34 descargadas del GenBank) y 76 de virus de países de América y Asia descargadas de GenBank.



**Figura 3.** Amplificación del gen E de DENV. Fotografías de gel de agarosa representativas de ensayos para amplificar cada fragmento del gen.

**Tabla 6.** Secuencias E de DENV-2 usadas en el estudio.

Período	Colombia		América	Asia	Total
	SAN	¶			
2014 - 2015	14	1	0	0	15
2011 - 2013	0	0	6	0	6
2007 - 2010	6	1	22	1	30
2006 - 2005	0	4	15	1	20
1998 - 2004	13	1	41	1	56
Antes 1998	0	1	41	13	55
Total	33	8	125	16	182

Colombia: Santander (SAN) y otros departamentos (¶): Norte de Santander (n = 2), Guaviare (n = 1), Antioquia (n = 1); sin dato (n = 2).

**Tabla 7.** Secuencias E-DENV-3 usadas en el estudio.

Período	Colombia		América	Asia	Total
	SAN	¶			
2014 - 2015	9	3	1	0	13
2011 - 2013	0	0	3	0	3
2007 - 2010	21	6	14	0	41
2006 - 2005	0	13	11	0	24
1998 - 2004	31	12	35	1	79
Antes 1998	0	0	5	6	11
Total	61	34	69	7	171

Colombia: Santander (SAN) y otros departamentos (¶): Norte de Santander (n = 8), Bolívar (n = 2), Valle del Cauca (n = 4), Antioquia (n = 20).

DENV-4: se usó una matriz de 122 secuencias (Tabla 8): 29 de Colombia (12 obtenidas en este estudio; de las 34 restantes, algunas de estudios previos del grupo (Jiménez *et al.* 2012; Henn *et al.* 2005) y 93 de virus de países de América y Asia del GenBank.

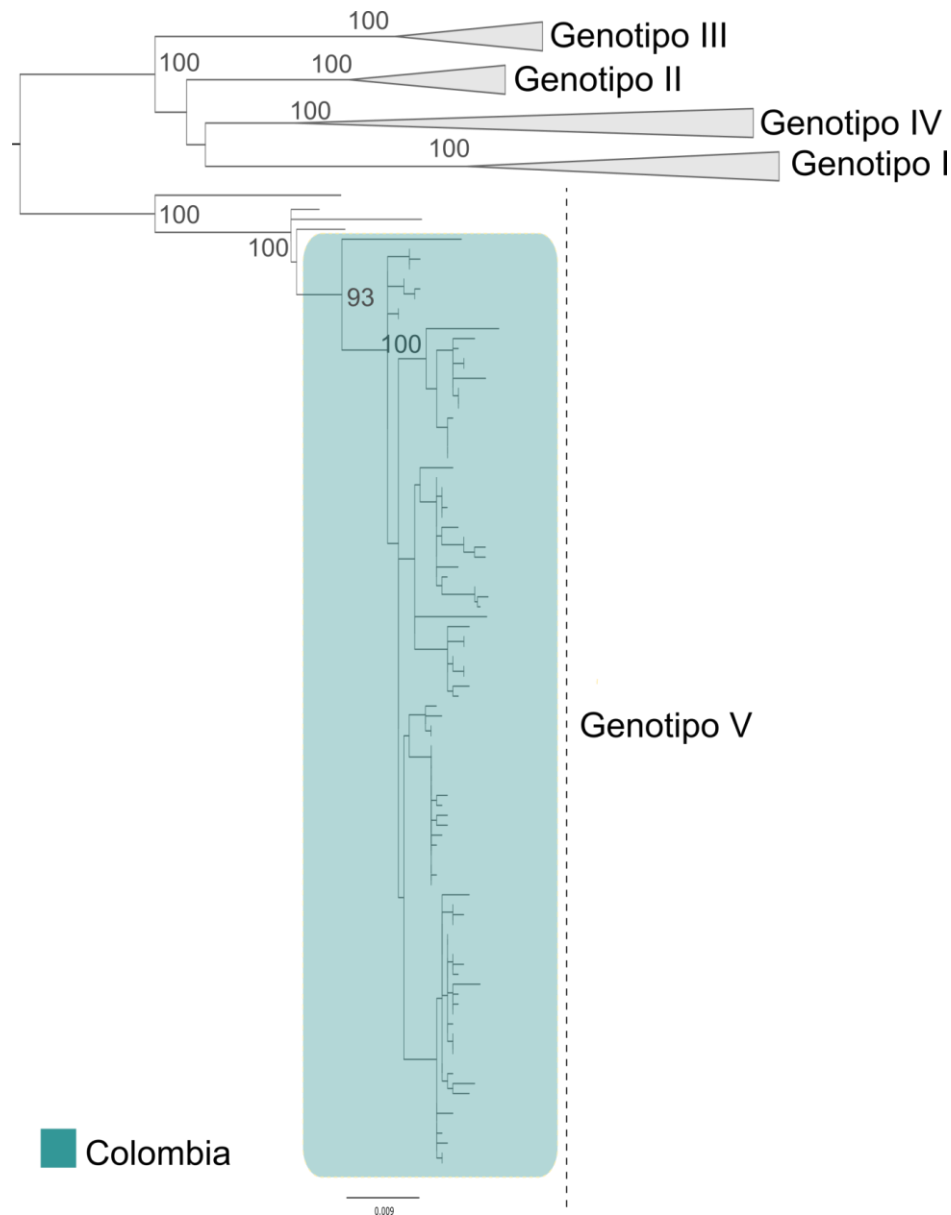
**Tabla 8.** Secuencias E-DENV-4 usadas en el estudio.

Período	Colombia		América	Asia	Total
	SAN	¶			
2014 - 2015	2	2	1	0	5
2011 - 2013	0	0	4	0	4
2007 - 2010	7	0	7	0	14
2006 – 2005	0	4	5	0	9
1998 - 2004	11	0	14	4	31
Antes 1998	1	3	48	7	59
Total	20	9	79	11	122

Colombia: Santander (SAN) y otros departamentos (¶): Norte de Santander (n = 8), Cesar (n = 2), Valle del Cauca (n= 4), Antioquia (n = 20)

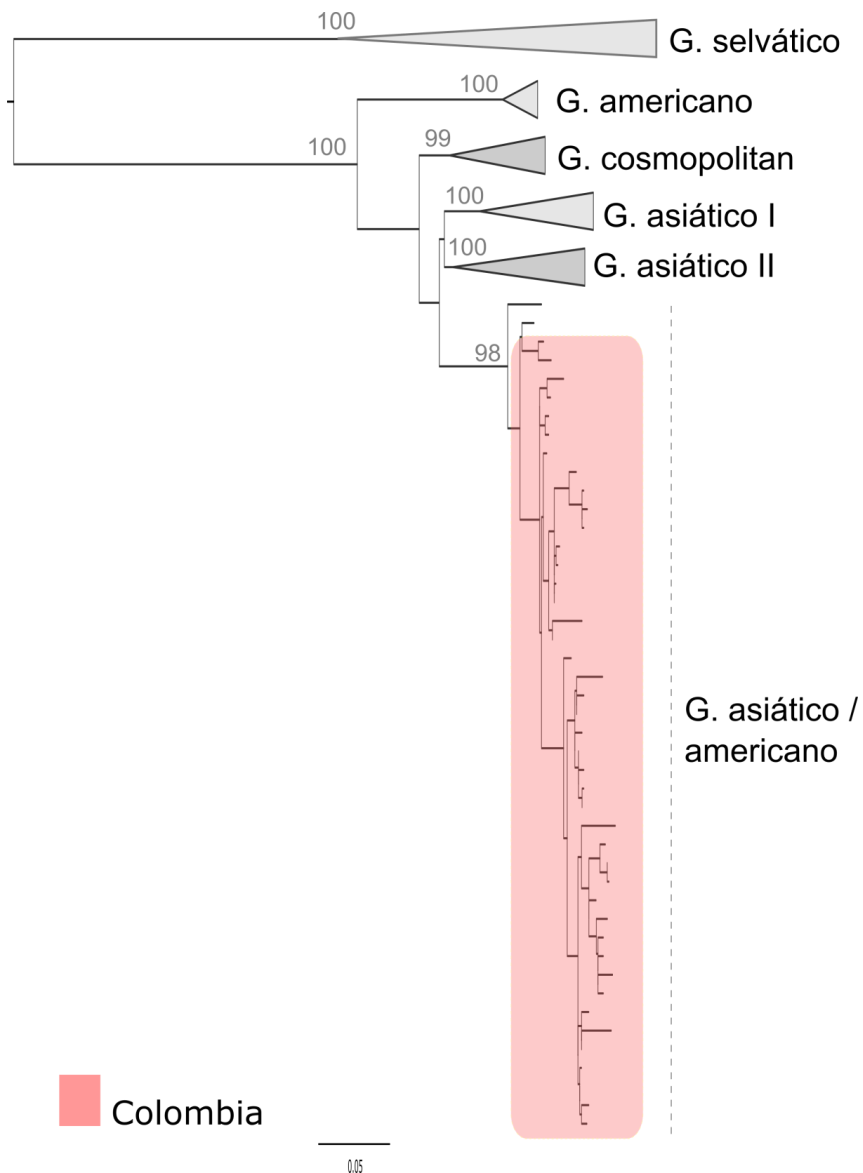
#### 4.2 Genotipo del serotipo

DENV-1: el total de cepas de Colombia (n = 78) del período 1998 – 2015 se agruparon con virus del genotipo V, lo mismo que la cepa antigua de 1985 (AF425616\_CO-1985) y la de 1996 (AF425617\_CO\_1996). Los resultados indican que un único genotipo, de los cinco reconocidos del serotipo, circuló en Colombia en el período estudiado (Figura 4).



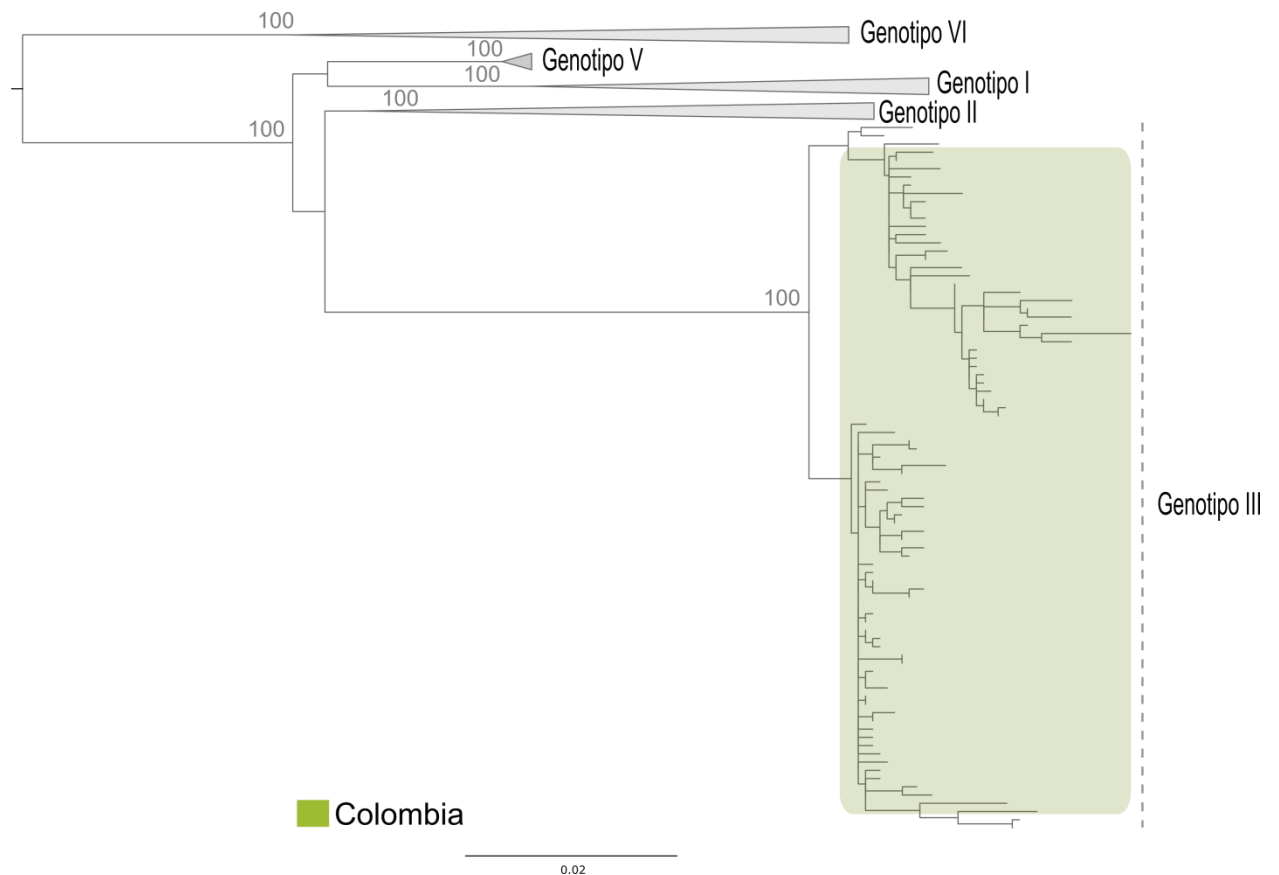
**Figura 4. Genotipo del DENV-1 de Colombia.** Árbol filogenético construido bajo el criterio de máxima likelihood. Los virus de Colombia (en azul) se agruparon en el genotipo V. Los números corresponden a soportes de bootstrap no paramétrico > 90. Los grupos externos se eliminaron por efectos gráficos.

DENV-2: el total de cepas de Colombia (n = 40;) del período 1998 – 2015 se agruparon con virus del genotipo Asiático / Americano y lo mismo la cepa antigua de 1993 (AY484644\_CO\_1993). Los resultados indican que un único genotipo, de los seis del serotipo, circuló en Colombia en el período analizado (Figura 5).



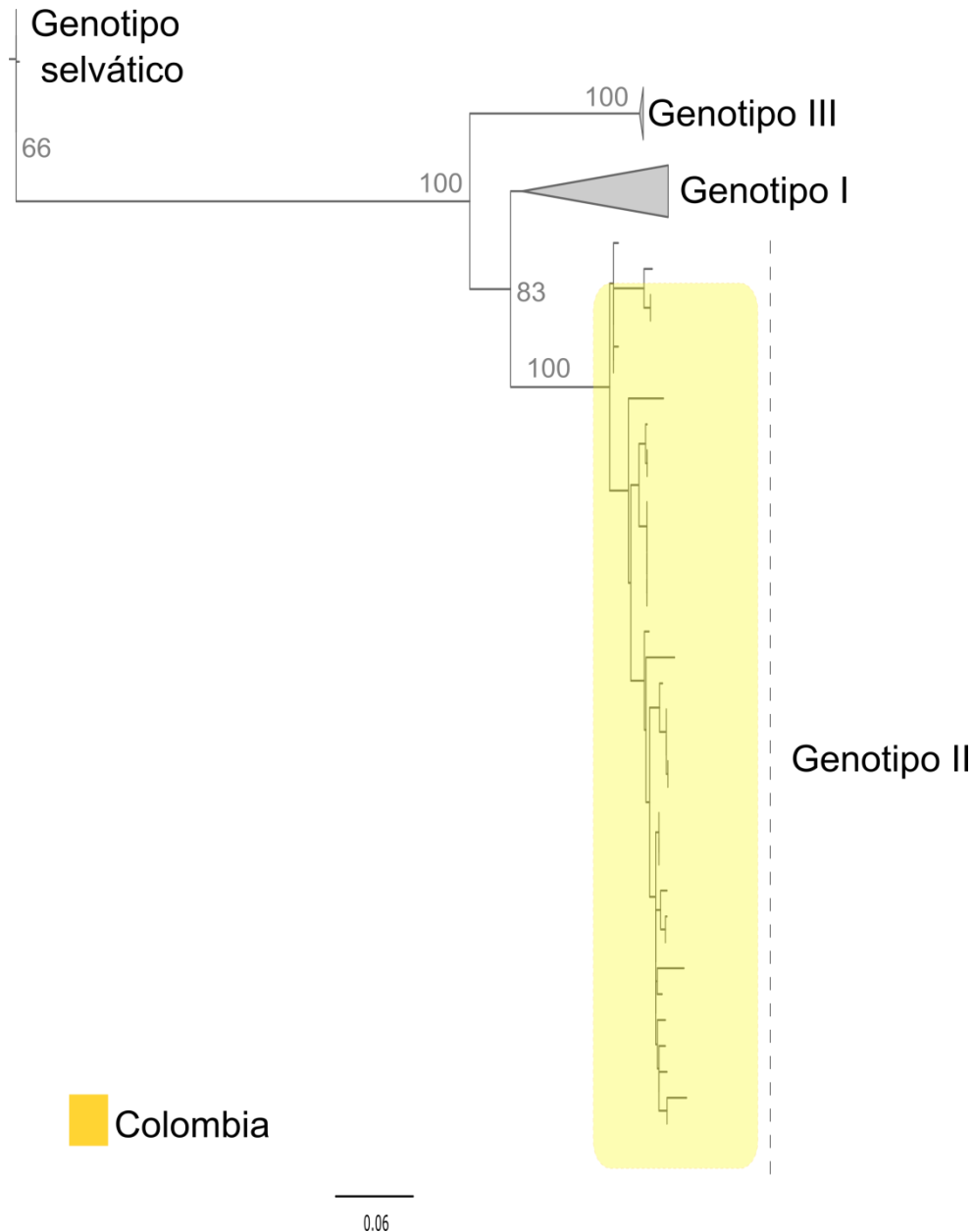
**Figura 5. Genotipo del DENV-2 de Colombia.** Árbol filogenético construido bajo el criterio de máxima verosimilitud. Los virus de Colombia (En rojo) se agruparon en el genotipo V. Los números corresponden a soportes de bootstrap no paramétrico > 90. Los grupos externos se eliminaron por efectos gráficos.

DENV-3: el total de cepas de Colombia (n = 95; 2001 – 2015) se agruparon con virus del genotipo III. Los resultados indican que un único genotipo, de los cuatro del serotipo, circuló en Colombia en el período estudiado (Figura 6).



**Figura 6. Genotipo del DENV-3 de Colombia.** Árbol filogenético construido bajo el criterio de máxima verosimilitud. Los virus de Colombia (En verde) se agruparon en el genotipo V. Los números corresponden a soportes de bootstrap no paramétrico > 90. Los grupos externos se eliminaron por efectos gráficos.

DENV-4: el total de cepas de Colombia ( $n = 32$ ) del período 2000 – 2015 y la cepa de 1997 (FJ24476\_CO\_1997) se agruparon con virus del genotipo II. Los resultados indicaron que un único genotipo, de los cuatro del serotipo, circuló presente en Colombia en el período del estudio (Figura 7).



**Figura 7. Genotipo del DENV-4 de Colombia.** Árbol filogenético construido bajo el criterio de máxima verosimilitud. Los virus de Colombia (en Amarillo) se agruparon en el genotipo V. Los números corresponden a soportes de bootstrap no paramétrico  $> 90$ . Los grupos externos se eliminaron por efectos gráficos.

### 4.3 Filogeografía

Para el análisis se denominó Colombia como unidad geográfica de estudio, incluyendo las secuencias del AMB - Santander y todas las disponibles de Colombia. Esto debido a la falta de homogeneidad en el número de secuencias representantes de diferentes regiones del país, la región Nororiental (Santander y Norte de Santander) es la más representativa. Estos fueron los hallazgos:

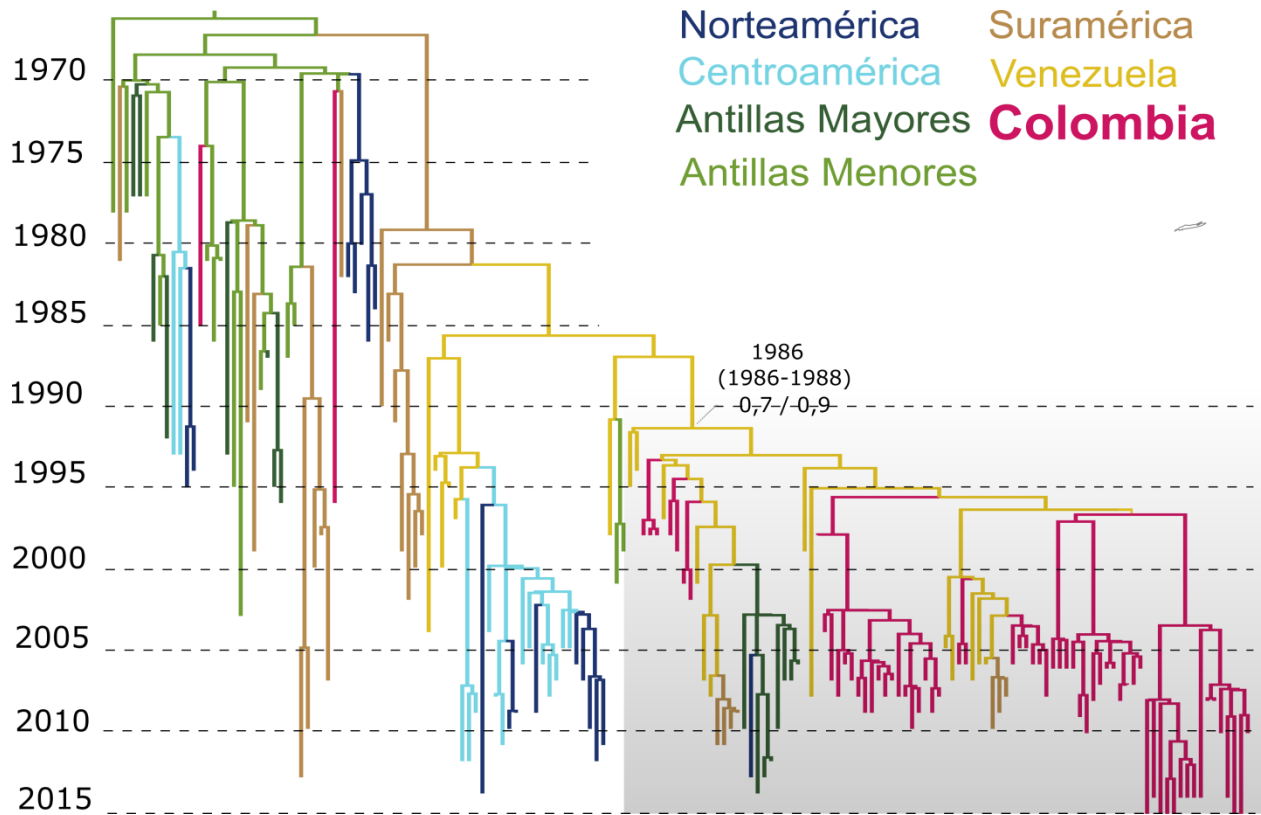
DENV-1-Genotipo V: de la reconstrucción filogeográfica de la Figura 8 se infieren dos rutas de dispersión hacia Colombia desde las Antillas menores que corresponden a tres introducciones. i) directamente a departamentos desconocidos, en 1970 (95 % BCI: 1970 -1972) (cepa AF425617\_CO\_1996, sin dato geográfico) y en 1973 (95 % BCI: 1971-1976) (AF425616\_CO\_1985, sin dato geográfico). ii) Pasando por Sur América – Venezuela y hacia Colombia en 1986 (95 % BCI: 1986 -1988) (las cepas de Santander / Norte de Santander del período 2000 – 2015). Otras rutas hacia y dentro de Colombia no se pudieron inferir debido al limitado número de secuencias.

DENV-2- Genotipo Asiático - Americano : de la reconstrucción filogeográfica de la Figura 9 se infieren dos rutas probables hacia Colombia desde las Antillas menores y cinco introducciones. i) Directamente: hacia Santander, en 1987 (95 % BCI: 1987 - 1989) (CO\_SAN\_1998), 1986 (95 % BCI: 1985-1988) (Santander 1999 – 2015) y 1991 (95 % BCI: 1990-1992) (otra cepa CO\_SAN\_1998); hacia otro departamento desconocido en 1991 (95 % BCI: 1989-1992) (AY484644\_CO\_1993, sin dato geográfico). ii) Desde Centro América, hacia un departamento desconocido en 2001 (95 % BCI: 2000-2001) (JF804029\_CO\_2007; sin dato

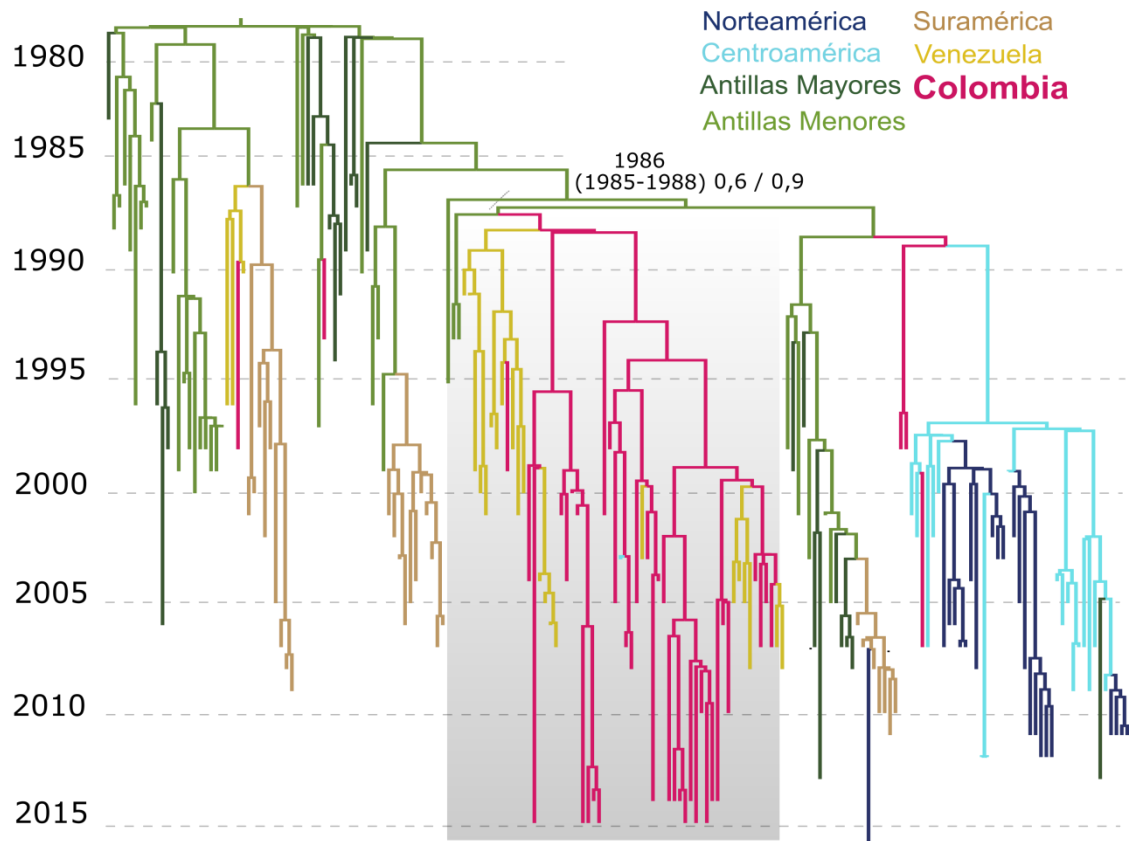
geográfico). La introducción de 1986 (95 % BCI: 1985-1988) se estableció y las otras, al parecer, fueron esporádicas. Se infiere flujo de virus entre Venezuela - Colombia ( Norte de Santander y entre Santander, Valle del Cauca, Antioquia y Guaviare). Otras rutas hacia y dentro de Colombia no se pudieron inferir debido al limitado número de secuencias.

DENV-3 - Genotipo III: de la reconstrucción filogeográfica de la Figura 10 se infiere rutas hacia Colombia desde Centroamérica, cada una correspondiendo a una introducción: i) en 1991 (95 % BCI: 1991-1992), de la cual probablemente se dio flujo de virus con Venezuela y entre departamentos (Santander, Antioquia y Valle del Cauca). ii) en 1992 (95 % BCI: 1991-1994), Se infiere flujo de virus entre departamentos de Colombia (Antioquía, Santander, Valle del Cauca y Bolívar) y con otros países: Venezuela, Nicaragua, Salvador, Estados Unidos (Florida) y Puerto Rico. Otras rutas hacia y dentro de Colombia no se pudieron inferir debido al limitado número de secuencias.

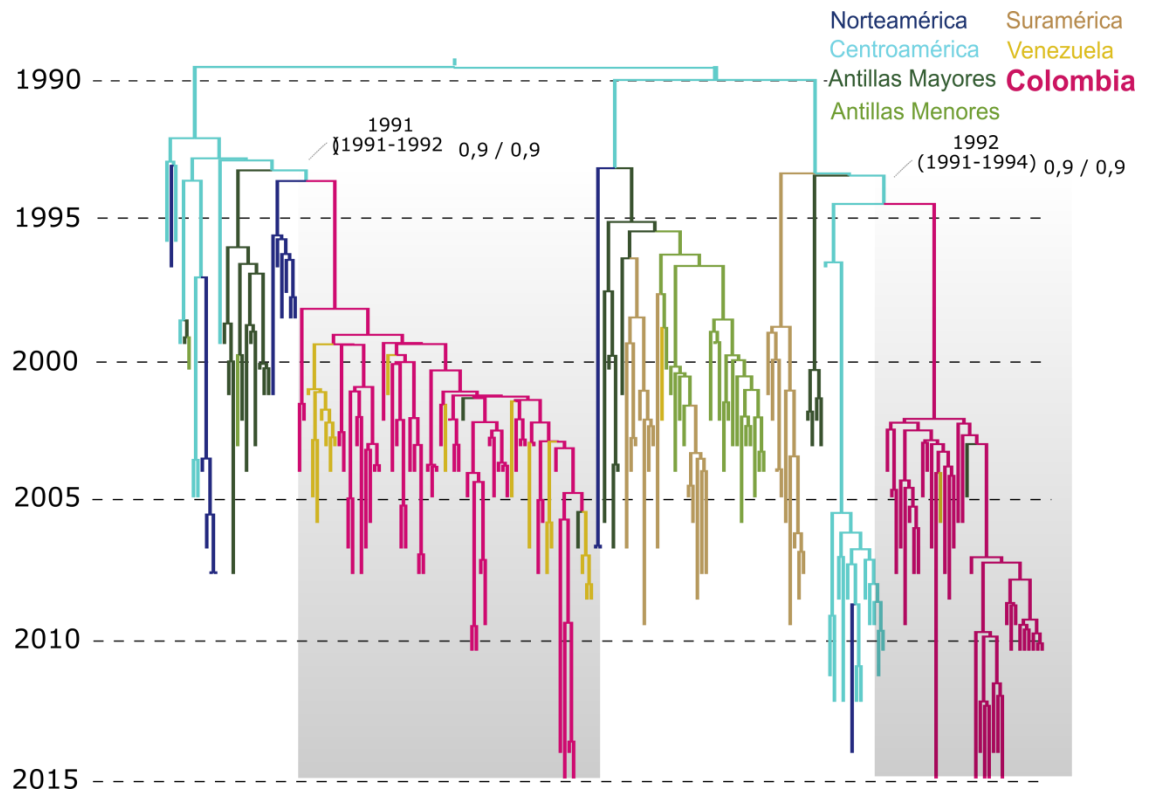
DENV-4 - Genotipo II : de la reconstrucción filogeográfica de la Figura 11 se infiere dos rutas hacia Colombia desde Venezuela con tres introducciones. i) En 1976 (95 % BCI: 1976 - 1980), cepa GU289913\_CO\_1982 y en 1980 (95 % BCI: 1980 - 1984), cepa KC963424\_CO\_1982. ii) En 1988 (95 % BCI: 1988 -1990), cepas FJ024476\_CO\_SAN\_1997, DQ341219\_CO\_1996, KC009639\_CO\_2006. iii) En 1989 (95 % BCI: 1989 - 1994), la cepas más recientes y una ruta reciente de Sur América . Se infiere flujo de virus de Colombia (Santander, Norte de Santander, Cesar y Valle del Cauca) con países de Sur América ( Brasil, Ecuador y Perú). Otras rutas hacia y dentro de Colombia no se pudieron inferir debido al limitado número de secuencias.



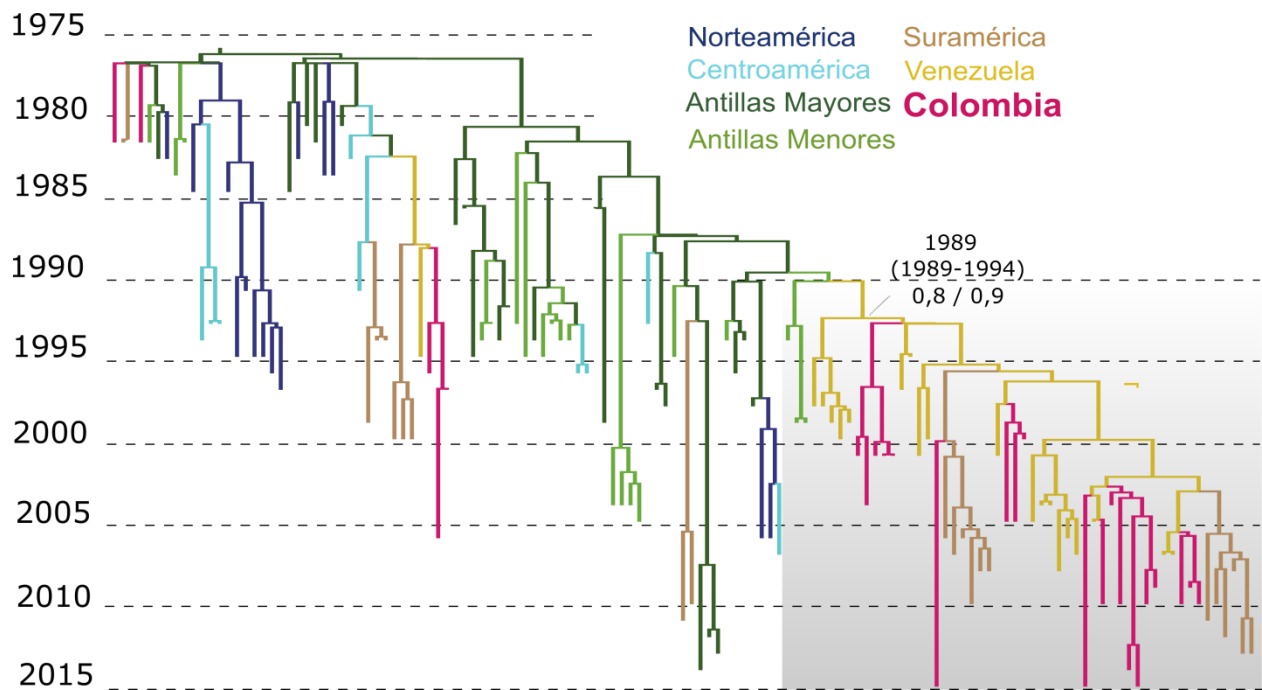
**Figura 8. Historia evolutiva y de dispersión del DENV-1 de Colombia.** Árbol de máxima credibilidad reconstruido usando el programa BEAST v 1.8. Las ramas se presentan coloreadas de acuerdo al origen geográfico y los números indican la probabilidad de la localidad / probabilidad posterior. Se indica el ancestro común más reciente (ACMR) con la media del año de origen y sus intervalos de credibilidad (95 % BCI). Se señala en un recuadro gris el linaje que estableció transmisión.



**Figura 9. Historia evolutiva y de dispersión del DENV-2 de Colombia.** Árbol de máxima credibilidad reconstruido usando el programa BEAST v 1.8. Las ramas se presentan coloreadas de acuerdo al origen geográfico y los números indican la probabilidad de la localidad / probabilidad posterior. Se indica el ancestro común más reciente (ACMR) con la media del año de origen y sus intervalos de credibilidad (95 % BCI). Se señala en un recuadro gris el linaje que estableció transmisión.



**Figura 10. Historia evolutiva y de dispersión del DENV-3 de Colombia.** Árbol de máxima credibilidad reconstruido usando el programa BEAST v 1.8. Las ramas se presentan coloreadas de acuerdo al origen geográfico y los números indican la probabilidad de la localidad / probabilidad posterior. Se indica el ancestro común más reciente (ACMR) con la media del año de origen y sus intervalos de credibilidad (95 % BCI). Se señala en un recuadro gris los linajes que establecieron transmisión.

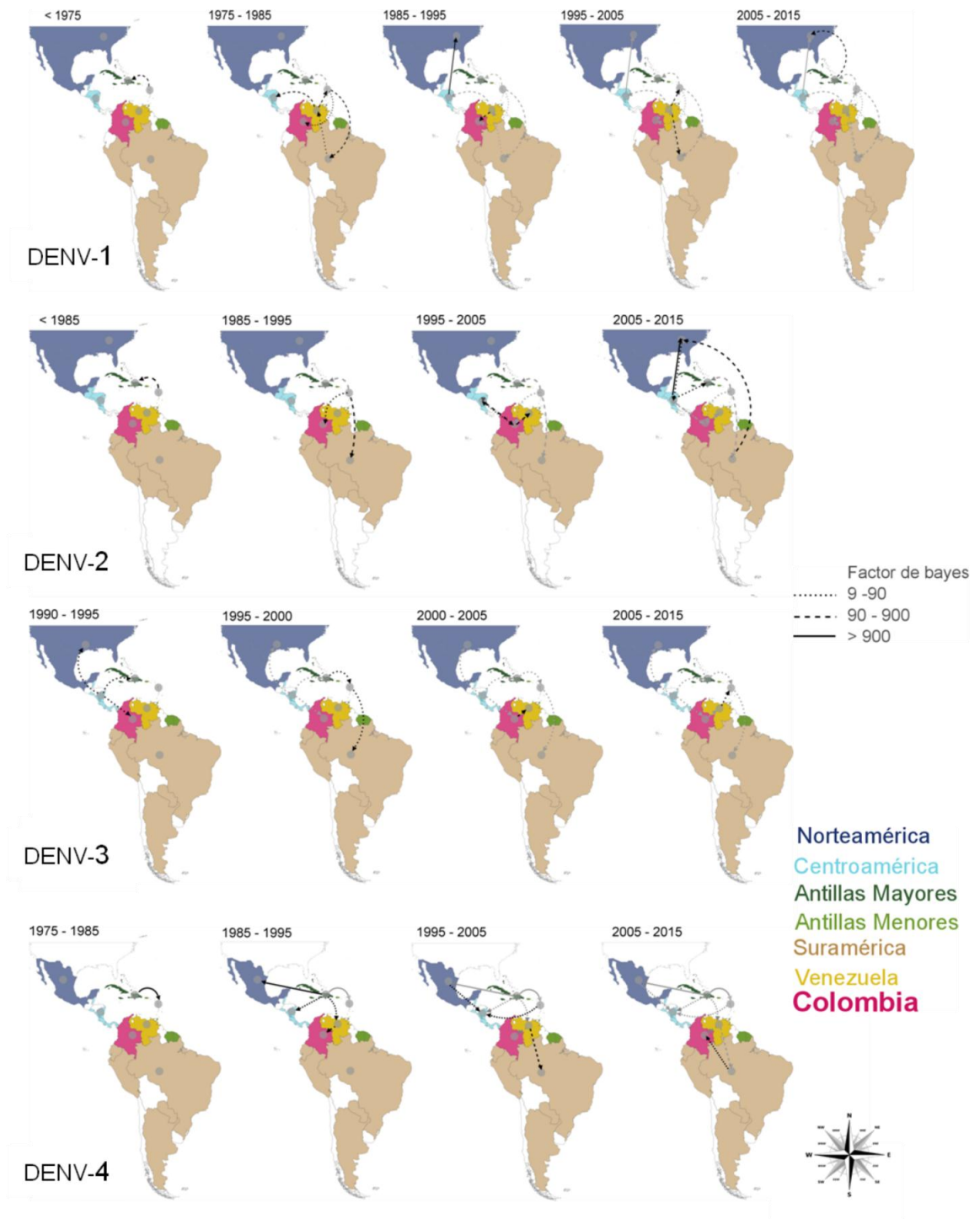


**Figura 11. Historia evolutiva y de dispersión del DENV-4 de Colombia.** Árbol de máxima credibilidad reconstruido usando el programa BEAST v 1.8. Las ramas se presentan coloreadas de acuerdo al origen geográfico y los números indican la probabilidad de la localidad / probabilidad posterior. Se indica el ancestro común más reciente (ACMR) con la media del año de origen y sus intervalos de credibilidad (95 % BCI). Se señala en un recuadro gris el linaje que estableció transmisión.

Rutas de intercambio de virus más significantes:

Venezuela – Colombia fue la ruta común para los cuatro serotipos (FB = 371.15, 532.5, 736.53

y 143.09 para DENV-1, -2, -3 y -4, respectivamente). Otras rutas probables fueron: Las Antillas menores – Colombia (BF: 9.82, 50.0 y 24.10 para DENV-1, -2, -3, respectivamente); Centroamérica (BF: 35.2 y 9.03 para DENV-2 y DENV-3); Sur América (BF: 13.99 para DENV-4)(Figura 12).



**Figura 12.** Probables rutas geográficas de intercambio de DENV con Colombia y países de América. Reconstrucciones obtenidas a partir de los árboles de máxima credibilidad para cada serotipo y las tasas de dispersión usando el programa Spread v1.0.6. (Factor de Bayes  $\geq 9$ ).

#### 4.4 Linajes de cada serotipo

Los análisis se hicieron adoptando el modelo Bayesiano Skygrid (Gill *et al.*, 2013) (Tabla 9) modelo de sustitución nucleotídica para cada base de datos, DENV-1: GTR + I + G, DENV-2: TN93 + I + G, DENV-3 Y DENV-4: GTR + G. La asignación de linaje y subgrupo se hizo cuando se evidenció uno o los dos siguientes criterios (Nunes *et al.*, 2014): i) monofilia: agrupación de al menos cuatro secuencias con origen común; y/ ò ii) sinapomorfía.

**Tabla 9.** Evaluación de modelos coalescentes usando estimación de los likelihood marginales (MLE).

Serotipo	modelo	PS	SS
DENV-1	Constant size	-8347	-8348,25
	Exponential growth	-8347,64	-8350,18
	<b>Skygrid</b>	<b>-8328,47</b>	<b>-8328,95</b>
	Skyride	-8352,09	-8354,7
DENV-2	Constant size	-9384,26	-9388
	Exponential growth	-9348	-9349,3
	<b>Skygrid</b>	<b>-9344,53</b>	<b>-9346,21</b>
	Skyride	-9363,59	-9366,83
DENV-3	Constant size	-8600,93	-8603,07
	Exponential growth	-8565,61	-8570,15
	<b>Skygrid</b>	<b>-8556,34</b>	<b>-8558,89</b>
	Skyride	-8576,3	-8579,6
DENV-4	Constant size	-7233,45	-7233,99
	Exponential growth	-7222,99	-7223,81
	<b>Skygrid</b>	<b>-7209,7</b>	<b>-7209,93</b>
	Skyride	-7175,99	-7105,21

PS = Selección de modelo por path sampling, SS = Selección de modelo por stepping-stone.

DENV-1: los resultados que se describen a continuación están referidos a la población viral de la introducción en 1986 (95 % BCI: 1986 -1988) que estableció transmisión. Los virus se agruparon en un único linaje con virus de El Caribe, Suramérica (Venezuela, Brasil, Paraguay, Argentina) y Norte América (U.S.A: Texas). Se recuperaron seis (A – F) subgrupos del linaje (Figura 13), cinco soportados por sinapormofias (sin sustitución de aminoácido y en codones no sometidos a presión de selección) y el otro por monofilia. Subgrupo A, Se encuentran estrechamente relacionadas cepas antiguas (1998 – 2002) de Santander y virus de Venezuela (1997- 2008), Brasil (2011), Argentina (2009 - 2010), Paraguay (2011), Puerto Rico (2006- 2013), República Dominicana (2007), Haití (2014) y USA (2013). Subgrupo B, tres cepas de Santander de 1998. Subgrupo C, cepas de Santander de 2008 y Norte de Santander de 2005-2006, Venezuela (2005, 2007) y Brasil (2009 – 2010). Subgrupo D, de Santander 1998, 2004 – 2010 y Norte de Santander 2006. Subgrupo E, otras de Santander 2007 – 2010 y Norte de Santander de 2006. Subgrupo F, otras cepas de Santander de 2008 – 2010 y las más recientes (2014 y 2015). Las relaciones filogenéticas del árbol sugieren flujo entre las cepas del subgrupo A con Venezuela, Brasil, Argentina Paraguay y a El Caribe (Puerto Rico, República Dominicana y Haití) / USA (NYS); las cepas del subgrupo C con Venezuela y Brasil, mientras que las de los otros subgrupos fueron exclusivas de Colombia.

DENV-2: los resultados que se describen a continuación están referidos a la población viral de la introducción en 1986 (95 % BCI: 1985-1988) que estableció transmisión. Los virus se agruparon en un único linaje con virus de El Caribe (Curazao), Centro América (Costa rica), Surinam y Venezuela. Se recuperaron tres (A – C) subgrupos del linaje (Figura 14). El linaje y los subgrupos se soportaron por sinapormofía y solo en el C (las cepas más recientes) se

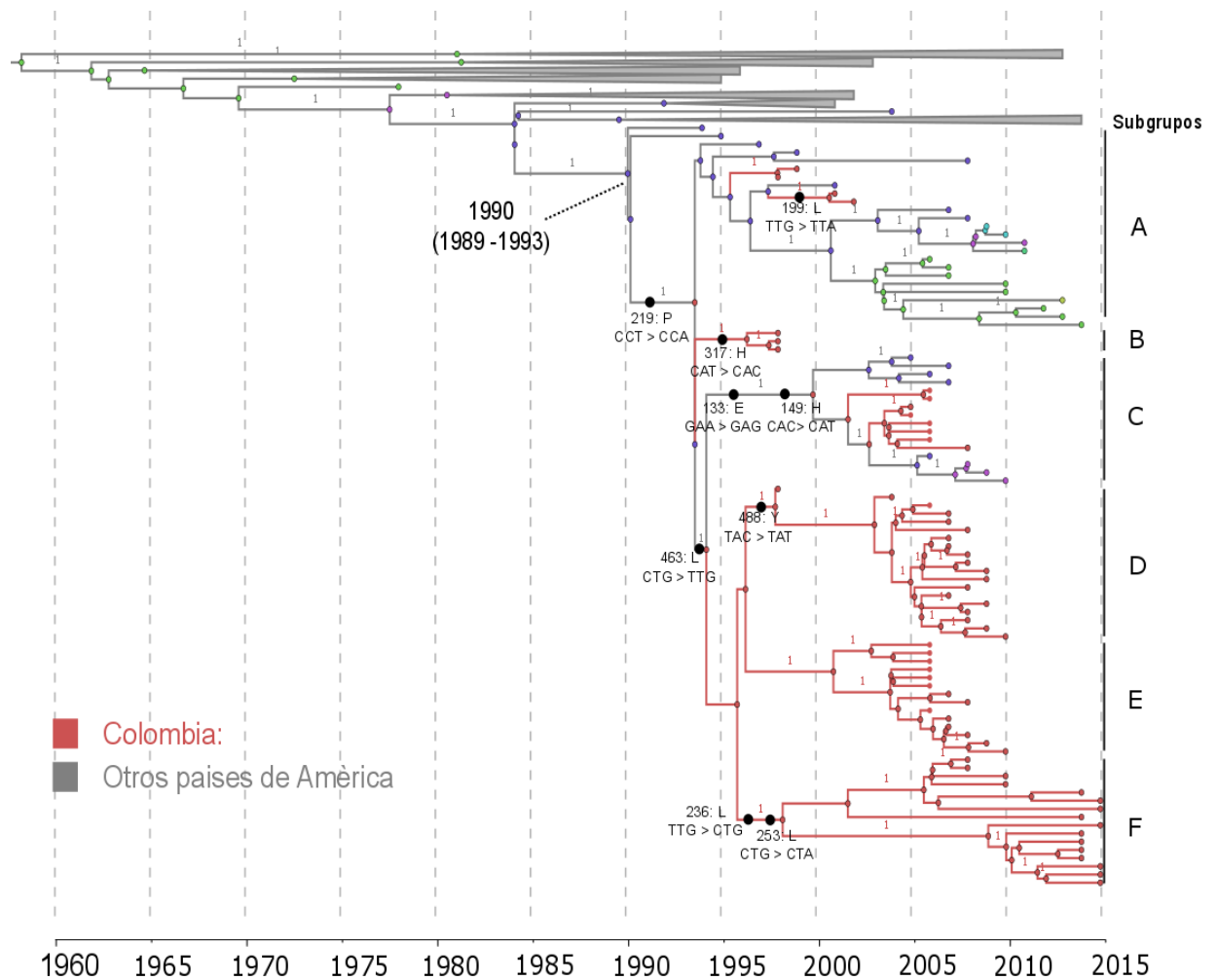
identificó sustitución de aminoácido (I – V, posición 462 del dominio III). Subgrupo A, contiene dos cepas de Santander de 1999 y de Venezuela (1991 - 2001). Subgrupo B, cepas de Santander de 2000 - 2004, 2014, 2015, las cepas de Antioquia – 2004 y del Valle del Cauca- 2015 y virus de Venezuela (1999 - 2001, 2004 - 2007). Subgrupo C, cepas de Santander 1998 – 2015, Norte de Santander 2005 – 2006 y Guaviare 2005, y virus de Curazao (1993), Surinam (1993), Costa Rica (2003) y Venezuela (2003 y 2005).

DENV-3: se recuperaron dos linajes en base a sinapomorfia (sin sustitución de aminoácido) que co-circularon desde 2002 (Figura 15). Linaje 1, conformado por cepas de la primera introducción en 1991 (95 % BCI: 1991-1992): de Santander (2001 – 2004, 2007 – 2010, 2014 – 2015), cinco de Norte de Santander (2005 – 2006), ocho de Antioquia (2002 – 2007), una del Valle del Cauca (2014), y virus de virus de Venezuela (2000, 2002 - 2007) y Puerto Rico (1998 – 2003 y 2007).

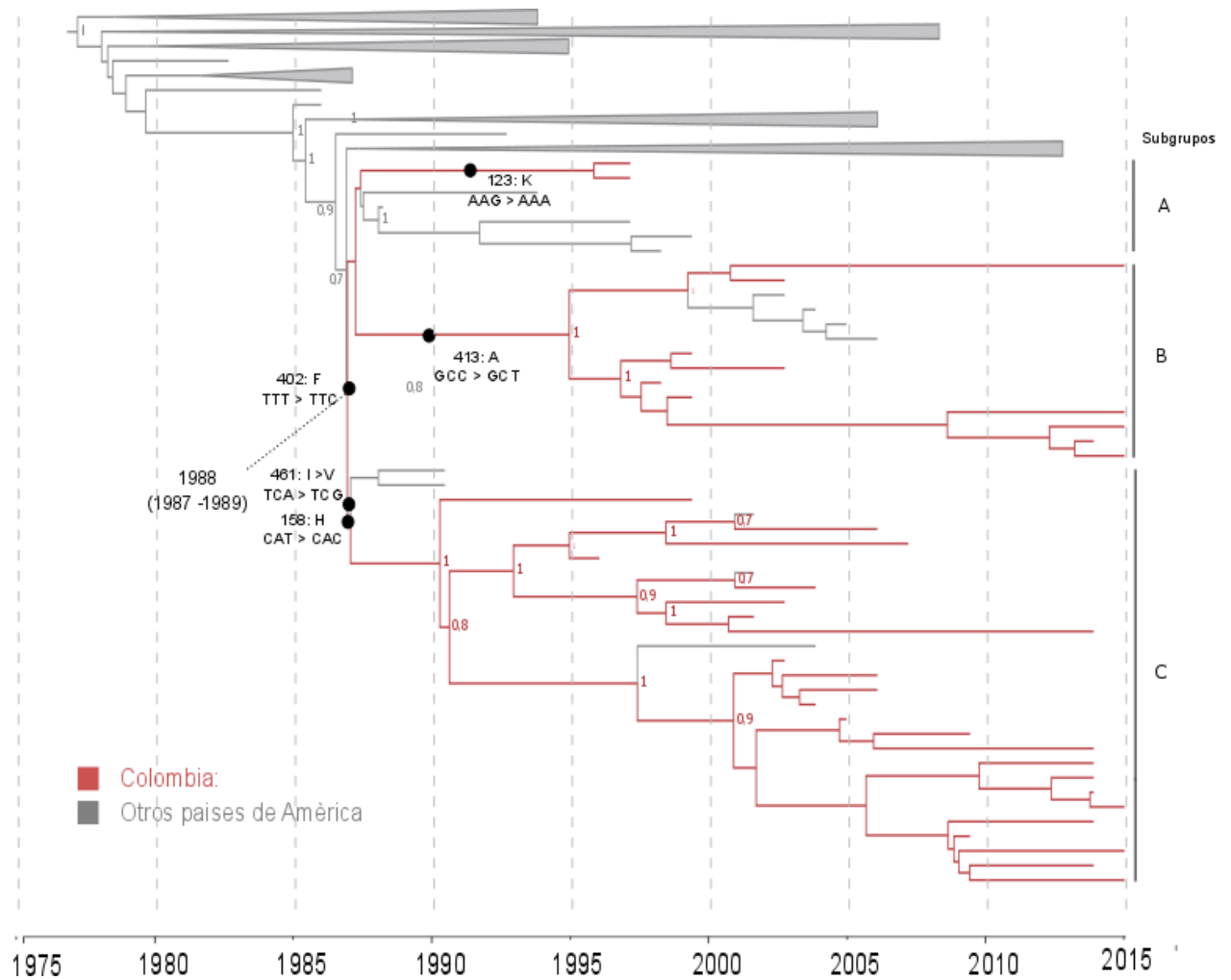
Linaje 2, conformado por cepas de la segunda introducción en 1992 (95 % BCI: 1991-1994): once de Antioquia (2003 – 2007 y 2009, tres del Valle del Cauca (2004, 2005 y 2015) y dos de Bolívar (2006 y 2015), y virus de Puerto rico (2004), Nicaragua (2008 - 2012), Salvador (2012) y Estados Unidos – Florida (2014). Se identificaron cuatro subgrupos (A - D) del linaje 2 y las cepas más recientes de Santander (2014 – 2015) quedaron en el D, el cual esta soportado por una sinapomorfia y los otros 3 (A-C) por el criterio de monofilia.

DENV-4: los resultados que se describen a continuación están referidos a la población viral de la introducción en 1989 (95 % BCI 1989-1994) que estableció transmisión. Los virus se agruparon un único linaje con virus de Venezuela, Brasil, Ecuador y Perú (Figura 16). Se

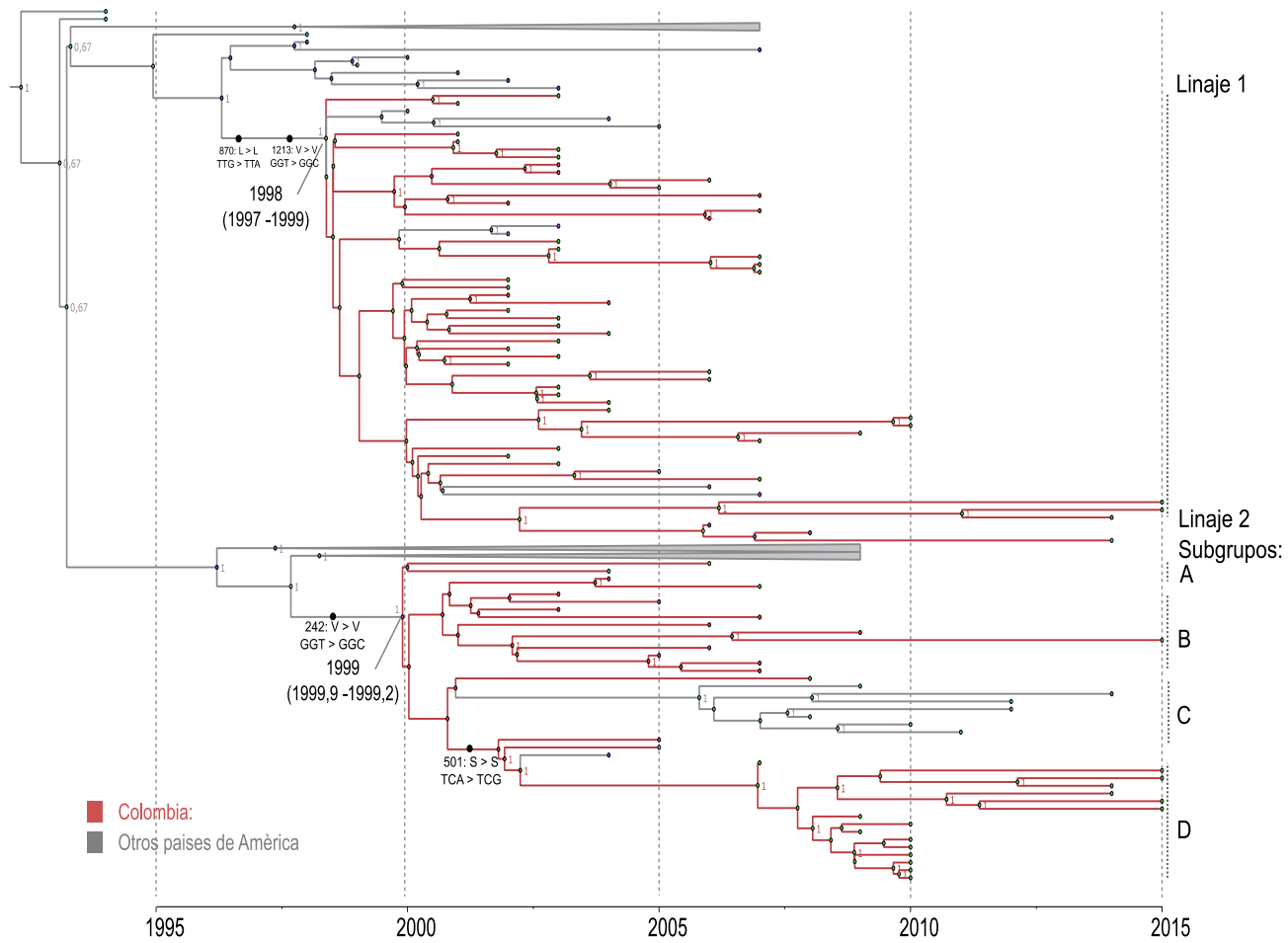
recuperaron tres subgrupos (A – C). El subgrupo A, contiene cuatro cepas de Santander de 2001 y 2004. El subgrupo B, tres cepas de Santander (2000 y 2004) y dos cepas de Norte de Santander (2005). El subgrupo C, contiene las cepas más recientes (2009, 2010, 2014 y 2015) y una antigua (2004) de Santander, una de Norte de Santander (2005), una del Cesar (2015), una del Valle del Cauca (2015), virus de Brasil (2008, 2010 y 2011), Ecuador (2006) y Perú (2007 y 2008). El linaje y los subgrupos se soportaron en sinapormofias, tres con sustitución de aminoácido: subgrupo A, de serina a una leucina en la posición 64 (dominio II); subgrupo C (cepas que circularon hasta el 2015), de alanina a treonina en la posición 222 (dominio II) y de serina a alanina en la posición 354 (dominio III).



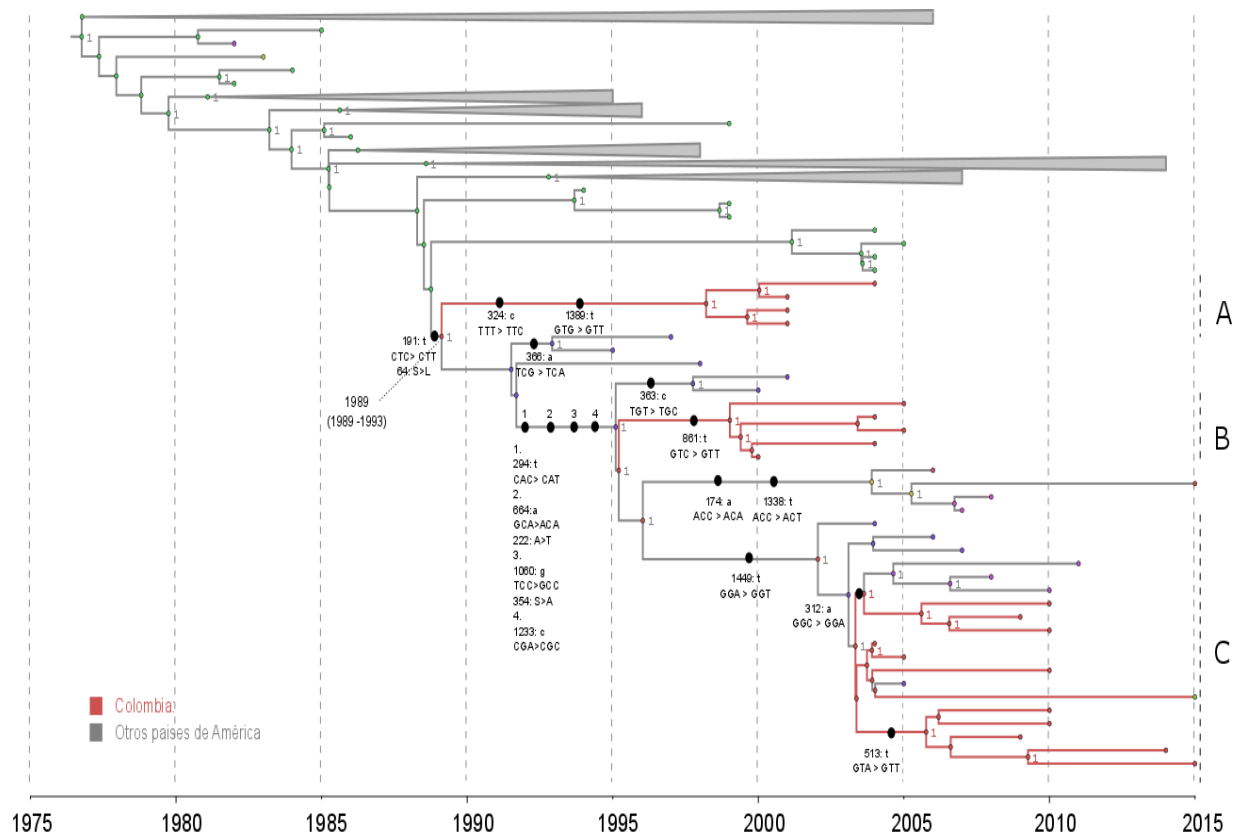
**Figura 13. Filogenia del DENV-1 de Colombia (1998 – 2015).** Árbol filogenético construido con el programa BEAST v 1.8. Se muestran los seis subgrupos (A – F) del linaje (ramas en rojo). Los datos en los nodos corresponden al valor PP y sinapomorfia (mapeado dentro del codón). Se muestra el ACMR: 1986 (95 % BCI: 1986 -1988). Las secuencias de otros países (gris) en diferentes clados se presentan colapsadas.



**Figura 14. Filogenia del DENV-2 de Colombia (1998 – 2015).** Árbol filogenético construido con el programa BEAST v 1.8. Se muestran los seis subgrupos (A – C) del linaje (ramas en rojo). Los datos en los nodos corresponden al valor PP y sinapomorfia (mapeado dentro del codón). Se muestra el ACMR: 1986 (95 % BCI: 1985-1988). Las secuencias de otros países (gris) se presentan colapsadas.



**Figura 15. Filogenia del DENV-3 de Colombia (2001 – 2015).** Árbol filogenético construido usando el programa BEAST v 1.8. Se muestran los dos linajes establecidos (ramas en rojo). Los datos en los nodos corresponden al valor PP y sinapomorfia. Se muestra los ACMR; linaje 1: 1991 (95 % BCI: 1991-1992) y linaje 2: 1992 (95 % BCI: 1991-1994). Las secuencias de otros países (gris) se presentan colapsadas.



**Figura 16. Filogenia del DENV-4 de Colombia (2000 – 2015).** Árbol filogenético construido usando el programa BEAST v 1.8. Se muestran el linaje y los subgrupos (ramas en rojo). Los datos en los nodos corresponden al valor PP y sinapomorfia. Se muestra los ACMR; 1989 (95 % BCI: 1989 - 1994). Las secuencias de otros países (gris) se presentan colapsadas.

#### 4.5 Diversidad genética del gen E

DENV-1:

Las estimaciones se hicieron respecto a la cepa (genotipo V) de América más antigua (GQ868601\_VG\_1985, Islas Vírgenes). La tasa de sustitución nucleotídica fue  $9 \times 10^{-4}$  ( $2 \times 10^{-3}$  -  $1 \times 10^{-3}$ ). Se identificaron 121 sustituciones, la mayoría en posiciones de la primera región de los dominios I y II de la proteína, de las cuales 22 fueron no sinónimas (Figura 17). Los valores de los otros parámetros de diversidad fueron:  $\pi = 0.009 \pm 0.01$ ;  $\theta = 0.017$ ,  $dN/dS = -0.078$  (IC 95%: 0.053 – 0.110); Tajima = -1.51 ( $P > 0.10$ ), indicando selección de presión purificadora y en concordancia exceso de. La falta de significancia del test de Tajima puede deberse al número de secuencias. Para evaluar si codones fueron sometidos a selección, se estimaron valores  $dN/dS$  por tres métodos (Tabla 10). Se identificaron 27 codones sometidos a selección negativa ( $dN/dS < 1.0$ ), de los cuales ocho (posiciones consenso: 3, 37, 117, 181, 250, 279, 365 y 429) por dos de los tres métodos y los restantes 19 por al menos uno. Las ocho posiciones consenso se distribuyen en los tres dominios de la proteína. No se identificó codón sometido a selección positiva.

**Tabla 10.** Codones E sometidos a presión de selección negativa en virus DENV-1 del AMB-Santander.

Posición	SLAC		FEL		REL	
	dN/dS	P	dN/dS	P	dN/dS	FB
3	-24.947	0.031	-69.513	0.011	-3.162	0.000
37	-33.263	0.009	-58.548	0.031	-3.378	0.000
47	-18.094	0.086	-77.085	0.037	-2.653	0.000
54	-15.486	0.111	-34.419	0.029	-2.130	0.000
63	-15.486	0.111	-25.290	0.046	-1.818	0.000
80	-15.486	0.111	-24.898	0.046	-1.820	0.000
84	-18.386	0.083	-104.21	0.026	-2.719	0.000
108	-16.632	0.096	-35.292	0.021	-2.184	0.000
117*	-23.229	0.037	-52.611	0.007	-3.103	0.000
119	-16.632	0.096	-40.635	0.018	-2.257	0.000
169	-15.486	0.111	-25.310	0.030	-1.822	0.000
181*	-30.972	0.012	-75.513	0.001	-3.408	0.000
183	-12.978	0.221	-39.360	0.027	-2.926	0.000
189	-7.743	0.333	-49.706	0.042	-1.566	0.000
219	-7.743	0.333	-49.708	0.032	-1.570	0.000
250*	-23.229	0.037	-164.01	0.001	-3.315	0.000
268	-7.743	0.333	-42.536	0.050	-1.508	0.000
279*	-33.263	0.009	-77.323	0.001	-3.415	0.000
280	-15.486	0.111	-84.831	0.006	-2.690	0.000
292	-12.108	0.262	-34.120	0.036	-2.808	0.000
337	-16.632	0.096	-34.625	0.022	-2.166	0.000
365*	-23.229	0.037	-57.362	0.009	-3.109	0.000
404	-7.743	0.333	-42.922	0.050	-1.511	0.000
406	-15.486	0.111	-34.928	0.029	-2.143	0.000
413	-15.486	0.111	-24.822	0.046	-1.816	0.000
429*	-33.263	0.009	-57.328	0.002	-3.386	0.000
437	-16.632	0.096	-37.597	0.045	-2.197	0.000

Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC), fixed-effects likelihood (FEL), Random-effects likelihood (REL). \*: Significancia con SLAC y FEL. FB: factor Bayes.

Con respecto al alineamiento de secuencias de de aminoácidos, se identificaron 22 sustituciones no-sinónimas de las cuales 10 se estos cambios fueron reportados previamente en la literatura con respecto a la localización y función de sitios de la proteína de la envoltura (Figura 18). Posición 96: F-L, en dos cepas de Norte de Santander del 2006 (JQ581607\_CO\_NSA\_2006 y JQ581610\_CO\_NSA\_2006), cambios en esta posición se han atribuido a cambios funcionales de la proteína (Depres *et al.*, 1993). En la región 298 – 403 (dominio de fusión) que contiene epitopes para anticuerpos neutralizantes (Mason *et al.*, 1989):

posición 364:P-S (JQ581618\_CO\_SAN\_2007), 380:V-L (P201080030\_CO\_SAN\_2015), 382:A-V (F14080018\_CO\_SAN\_2014), 383 G-S (LV\_121017\_CO\_SAN\_2009), 384: E-G (JQ581646\_CO\_NSA\_2006). En la región 411-425 que contiene epitopes para células T (Simmons *et al.*, 2005): posición 425 I-M (JQ581644\_CO\_NSA\_2006 y P201080030\_CO\_SAN\_2015).

#### DENV-2:

La comparación de secuencias se hizo respecto a la cepa (genotipo Asia /Americano) de América más antigua (AY484605\_JM\_1983, Jamaica). La tasa de sustitución nucleotídica fue de  $7 \times 10^{-4}$  ( $1 \times 10^{-4}$  -  $5 \times 10^{-3}$ ). Se identificaron 135 sitios polimórficos nucleotídicos distribuidas en la segunda región del dominio II y el extremo carboxilo (región de anclaje de la proteína E), de los cuales 32 fueron no sinónimas (Figura 17). Los valores de índices de diversidad fueron:  $\pi = 0.017 \pm 0.02$ ;  $\theta = 0.0227$ ,  $dN/dS = 0.078$  (IC 95%: 0.053 – 0.110); Tajima = -2,03 ( $P < 0.05$ ), indicando selección purificadora y en concordancia a un elevado número de sitios segregativos. Se identificaron 14 codones sometidos a selección negativa, de los cuales uno (posición consenso 431) por los tres métodos y los restantes 13 por al menos uno (Tabla 11). La posición consenso se ubica en la región de anclaje de la proteína (una de las más conservadas). No se identificó codón sometido a selección positiva.

Con respecto el alineamiento de secuencias de de aminoácidos, se identificaron 32 sustituciones no-sinónimas de las cuales 1 de estos cambios fueron reportados previamente en la literatura con respecto a la localización y función de sitios de la proteína de la envoltura

(Figura 18); En sitios con epitopes para célula T: (Simmons et al. 2005, Falconar 1999):

posición 424, S-A en la cepa LV-1111371\_CO\_SAN\_2010.

**Tabla 11.** Codones E sometidos a presión de selección negativa en virus DENV-2 del AMB-Santander.

Posición	SLAC		FEL		REL	
	dN/dS	<i>P</i>	dN/dS	<i>P</i>	dN/dS	<i>FB</i>
12	-30.329	0.111	-77.361	0.019	-1.158	188823
35	-30.329	0.111	-75.422	0.014	-1.161	905632
102	-30.329	0.116	-89.972	0.028	-1.153	823105
110	-36.286	0.082	-80.979	0.036	-1.153	525352
157	-37.294	0.079	-119.660	0.019	-1.153	208980
191	-30.329	0.111	-52.113	0.029	-1.160	970099
224	-30.329	0.111	-60.865	0.020	-1.161	177329
252	-30.329	0.111	-51.454	0.037	-1.158	810850
346	-35.013	0.083	-65.537	0.031	-1.156	304131
352	-32.197	0.099	-48.105	0.040	-1.158	844884
374	-30.329	0.117	-104.046	0.023	-1.153	138156
431*	-45.494	0.037	-70.565	0.006	-1.163	817585
454	-30.329	0.111	-39.301	0.041	-1.161	368828
478	-30.329	0.118	-67.410	0.014	-1.162	343680

\*: Significancia con los tres métodos. FB: factor Bayes.

### DENV-3:

La comparación de secuencias se hizo respecto a la cepa (genotipo III) de América más antigua (AY702033\_NI\_1994, Nicaragua 1994). La tasa de sustitución nucleotídica fue de  $1 \times 10^{-3}$  ( $3 \times 10^{-3}$  -  $2 \times 10^{-3}$ ). Se identificaron 243 sustituciones nucleotídicas, distribuidas en la región de anclaje, de las cuales 34 fueron no sinónimas (Figura 17). Los valores de los otros parámetros fueron:  $\pi = 0.014 \pm 0.02$ ;  $\theta = 0.033$ ,  $dN/dS = 0.082$  (IC 95%: 0.053 – 0.110); Tajima = -1.91 ( $P < 0.05$ ), indicando selección purificadora y en concordancia exceso de baja frecuencia de polimorfismos. Se identificaron 23 codones sometidos a selección negativa, de los cuales uno (posición consenso: 320) por los tres métodos y los restantes 22 por al menos

uno (Tabla 12). La posición consenso se ubica en el extremo carboxilo. No se identificó ningún codón sometido a selección positiva.

**Tabla 12.** Codones E sometidos a presión de selección negativa en virus DENV-3 del AMB-Santander.

Posición	SLAC		FEL		REL	
	dN/dS	P	dN/dS	P	dN/dS	FB
18	-9.220	0.111	-18.775	0.041	-1.237	19.116
21	-9.220	0.111	-19.050	0.049	-1.242	13.471
39	-9.220	0.111	-26.526	0.018	-1.392	33.776
42	-21.295	0.007	-49.343	0.009	-2.512	25.180
65	-14.742	0.031	-33.368	0.011	-1.929	25.442
139	-13.830	0.037	-32.944	0.012	-1.929	22.686
167	-9.220	0.120	-38.572	0.011	-1.535	28.212
181	-7.431	0.239	-24.898	0.036	-1.734	10.666
207	-10.648	0.083	-22.110	0.049	-1.305	10.221
237	-9.220	0.111	-41.175	0.011	-1.553	23.898
260	-9.220	0.111	-20.117	0.037	-1.269	19.817
265	-9.220	0.111	-20.160	0.037	-1.269	19.481
266	-9.220	0.111	-40.196	0.011	-1.546	23.766
308	-11.610	0.075	-51.650	0.022	-1.596	7.007
320*	-19.656	0.010	-49.319	0.003	-2.526	62.555
345	-10.648	0.083	-27.159	0.036	-1.397	10.838
365	-9.828	0.098	-20.780	0.040	-1.284	15.512
417	-9.220	0.111	-18.600	0.041	-1.234	19.078
435	-10.648	0.083	-24.117	0.044	-1.338	10.434
448	-9.220	0.118	-40.348	0.030	-1.532	7.083
449	-9.220	0.111	-20.037	0.046	-1.265	13.654
477	-15.971	0.026	-38.127	0.013	-1.997	17.482
483	-9.828	0.098	-22.904	0.035	-1.328	15.941

\*: Significancia con los tres métodos. FB: factor Bayes.

Con respecto al alineamiento de secuencias de aminoácidos, se identificaron 34 sustituciones no-sinónimas de las cuales 5 de estos cambios fueron reportados previamente en la literatura con respecto a la localización y función de sitios de la proteína de la envoltura (Figura 18): posición 155: T->M en cepas del 2002 y 2014 (02288\_CO\_SAN\_2002 y P202090044\_CO\_SAN\_2014); posición 172: I->T en una cepa del 2010 (LV\_132056\_CO\_SAN\_2010); posición 380: I->T en otras cepas del 2010 (LV\_111082\_CO\_SAN\_2010, LV\_121155\_CO\_SAN\_2010) y en cepas del 2003 (FJ189458\_CO\_SAN\_2003 y FJ898443\_CO\_SAN\_2003) (Howard, 2006).

#### DENV-4:

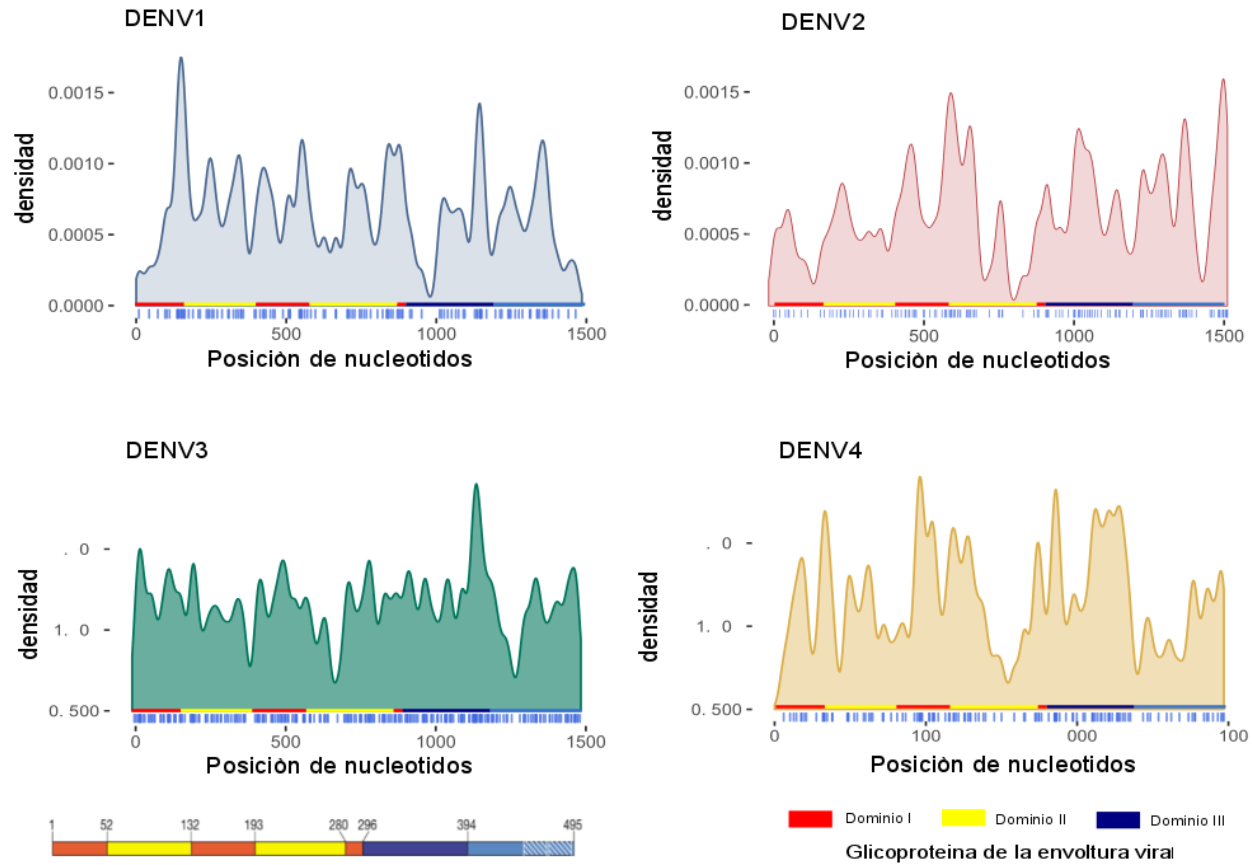
La comparación de secuencias se hizo respecto a la cepa (genotipo II) de América más antigua (GU28991\_CO\_1982, Colombia 1982). La tasa de sustitución nucleotídica fue de  $6 \times 10^{-3}$  ( $1 \times 10^{-4}$  -  $1 \times 10^{-3}$ ). Se identificaron 122 sitios polimórficos nucleotídicas, la mayoría en el dominio I, de las cuales 20 fueron no sinónimos (Figura 17). Los valores de los otros parámetros fueron:  $\pi = 0.098 \pm 0.1$ ;  $\theta = 0.033$ ,  $dN/dS = 0.090$  (IC 95%: 0.058 – 0.132); Tajima = -1.37 ( $P < 0.10$ ), indicando selección de presión negativa (purificadora). Se identificaron 2 codones sometidos a selección positiva (adaptativa) por los tres métodos y 11 codones a selección negativa por al menos uno (Tabla 13). Las 13 posiciones se distribuyeron en los tres dominios de la proteína.

**Tabla 13.** Codones E sometidos a presión de selección en virus DENV-4 del AMB-Santander.

Posición	SALC		FEL		REL	
	dN/dS	P	dN/dS	P	dN/dS	FB
21	-27.155	0.111	-73.286	0.042	-2.069	4
58	-27.155	0.111	-78.863	0.028	-2.119	5
64**	14.675	0.368	21.679	0.692	0.457	164
91	-28.126	0.104	-85.836	0.030	-2.221	4
141	-27.155	0.111	-180.639	0.008	-2.741	6
171	-27.155	0.111	-160.337	0.012	-2.626	5
309**	9.122	0.549	103.676	0.107	0.668	363
321*	-40.733	0.037	-241.775	0.002	-3.884	19
364	-27.155	0.111	-183.676	0.009	-2.684	5
369	-22.558	0.233	-102.818	0.028	-3.434	8
463	-27.155	0.111	-154.030	0.012	-2.654	5
464	-22.497	0.228	-91.467	0.033	-3.338	7
492	-27.155	0.111	-143.219	0.009	-2.598	6

\*\* : Presión de selección positiva, significancia con los tres métodos. \* : Presión de selección negativa, significancia con dos métodos. Sin asterisco: presión de selección negativa, significancia por un método. FB: Factor Bayes.

Con respecto al alineamiento de secuencias de aminoácidos, en donde se identificaron 20 sustituciones no-sinónimas de las cuales 2 de estos cambios fueron reportados previamente en la literatura con respecto a la localización y función de sitios de la proteína de la envoltura (Figura 17): posición 329, A-T, en una cepa de 2015 (P2020976\_CO\_SAN\_2015); posición 494: Q-R (KC009634\_CO\_SAN\_2001). La 329 hace parte de un epítipo específico del serotipo y la posición 494 está ubicada en la porción C-terminal de la proteína E la cual hace parte a los sitios de unión a prM, estabilizando la red E ± prM dentro de la partícula vírica (Wang *et al.*, 1999).

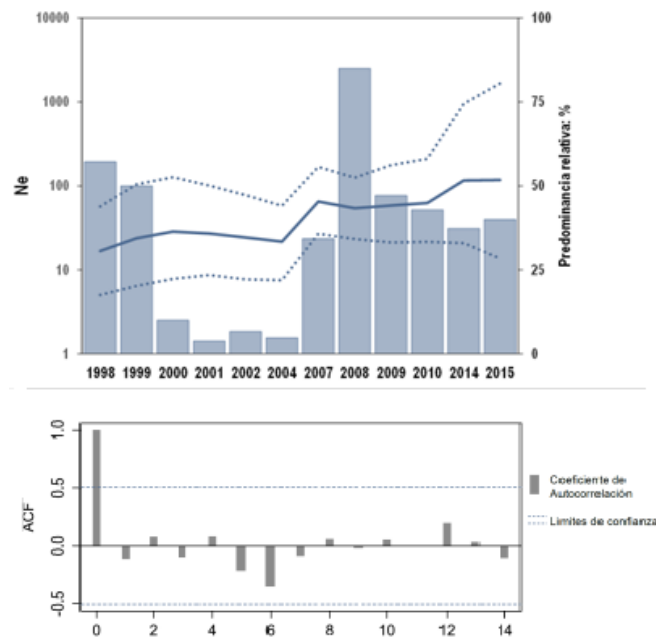


**Figura 17.** Frecuencia y distribución de los polimorfismos del gen E en poblaciones virales del AMB-Santander (1998 - 2015).



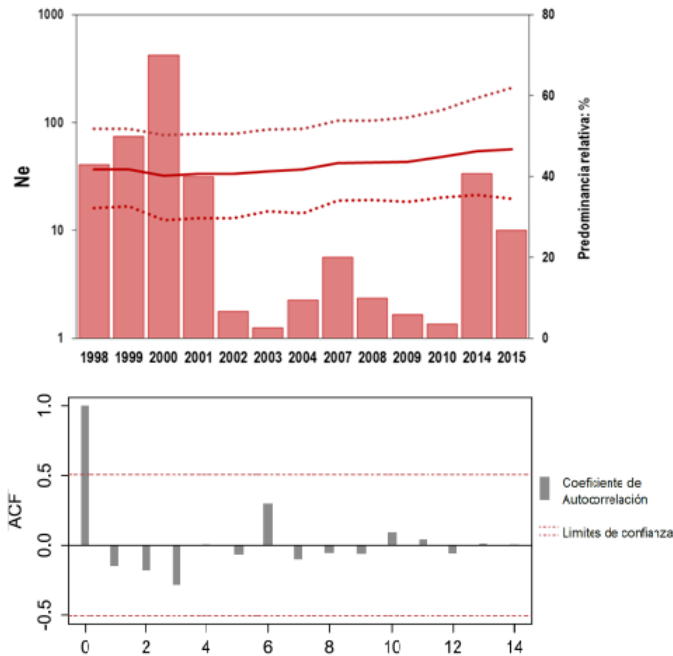
#### 4.6 Historia demográfica y prevalencia del serotipo

DENV-1 (Figura 19): el incremento de la prevalencia del serotipo (frecuencia de aislamientos) se correlacionó ( $r\text{-Sperman} = 0.73, p < 0.05; DW = 1.97, p > 0.05$ ) con incremento constante del tamaño de la población (parámetro  $N_e$ ). Incrementos de  $N_e$  antecedieron incrementos de prevalencia: mayor tamaño de la población entre 2007 - 2015 (prevalencia 43%: 91 aislados de 210) y menor en 2000 - 2004 (3.7%: 4 aislados de 109). En el segundo período de prevalencia (2008 - 2015) co-circularon tres subgrupos del linaje, mientras que en el de menor prevalencia uno (ver Figura 13) y los valores  $N_e$  se mantuvieron constantes.



**Figura 19. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-1 y tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) - AM- Santander.** En la parte inferior: representación gráfica del auto correlación.

DENV-2 (Figura 20): el incremento de la prevalencia del virus no se correlacionó (r-

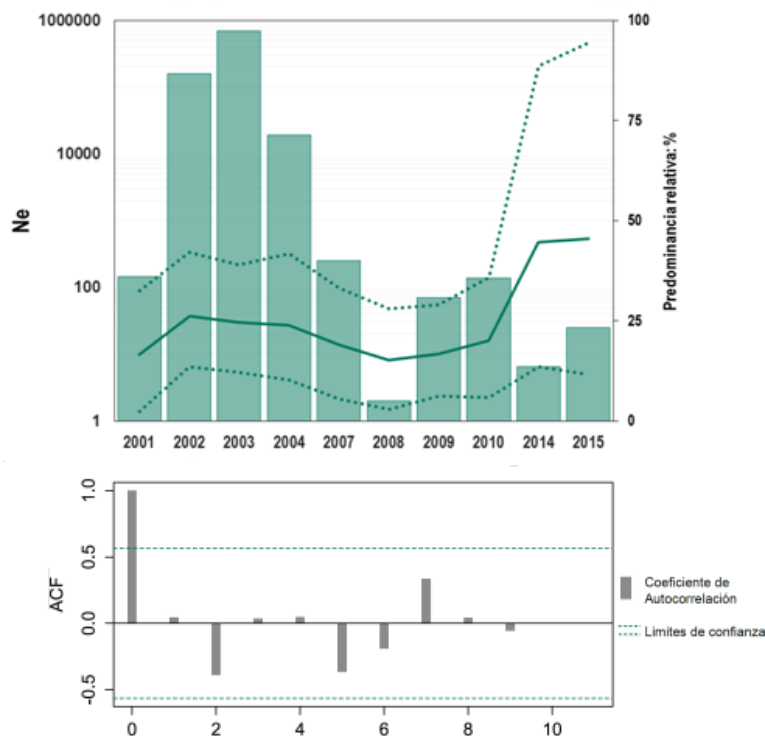


**Figura 20. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-2 y tamaño efectivo de la población**

( $N_e$ ) - AM- Santander. En la parte inferior: representación gráfica del auto correlación

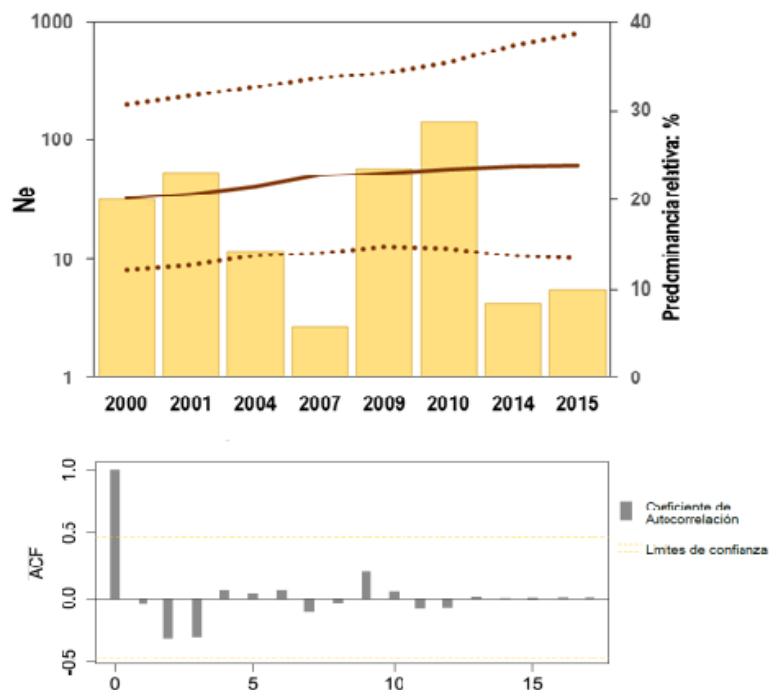
Sperman = 0,10,  $p > 0,05$ ; DW = 2.28,  $p > 0.05$ ) con el incremento de  $N_e$ , no se evidenció oscilación del parámetro, se notó poco incremento en el tiempo el cual fue constante. El incremento de  $N_e$  más evidente fue en el 2014, coincidiendo con incremento de la prevalencia: 37.2% (32 de 86) vs. 8% (16 de 198) entre 2002 – 2010. Dada los resultados, se evaluaron otros modelos demográficos que pudieran estar explicando mejor la dinámica de la población a diferencia de las oscilaciones en la diversidad genética relativa observada para DENV-1 y DENV-3; un modelo de crecimiento exponencial el modelo coalescente que mejor se ajusta al comportamiento de los datos (tabla 14). En el período de mayor prevalencia (1998 – 2001) circularon los tres subgrupos, en el segundo y en el de menos prevalencia circularon dos (ver Figura 14).

DENV-3 (Figura 21): el incremento de la prevalencia no se correlacionó ( $r\text{-Sperman} = 0,035, p > 0,05; DW = 1.89, p > 0.05$ ) con incremento de  $N_e$ , aunque se observó oscilación del parámetro. Sin embargo, la disminución de prevalencia en 2004 – 2009 (38%: 34 de 89 vs. 76%: 59 de 78 entre 2001 – 2003) coincidió con disminución de  $N_e$ ; incremento nuevamente de prevalencia en 2009 – 2010 (44%; 30 de 69) con incremento de  $N_e$ . En el segundo periodo de prevalencia co-circularon los dos linajes, mientras en el primero uno (Figura 15).



**Figura 21. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-3 y tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) - AMB- Santander.** En la parte inferior: representación gráfica del auto correlación.

DENV-4 (Figura 22): cambios en la prevalencia del virus no se correlacionaron ( $r$ -Sperman = 0,21,  $p > 0,05$ ; DW = 2,08,  $p > 0.05$ ) con el incremento de Ne, no se evidenciaron oscilaciones del parámetro. Este resultado se debe a que un modelo demográfico de crecimiento exponencial explica mejor el comportamiento de cambios en la diversidad genética en el tiempo (Ne) como paso con DENV-2 a diferencia de DENV-1 ò DENV-3 que un modelo no paramétrico como skygrid es el que mejor se ajusta al comportamiento de los datos (Tabla 14). En periodos de prevalencia (2000 – 2001: 20% vs 0% en 98 -99) y 2009 – 2010 (28%; 25 de 90 vs. 9%; 8 de 89 en 2014 – 2015) co-circularon dos subgrupos del linaje (ver Figura 15).



**Figura 22. Relación entre patrón de prevalencia del DENV-4 y tamaño efectivo de la población (Ne) AMB- Santander.** En la parte inferior: representación gráfica de la autocorrelación.

**Tabla 14.** Evaluación de modelos coalescentes para la población de AMB-Santander usando estimación de los likelihood marginales (MLE).

<b>Serotipo</b>	<b>modelo</b>	<b>PS</b>	<b>SS</b>
<b>DENV-1</b>	Constant size	-3633,38	-3633,45
	Exponential growth	-3627,41	-3627,35
	<b>Skygrid</b>	<b>-3624,16</b>	<b>-3624,51</b>
	Skyride	-3632,07	-3632,49
<b>DENV-2</b>	Constant size	-3719,14	-3719,25
	Exponential growth	<b>-3714,21</b>	<b>-3714,45</b>
	<b>Skygrid</b>	-3716,73	-3716,96
	Skyride	-3716,07	-3716,08
<b>DENV-3</b>	Constant size	-4785,08	-4785,05
	Exponential growth	-4783,05	-4783,68
	<b>Skygrid</b>	<b>-4766,52</b>	<b>-4767,41</b>
	Skyride	-4776,1	-4776,45
<b>DENV-4</b>	Constant size	-3271,11	-3271,24
	Exponential growth	<b>-3268,18</b>	<b>-3268,23</b>
	<b>Skygrid</b>	-3269,76	-3269,91
	Skyride	-3269,27	-3269,42

PS = Selección de modelo por path sampling, SS = Selección de modelo por stepping-stone.

## 5. Discusión

La dinámica espacio - temporal de cada serotipo del DENV es un componente del enfoque filodinámico para integrar a la epidemiología convencional y a la complejidad del patrón endemo-epidémico del dengue (Gill *et al.*, 2016; Rasmussen *et al.*, 2014). Con este estudio se pretendió aportar nuevo conocimiento sobre la historia evolutiva, de dispersión y la base genética del mantenimiento de cada serotipo del DENV en el AMB-Santander. El AMB es una de las más indicadas para un estudio retrospectivo debido a que: por años ha ocupado primeros lugares en incidencia de casos (Villar *et al.* 2015); se conoce la distribución temporal de serotipos en 13 años (Gómez *et al.*, 2008; Ocazonez *et al.*, 2013; Ocazonez *et al.*, 2007; Ocazonez *et al.*, 2006; Villabona *et al.*, 2016) y se contó con secuencias del gen E año a año de cada serotipo que circulo . Por estas características del AMB-Santander, los hallazgos de este estudio sirven para describir la dinámica espacio – temporal del DENV en Colombia.

El tamaño de muestra determina el poder que se le asigna para derivar las inferencias del estudio. No hay aún acuerdo sobre los criterios para inclusión de secuencias en estudios filogenéticos y filogeográficos. Recientemente, expertos han sugerido que se tenga en cuenta la frecuencia de infecciones por el serotipo e incluir mínimo dos y máximo 21 secuencias por año; y que la selección se realice de manera uniforme, es decir, sin más secuencias de años recientes que antiguos o más de una localidad que otras (Afreen *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2016). Para este estudio se incluyeron secuencias de cada serotipo del AMB-Santander en base a la frecuencia anual de aislamientos del serotipo y maximo cuatro cepas por semestre. Dado que no se incluyeron suficientes secuencias de otros departamentos, el analisis filogeográfico es limitado

para inferir el total las rutas de dispersion de cada serotipo hacia y dentro de Colombia. Para estos analisis se hicieron exploraciones de unidades geograficas teniendo como criterio mantener la mayor uniformidad en numero de secuencias por ruidad y representatividad por año. Aun con esta limitación, se evidenciò el origen de la poblacion viral objeto de estudio y flujo de virus con otros paises de Amèrica.

Las inferencias de las topologías de los árboles filogenéticos se pueden considerar confiables en consideración a: el periodo de estudio es de 13 años que permite detectar cambios genéticos dependientes de tiempo; se adoptaron modelos y parámetros dada previas exploraciones, teniendo en cuenta criterios de seleccion de modelos, dado el comportamiento de los datos y estudios previos (Allicock *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2014; Villabona *et al.*, 2016) y se usó la secuencia completa del gen E (1485 nts) de cepas virales colectadas en períodos de menor y mayor abundancia del serotipo. Así, el conjunto de secuencias de cada serotipo es más robusto que los usados en otros estudios previos de DENV de Colombia (Mendez *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2012; Méndez & Calvache, 2003; Ocazonez *et al.*, 2013; Ospina *et al.*, 2010; Usme *et al.*, 2008; Villabona *et al.*, 2009b). No obstante, el análisis evolutivo y de diversidad puede ser incompleto dado que secuencias de otros genes no se analizaron. Para un análisis robusto se recomienda la secuencia completa del genoma, no se contaba con recursos para obtenerlas en este estudio.

Venezuela y países de El Caribe se han propuesto como centros de difusión de DENV de donde se dispersan a otros países de las Américas (Carrington *et al.*, 2005; Villabona & Zanotto, 2011; Allicock *et al.*, 2012; Villabona & Zanotto, 2013). El análisis filogeográfico

evidenció intercambio de cepas de los cuatro serotipos en la frontera con Venezuela ( $FB < 9$ ) y esto se espera considerando la alta y permanente movilidad de pobladores de los dos países en esa área. Las epidemias en los años 70 y primer reporte de la presencia del DENV-1 coincidieron con el periodo de mayor migración de Colombianos al país vecino (Padilla *et al.*, 2012). Este flujo viral sugiere a ciudades fronterizas como Cúcuta como un punto de control importante de circulación de virus de donde se dispersan hacia los municipios del norte, centro y oriente del país. Aunque no se incluyeron secuencias de cepas que circularon en Cúcuta, se evidenció flujo viral entre Ocaña y el AMB-Santander y solo 198 kilómetros separan Cúcuta de Ocaña. El análisis filogeográfico también evidenció flujo viral entre El Caribe y Colombia (AMB-Santander y Antioquia) y esto es esperado por el turismo y comercio entre los países.

Las fronteras con Ecuador y Perú pueden ser puntos geográficos de flujo viral con Colombia, en localidades de estas áreas el dengue es endémico (Ramos *et al.*, 2017). No se incluyeron secuencias de virus de parte de Colombia, las más cercas son del Valle del Cauca (6 cepas) y Guaviare (1 cepa). No obstante, el análisis no sugiere flujo de DENV-3 en la frontera Ecuador - Putumayo y dispersión a Antioquia, como lo sugiere el estudio de Ospina y colaboradores (2010). Las relaciones filogenéticas evidenció que cepas del linaje 2 (llamado ecuatoriano en ese estudio) probablemente se introdujeron directamente a Antioquia desde El Caribe (PL: 0,6).

La frontera con Brasil puede ser otro punto geográfico de flujo de virus, principalmente en Leticia, Amazonas, donde el dengue es endémico. Secuencias de esta región del país no se incluyeron en el estudio. Las relaciones filogenéticas evidenció flujo de virus entre Colombia

y Brasil solo con DENV-4 (PL: 0,7). El hallazgo pudo deberse a que este serotipo fue el prevalente en la epidemia de 2010 en el norte de Brasil (Villabona & Zanotto, 2011) y las secuencias incluidas en el análisis son de cepas de la Amazonía brasilera.

Los análisis filogeográficos indican que la población viral de DENV-1, -2 y -4 se originó de más de una introducción pero solo una logró establecer transmisión continua. La población de DENV-3 es la más reciente (15 años de permanencia *versus* 35 – 40 de los otros serotipos) y esto podría explicar que las dos introducciones se establecieron porque la carga inmune de la población era baja. Las cepas más antiguas de cada serotipo se relacionaron más estrechamente con cepas de otros países de América datadas 2 – 6 años antes del aislamiento en el AMB-Santander. Esta relación filogenética sugiere que los virus en el AMB circularon años antes de ser aislados por primera vez. Esto es de esperarse considerando que en Colombia la vigilancia del virus es pasiva, esto es, se procesa 10% de muestras de casos atendidos en las instituciones de salud y no se hace de casos asintomáticos ni mosquitos. Así, el virus circula sin ser detectado hasta que el número de infecciones alcanza un umbral alto. De otra parte, existe la posibilidad que el virus se haya trasladado a otra localidad y no se detecte, dado el tiempo desde la picadura del infectado y la colecta del suero.

La co-circulación de genotipos de cada serotipo proporciona mayor diversidad genética en la población viral; en consecuencia, favorece el mantenimiento de la endemia y ocurrencia de epidemias de dengue (Dash *et al.*, 2006; E. Holmes & Twiddy, 2003). Este estudio confirma la presencia en el AMB-Santander de solo un genotipo de DENV-1, -2, -3 y -4 como lo reportaron otros (Mendez *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2012; Méndez & Calvache, 2003; Ocazonez *et al.*, 2013; Ospina *et al.*, 2010; Usme *et al.*, 2008; Villabona *et al.*, 2009b). Con

respecto a DENV-4, también se identificó un solo genotipo (II) y hasta la fecha no se han publicado otros estudios. Los resultados fueron esperados ya que los genotipos detectados son los que han circulado en las Américas en los años recientes (Ramos *et al.*, 2017). En el 2013 se detectó presencia del genotipo I del DENV-4 en Brasil (Campos *et al.*, 2013) pero aún no ha sido reportada en otros países. La introducción a Colombia de otros genotipos del serotipo es probable en el futuro inmediato. Ha incrementado del turismo, comercio y relaciones académico –culturales entre países vecinos y con países del continente asiático.

Los análisis de diversidad genética indican que las poblaciones virales del AMB-Santander han sido sometidas a selección negativa o purificadora (Tajima entre -1.3 y -2.0). Esto indica que solo persisten viriones con ciertas características en tremimos de la proteína de la envoltura, es decir aquellos estructural y biológicamente capaces de transmitirse. La selección purificadora en DENV ha sido identificada en otros estudios (Twiddy *et al.*, 2002; Weaver & Vasilakis, 2009b). Se atribuye a la complejidad del ciclo de transmisión del virus (huéspedes distintos) y cuello de botella que favorece la deriva genética con múltiples mutaciones que la mayoría son deletéreas. La proporción dN/dS es un indicador de la fuerza de la selección natural y valores  $> 1.0$  indican selección positiva o aminoácido que se fijó y que puede incrementar el *fitness* (Holmes, 2006). El análisis del gen E completo y por codón no evidenció selección positiva para ninguno de los serotipos (dN/dS:  $< 1.0$ ). Sin embargo, con DENV-4 se evidenció que los codones 64 (dN/ds [SLAC]: 14.6) y 309 (dN/dS [SLAC]: 9.1) fueron sometidos a selección positiva y la segunda fue un caracter propio de cepas recientes 2010-2015. Los codones están localizados en dominios II y III de la proteína y en el III se localizan sitios de interacción con receptores celulares (Twiddy *et al.*, 2002). Esta mutación

podría haber favorecido el incremento notorio de la prevalencia del serotipo en 2009 – 2010, sin embargo son necesarios estudios que evalúen capacidad replicativa dada esa mutación.

La proteína E es un blanco del sistema inmune por su localización sobre la superficie del virión y por eso es el componente más inmunogénico de la vacuna Dengvaxia (Guy *et al.*, 2015). En el AMB-Santander se realizaron los estudios clínicos de la vacuna y la aprobación para introducción está en proceso. Bajo esta circunstancia, el conocimiento de las mutaciones que llevan a sustitución de aminoácidos sirve para interpretar los resultados de eficacia. Para cada serotipo del AMB-Santander se identificaron sustituciones de aminoácidos en epitopes reconocidos por células B (anticuerpos neutralizantes) y células T (citotoxicidad mediada por TCD8) (Mason *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 2005; Twiddy *et al.*, 2002). No obstante, todos fueron al azar y no constituyeron una novedad evolutiva. Se podría especular que la mutación del gen E en poblaciones virales del AMB-Santander no jugaría papel preponderante en la eficacia de la vacuna.

El patrón temporal de prevalencia de los serotipos en áreas hiperendémicas se ha intentado explicar por la diversificación genética de las poblaciones virales en linajes y sub-linajes y la co-circulación y extinción de estas (Allicock *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2010; McElroy *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2005). A continuación se discuten los hallazgos más relevantes con cada serotipo.

DENV-1: se recuperó un único linaje que se estableció desde su introducción desde Venezuela entre 1986 – 1988. Méndez y Colb. (2010), comparando otra región del genoma, recuperaron dos linajes de una población de 1978 – 2005: uno de ellos contiene cepas antiguas

(años 70) y el otro más recientes (1996 – 2005). La circulación de otros linajes del serotipo podría estar ocurriendo. Recientemente, Passos-Cuñha y Colb. (2016), comparando el gen E completo, reportaron la presencia de dos linajes durante la epidemia del 2013 en Goias (Brasil). El incremento de la diversidad genética del serotipo del AMB-Santander coincidió con crecimiento de la población viral y esto se correlacionó ( $r$ -Sperman = 0.73,  $p < 0.05$ ) con mayor prevalencia del serotipo (Figura 17). En base a los resultados, se infiere que la diversidad genética, no introducciones de nuevas cepas, ha jugado papel para el patrón de prevalencia del serotipo.

DENV-2: se recuperó un único linaje originado entre 1987 - 1989 desde El Caribe. Méndez y Colb (2012), comparando otra región del genoma, recuperaron dos linajes, uno contiene cepas de los años 80 que no se aislaron en los años más recientes del estudio (2005 – 2010). La co-circulación de linajes en el país es probable y se requieren estudios con más secuencias para confirmarlo. Se evidencio que la población de AMB-Santander de 1998 fue producto de tres introducciones, estableciéndose solo una de ellas que diversificó en tres subgrupos. El análisis skygrid no evidenció correlación ( $r$ -Sperman = 0,10,  $p > 0,05$ ; DW = 2.28,  $p > 0.05$ ) de esta diversificación con el patrón de prevalencia del serotipo, a pesar con el skygrid se observó incremento gradual de la diversidad. Esto pudo deberse ya que esta población viral se ajusta más a un modelo de crecimiento exponencial a lo largo del tiempo más que oscilaciones de la diversidad genética en el tiempo.

DENV-3: se recuperaron dos linajes. Ospina y Colb. (2010), comparando la misma región del genoma de cepas de 2002 - 2009, recuperan los dos linajes Usme y colb. (2009),

comparando una secuencia menor de cepas del período 2002 y 2005 recuperaron un linaje. El serotipo estuvo ausente del país por al menos 23 años y su re-introducción se detectó por primera vez en AMB-Santander coincidiendo con la epidemia del 2001 (Villabona *et al.*, 2009). El análisis filogenético evidenció que esta población inicial conforma el linaje 1 y se introdujo desde Centro América entre 1991 y 1992. En 2010 se reportó una nueva epidemia en el AMB-Santander (Villabona *et al.*, 2016) que coincidió con introducción del linaje 2 al parecer procedente de Antioquia. Este incremento de la diversidad genética (co-circulación de linajes) coincidió con crecimiento de la población viral pero esto no se correlacionó ( $r$ -Sperman = 0,035,  $p > 0,05$ ; DW = 1.89,  $p > 0.05$ ). Con mayor prevalencia del serotipo (Figura 19). Este resultado puede deberse a que el serotipo ha sido predominante por varios, con incremento de la diversidad, pero sin un período prolongado de escasez. Lo mismo se ha sugerido con la población viral de Puerto Rico (Santiago *et al.*, 2012).

DENV-4: se recuperó un único linaje originado de una introducción entre 1989 - 1994 desde El Caribe. No se encontraron trabajos con otras poblaciones virales del país. El serotipo ha sido el menos aislado en el AMB-Santander y los dos períodos de mayor prevalencia coincidieron con las epidemias de 2001 y 2010 (Villabona *et al.*, 2016). El análisis filogenético evidenció tres subgrupos del linaje que correspondieron a los años epidémicos (A y C) y al año no-epidémico (B: 2002 – 2004). Los grupos fueron temporales, sugiriendo reemplazo de linaje como se ha visto en otros países de América (Bennett *et al.*, 2010; Villabona & Zanotto, 2011). El análisis skygrid mostró que este patrón de diversidad no correspondió con incremento notorio de la población viral ni se correlacionó ( $r$ -Sperman = 0,21,  $p > 0,05$ ; DW = 2,08,  $p > 0.05$ ) con cambios de prevalencia del serotipo (Figura 20). Esto podría deberse a la permanente

baja prevalencia sin un patrón marcado de oscilación. Dada exploraciones adicionales, un modelo de crecimiento exponencial se ajusta mejor a la población viral y muestra que pese a la baja prevalencia se da incremento en la diversidad genética.

## 6. Conclusiones

Cada una de las cuatro poblaciones virales (DENV-1, -2, -3 y -4) fue un linaje de un único genotipo.

Virus de cada serotipo se introdujeron en el AMB-Santander más de una vez pero solo una resultó en circulación estable. Se evidenció que la frontera Colombo – venezolana es un centro de difusión de virus y de permanente intercambio (flujo viral) para los cuatro serotipos.

Pese a la elevada frecuencia de polimorfismos en el gen E de las poblaciones DENV-1, -2, -3 ninguna se fijó para proporcionar una ventaja evolutiva.

En la población DENV-4 se identificaron dos sustituciones nucleotídicas que se fijaron y esto podría haber incrementado el *fitness* que resultó en el marcado incremento de la prevalencia en la epidemia del 2010. Se requieren estudios posteriores para determinar su asociación.

En el AMB-Santander, el incremento de la prevalencia del DENV-1 desde 2007 se relacionó con incremento de la diversidad genética.

### Referencias bibliográficas

- Allcock, 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>
- Baele, G., Lemey, P., Bedford, T., Rambaut, A., Suchard, M. A., Alekseyenko, A. V., ... Chen, M. H. (2013). Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Molecular Biology and Evolution*, 29(5), 1970–1979. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-8-114>
- 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>
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. a., & Lemey, P. (2011). SPREAD: Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, 27(20), 2910–2912. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr481>
- Boshell J Groot H, G. M. M. G. G. M. G. M. (1986). Dengue en Colombia. *Biomédica.*, 6, 101–102.
- Brower, A. V. Z., Biology, S., & Mar, N. (1999). Delimitation of Phylogenetic Species with DNA Sequences : A Critique of Davis and Nixon's Population Aggregation Analysis, 48(1), 199–213.
- Bruen, T. C., Philippe, H., & Bryant, D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting

the presence of recombination. *Genetics*, 172(4), 2665–2681.

<http://doi.org/10.1534/genetics.105.048975>

Campos, R. de M., Veiga, C. S. B., Meneses, M. D. F., de Souza, L. M., Fernandes, C. A. S., Malirat, V., ... Ferreira, D. F. (2013). Emergence of Dengue virus 4 genotypes II b and I in the city of Rio de Janeiro. *Journal of Clinical Virology*, 56(1), 86–88.  
<http://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.10.006>

Carrington, C., Foster, J., Pybus, O. G., Bennett, S. N., & Holmes, E. C. (2005). Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. *Journal of ...*, 79(23), 14680–14687. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14680>

Castrillón, J. C., Carlos, J., & Urcuqui, S. (2015). Dengue en Colombia, diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, 32(1).

Chen, R., & Vasilakis, N. (2011a). Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*, 3(9), 1562–1608.  
<http://doi.org/10.3390/v3091562>

Chen, R., & Vasilakis, N. (2011b). Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses*, 3(9), 1562–1608.  
<http://doi.org/10.3390/v3091562>

Dash, P. K., Parida, M. M., Saxena, P., Abhyankar, A., Singh, C. P., Tewari, K. N., ... Rao, P. V. L. (2006). Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology Journal*, 3, 55. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-3-55>

Delport, W., Poon, A. F. Y., Frost, S. D. W., & Kosakovsky Pond, S. L. (2010). Datamonkey 2010: A suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*, 26(19), 2455–2457. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq429>

DNASTAR. (2013). SeqMan NGen Benchmarking Data. Retrieved from

<http://www.dnastar.com/t-sub-nextgen-seqman-ngen-benchmarks.aspx>

- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4(5), 699–710. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
- 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. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 113. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Foster, J. E., Bennett, S. N., Vaughan, H., Vorndam, V., McMillan, W. O., & Carrington, C. V. F. (2003). Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the caribbean. *Virology*, 306(1), 126–134. [http://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00033-8](http://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00033-8)
- Gill, M. S., Lemey, P., Bennett, S. N., Biek, R., & Suchard, M. A. (2016). Understanding Past Population Dynamics: Bayesian Coalescent-Based Modeling with Covariates. *Systematic Biology*, 65(6), 1041–1056. <http://doi.org/10.1093/sysbio/syw050>
- Gill, M. S., Lemey, P., Faria, N. R., Rambaut, A., Shapiro, B., & Suchard, M. a. (2013). Improving bayesian population dynamics inference: A coalescent-based model for multiple loci. *Molecular Biology and Evolution*, 30(3), 713–724. <http://doi.org/10.1093/molbev/mss265>
- Gómez Sergio Yebraíl Rangel Arenas, C. J. V. P. F. A. T. E. D. R. M. J. R. E. O. (2008). Dengue virus serotype 3 (genotype III) from Colombia: A perspective of its pathogenic potential. *Dengue Bulletin*, 32, 126–137.

- Grenfell, B. T., Pybus, O. G., Gog, J. R., Wood, J. L. N., Daly, J. M., Mumford, J. a, & Holmes, E. C. (2004). Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* (New York, N.Y.), 303(5656), 327–332. <http://doi.org/10.1126/science.1090727>
- Griffiths, R. C., & Tavaré, S. (1994). Sampling theory for neutral alleles in a varying environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 344(1310), 403–10. <http://doi.org/10.1098/rstb.1994.0079>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., & Anisimova, M. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum- Likelihoods Phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321.
- Guy, B., Briand, O., Lang, J., Saville, M., & Jackson, N. (2015). Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. *Vaccine*. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.108>
- Hall, M. D., Woolhouse, M. E. J., & Rambaut, A. (2016). The effects of sampling strategy on the quality of reconstruction of viral population dynamics using Bayesian skyline family coalescent methods: A simulation study. *Virus Evolution*, 2(1), vew003. <http://doi.org/10.1093/ve/vew003>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. <http://doi.org/citeulike-article-id:691774>
- Holmes, E. C. (1998). Editorial: Molecular epidemiology of dengue virus – the time for big science. *Tropical Medicine & International Health*, 3(11), 855–856. <http://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00332.x>
- Holmes, E. C. (2006). The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Foundation Symposium*,

277, 177-187-192, 251–253.

Holmes, E. C., & Burch, S. S. (2000). The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends in Microbiology*, 8(2), 74–77.

Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(1), 19–28. [http://doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00004-2](http://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00004-2)

Holmes, E. C., Worobey, M., & Rambaut, a. (1999). Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Molecular Biology and Evolution*, 16(3), 405–409.

Holmes, E., & Twiddy, S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, 3(1), 19–28. [http://doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00004-2](http://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00004-2)

Howard, C. B. (2006). Identification of Epitopes on the Dengue Virus Type 4 Envelope Glycoprotein Involved in Neutralisation by Antibodies.

Johnson, A. J., Guirakhoo, F., & Roehrig, J. T. (1994). The Envelope Glycoproteins of Dengue 1 and Dengue 2 Viruses Grown in Mosquito Cells Differ in Their Utilization of Potential Glycosylation Sites. *Virology*, 203(2), 241–249. <http://doi.org/DOI:10.1006/viro.1994.1481>

King, C.-C., Chao, D.-Y., Chien, L.-J., Chang, G.-J. J., Lin, T.-H., Wu, Y.-C., & Huang, J.-H. (2008). Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *Virology Journal*, 5, 63. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-5-63>

Kingman, J. (1982). The coalescent. *Stoch. Proc. Appl.*, 13, 235–48.

Kosakovsky, S. L., & Frost, S. D. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1208–1222. <http://doi.org/10.1093/molbev/msi105>

- Lai, C., & Putnak, R. (2006). Dengue and the dengue viruses. *Perspectives in Medical Virology*, 7069(6), 269–298. [http://doi.org/10.1016/S0168-7069\(06\)16011-5](http://doi.org/10.1016/S0168-7069(06)16011-5)
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J., & Suchard, M. a. (2009). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, 5(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000520>
- Li, C., & Wu, and C. L. (1985). A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol*, 2(2), 150–174.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular Biology of Flavivirus. *Advances in Virus Research*, 59, 1317–1542. <http://doi.org/10.1152/physrev.00004.2012>
- Mason, P. W., Dalrymple, J. M., Gentry, M. K., McCown, J. M., Hoke, C. H., Burke, D. S., ... Mason, T. L. (1989). Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. *Journal of General Virology*, 70(8), 2037–2049.
- McElroy, K. L., Santiago, G. a., Lennon, N. J., Birren, B. W., Henn, M. R., & Muñoz-Jordán, J. L. (2011). Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 64–71. <http://doi.org/10.3201/eid1701.100961>
- Méndez, J. a, P, M., & Calvache, D. De. (2003). Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus Dengue Tipo 2. *Journal of General Virology*, 1(1), 37–43.
- Mendez, J. a, Usme-Ciro, J. a, Domingo, C., Rey, G. J., Sanchez, J. a, Tenorio, A., & Gallego-Gomez, J. C. (2010). Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue

- type 1 virus in Colombia. *Virology Journal*, 7, 226. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-7-226>
- Méndez, J. a, Usme-Ciro, J. a, Domingo, C., Rey, G. J., Sánchez, J. a, Tenorio, A., & Gallego-Gomez, J. C. (2012). Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virology Journal*, 9(1), 64. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-9-64>
- Messer, W. B., de Alwis, R., Yount, B. L., Royal, S. R., Huynh, J. P., Smith, S. A., ... Baric, R. S. (2014). Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(5), 1939–1944. <http://doi.org/10.1073/pnas.1317350111>
- Messer, W. B., Gubler, D. J., Harris, E., Sivananthan, K., & De Silva, A. M. (2003). Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 800–809. <http://doi.org/10.3201/eid0907.030038>
- Minin, V. N., Bloomquist, E. W., & Suchard, M. A. (2008). Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1459–1471. <http://doi.org/10.1093/molbev/msn090>
- Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, & SIGIVILA. (2010). Protocolo para la Vigilancia en Salud Pública del Dengue. Plan Nacional de Salud Pública.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), 313–319. <http://doi.org/10.1038/nature02165>
- Nixon, K. C. (2002). WinClada ver. 1.00.08. Published by the Author, Ithaca, NY, 8(i), Published by the author, Ithaca, NY.
- Nunes, M. R. T., Palacios, G., Faria, N. R., Sousa, E. C., Pantoja, J. A., Rodrigues, S. G., ... Lipkin, W. I. (2014). Air Travel Is Associated with Intracontinental Spread of Dengue Virus

Serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4).

<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002769>

Ocazonez-jiménez, R. E., Ortiz-báez, A. S., Gómez-rangel, S. Y., & Miranda-esquivel, D. R. (2013). Virus del dengue de serotipo 1 ( DENV-1 ) de Colombia : su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander. *Biomédica*, 33(1), 22–30.

Ocazonez, R. E. (2007). Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Rev Salud Pública*, 9(2), 262–274.

Ocazonez, R. E., Cortes, F. M., Villar, L. A., & Gómez, S. Y. (2006). Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence: re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 725–731. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762006000700004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762006000700004&nrm=iso)

Ocazonez, 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, R. E., Gómez, S. Y., & Cortés, F. M. (2007). Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Revista de Salud Pública*. <http://doi.org/10.1590/S0124-00642007000200010>

Ocazonez, R. E., Ph, D., Cortés, F., Villar, L. A., & Sc, M. (2005). Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. *Colombia Medica*, 36, 65–72.

- Ospina, M. C., Diaz, F. J., & Osorio, J. E. (2010). Prolonged Co-circulation of Two Distinct Dengue Virus Type 3 Lineages in the Hyperendemic Area of Medellín , Colombia, 83(3), 672–678. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0766>
- Padilla, J., Rojas, D., & Saenz-Gomez, R. (2012). Dengue en Colombia: Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Padilla, J., Rojas, D., & Sáenz, R. (2012). Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. (Primera). Bogotá.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290.
- 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>
- R Core team. (2015). R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing , Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-Project.org/>. Retrieved from <http://www.mendeley.com/research/r-language-environment-statistical-computing-96/%5Cnpapers2://publication/uuid/A1207DAB-22D3-4A04-82FB-D4DD5AD57C28>
- Rambaut, A. (2007). Tracer v1.4. Available from <http://beastbioedacuk/Tracer> .
- Ramos-Castañeda, J., Barreto dos Santos, F., Martínez-Vega, R., Galvão de Araujo, J. M., Joint, G., & Sarti, E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(1), e0005224. <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>
- Rey, F. a, Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375(6529), 291–298. <http://doi.org/10.1038/375291a0>
- Rey Felix A. Heinz, F. M. C. K. C. H. S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2. *Nature*, 375, 291–298. <http://doi.org/10.1038/375291a0>
- Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Salas, R. a, Tovar, D., Nisalak, a, Ramos, C., ... da Rosa, a T. (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, 230(2), 244–251. <http://doi.org/10.1128/CVI.00363-08>
- 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>
- Rudnick, A. (1984). *Proceedings of the International Conference on dengue/DHF*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- 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. *Journal of Infectious Diseases*, 206(6), 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>
- Schmidt, H. A., Strimmer, K., & Vingron, M. (2002). TREE-PUZZLE : maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing, 18(3), 502–504.
- Secretaría de Salud de Santander, & Observatorio de Salud Pública de Santander. (2012). Diagnóstico de salud de Santander. Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander, 1, 128.
- Simmons, C. P., Dong, T., Chau, N. V., Thao, T., Dung, N. T., Hien, T. T., ... Thi, L. (2005). Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections. *Journal of Virology*, 79(9), 5665–5675. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5665>
- Trapletti, A., & Hornik, K. (2017). tseries: Time Series Analysis and Computational Finance. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=tseries>
- Twiddy, S. S., Woelk, C. H., & Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 7), 1679–1689.
- Usme-Ciro, J. a, Mendez, J. a, Tenorio, A., Rey, G. J., Domingo, C., & Gallego-Gomez, J. C. (2008). Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Virology Journal*, 5, 101. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-5-101>
- 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., & de Andrade Zanotto, P. M. (2011). Evolutionary history of Dengue

- virus type 4: Insights into genotype phylodynamics. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 878–885. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.007>
- Villabona-arenas, C. J., Elvira, R., Jimenez, O., & Silva, L. J. (2016). Dengue Vaccine : Considerations before Rollout in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004653>
- Villabona-Arenas, C. J., Miranda-Esquivel, D. R., & Jimenez, R. E. O. (2009a). Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Tropical Medicine & International Health*, 14(10), 1241–1250. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02339.x>
- Villabona-Arenas, C. J., Miranda-Esquivel, D. R., & Jimenez, R. E. O. (2009b). Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Tropical Medicine and International Health*, 14(10), 1241–1250. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02339.x>
- Villabona-Arenas, C. J., Oliveira, De, J. L., Sousa-capra, C. De, Balarini, K., Ricardo, C., ... Zanotto, D. A. (2016). Epidemiological dynamics of an urban, Brazil Dengue 4 outbreak in Sao Paulo. *PerrJ*, 1–17. <http://doi.org/10.7717/peerj.1892>
- Villabona-Arenas, C. J., & Zanotto, P. M. D. a. (2011). Evolutionary history of Dengue virus type 4: Insights into genotype phylodynamics. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 878–885. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.007>
- Villabona-Arenas, C. J., & Zanotto, P. M. D. A. (2013). Worldwide spread of Dengue virus type 1. *PloS One*, 8(5), e62649. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062649>
- Wang, S., He, R., & Anderson, R. (1999). PrM and Cell Binding Domains of the Dengue Virus E Protein. *Journal of Virology*, 73(3), 2547–2551.
- Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009a). 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. (2009b). 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>

Zhang, C., Jr, M. P. M., Klungthong, C., Monkongdee, P., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S., ...

Rodpradit, P. (2005). Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence †. *Journal of Virology*, 79(24), 15123–15130. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15123>