

*Instituto de Medicina Tropical*

*“Pedro Kourí”*

Departamento de Virología

Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio de las  
Enfermedades Víricas

*“Caracterización Molecular de cepas de Dengue  
aisladas en epidemias cubanas”*

Tesis en opción del grado de Doctor en Ciencias de la Salud.

*Autor: Lic. Rosmari Rodríguez Roche, MSc*

*Tutor: Prof. María G. Guzmán Tirado, DrC*

Ciudad Habana, 2005

## SÍNTESIS

Se presentan los resultados de la caracterización molecular de 20 aislamientos de DEN-2 obtenidos durante la epidemia ocurrida en Santiago de Cuba en 1997, así como de 3 aislamientos de DEN-3, obtenidos en las epidemias de Ciudad Habana del 2000 y 2001-2002. El análisis de las secuencias nucleotídicas de los aislamientos de DEN-2 obtenidos en diferentes momentos de la epidemia de 1997, permitió comprobar que existía una marcada conservación de los genes estructurales y de las regiones no codificantes. Sin embargo, se encontraron cambios en los genes no estructurales que revelaron un patrón típico de evolución. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas para los aislamientos de DEN-3, sugirió que durante los años 2000-2001 existieron en Cuba dos introducciones de dengue cercanas en el tiempo, probablemente a partir de países diferentes de la región. Los estudios filogenéticos realizados permitieron establecer la relación genética y el origen de los aislamientos cubanos obtenidos en las epidemias de 1997, 2000 y 2001-2002, demostrándose la introducción de cepas asiáticas con alto potencial virulento. Los cambios nucleotídicos encontrados, algunos de ellos no sinónimos pudieran estar relacionados con una mayor capacidad replicativa del virus y de esta forma explicar el incremento de severidad observado con la progresión de la epidemia. Los resultados obtenidos sientan bases para futuras investigaciones sobre marcadores de virulencia viral.

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
I.1. Antecedentes.....	1
I.2. Hipótesis.....	6
I.3. Objetivos.....	6
I.4. Novedad Científica y Valor	7
Teórico.....	8
I.5. Valor Práctico.....	
<b>II. REVISIÓN</b>	<b>9</b>
<b>BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
II.1. La historia del dengue y su epidemiología.....	13
II.2. Origen de los virus del dengue	16
II.3. Clasificación, estructura y propiedades físico-químicas.....	16
II.4. Genoma: organización y estructura.....	17
II.5. Proteínas virales.....	21
Replicación.....	22
II.6. Ciclo de transmisión.....	22
II.7. Características clínicas de la enfermedad.....	25
II.8. Inmunopatogenia y respuesta inmune.....	28
II.9. Diagnóstico de dengue.....	29
II.9.1. Muestras utilizadas en el diagnóstico.....	29
II.9.2. Aislamiento viral.....	30
II.9.3. Identificación viral.....	30
II.9.4. Diagnóstico serológico.....	31
II.9.5. Detección molecular.....	32
II.9.6. Detección antigénica.....	33
II.10. Genética evolutiva de los virus del dengue.....	33
II.10.1. Definición de evolución.....	33
II.10.2. Proceso de evolución.....	33

II.10.3. Variación natural.....	34
II.10.3.1. Selección natural.....	34
II.10.3.2. Deriva genética.....	35
II.10.4. Diversificación viral.....	37
II.10.5. Respuesta a la selección.....	37
II.10.6. Adaptación.....	37
II.10.7. Aspectos relacionados con la evolución de los virus del dengue.....	
<b>III. MATERIALES Y</b>	<b>41</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
III.1. Aislamiento viral.....	42
III.2. Virus.....	44
III.3. Extracción de ARN.....	45
III.4. Transcripción Reversa.....	45
III.5. Amplificación y secuenciación nucleotídica del gen E de aislamientos cubanos de DEN-2.....	47
III.6. Amplificación y secuenciación nucleotídica del genoma viral completo de aislamientos cubanos de DEN-2.....	50
III.7. Amplificación y secuenciación nucleotídica del gen E de aislamientos cubanos de DEN-3.....	50
III.8. Análisis Filogenético de los DEN-2 a partir de la secuencia nucleotídica del gen E.....	53
III.9. Análisis Filogenético de los DEN-2 a partir de la secuencia nucleotídica del genoma viral completo.....	54
III.10. Análisis Filogenético de los DEN-3 a partir de la secuencia nucleotídica del gen E.....	

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
IV.1. Caracterización molecular de aislamientos de DEN-2 obtenidos durante la epidemia de Santiago de Cuba, 1997.....	56
IV.1.1. Análisis Filogenético a partir de la secuencia nucleotídica del gen E...	56
IV.1.2. Análisis de la secuencia aminoacídica deducida para la proteína E.	60
IV.1.3. Análisis de la secuencia nucleotídica del genoma viral completo y la secuencia aminoacídica deducida para la poliproteína. Análisis Filogenético.....	63
IV.2. Caracterización Molecular de los aislamientos de DEN-3 obtenidos durante las epidemias de Ciudad Habana 2000 y 2001-2002.....	76
IV.2.1. Análisis Filogenético a partir de la secuencia nucleotídica del gen E...	
IV.2.2. Análisis de la secuencia aminoacídica deducida para la proteína E	76
IV.3. Consideraciones Generales.	79
	85
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	<b>89</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.</b>	<b>90</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>91</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS.</b>	<b>115</b>
<b>IX. ANEXOS.</b>	<b>118</b>

## **Listado de abreviaturas**

ADA: Amplificación dependiente de anticuerpos

ARN: ácido Ribonucleico

DEN: virus dengue

ELISA: Ensayo inmunoenzimático (siglas del inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

FD: Fiebre del dengue

FHD: Fiebre hemorrágica del dengue

g: gravedades

HLA: Antígenos Leucocitarios de Histocompatibilidad (siglas del inglés, Histocompatibility Leucocyte Antigen)

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleucinas

kb: kilobases

MEM: Medio esencial mínimo

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (siglas del inglés, Major Histocompatibility Complex)

min: minutos

<sup>32</sup>P: Fósforo radiactivo

P: Pases en cultivos de células

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas del inglés, Polymerase Chain Reaction)

RT: transcripción reversa (siglas del inglés, reverse transcription)

SCD: Síndrome de choque por dengue

STFI: suero de ternera fetal inactivado.

Th: T cooperadoras (siglas del inglés, T helper)

TNF: Factor de necrosis tumoral (siglas del inglés, Tumoral necrosis factor)

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Antecedentes**

La fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) constituyen hoy la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en humanos. Dicha enfermedad afecta a más de 100 países, fundamentalmente a los localizados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que anualmente ocurren entre 50-100 millones de infecciones. Esta enfermedad es la causa de 300,000 a 500,000 hospitalizaciones anuales con una tasa de mortalidad del 1-5% (1, 2).

Los virus del dengue consisten en cuatro serotipos antigénicamente diferentes (DEN-1 al 4) asignados al género *flavivirus* (Familia *Flaviviridae*). El genoma de estos virus está constituido por una simple cadena de ARN(+) que codifica para tres proteínas estructurales C, PrM/M, E y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (3)

La infección por cualquiera de los serotipos puede producir diferentes formas clínicas de la enfermedad, desde un cuadro clínico leve hasta la forma severa conocida como FHD que ocasionalmente conduce a la muerte por choque (4, 5). Aunque la patogénesis del dengue es controversial, las hipótesis (no mutuamente exclusivas) de ocurrencia de amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) y existencia de cepas con mayor virulencia, son comúnmente invocadas para explicar la patogénesis de la forma severa de la enfermedad (1, 6-8). Actualmente se plantean numerosos factores de riesgo que implican el desarrollo de la forma severa de la enfermedad, dentro de los que se incluyen las variaciones que experimentan los virus, factores dependientes del hospedero, factores relativos al vector, factores epidemiológicos y las condiciones ecológicas (8-15).

En particular, la infección secundaria con un virus de dengue de serotipo diferente al que ocasionó la infección primaria (virus heterólogo) se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de la FHD/SCD. Unido a esto, la introducción en las Américas de cepas de DEN-2 de origen Asiático ha sido asociado con un incremento del riesgo de desarrollo de FHD/SCD (12-14, 16-18).

Se conoce que los cuatro serotipos del virus dengue circulan en la región Latinoamericana y aunque en la mayoría de estos países el dengue es endémico, la situación epidemiológica de Cuba se considera excepcional.

### **El dengue en Cuba**

Desde el siglo XVIII y hasta mediados del siglo XX (1945) en Cuba existieron reportes de brotes compatibles con dengue (19). Sin embargo, en 1975 un estudio que abarcó más de 2000 muestras de suero de todo el país demostró que solamente el 2.6 % de la población presentaba anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el grupo B de los Arbovirus. La mayor parte de los positivos fueron adultos indicando una baja circulación desde 1945 (20).

En 1977, a la vez que circulaba en la mayoría de los países de la región, se produjo en Cuba una epidemia causada por el DEN-1 (20). Se estima que se infectaron alrededor de medio millón de personas en las cuales se apreció un cuadro benigno de FD. Los estudios seroepidemiológicos realizados en 1978, mostraron un 44.5 % de positividad (21).

En 1981 se produjo una epidemia severa de FHD/SCD causada por el DEN-2. Se reportaron 344 203 casos de los cuales 10 312 fueron considerados como FHD/SCD con 158 fallecidos, 101 de estos niños (22). La infección secundaria constituyó el factor de riesgo más notable, de esta forma, la mayor parte de los casos severos fueron observados en niños pequeños que previamente habían sido infectados con el DEN-1 (8). La cepa causante de la epidemia fue clasificada años más tarde dentro del genotipo asiático. Dicha cepa presentaba gran similitud con las cepas viejas que circularon en los años cuarenta en Asia. Este genotipo incluye la cepa prototipo de DEN-2 conocida como Nueva Guinea C (23, 24).

Una vez controlada la epidemia de 1981, en Cuba se estableció una campaña para la lucha contra el *Aedes aegypti*, además de un sistema de vigilancia que permitió que por un período de más de 15 años no se detectara la circulación de los virus del dengue en el la isla (25).

En 1997, varios factores presentes en el municipio de Santiago de Cuba favorecieron la re-emergencia del dengue (25). En condiciones climatológicas excepcionales con una alta densidad del vector, el sistema de vigilancia activa detectó de manera temprana la circulación del virus.

La epidemia fue muy severa, confirmándose 3012 casos, 205 de ellos clasificados como FHD/SCD y 12 fallecidos (26). En dicha epidemia pudo constatarse nuevamente la infección secundaria como factor de riesgo importante para desarrollar la forma severa de la enfermedad. De esta forma, se demostró la infección secundaria en 11(92 %) de los 12 fallecidos y en el 98 % de los casos de FHD/SCD (26).

Los datos reportados en esta epidemia son de gran interés, teniendo en cuenta que se produjeron infecciones secundarias a 20 años de la primo infección y la enfermedad severa fue observada en adultos. En este sentido, Cuba representa un escenario epidemiológico único para investigar si los anticuerpos heterólogos fueron capaces de mediar ADA tras un largo período de haber ocurrido la epidemia de DEN-1 (17, 27).

Luego del control de la epidemia de Santiago de Cuba, no se reportaron más casos de dengue en la isla hasta el año 2000. A pesar de que desde 1994, se había demostrado la entrada del serotipo 3 en la región Latinoamericana, no es hasta el año 2000 que se reportan casos de DEN-3 (28). En este período se comprobó un pequeño brote que afectó tres áreas de salud en Ciudad Habana, con un total de 138 casos, todos de FD, aislándose además el serotipo 4 (28).

A pesar de que el brote del año 2000 fue eliminado de inmediato, meses más tarde se reportó en la misma ciudad un brote de mayor envergadura, en el cual se identificó al DEN-3 como agente etiológico. Este brote se extendió rápidamente a toda la Ciudad de la Habana reportándose 12 889 casos confirmados de la enfermedad con 78 casos de FHD/SCD y 3 fallecidos, todos adultos (29). Además, se produjeron algunas transmisiones locales en cinco provincias del país para un total de 14 443 casos confirmados, 81 casos de FHD/SCD y 3 fallecidos. En este período, se desarrolló una

estrategia de lucha antivectorial que posibilitó que la epidemia pudiera controlarse en 8 meses y que no se extendiese al resto del país (29).

Tanto en la epidemia del año 1981 como en la de 1997, la enfermedad severa se observó en individuos con evidencias serológicas de infección por DEN-1 en 1977. En ambas epidemias, la proporción de casos de FHD/casos de FD, así como la proporción de fallecidos/casos de FHD, se incrementó notablemente con la progresión de la epidemia (27, 30). Este fenómeno también fue observado durante la epidemia de DEN-3 del período 2001-2002 constatándose un incremento en la severidad de la epidemia con la progresión de la misma en el tiempo (Guzman MG, Kouri G, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, 2002, datos no publicados).

Guzman y colaboradores (30), sugirieron que este fenómeno de incremento de la severidad con la progresión de las epidemias en el tiempo podría estar dado por la selección de mutantes de escape a la neutralización heterotípica en individuos inmunes al DEN-1. De esta forma, la infección por dichas mutantes de escape en individuos inmunes a DEN-1 podría estar sujeta al fenómeno de ADA, favoreciendo la infección de un mayor número de células.

Si se asume que los anticuerpos heterotípicos de individuos infectados secundariamente fueron esenciales para el desarrollo de la enfermedad severa, no sólo por facilitar la ADA, también por favorecer la formación de mutantes de escape a la neutralización con la progresión de la epidemia en el tiempo, entonces pudiera existir una relación entre el incremento de la severidad observado y la aparición de cambios particulares en el genoma del virus (30).

Consecuentemente, se consideró apropiado realizar la caracterización molecular de aislamientos cubanos obtenidos en diferentes momentos de la epidemia cubana de 1997. Inicialmente, a través del estudio de la secuencia del gen E, por considerarse diana para la formación de anticuerpos neutralizantes y para la respuesta inmune de células T, así como el determinante fundamental del tropismo de los flavivirus (31). Subsecuentemente, se realizó la caracterización molecular mediante el análisis del genoma viral completo de algunos aislamientos representativos de los diferentes momentos de esta epidemia.

Por otra parte, a modo de profundizar en la evolución de los virus del dengue en Cuba, se encontró oportuno incluir en este trabajo, el análisis del virus DEN-3 desde que fue introducido en Nicaragua en 1994 (32) hasta que fue aislado en Cuba en el brote del año 2000 y posteriormente durante la epidemia ocurrida en el 2001. De esta forma, podría determinarse, la presencia o no de cambios moleculares a nivel del gen E, que pudieran asociarse con la patogénesis viral; así como, establecer la relación genética de las cepas cubanas de este último período.

## I.2. Hipótesis de trabajo

“Mediante la caracterización genética de cepas epidémicas de dengue es posible determinar la evolución y la epidemiología molecular de estos virus en Cuba”

## I.3. Objetivos

### ***Objetivo General***

Contribuir al conocimiento de las bases moleculares del origen y la evolución de los virus del dengue en Cuba.

### ***Objetivos específicos***

- Examinar si existen diferencias genéticas entre aislamientos de DEN-2 obtenidos en diferentes momentos de la epidemia de Santiago de Cuba, 1997.
- Definir la relación genética y el origen de los aislamientos cubanos de DEN-2 obtenidos durante la epidemia de Santiago de Cuba, 1997.
- Determinar la relación genética y el origen de los aislamientos cubanos de DEN-3 obtenidos durante las epidemias ocurridas en Ciudad Habana en los años 2000 y 2001-2002.

#### I.4. Novedad científica y valor teórico

- Por primera vez en Cuba, se logra obtener la secuencia nucleotídica del genoma viral completo de cepas cubanas de dengue y se realizan análisis filogenéticos de alta resolución utilizando el modelo de evolución más complejo existente.
- Por primera vez a nivel internacional, se estudia la evolución del virus dengue en el transcurso de una epidemia y puede asociarse con el incremento de severidad observado con la progresión de la misma, determinándose posibles marcadores de virulencia.
- Los estudios aquí presentados son de gran valor científico a nivel internacional, dada la exclusividad que caracteriza la epidemiología del dengue en Cuba, donde no existe endemidad de la enfermedad, lo cual permite relacionar los hallazgos moleculares con la etiopatogenia de la enfermedad.

## I.5. Valor práctico

- Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo fueron depositadas en la base de datos GenBank y están disponibles para nuevos estudios filogenéticos, los cuales permitirán profundizar en el origen y evolución de los virus del dengue a nivel global.
- Los resultados de este trabajo son de utilidad en el diseño de candidatos vacunales contra los virus del dengue.
- Se diseñaron juegos de cebadores útiles para la amplificación y secuenciación del genoma viral completo de cepas de dengue, lo que permitirá continuar con los estudios de caracterización de otras cepas cubanas de dengue.
- Los resultados obtenidos en este estudio permitieron corroborar observaciones derivadas de la vigilancia epidemiológica. Se confirmó que el brote de DEN-3 ocurrido en el año 2000, ciertamente fue eliminado y que en el año 2001 ocurrió una segunda introducción del mismo serotipo, lo que apoya el carácter no endémico de la enfermedad en Cuba.
- Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a cuatro publicaciones internacionales en revistas de alto impacto.
- Los estudios realizados en esta tesis estuvieron enmarcados dentro del proyecto: *“Investigation of the underlying basis for the emergence of dengue haemorrhagic fever in Cuba”*, concluido recientemente. Los resultados de este proyecto fueron calificados como muy satisfactorios por los evaluadores de la *Wellcome Trust*, lo que constituye un aval para el IPK y para Cuba en materia de Ciencia a nivel internacional.

## **CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1. La historia del dengue y su epidemiología**

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen viral que se trasmite al hombre a través de un mosquito del género *Aedes*, provocando una enfermedad con un amplio espectro de formas clínicas que va desde la fiebre indiferenciada hasta las formas más graves con hemorragia y choque (33).

La primera descripción de una enfermedad compatible con dengue se publicó en la Enciclopedia China en el año 992 de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1635 que en las Indias Francesas del Oeste se conoció un reporte similar, donde la enfermedad fue denominada “Coup de Barre” (34). En 1779, en Batavia, Indonesia se reportó una epidemia de casos febriles denominada “Knockelkoorts” (Fiebre de huesos) y en el mismo año en el Cairo, Egipto se le denominó “Mal de Genoux” (problemas de rodilla). En 1780 en Filadelfia, EUA se reportó la enfermedad febril como “Escarlatina reumática”.

La ocurrencia casi simultánea de epidemias en Asia, África, y América del Norte indicó una distribución mundial de estos virus y su vector. En sus inicios, se consideró una enfermedad benigna de los visitantes a los trópicos (34). Las epidemias se producían a intervalos de 10-40 años, principalmente porque los virus y su vector transmisor sólo podían transportarse entre los centros de la población a través de la navegación (34).

Fueron varios los nombres asociados a esta enfermedad de acuerdo a la región geográfica (34). De esta forma se denominó “La Piadosa” en Cádiz, España (1784-86), “Dengue” en España (1809), Ki Dinga Pepo, Denga en Zanzíbar, África del Este (1823), “Ephemeral fever” en Calcutta, la India (1824), “Dandy fever” Santo Tomas, Islas Virginias (1827), “Dunga, Dengue” en Cuba, 1828, “Polka fever” en Brasil, (1845-49), “Three-day or Seven-day fever” en la India, 1909, “Ban-’Sha” en Taiwan, 1916 y “Five-day fever” en Indonesia (1960s). A partir de la década de los años cincuenta se denominó FD a la forma clásica y FHD/SCD a la forma severa de la enfermedad (34).

Los estudios de la enfermedad comenzaron con la demostración por Graham en 1903 (35) de la capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue. El virus dengue se aisló por primera vez en Hawai en 1944, al que se denominó DEN-1 y en el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó DEN-2 (36, 37). En Manila, 1956 y 1960, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con un cuadro de dengue hemorrágico (38).

### **Emergencia Mundial**

La pandemia global de dengue que empezó en el Sudeste de Asia después de la Segunda Guerra Mundial, se ha intensificado durante los últimos 30 años, siendo frecuentes las epidemias causadas por varios serotipos (hiperendemicidad) (39). En el Sudeste Asiático, la FHD en su forma epidémica apareció por primera vez en los años cincuenta (40, 41), en 1975 ya era una causa importante de hospitalización y muerte, fundamentalmente en niños. Hasta el año 1990, se habían reportado oficialmente alrededor de 3 millones de casos de FHD, la mayoría de estos en Asia. Tomando en consideración solamente a Tailandia, entre 1958 y 1990 se reportaron 874 207 casos, con una tasa de mortalidad del 1.57 % siendo en este país la quinta causa de morbilidad y la tercera causa de muerte (34). En Asia, la FHD es considerada una enfermedad de la niñez, observándose dos picos de mayor tasa de incidencia en edades específicas: niños menores de un año de edad y niños entre tres y cinco años. La enfermedad en recién nacidos se asocia a infecciones primarias en presencia de anticuerpos maternos, mientras que la mayoría de los casos observados en niños mayores son el resultado de infecciones secundarias (33, 34).

En los años ochenta, la FHD comenzó su segunda expansión por Asia cuando Sri Lanka, la India, y las Islas Maldivas tenían sus primeras epidemias de FHD (34). Las recientes epidemias en Sri Lanka y la India han estado asociadas con múltiples serotipos de los virus del dengue, siendo el DEN-3 predominante y genéticamente distinto de los DEN-3 aislados previamente en esos países (42, 43). En otros países de Asia donde la FHD es endémica, las epidemias han sido progresivamente de mayor extensión en los últimos 15 años (34, 44-47).

Los factores responsables de la emergencia de la FHD como una enfermedad epidémica (33, 34) en Asia en los años cincuenta y del reciente incremento en su incidencia incluyen:

1. Cambios demográficos (crecimiento poblacional y urbanización no planificada) que favorecen el contacto con el vector, el mosquito doméstico *A. aegypti*.
2. Cambios ecológicos relacionados a la urbanización (pobre saneamiento ambiental, inadecuado suministro de agua que implica el almacenamiento doméstico de la misma).
3. El rápido incremento de los viajes aéreos, que posibilita el movimiento de personas en fase virémica y la diseminación de múltiples serotipos y cepas del dengue.
4. Establecimiento de una situación de hiperendemicidad y aumento de la frecuencia de infecciones secuenciales en niños.

En el Pacífico, los virus del dengue fueron reintroducidos tempranamente en la década del setenta después de una ausencia de más de 25 años. La actividad epidémica causada por los cuatro serotipos se ha intensificado en los años recientes con epidemias de FHD en varias islas de esa región (44, 48-52).

La vigilancia del dengue en África ha sido extremadamente pobre, previo a los años 80 la mayoría de los brotes no eran reportados y actualmente aunque la vigilancia no ha mejorado, se ha incrementado el número de reportes. Más recientemente, la mayor actividad epidémica ha ocurrido en África Oriental (53-56).

Los factores descritos previamente como determinantes de la emergencia de la FHD en Asia, algunos años después, también fueron responsables de la emergencia en las Américas. Al final de la década de los años 70 la distribución de *Aedes aegypti* cambió dramáticamente debido al colapso de los esfuerzos para el control del vector. El patrón de las infecciones por dengue en la región latinoamericana cambió de brotes producidos por un simple serotipo con intervalos inter-epidémicos largos a brotes anuales y co-circulación

de tres de los cuatro serotipos del dengue (34). En 1977, se introdujo el DEN-1 en América provocando epidemias de FD a lo largo de toda la región y aún se encuentra circulando(57). El DEN-3 por su parte estuvo circulando en la región entre los años 1963 y 1977, sin embargo se reportaban casos esporádicos de FHD.

En la década de los años 80, la FD/FHD se presentó como un problema de salud de gran envergadura. Específicamente en 1981, se reportó en Cuba una epidemia de FHD/SCD sin precedentes en las Américas, causada por una cepa de DEN-2 de origen asiático, relacionada genéticamente con la cepa NGC del año 1944 (8, 23, 58). En este mismo año también se introdujo el DEN-4 en la región. En este período, ambos serotipos causaron epidemias siendo relevantes las epidemias causadas por el DEN-2 en Venezuela y Brasil (59, 60). Por su parte, el DEN-4, afectó notablemente a Puerto Rico, México, Surinam y El Salvador (34).

En la década de los años 80 y 90 estuvo circulando en la región más de un genotipo de DEN-2, de esta forma otras epidemias fueron causadas por cepas relacionadas genéticamente con la cepa Jamaica/83 también de origen asiático (61, 62).

En 1994, tras una ausencia de 17 años, el DEN-3 fue reintroducido en Latinoamérica. Se realizaron aislamientos casi simultáneamente en Nicaragua y Panamá; posteriormente en Costa Rica en el año 1995 (32). Los estudios filogenéticos realizados muestran que el virus aislado tuvo su origen en Asia, relacionándose genéticamente con los virus aislados en la India y Sri Lanka en los años ochenta (43, 63), y por tanto diferente del que circuló previamente en la Región durante los años 1963-1977. Debido a la susceptibilidad de la población en los trópicos americanos, esta nueva cepa de DEN-3 se extendió rápidamente a lo largo de la región, causando epidemias de FD/FHD (29, 64).

La enfermedad es endémica en las Américas, Sudeste de Asia, Pacífico Oeste, África, Mediterráneo Oriental, con mayor carga en las tres primeras regiones (65).

Aunque los cuatro serotipos del dengue son capaces de producir casos de FHD, el DEN-2 y el DEN-3 son los más frecuentemente asociados con la enfermedad severa. La infección

por DEN-1 seguida por DEN-2 ha sido asociada con epidemias de FHD, aunque en áreas hiperendémicas no es fácil definir el virus causante de la infección primaria.

## **II.2. Origen de los virus del dengue**

Dentro de los Arbovirus los virus del dengue son los únicos que aparentemente han “escapado” de las ataduras de una existencia selvática. Estos evolucionaron con la capacidad de circular dentro de la población humana de todas las regiones tropicales y subtropicales, en un ambiente urbano. Esta característica los diferencia del virus de la Fiebre Amarilla que es capaz de producir epidemias urbanas sólo temporalmente (66). Las epidemias de Fiebre Amarilla aparecen cuando el virus selvático es reintroducido en áreas rurales o urbanas. Contrariamente, las cepas selváticas de dengue no han sido asociadas con epidemias en humanos (67-69). Algunos estudios experimentales han indicado que los vectores urbanos son más susceptibles a cepas de DEN-2 urbanas que a cepas selváticas, esto es consistente con la hipótesis que plantea que el dengue urbano emergió a través de la adaptación de mosquitos peridomésticos (70).

Los estudios antigénicos han demostrado que los virus del dengue deben ser clasificados como flavivirus. Sin embargo, para dar luz a la historia evolutiva de estos virus se ha requerido de un análisis filogenético molecular más detallado. Independientemente de la alta resolución de estos estudios, muchos aspectos relacionados con el pasado de los virus del dengue permanecen sin respuesta. Todos los análisis realizados hasta la fecha muestran que los cuatro serotipos del dengue son filogenéticamente distintos y frecuentemente con el mismo grado de divergencia con que es posible distinguir entre “especies” diferentes de flavivirus (68).

El análisis filogenético de más de 70 flavivirus realizado por Kuno y colaboradores (71) basado en la secuencia del gen NS5 permitió distinguir tres grupos fundamentales de flavivirus, esta división generalmente se relaciona con el modo de transmisión: virus transmitidos por garrapatas, por mosquitos y con vector desconocido.

Aunque el agrupamiento de los virus del dengue dentro de la rama de los virus transmitidos por mosquito está bien soportado, la cercanía relativa entre ellos no puede ser determinada con certeza, ya que se obtiene un débil soporte de re-muestreo (del inglés bootstrap) en los nodos críticos del árbol. Para la resolución de esta parte de la filogenia de los flavivirus se requiere de un análisis a partir de secuencias de genomas completos, las cuales no se han realizado aún, al menos a gran escala (68).

La mayoría de las filogenias muestran el DEN-4 como el primero en bifurcarse, indicando que fue el primer serotipo en emerger, seguido por DEN-2 y la partición final entre DEN-1 y DEN-3. No obstante, algunas filogenias muestran resultados diferentes. Por ejemplo, algunos árboles obtenidos a partir de la secuencia de NS5, aunque con un débil soporte de re-muestreo, revelan que el DEN-2 se agrupa con el DEN-3. Utilizando el mismo tipo de análisis pero con en otras regiones del genoma, puede apreciarse que el DEN-2 se agrupa con el DEN-4 (Holmes EC, Universidad de Oxford, 2003, observaciones no publicadas). No está claro aun si esta ubicación de las ramas es enteramente estocástica o es una señal de recombinación muy antigua (68).

A pesar de la falta de resolución en los árboles filogenéticos de flavivirus, pueden hacerse algunas inferencias con relación al origen de los virus del dengue(68). Se han realizado observaciones claves en este sentido: a) la identificación de ciclos de transmisión selvática en Asia y África occidental que involucran monos y b) la ubicación de cepas selváticas específicamente de DEN-2 y DEN-4 en la base de árboles construidos con aislamientos provenientes de humanos (67). Esto podría ser así para DEN-1, aunque no se ha hecho todavía el análisis y en el caso de DEN-3, aún no se han identificado cepas selváticas; sin embargo, la presencia de anticuerpos a DEN-3 en monos de Malasia sugiere que también existe un ciclo selvático para este serotipo(68). De aquí se derivan fuertes evidencias de que el dengue fue un virus originalmente de monos y que la transmisión entre especies a humanos ha ocurrido independientemente para los cuatro serotipos (68).

Lo que no está definido de manera absoluta es donde se originó el dengue. Gaunt y colaboradores (72) sugirieron un origen africano, principalmente debido a que muchos de los flavivirus transmitidos por mosquitos, que revelan la mayor divergencia, circulan

exclusivamente en África y con frecuencia infectan primates, lo que sugiere que este grupo tuvo su origen en África. Unido a esto, también se plantea que el *Aedes aegypti* tuvo su origen en África. No obstante, esta especie es probable que haya sido adoptada como vector para la transmisión a humanos en un pasado relativamente reciente.

Contrariamente, la presencia de los cuatro serotipos en Asia tanto en humanos como en monos y particularmente la profunda posición filogenética de las cepas selváticas asiáticas sugiere que el virus tuvo un origen asiático (67). La elevada prevalencia del dengue en esta región también podría apoyar la segunda hipótesis, pero no es menos cierto que sólo un pequeño número de muestras africanas (de humanos y monos) están disponibles para su análisis. Claramente, para determinar el lugar de origen de los virus del dengue se requerirá de un muestreo más amplio de cepas selváticas y de filogenias moleculares más precisas.

Una pregunta obligada con relación al origen de los virus del dengue es: ¿Por qué existen cuatro serotipos diferentes? Según la hipótesis planteada por Holmes y colaboradores (68), es muy probable que los virus del dengue se hayan separado en cuatro linajes debido a divisiones ecológicas o geográficas en diferentes poblaciones de primates y por tanto los cuatro serotipos evolucionaron de forma independiente.

Alternativamente, otros autores plantean que los virus del dengue pudieron evolucionar dentro de una única población, porque la presencia de cuatro serotipos antigénicamente diferentes facilitó la transmisión a través del fenómeno de ADA. Bajo este modelo, la selección natural favorece a los virus con un grado de disimilaridad antigénica que maximice la amplificación inmunológica (73).

Si la ADA fuese la fuerza fundamental que determina la diversidad genética de los virus del dengue; entonces debía esperarse que los virus estuvieran sometidos a una constante presión selectiva de tipo inmunológica. Los estudios de selección natural realizados hasta la fecha muestran que ese no es el caso de los virus del dengue (74, 75).

Consecuentemente, la ADA, más que una estrategia evolutiva a largo plazo, muy probablemente sea el resultado del contacto reciente entre los cuatro virus que

evolucionaron por separado durante un período extenso y por casualidad tienen un nivel de disimilaridad antigénica, que permite la inmunoamplificación (68). Aunque existen numerosas evidencias que relacionan la ADA con la patogénesis del dengue, su influencia en la diversificación genética de los virus del dengue requiere una mayor investigación.

### **II.3. Virus del dengue: Clasificación, estructura y propiedades físico-químicas**

Los virus del dengue pertenecen a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* el cual agrupa alrededor de 70 miembros. Existen cuatro serotipos (DEN-1, 2, 3, 4), para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente (76).

Los viriones maduros son partículas esféricas de 40-60 nm de diámetro, que contienen un núcleo electrodenso de 30 nm de diámetro rodeado por una bicapa lipídica. La envoltura es de 10 nm de espesor y contiene dos proteínas que dan lugar a proyecciones localizadas en la superficie del virión de aproximadamente 7 nm de longitud (77). Esta bicapa lipídica se deriva de la membrana celular del hospedero. La nucleocápside icosaédrica contiene una molécula de ARN de simple cadena, con orientación positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud y peso molecular de 4,2 kD (78).

La constitución lipoproteica de la envoltura de los viriones les confiere una elevada sensibilidad al tratamiento con cloroformo, formaldehído, peróxido de hidrógeno, alcohol y yodo. Además, son sensibles a enzimas hidrolíticas que generan pérdida de ciertas propiedades antigénicas. La infectividad viral se preserva bien a bajas temperaturas y a valores de pH entre 8,4 y 8,8. Son inactivados por la luz ultravioleta, las radiaciones gamma y las altas temperaturas. A 50 °C, se pierde el 50% de la infectividad en 10 min. Se pueden conservar por años a -70 °C y son estables de forma liofilizada a 4 °C (79).

### **II.4. Genoma viral : organización y estructura**

La molécula de ARN (+) se comporta como ARN mensajero durante la síntesis de las proteínas virales. Posee una caperuza m<sup>7</sup>G5'ppp5'A en el extremo 5'. No presenta cola

poliadenilada en el extremo 3'. Presenta un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína precursora que es procesada pre y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales. Los genes ubicados hacia el extremo 5' codifican para las tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C) y dos proteínas de superficie: la de membrana (M), no glicosilada, la cual se forma durante la maduración a partir del precursor denominado prM y la proteína de envoltura (E), glicosilada. Las proteínas no estructurales son codificadas por genes situados hacia el extremo 3' y se denominan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (77)

En ambos extremos, 5' y 3' están presentes secuencias no codificantes (NCR) -del inglés noncoding regions-. Estas regiones contienen secuencias conservadas, que dirigen el proceso de amplificación, traducción y empaquetamiento del genoma (77). La función más significativa de la NCR 5' probablemente reside en su complementariedad reversa con la NCR 3' de las cadenas negativas virales, la cual forma el sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva. La NCR 3' del genoma de los *Flavivirus* actúa como promotor de la síntesis de la cadena negativa (77).

## **II.5. Proteínas Virales**

### **Proteínas estructurales**

La proteína C es pequeña, de aproximadamente 12 kD con una elevada carga positiva y rica en residuos de lisina y arginina que le conceden un carácter altamente básico. Dicha composición permite su interacción con el ARN viral lo que favorece la formación de la nucleocápside. La homología de esta proteína entre los *Flavivirus* es baja; sin embargo, hay regiones muy conservadas que interactúan con las membranas celulares y puede participar en el ensamblaje del virión (77) .

La proteína C, es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción. Su dominio carboxilo terminal, se plantea que actúa como transductor de señales a través de la membrana que media la inserción del precursor prM dentro del retículo endoplasmático rugoso (80).

La proteína prM de 26 kD es escindida proteolíticamente, liberándose su extremo amino terminal para dar lugar a la proteína M de 8 kD. La formación de M a partir de prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral. De esta forma el precursor se localiza en los viriones inmaduros intracelulares y la proteína M en el virión extracelular, el clivaje coincide con la liberación de los viriones (77).

Durante la ruptura se genera a su vez un fragmento pr, cuyo papel no ha sido bien identificado. El fragmento pr es predominantemente hidrofílico, contiene seis residuos de cisteína conservados, de los cuales todos participan en puentes disulfuro y en un número variable de sitios potenciales de N-glicosilación. Los anticuerpos contra prM pudieran mediar inmunidad de tipo protectora, quizás por neutralización de los viriones liberados que contienen prM no clivada (77, 81).

La glicoproteína E forma parte de la envoltura viral. Tiene un peso molecular de 53-54 kD, constituye la principal proteína estructural de los flavivirus y la más conservada en este género (82). Un modelo estructural que se propone para esta proteína consiste en 3 dominios antigénicos no superpuestos designados como A, B y C, que contienen al menos 16 epítopes (83). Otro modelo propuesto es aquel donde en la cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína se reconocen 3 dominios (I, II, III), en los cuales predomina la hoja plegada como estructura secundaria (84).

Generalmente la proteína E aparece intracelularmente como un heterodímero E-prM y como un homotrímero en la superficie del virión maduro (85). Para que ocurra el plegamiento apropiado, la asociación a membrana y el ensamblaje de la proteína E, se requiere de su cosíntesis y expresión con la proteína prM (86). Existen evidencias de que en el heterodímero prM-E, la proteína prM estabiliza los epítopes de la proteína E sensibles a valores bajos de pH, lo que evita cambios conformacionales irreversibles durante la secreción de la partícula viral a través del compartimiento acidificado. Algunos de los cambios sufridos por la proteína E en las vesículas ácidas de la vía exocítica, parecen ser de gran importancia en la infectividad del virus por relacionarse con la actividad fusogénica de la proteína (87).

En la proteína E radican las principales funciones biológicas del virión tales como: inducción de anticuerpos neutralizantes, inmunoamplificadores e inhibidores de la hemaglutinación, tropismo tisular, maduración viral, enlace al receptor celular y fusión de membrana catalizada por ácidos, necesaria para la infección (31). En la misma se ha determinado la presencia de epítopes de células T, también de importancia en la inmunidad y la patogenia de la enfermedad. Los determinantes antigénicos de la proteína E han mostrado especificidad de grupo, complejo y tipo, también de subcomplejo, genotipo, cepa y subcepa (88).

### **Proteínas no estructurales**

NS1 es una glicoproteína de 39-41 kD que existe asociada a la célula, en la superficie celular y en forma extracelular. Es capaz de inducir la formación de anticuerpos fijadores del complemento. La misma presenta dos sitios de glicosilación bien conservados (80).

Esta glicoproteína presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo, así como algunos de reactividad cruzada. Es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso como una glicoproteína monomérica y en un período corto se une formando un homodímero. Una vez formado este dímero, la glicoproteína es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones y de aquí a la superficie celular, liberándose al medio extracelular (77).

La función de NS1 en la replicación viral no ha sido dilucidada, aunque se ha involucrado en la morfogénesis viral. Algunas mutaciones de esta proteína afectan la virulencia de la partícula viral. Se conoce que la célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica, (88) tanto la realizada por células T citotóxicas, como la mediada por anticuerpos específicos contra ella que la hacen blanco de la acción del complemento o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por esta razón resulta interesante el uso potencial de la proteína NS1 en la protección del hombre contra la infección por los *Flavivirus*. Los estudios realizados por Libraty y colaboradores (89) muestran que es posible correlacionar los niveles elevados de NS1 circulante, encontrados

en la fase temprana de la enfermedad con el desarrollo de la forma severa de la enfermedad (FHD).

NS2 está constituida por dos proteínas NS2A y NS2B. NS2A tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kD, puede encontrarse atravesando la membrana y además ha sido localizada en posibles sitios de replicación del ARN. Esta proteína puede actuar en el reclutamiento de las copias de ARN por la replicasa unida a la membrana. La proteína NS2B está asociada a la membrana, tiene un peso molecular de 14 kD y presenta una región hidrofílica central conservada, que se encuentra flanqueada por segmentos hidrofóbicos. Forma un complejo con NS3 y es un cofactor requerido para la función de la serina proteasa de NS3. En el dominio central existe una región conservada constituida por 40 aminoácidos que es requerida para la actividad de la proteasa NS2B-NS3 (77, 90-92).

NS3 es la segunda proteína en tamaño del virus con un peso molecular de 70 kD y es altamente conservada entre los *Flavivirus*. Se piensa que es un componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. La comparación de secuencias nucleotídicas y análisis bioquímicos sugieren que es trifuncional, con actividad de proteasa, helicasa y actividad de ARN trifosfatasa. Esta proteína se asocia a la membrana a través de su interacción con NS2B (93). Se ha demostrado que la misma es la fuente principal de epítomos de células T. El extremo N terminal de NS3 contiene el dominio catalítico de la proteasa NS2B-NS3, parecida a la proteasa serina de las subfamilias de la Tripsina. Se considera que esta enzima participa como proteasa en el clivaje de NS2B, NS3, NS4A y NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C (94, 95).

NS4 da origen a NS4A y NS4B, que son proteínas relativamente pequeñas (aproximadamente 16 y 27 kD respectivamente). Teniendo en cuenta la distribución de NS4A y su interacción con NS1, se plantea que NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. NS4B se localiza en sitios de replicación del ARN, pero también aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo. Esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales que aún son desconocidas (77).

NS5 es la última proteína codificada en el largo marco abierto de lectura, tiene un peso molecular de 103 a 104 kD y es una de las más conservadas en los *Flavivirus*. Es una proteína básica y se cree funciona como ARN polimerasa ARN dependiente, lo que aunque no se ha verificado directamente, se fundamenta en la presencia de una región altamente conservada, característica de este tipo de enzima presente en los virus de ARN de cadena positiva. Además, presenta homología con enzimas metiltransferasas involucradas en la formación de la caperuza del ARN, por lo que probablemente esta proteína participa en la metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral (77, 96, 97).

## **II.6. Replicación viral**

Los flavivirus pueden replicarse en cultivos celulares de mamíferos, aves y artrópodos. Inicialmente ocurre la unión al receptor celular específico que sigue con la penetración mediante endocitosis y posteriormente el virión es atrapado en una vesícula donde la membrana es fusionada a pH ácido y la nucleocápside es liberada al citoplasma celular. La liberación del ARN y el inicio de la replicación no han sido completamente estudiados. La traducción primaria del ARN mensajero da como resultado una poliproteína que luego de varios clivajes y procesos post-traduccionales da lugar al virión y los componentes replicativos. La replicación del ARN viral puede ser detectado tres horas después de la infección y parece ocurrir en la región perinuclear de la célula infectada asociada con membranas lisas. La replicación del ARN comienza con la síntesis de una cadena negativa complementaria que es empleada como molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN positivo que pueden ser usadas para la traducción de nuevas poliproteínas, síntesis de cadenas negativas o pueden ser encapsidadas para la formación de nuevos viriones. El ARN de los virus del dengue contiene un marco abierto de lectura para una polimerasa que esta insertada dentro de la membrana del retículo endoplasmático (77, 84, 98, 99).

El ensamblaje de la nucleocápside a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura, ocurren intracelularmente. Los viriones son llevados en vesículas de transporte que salen de la membrana del retículo endoplasmático y por un mecanismo específico son translocadas al pre-Golgi pasando posteriormente al aparato de Golgi. En las vacuolas de pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas

de membrana a la superficie celular. La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica con la membrana plasmática o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana que lo separan del espacio exterior (100).

## **II.7. Ciclo de transmisión del virus**

El dengue es una enfermedad de transmisión vectorial, siendo el *Aedes aegypti* el vector principal. Dicho mosquito es esencialmente doméstico, de aguas limpias, diurno y antropofílico. Luego de la ingestión de sangre infestada, el mosquito puede transmitir el agente después de un período de 8 a 12 días de incubación extrínseca. La transmisión puede ocurrir de forma mecánica cuando se interrumpe la alimentación y el mosquito se alimenta de inmediato de un hospedero susceptible cercano (101).

Los virus del dengue persisten en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-mosquito-hombre, aunque existe un ciclo selvático (68, 102, 103). El ciclo de transmisión selvático ha sido demostrado en Asia, principalmente entre especies de monos *Presbytis* y *Macaca* principalmente a través de mosquitos del género *Ochlerotatus*. También, ha sido demostrado en África, con los monos *Erythrocebus patas* y varios vectores selváticos incluyendo *Aedes taylori-furcifer*, *Aedes leuteocephalus* y *Aedes opok* (67).

## **II.8. Características clínicas de la enfermedad**

El dengue se manifiesta como una enfermedad infecciosa aguda, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde formas leves de fiebre indiferenciada hasta formas graves con hemorragia y choque (104, 105).

La FD se considera una enfermedad autolimitada y raramente fatal. La convalecencia puede prolongarse a varias semanas, asociándose a depresión y debilidad fundamentalmente en adultos, aunque no existen evidencias de secuelas permanentes posterior a la infección (5, 106).

La FD se caracteriza por la presencia de fiebre alta de inicio abrupto, cefalea severa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, náuseas y erupción. Clínicamente la enfermedad se manifiesta después de un período de incubación que oscila entre tres y siete días, al cabo de los cuales comienzan a evidenciarse los primeros síntomas. La fiebre entre 38 y 39°C se mantiene de dos a siete días, desciende y reaparece. La erupción es variable y se presenta tempranamente en el 50 % de los pacientes, el enrojecimiento facial puede coincidir con la fiebre y desaparece generalmente entre el primero y el segundo día de instalado el signo. Una segunda erupción comienza entre el segundo y sexto día, variando de la forma máculo-papular a la escarlatiforme, distribuyéndose en el tronco, las extremidades y apareciendo en zonas en las que se alterna un patrón eritematoso con áreas de piel normal. Las pruebas de laboratorio muestran neutropenia con linfocitosis, en ocasiones linfocitos atípicos, las enzimas hepáticas pueden elevarse de forma ligera en algunos pacientes (107, 108).

Aunque las manifestaciones hemorrágicas no son frecuentes, puede observarse sangramiento gingival, hematuria indicando la afectación del sistema genito-urinario e hipermenorrea por daño del sistema ginecológico así como lesiones petequiales y purpúricas en la piel; la trombocitopenia también ha sido reportada en algunos casos (109).

En la FHD sin choque, las manifestaciones clínicas son semejantes a las de la FD. La epigastralgia, la sensibilidad en el reborde costal derecho y el dolor abdominal son comunes. La temperatura es alta del segundo al séptimo día y posteriormente baja a nivel normal o subnormal, en ocasiones sube a 40°C o más y puede acompañarse de convulsiones febriles. La manifestación hemorrágica más común es una prueba del torniquete positiva. Un paciente es clasificado como caso de FHD sí, además de fiebre y hemorragia, presenta trombocitopenia (conteo plaquetario menor de 100 000 plaquetas/mm<sup>3</sup>) y hemoconcentración (aumento del hematocrito en un 20 % ó más). Pueden observarse la presencia de ascitis y el derrame pleural, como signos de hemoconcentración (5, 107, 108, 110).

En muchos casos se observan hemorragias en los sitios de venipunción. En la etapa inicial podemos ver petequias finas diseminadas por las extremidades, las axilas, la cara y el paladar blando. Puede verse erupción maculopapular al principio y al final de la

enfermedad. Puede existir hepatomegalia de dos a cuatro centímetros, dolorosa a la palpación. La esplenomegalia es infrecuente en lactantes, pero a veces se observa un marcado aumento del bazo en la radiografía. Después de esta etapa viene la rápida recuperación que puede ser espontánea o seguida del tratamiento adecuado con fluidos (líquidos y electrolitos) (5, 65, 107, 111).

En la FHD/SCD se produce un deterioro súbito del paciente luego de una fiebre de corta duración, la temperatura desciende y más tarde entre el tercero y el séptimo día aparecen los signos indicadores de la insuficiencia del sistema circulatorio, constatándose frialdad de la piel y congestión, es frecuente la cianosis peri-labial y el pulso débil pero acelerado. Los pacientes aunque letárgicos se muestran inquietos. Con la entrada al estado de choque crítico, la tensión arterial desciende (20 mm Hg ó 2,7 kPa o inferior) la piel se nota fría y húmeda (112).

Los pacientes con FHD/SCD están en peligro de muerte, si no se les administra de inmediato el tratamiento adecuado. La mayoría de los casos se mantienen conscientes casi hasta la etapa final. La duración del choque es corta, el paciente puede morir de 12 a 24 horas o recuperarse con rapidez después del tratamiento. El choque no corregido puede llevar a la acidosis metabólica, hemorragia grave del aparato digestivo o cualquier otro órgano con un pronóstico desfavorable. En estos pacientes puede aparecer encefalopatía por alteraciones metabólicas y electrolíticas (2, 5, 65, 107).

La convalecencia en la FHD con o sin choque suele ser corta, aún en casos de choque profundo. Una vez corregido éste, los pacientes se recuperan entre 48 a 72 horas. En la convalecencia es común la bradicardia o las arritmias sinusales y una característica erupción petequial. En la FHD, el rango de síntomas neurológicos va desde irritabilidad y depresión hasta encefalitis y muerte (113). La encefalopatía en la FHD puede resultar de la anoxia cerebral, edema, hemorragia intracraneal y oclusión de los vasos. Existe una controversia acerca de si los virus del dengue producen una enfermedad neurológica, como una complicación no específica o invaden directamente el cerebro de la misma forma que otros *Flavivirus* como la encefalitis Japonesa y la encefalitis de San Luis (114)

## **II.9. Inmunopatogenia y respuesta inmune**

La respuesta inmune a la infección por los virus del dengue puede estar asociada tanto a la prevención y recuperación como a la inmunopatología de la FHD/SCD (115). La infección con un serotipo de dengue brinda inmunidad homóloga de larga duración, pero solamente hay protección cruzada transitoria contra el resto de los serotipos, por lo que el individuo que se infectó primariamente en breve será susceptible a una infección secundaria por otro serotipo. Se ha comprobado que el desarrollo de la forma severa de la enfermedad, en un alto porcentaje de los casos, está relacionada con la presencia de anticuerpos heterotípicos debido a una infección anterior, de esta manera se han encontrado niños pequeños con anticuerpos maternos que han desarrollado FHD. Sin embargo, esto no es una regla, ya que la FHD se presenta aunque en un porcentaje menor, en pacientes con infección primaria. Por otra parte, de los pacientes que sufren una infección secundaria solamente una fracción relativamente pequeña (2-6 %) desarrolla FHD (16, 116).

Mediante diversos experimentos realizados *in vitro* se han constatado varias funciones de la respuesta inmune humoral generada contra los virus del dengue como son: la ADA (9), la neutralización (117), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (118) y la citólisis mediada por complemento (119). De esta forma la infección primaria por un serotipo determinado, origina anticuerpos capaces de neutralizar a los virus homólogos y por tanto deben proteger al individuo a largo plazo; pero igualmente origina anticuerpos neutralizantes heterólogos de corta duración, responsables del efecto de ADA (18).

La ADA es un fenómeno serológico demostrado *in vitro*, donde la infección viral de células susceptibles es modificada por la adición de anticuerpos que reconocen al virus. Este fenómeno podría estar relacionado con los procesos inmunopatológicos que ocurren *in vivo* (120). Los anticuerpos heterólogos formados durante la infección primaria, en concentraciones subneutralizantes son capaces de reconocer epítopes presentes en el virus que ocasiona la infección secundaria y pueden formar inmunocomplejos con el virus y facilitar la entrada a las células mononucleares. La infección se amplifica ya que los inmunocomplejos infecciosos pueden acceder con más facilidad a los receptores para Fc de los monocitos, provocando que un mayor número de células sean infectadas (18, 121).

La importancia de la ADA en el desarrollo de la FHD/SCD ha sido sustentada fundamentalmente por experiencias epidemiológicas (25, 122, 123).

Los anticuerpos son considerados el mecanismo más importante de protección en la infección por los virus del dengue; no obstante el cambio de los isotipos y el desarrollo de células de memoria son eventos dependientes de linfocitos T (124). Ante la infección primaria con un serotipo de los virus del dengue se genera un patrón linfocitario heterogéneo en el que se encuentran tanto los linfocitos T de memoria serotipo-específicos como los de reactividad cruzada. Ambos linfocitos juegan un papel importante en el desarrollo de la FHD/SCD y en la inmunopatogénesis de la enfermedad (4, 125).

Se ha observado que la respuesta es mayor contra el serotipo homólogo; sin embargo, después de una infección secundaria con uno de los virus del dengue los linfocitos T de memoria inducidos por la infección primaria muestran reactividad cruzada y proliferan rápidamente. Específicamente en Cuba, los estudios de Sierra y colaboradores muestran esta reactividad cruzada a 20 años de haber ocurrido la primo infección (115, 126, 127).

Las células T CD4+ y CD8+ de memoria son muy activas y de reactividad cruzada pudiendo contribuir con la patogénesis de la FHD/SCD. El desarrollo de anticuerpos que tienen reacción cruzada con el plasminógeno (debido a la similitud en una secuencia de 20 aminoácidos con la glicoproteína E del DEN y una familia de factores coagulantes), pueden tener relación con la causa de hemorragia en la FHD (128).

Una mayor destrucción de las plaquetas o una disminución en su producción pudieran ser la causa de la trombocitopenia. En este sentido, se ha detectado la presencia de complejos virus-anticuerpos en la superficie de las plaquetas de pacientes con FHD, lo que sugiere que la respuesta inmune desempeña algún papel en la destrucción de las plaquetas. En este sentido, se ha encontrado la presencia de anticuerpos IgM de reactividad cruzada contra las plaquetas en los sueros de pacientes con FHD que podrían causar lisis de estas y por tanto estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad (129).

La activación del complemento también pudiera estar involucrada en la patogénesis de la filtración capilar en la FHD. La cascada del complemento podría ser activada por los

complejos inmunes formados por los virus circulantes y los anticuerpos específicos contra estos (130).

Otros autores han considerado que las formas graves de la enfermedad son el resultado de la infección por cepas muy virulentas de los virus del dengue (131, 132). Tales cepas podrían ser originadas en circunstancias de hiperendemicidad y circulación concomitante de múltiples serotipos virales y presentar mutaciones producto de sucesivas replicaciones en hospederos filogenéticamente tan distintos, como hombre y artrópodo. Según esta hipótesis no sería necesaria una infección previa para desarrollar FHD/SCD. En tal sentido existen ejemplos, aunque escasos, de epidemias severas ocurridas en poblaciones primo infectadas (131, 132). Ciertamente, existen algunas evidencias que apuntan hacia la existencia de cepas con mayor o menor potencial virulento. Un ejemplo es la cepa DEN-2 (Genotipo Americano) que provocó la epidemia de Iquitos, Perú en 1995 en una población inmune a DEN-1 y no se reportó un solo caso de DHF (133, 134). Por el contrario la epidemia Cubana de 1981, provocada igualmente por una cepa de DEN-2, pero Genotipo Asiático, en el mismo contexto inmunológico (personas inmunes a DEN-1) ocasionó una epidemia extremadamente severa (8).

Leitmeyer y colaboradores (62) encontraron diferencias estructurales entre cepas de DEN-2 de origen asiático y americano que pueden tener influencia sobre la virulencia y/o la patogenicidad de estas cepas. De acuerdo con las evidencias encontradas por estos autores (62), los determinantes principales de la severidad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E que puede afectar la unión a la célula hospedera; los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la región 5' no codificadora, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción; y en los primeros 300 nucleótidos de la región no codificadora 3', que pudieran participar en la regulación de la replicación viral.

De esta forma se postula que los virus del dengue del genotipo Americano podrían replicarse pobremente *in vivo* produciendo una enfermedad poco severa. Otros estudios apoyan esta hipótesis comprobando que un cambio en el aminoácido 390 de la proteína E afecta la neurovirulencia en ratones (135). Adicionalmente, Pryor y colaboradores (136) construyeron un DEN-2 recombinante con sustituciones en el residuo 390 de dicha

proteína. La sustitución de N (genotipo Asiático) por D (genotipo Americano) resultó en una disminución en la habilidad para replicarse en monocitos humanos. Por otra parte, empleando un clon infeccioso de dengue, en el cual se sustituyó el aminoácido 390 se comprobó que dicho cambio tenía influencia sobre la replicación viral en monocitos humanos y células dendríticas (137).

Otros estudios recientes sugieren que hay diferencias en la habilidad de algunas cepas virales para unirse e infectar células diana y en su capacidad para generar una mayor progenie viral *in vitro* (138). Por otra parte, una mayor carga viral en las etapas iniciales de la infección viene aparejado con las formas más severas de la enfermedad, lo que podría estar dado por factores virales (139).

Estos resultados sugieren un papel esencial para la virulencia en la patogénesis de la FHD/SCD. Sin embargo, la falta de un modelo animal apropiado para reproducir la enfermedad del dengue ha dificultado un conocimiento más profundo de los efectos de la virulencia *in vivo*.

Actualmente, la mayoría de los autores acepta que existe una vinculación de muchos factores de riesgo donde se involucran los dependientes del hospedero, el vector, los factores epidemiológicos y ecológicos. Sin embargo, desde 1987 ya había sido planteada por Kourí y colaboradores la denominada hipótesis integral (8). En el citado artículo, tomando en cuenta la experiencia Cubana en FHD, así como las observaciones de otros países afectados por la enfermedad, se le da un carácter multifactorial al desarrollo de la forma grave de esta enfermedad.

Poco se sabe aún acerca de qué tipo de hospedero y cuáles factores virus específicos, determinan por qué ciertos individuos solamente desarrollan FD mientras que otros FHD. Los factores de riesgo individuales tales como el sexo, la raza, la edad, estado nutricional, genético, las enfermedades crónicas como asma, diabetes y anemia drepanocítica hacen la enfermedad más frecuente en ciertos grupos poblacionales (58, 140, 141).

## **II.10. Diagnóstico de dengue**

### **II.10.1. Muestras utilizadas en el diagnóstico**

Para el aislamiento del agente causal del dengue se recomienda la toma de muestras de sangre durante el período febril y sobre todo antes del quinto día de comienzo de la enfermedad. En los casos fallecidos, se pueden utilizar muestras frescas de tejidos (hígado, bazo, nódulos linfáticos, sangre del ventrículo) las que son homogenizadas y procesadas según el sistema diagnóstico a emplear. Además se pueden utilizar muestras de tejidos fijadas en formalina e incluidas en parafina para la detección de antígenos virales, con la utilización de métodos inmunohistoquímicos o la detección del genoma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) (142-144).

Para el diagnóstico serológico a partir de la determinación de anticuerpos IgM, se recomienda la toma de la muestra de suero después del quinto día de comienzo de los síntomas. Mientras que para determinar el incremento en título o la seroconversión de anticuerpos IgG se utilizan muestras pareadas de sueros (tomadas en los primeros siete días de comienzo de los síntomas y 14 a 21 días después). Adicionalmente, se ha demostrado la utilidad de las muestras de sangre seca sobre el papel de filtro, tanto para la detección de anticuerpos IgM como IgG específicos contra los virus del dengue; así como la utilidad de la saliva para la detección de dichos anticuerpos, IgM e IgG (145).

### **II.10.2. Aislamiento viral**

Existen varios sistemas disponibles para el aislamiento viral: los ratones recién nacidos inoculados por la vía intracerebral, en los que la infección produce parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central; los cultivos celulares, tanto líneas de mamíferos (Vero, LLCMK2 y BHK-21) como de mosquitos (C6/36 HT, AP-61) siendo estas últimas las más sensibles y por último los mosquitos del género *Aedes albopictus* y *Toxorhynchites amboinensis* han demostrado ser de gran utilidad en el aislamiento de estos agentes. Los cultivos celulares de mosquitos son el sistema de elección para diagnóstico de rutina del dengue, por su adecuada sensibilidad y la posibilidad de procesar un elevado número de muestras a relativamente bajo costo (143).

### **II.10.3. Identificación viral**

Para la identificación viral se utiliza la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Henchal y colaboradores (146) han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos de grupo (*Flavivirus*), complejo (dengue), subcomplejo y tipo. La identificación en la siembra primaria es en algunos casos imposible, por lo que se necesitan uno o dos pases en el mismo sistema celular con el objetivo de incrementar la concentración viral.

La utilización de un anticuerpo policlonal (líquido ascítico hiperinmune de ratón o un suero humano de alto título de anticuerpos contra los virus del dengue) permite realizar un pesquisaje inicial para detectar las muestras positivas mediante IFI. Un segundo ensayo, con la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los cuatro serotipos del virus, permite la tipificación (147).

#### **II.10.4. Diagnóstico serológico**

El diagnóstico serológico del dengue es complicado, por causa de los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los cuatro serotipos y los *Flavivirus* en general. Por otra parte, considerando los elevados niveles de anticuerpos observados en los individuos que desarrollan una infección de tipo secundaria, el estudio de monosueros tomados en la fase aguda o en la convalescente temprana puede ser de utilidad como criterio de caso probable o presuntivo de dengue (142).

Los virus del dengue son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ganso; esto ha permitido que la técnica de inhibición de la hemaglutinación sea aplicada en el estudio serológico de monosueros y pares de sueros, con la utilización de antígenos de los cuatro serotipos producidos en cerebro de ratón lactante y extraídos mediante el método de sacarosa-acetona (148).

La prueba de neutralización por reducción de placas es un ensayo sensible y específico, que permite la detección de anticuerpos neutralizantes. Se ha planteado que en un individuo con una infección de tipo secundaria, el título de anticuerpos neutralizantes al primer serotipo que produjo la infección primaria, es anamnesticamente mayor que contra el serotipo infectante durante la segunda infección (“fenómeno del pecado original”). La prueba de neutralización por reducción de placas es considerada de gran utilidad en estudios

seroepidemiológicos por su elevada especificidad, lo que permite identificar el serotipo causante de una infección pasada. También ha sido utilizada en la identificación de los virus del dengue (142).

En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas ELISA para el diagnóstico del dengue. Estos sistemas son económicos, rápidos, fáciles de ejecutar y muestran a su vez elevada sensibilidad y especificidad cruzada, por lo que son gran utilidad como pruebas de “tamizaje”. Todas estas características permiten que puedan ser utilizados para determinar la presencia de anticuerpos totales anti-flavivirus en estudios seroepidemiológicos y en el diagnóstico serológico (149-151).

El ELISA de captura de IgM ha constituido uno de los sistemas más importantes y útiles para el diagnóstico y la vigilancia del dengue. Los anticuerpos IgM anti-dengue se producen transitoriamente durante las infecciones primaria y secundaria y su detección indica una infección activa o reciente por dengue. La detección de anticuerpos IgM se ha convertido en una herramienta de incalculable valor para la vigilancia del dengue y resulta el método de elección en la mayoría de los laboratorios (142, 144).

Recientemente se ha desarrollado un sistema visual de tira reactiva que se basa en una cromatografía (PanBio, Australia), el cual permite la detección de anticuerpos IgM en menos de 5 min. Dicho sistema muestra niveles de sensibilidad y especificidad de 99 y 96%, respectivamente (152-154).

Otro sistema que ha sido ampliamente utilizado en el diagnóstico es el ELISA de Inhibición, que permite detectar la presencia de inmunoglobulinas totales contra los virus del dengue, así como determinar los títulos de anticuerpos (149, 155).

#### **II.10.5. Detección molecular**

La hibridación de ácidos nucleicos ha sido aplicada tanto en el diagnóstico como en los estudios epidemiológicos (156). Por ejemplo se han realizado ensayos a partir del ARN extraído de células infectadas con el virus o de homogenizados de mosquitos *Aedes albopictus* infectados, utilizando para la hibridación sondas específicas biotinizadas o

radiactivas marcadas con  $^{32}\text{P}$ . La detección utilizando sondas biotiniladas es menos sensible que la que utiliza sondas radiactivas y no es de gran utilidad en la identificación directa del virus en muestras clínicas, a menos que se haya realizado una amplificación previa del material genético (156).

La PCR ha sido ampliamente difundida y utilizada en el diagnóstico del dengue debido a la rapidez con que se obtienen los resultados, pudiéndose detectar el ácido nucleico viral de forma directa en muestras de suero, células infectadas, sobrenadantes celulares y en larvas infectadas, así como en muestras de tejidos frescos y embebidas en parafina tomadas de fallecidos por FHD (24, 157). A su vez, tiene como ventaja que permite determinar la presencia de infecciones concurrentes por dos serotipos (158). Lanciotti y colaboradores (159), desarrollaron una PCR rápida con la utilización de cebadores consenso localizados en los genes C y prM. La primera PCR produce un fragmento de 511 pb, la cual es seguida de una PCR anidada utilizando cebadores específicos para cada serotipo.

La PCR también es extremadamente útil en el estudio genómico de cepas, ya sea a través del análisis de los patrones obtenidos luego de la digestión con enzimas de restricción o mediante la secuenciación nucleotídica de los productos de PCR (23, 160, 161).

#### **II.10.6. Detección antigénica**

Un método alternativo para el diagnóstico rápido del dengue es la detección directa del antígeno viral en el suero del paciente o en muestras de tejidos de fallecidos, con la utilización de sistemas inmunoenzimáticos y técnicas inmunohistoquímicas. En general los sistemas inmunoenzimáticos diseñados para detección de antígeno viral muestran baja sensibilidad, sobre todo cuando se estudian muestras procedentes de individuos que sufren una segunda infección por dengue (162). En este sentido, Young y colaboradores (163) sugirieron que la detección de la proteína NS1 en suero de los pacientes pudiera servir como un marcador para medir la viremia.

## **Genética evolutiva de los virus del dengue**

### **II.10.1. Definición de Evolución**

Un cambio evolutivo es un proceso temporal derivado del éxito reproductivo diferencial de los individuos y su fenotipo heredado, que altera el genotipo correspondiente entre las distintas generaciones (164). La evolución es por tanto algo inevitable en poblaciones de entidades que: a) se auto-repican y b) exhiben variaciones heredables en el fenotipo que afectan la reproducción (164).

Los virus del dengue, que se replican de manera autónoma y que pueden exhibir profundos grados de variación fenotípica con base genotípica, están por supuesto sometidos a las leyes de la evolución. Los virus de hecho, usan los cambios evolutivos como estrategias de supervivencia a corto y largo plazo, lo que les permite “escapar” de la respuesta antiviral del hospedero, frecuentemente a través de condiciones impredecibles. Sin embargo, esto no quiere decir que los virus obligatoriamente tienen que evolucionar rápidamente para existir. Muchos virus cambian muy poco entre generaciones debido a una baja frecuencia de mutación (68).

### **II.10.2. Proceso de evolución**

#### **II.10.2.1. Variación natural**

La variación que ocurre naturalmente como diversidad fenotípica derivada genéticamente es un requisito evolutivo característico de las poblaciones. Esta variación tiene muchas bases pero las dos causas primarias de la diversidad genética viral son las mutaciones (incluyendo el intercambio genético) y el tamaño poblacional. En la medida en que las dos aumentan, también lo hace el espectro de características disponibles para ser heredadas por los descendientes virales (164).

La magnitud de esta variación difiere extraordinariamente entre los tipos virales. Muchos virus ARN, por ejemplo los virus del dengue, existen como quasiespecies, que son con frecuencia una amplia distribución de genomas virales mutantes, existiendo como una

población dentro de un hospedero simple (165). Para los virus del dengue se han estimado tasas de sustitución nucleotídica en un rango de  $4.55 \times 10^{-4}$  a  $11.58 \times 10^{-4}$  sustituciones por sitio por año (166), lo que se traduce en una elevada heterogeneidad genética observable en aislamientos del virus.

#### **II.10.2.2. Selección Natural**

La selección natural es una fuerza discriminante que permite la producción y supervivencia de una progenie a partir de una población parental. Esta selectividad es manejada por condiciones bióticas y abióticas específicas, bajo las cuales existe la población. Los fenotipos heredables apropiados para la reproducción, bajo estas condiciones, son los “permitidos” para ser transmitidos a una generación subsiguiente.

Se acepta que la selección natural conduce a algún tipo de cambio evolutivo denominado adaptativo. Adaptación se refiere tanto al proceso a través del cual la población se convierte en apropiada para la supervivencia y reproducción en un ambiente dado, así como al carácter fenotípico actual que aparece por la vía de la selección natural y que concede esta habilidad. La palabra *adecuación* (del inglés *fitness*), es el término relativo que describe la contribución genética que un individuo hace a la generación subsiguiente, comparada con la hecha por otros individuos de la misma población. La adecuación se basa en la selección natural y se incrementa con la adaptación (164, 167).

#### **II.10.2.3. Deriva genética**

Los cambios en la constitución genética a través del tiempo (Ej. Cambio evolutivo) no necesitan ser adaptativos o conducidos por la selección natural. Las fluctuaciones en el tamaño poblacional ya sean de forma aleatoria o predecible que se traducen en un éxito reproductivo diferencial obviamente pueden tener influencia sobre futuras frecuencias genéticas. Una deriva genética (del inglés *genetic drift*) ocurre como resultado de cambios estocásticos en el tamaño poblacional independientemente de los rasgos reproductivos (164).

Los virus pueden ser particularmente susceptibles a los efectos de las derivas genéticas ya que las transmisiones hospedero-hospedero frecuentemente incluyen cuellos de botella (del inglés *bottlenecks*) por variaciones del tamaño poblacional que ocurren independientemente de la adecuación viral (168). En otras palabras, un tipo viral específico puede estar muy bien adaptado para replicarse en un medio particular pero debido a eventos ocurridos por casualidad puede impedirse su supervivencia o reproducción. El resultado puede ser que un virus de menor capacidad reproductiva puede sobrevivir a pesar de que disminuya la adecuación de esta población, ya que estará menos adaptada al medio. Este fenómeno está bien ejemplificado por virus que dependen de la ruta de transmisión. Todo esto ocurre debido a que estamos en presencia de un fenómeno estadístico elemental conocido como error de muestreo (164). Durante un evento de transmisión sólo unas pocas partículas podrían ser seleccionadas. El resultado es una nueva población establecida en un medio similar pero con miembros de una pequeña y menos adecuada clase de virus (164).

### **II.10.3. Diversificación viral**

Los virus existentes se han formado a través de una extraordinaria secuencia de divergencias y cambios evolutivos, que se ejemplifica mediante la inmensa variedad que observamos en morfologías, estrategias de replicación, rango de hospederos, tolerancia al medio ambiente y estrategias de transmisión (164).

La diversidad genética es básicamente generada por *mutaciones* o *recombinaciones*. El número de mutaciones virales que ocurre por unidad de tiempo es ampliamente determinado por dos factores fundamentales: la fidelidad de la polimerasa y el tiempo de generación. La fidelidad de la polimerasa difiere grandemente entre los ácidos nucleicos. Las ARN polimerasas y las reverso transcriptasas carecen de mecanismos correctores, lo que resulta en un mayor número de errores por evento de copia (169, 170).

La recombinación se define como un proceso mediante el cual se intercambia material genético, que trae como resultado la formación de un descendiente de ácido nucleico compuesto de material de dos o más ácidos nucleicos parentales. La recombinación es también una fuente importante de variación genética, sin embargo esta última está

frecuentemente asociada con divergencias rápidas. La recombinación entre virus puede ocurrir solamente durante la ocupación simultánea de un hospedero simple (164). Con relación a la importancia de la recombinación en la evolución viral, hay muchos aspectos aún desconocidos que son objeto de profundas investigaciones.

Un aspecto importante en la evolución de los virus ARN transmitidos por artrópodos es que debido a restricciones intrínsecas asociadas con la replicación dual en mamíferos y hospederos invertebrados, estos virus evolucionan más lentamente que los virus ARN transmitidos por otras rutas (171). Sin embargo, aunque esta teoría es comúnmente expuesta, la evidencia para soportarla es muy ambigua. Por ejemplo, los estudios filogenéticos a larga escala revelan que los arbovirus tienen velocidades de sustitución nucleotídica significativamente menor que otros virus ARN y están sometidos a una menor presión selectiva positiva sobre sus genes estructurales (171).

En contraste, el análisis de los hospederos individuales (humanos y mosquitos) infectados con los virus del dengue ha mostrado niveles de variaciones genéticas sinónimas y no sinónimas comparables con otros virus ARN altamente variables (165). Intentando resolver esta discrepancia Holmes diseñó un estudio comparativo a partir de tres grupos de datos que representaban distintos niveles de divergencia evolutiva: a) poblaciones de virus presentes dentro de un único hospedero humano b) poblaciones de virus epidemiológicamente relacionados y c) poblaciones representativas de la extensión completa de diversidad genética de dos de los serotipos de dengue.

El resultado de esta comparación demostró que como promedio un 75% de las mutaciones observadas a nivel intra-hospedero eran no sinónimas. En contraste, al nivel inter-hospedero en poblaciones virales epidemiológicamente relacionadas era como promedio de un 14 %. Esto indica que existe gran diferencia entre las presiones selectivas que son impuestas sobre las poblaciones virales a corto y a largo plazo. Existen evidencias que prueban que la mayoría de estas mutaciones son letales. Al analizar estos sitios de mutación comparando grandes bases de datos de virus del dengue relacionados se puede apreciar que la mayoría de los cambios se encuentran en regiones usualmente conservadas para una larga lista de cepas de virus del dengue, lo que indica que estos sitios están sometidos a

una mayor restricción selectiva y que por tanto la selección purificadora a largo plazo, elimina estas variaciones no sinónimas (172).

Es muy probable que los arbovirus de manera general, sean capaces de producir más mutaciones letales que otros virus ARN que se replican solamente en especies de hospederos filogenéticamente similares (172).

#### **II.10.4. Respuesta a la selección**

La selección se manifiesta como supervivencia y reproducción diferencial de individuos que compiten por una fuente reproductiva limitada. Los individuos que son capaces de producir descendientes a una velocidad exageradamente mayor que otros que se replican simultáneamente son considerados de mayor *adecuación* (164, 167).

#### **II.10.5. Adaptación**

La adaptación no es más que un carácter que aparece por la vía de la selección natural y por lo tanto confiere a su portador la habilidad de tener éxito genéticamente en un medio ambiente específico (173). La adaptación puede permitirle la entrada a un ambiente reproductivo inusual. Esto inicialmente puede sacarlo de competencia, ya que este virus se presentará en su nuevo ambiente, con una densidad poblacional baja. Como resultado aparecerá una nueva población (o eventualmente muchas poblaciones) con un estilo replicación completamente diferente. Esto ocurre frecuentemente cuando los virus cruzan barreras de tejidos, hospederos o vectores (164).

#### **II.10.6. Aspectos relacionados con la evolución de los virus del dengue**

En los virus del dengue, esta variabilidad genética se manifiesta indiscutiblemente, en la existencia de cuatro serotipos antigénicamente diferentes, como ya se mencionó en el tópico de origen de los virus del dengue. Previo a que los datos de secuenciación nucleotídica estuvieran disponibles, ya se conocía que también existían variaciones genéticas dentro de cada serotipo (174, 175). Sin embargo, el análisis comparativo de secuencias de genes ha permitido estudiar la estructura genética de poblaciones de los virus

del dengue y revelar los procesos que gobiernan la evolución viral. Ricco-Hesse y colaboradores (61), demostraron la variación intra-serotipo estudiando un fragmento de 240 pares de bases (pb) correspondientes a la región de unión de los genes E/NS1, el cual permitió determinar la diversidad genética existente para los DEN-1 y DEN-2. Mediante dicho análisis, se estableció la existencia de “genotipos”, definidos arbitrariamente como “un grupo de virus del dengue que tenían menos de un 6% de divergencia en sus secuencias nucleotídicas”.

Actualmente, los estudios genotípicos han sido muy expandidos, aunque la mayoría de los autores utilizan como marcador filogenético la secuencia del gen E (aproximadamente 1485 pb). La extensión de la diversidad genética dentro de los virus del dengue ha sido estudiada con más rigor para el DEN-2. La variación genética observada dentro del DEN-2 es típica de los virus del dengue de forma general, ya que los genotipos de manera frecuente difieren de acuerdo a su distribución geográfica (74).

En particular, dos de los genotipos de DEN-2 se encuentran únicamente en poblaciones Asiáticas (Asiático 1 y Asiático 2), mientras que el genotipo denominado Cosmopolita se distribuye prácticamente por todo el mundo Tropical. Este genotipo que alberga virus tomados de localizaciones geográficas muy diferentes, es un fuerte indicador de cuán lejos un organismo infectado y el vector pueden propagar el virus (68).

Una pregunta de mayor importancia para los biólogos que estudian la evolución es si la diferencia en cuanto a distribución geográfica de cada uno de los genotipos de los virus del dengue tiene alguna clase de base selectiva; es decir, cabe preguntarse si algunos genotipos podrían tener un mayor “potencial virulento” que otros y por tanto, serían capaces de agravar un brote en una localización geográfica determinada. Twiddy y colaboradores (75), encontraron selección positiva esporádica en secuencias del gen E, para DEN-3 y DEN-4 y algunos genotipos de DEN-2, no así para el DEN-1.

Teniendo en cuenta que la proteína E es el mayor determinante antigénico de los virus del dengue, no es sorprendente encontrar que la mayoría de los sitios seleccionados están localizados en zonas de epítopes de células T o B, sugiriendo que la selección está

relacionada con la evasión al sistema inmune. Por otra parte es de notar que las relaciones de sustituciones no sinónimas/sustituciones sinónimas calculadas para cepas selváticas y humanas de DEN-2 son similares y generalmente muy bajas (75). Esto implica que no hubo grandes cambios en el gen E o que no hubo grandes adaptaciones hospedero-específicas mientras el virus cambió su ciclo de transmisión de mono a humano (68).

Consecuentemente, el hecho de que el genotipo Cosmopolita muestre la mayor presión selectiva al compararse con el resto de los genotipos DEN-2 pudiera asociarse con la habilidad de dispersión de este genotipo. Más aún, los virus correspondientes a los genotipos Cosmopolita y Americano tienen una mutación característica en el aminoácido 390 del gen E que ha sido identificado como un determinante de virulencia en estudios experimentales. Por lo tanto, estos estudios tentativamente implican que los genotipos virales pueden diferir en su adecuación (62).

Otra posible evidencia de la acción de la selección natural en los virus del dengue es la extinción y reemplazo de cepas. Por ejemplo, en Tailandia aparentemente hubo un cambio de cepa de DEN-2 entre 1980 y 1987 (176) y de DEN-3 durante los noventa (42, 43). Tal reemplazo de cepas podría ser esperado si los virus en cuestión difieren en adecuación, aunque esto no ha sido demostrado formalmente. Ciertamente, este patrón de extinción y reemplazo podría ser explicado por procesos enteramente estocásticos, tales como "cuellos de botella" poblacionales seguidos de una disminución en el número de mosquitos durante los años inter-epidémicos (68).

Las variaciones a gran escala de los tamaños poblacionales del vector también podrían significar que las derivas genéticas juegan un papel importante en la evolución de los virus del dengue, por tanto el destino de un virus en una población no siempre reflejará su adecuación. Cualquiera que sea el mecanismo, es muy probable que la extinción de cepas haya sido de una ocurrencia regular en la evolución viral, especialmente en momentos donde la cantidad de hospederos o mosquitos susceptibles fuera baja (68).

Con el conocimiento de que el mosquito *Aedes aegypti* es capaz de tener múltiples actos de alimentación, unido a las evidencias existentes de infecciones mixtas, no es sorprendente que exista recombinación para los virus del dengue.

La recombinación parece ocurrir a través de un mecanismo de selección-copia (del inglés copy-choice), en el cual la polimerasa cambia de una molécula parental a otra durante el proceso de replicación (177). Aunque este fenómeno ha sido documentado para los cuatro serotipos, no se ha encontrado recombinación inter-serotipo, como pudiera esperarse de acuerdo a su extensa divergencia genética (178-182).

No obstante, está menos esclarecida la importancia que dicha recombinación podría tener en términos de evolución a largo plazo. Aunque la recombinación podría contribuir a la eliminación de alelos letales, los niveles de recombinación relativamente bajos, observados hasta la fecha sugieren que este fenómeno es de ocurrencia esporádica, a merced de oportunidades ecológicas y no un rasgo selectivamente determinado que incrementa la adecuación viral (68).

## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.1. Aislamiento viral**

Para el aislamiento viral se aplicó el método de centrifugación rápida utilizando una línea celular de *Aedes albopictus* (C6/36 HT). Las células fueron crecidas en placas plásticas de 24 pozos, a 33 °C, en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor a 56°C por una hora (STFI), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de una solución de glutamina 200 mM. Cuando se alcanzó la confluencia de las monocapas celulares, se retiró el medio de cultivo y se inocularon las muestras correspondientes (183).

Se utilizaron muestras de suero de pacientes de dengue en fase aguda de la enfermedad o piezas de tejido obtenidas durante la autopsia de fallecidos. Se utilizaron 100 µL de cada suero previamente diluido (1/30) en MEM ó 100 µL del sobrenadante obtenido luego de la maceración y resuspensión de las piezas de tejido al 10% en medio MEM conteniendo 500 unidades de penicilina y 500 µg de estreptomicina. Una vez añadido el inóculo correspondiente la placa fue centrifugada durante una hora a 1000 g a 33°C, los inóculos fueron descartados y se agregó 1mL de MEM conteniendo 2% de STFI.

Las células inoculadas se mantuvieron a 33 °C y se observaron diariamente en búsqueda de efecto citopático (ECP). Si se observaba ECP o en caso contrario al cabo de 11 días de inoculadas, las células fueron fijadas para detección de antígeno de dengue mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando un líquido ascítico hiperinmune contra el DEN-2. En los casos positivos se realizó una segunda IFI con el objetivo de realizar la tipificación utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra los cuatro serotipos del dengue (146), donados gentilmente por el Dr. D. Gubler del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, EUA.

## **III.2. Virus**

### **III.2.1. Aislamientos virales de DEN-2 estudiados**

Se estudiaron 20 aislamientos virales obtenidos en diferentes momentos (inicio, medio y final) de la epidemia de Santiago de Cuba del año 1997. De esta forma se pudo contar aislamientos de la fase temprana de la epidemia, donde se habían confirmado muy pocos casos y las tasas de mortalidad eran muy bajas, así como, de la etapa de mayor número de casos confirmados y de la etapa final, donde se observaron tasas de mortalidad muy altas. Dieciocho de estos aislamientos fueron obtenidos a partir de sueros colectados de pacientes en fase aguda de la enfermedad y los dos restantes se obtuvieron a partir de piezas de bazo obtenidas durante la autopsia de fallecidos. En los 20 aislamientos se estudió el gen que codifica para la proteína E del virus y en 6 de ellos se estudió el genoma viral completo. En la Tabla 1 se muestran los datos correspondientes a estos aislamientos.

**Tabla 1. Aislamientos de DEN-2 estudiados mediante secuenciación nucleotídica**

Aislamientos	Fecha de comienzo de la fiebre	Historial de pases (P)	Clasificación Clínica	Tipo de infección
<b>13/97</b>	<b>30/1/97</b>	<b>2P C6/36 HT</b>	<b>FD</b>	<b>Primaria</b>
<b>58/97</b>	<b>5/2/97</b>	<b>2P C6/36 HT</b>	<b>FD</b>	<b>Primaria</b>
70a/97	5/2/97	1P C6/36 HT	FD	Secundaria
23/97	25/5/97	2P C6/36 HT	FD	Secundaria
28/97	25/5/97	2P C6/36 HT	FD	-
30/97	25/5/97	1P C6/36 HT	FHD	Secundaria
32/97	25/5/97	2P C6/36 HT	FD	-
46/97	3/6/97	1P C6/36 HT	FD	Primaria
<b>89/97*</b>	<b>1/6/97</b>	<b>2P C6/36 HT</b>	<b>FHD/SCD</b>	<b>Secundaria</b>
<b>115/97</b>	<b>10/6/97</b>	<b>2P C6/36 HT</b>	<b>FD</b>	<b>-</b>
118/97	10/6/97	1P C6/36 HT	FD	Secundaria
120/97	10/6/97	1P C6/36 HT	FD	Secundaria
137/97	12/6/97	1P C6/36 HT	FHD	Secundaria
133/97	12/6/97	1P C6/36 HT	FD	Secundaria
163/97	12/6/97	1P C6/36 HT	FD	Secundaria
<b>165/97</b>	<b>12/6/97</b>	<b>1P C6/36 HT</b>	<b>FHD</b>	<b>Secundaria</b>
166/97	12/6/97	1P C6/36 HT	FHD	Secundaria
187/97	27/6/97	1P C6/36 HT	FD	-
188/97	27/6/97	1P C6/36 HT	FD	-
<b>205/97/*</b>	<b>1/7/97</b>	<b>1P C6/36 HT</b>	<b>FHD/SCD</b>	<b>Secundaria</b>

\*Aislamientos realizados a partir de piezas de bazo de fallecidos.  
 En negritas los aislamientos empleados para el estudio del genoma completo.

### III.2.2. Aislamientos virales de DEN-3

Para estudiar los virus aislados durante el brote del 2000 y la epidemia 2001-2002 ocurridos en Ciudad de la Habana y compararlos con el primer aislamiento de DEN-3 aislado durante la introducción de este serotipo en Nicaragua en el año 1994; se escogieron tres aislamientos cubanos y un aislamiento nicaragüense, todos obtenidos en el laboratorio Arbovirus del IPK. En la Tabla 2 se muestran los datos correspondientes.

**Tabla 2. Descripción de los aislamientos de DEN-3 empleados en la caracterización molecular**

Aislamientos	Epidemia	Fecha de comienzo de la fiebre	Historial de pases	Clasificación Clínica
116/00	Cuba 2000	11/10/00	1P C6/36 HT	FD
580/01*	Cuba 2001-2002	22/11/01	1P C6/36 HT	FHD/SCD
21/02	Cuba 2001-2002	20/01/02	1P C6/36 HT	FD
24/94	Nicaragua 1994	27/10/94	3P C6/36 HT	FHD

\*Aislamiento realizado a partir de una pieza de bazo colectada de un fallecido.

### III.3. Extracción de ARN

El ARN viral fue extraído a partir de 200  $\mu$ L de sobrenadante de células C6/36 HT infectadas con los virus correspondientes utilizando un estuche comercial para la extracción del ARN total (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Al sobrenadante de células infectadas se le añadió 600  $\mu$ L de solución desnaturalizante y 60  $\mu$ L de Acetato de Sodio. Luego de una agitación suave se añadió 600  $\mu$ L de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, se agitó la mezcla suavemente por inversión del tubo y se mantuvo en hielo por 15 min. Luego de centrifugar 10 min a 12 000 g, 4°C se tomó la fase acuosa y se precipitó el ARN presente en esta, añadiendo Isopropanol a una relación 1:1 (V/V) a -20 °C, durante 18 horas. El ARN se obtuvo por centrifugación a 12 000 g a 4°C y se lavó con Etanol frío preparado al 70%. El tubo que contenía el precipitado de ARN se mantuvo abierto por unos minutos en el gabinete de seguridad, una vez que el ARN estuvo seco, se resuspendió en 22  $\mu$ L de agua destilada libre de nucleasas.

### **III.4. Transcripción Reversa (RT), siglas en inglés**

La reacción de RT se llevó a cabo en un volumen total de 30  $\mu\text{L}$ . Se mezclaron 11  $\mu\text{L}$  de ARN y 5  $\mu\text{L}$  del cebador correspondiente (Den-2-3utr-1r para DEN-2 y Den-3-RT para DEN-3) a una concentración de 10 pmol/ $\mu\text{L}$ . La mezcla se calentó a 95°C por 2 min y se enfrió en hielo. Luego se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM), 3  $\mu\text{L}$  de DTT (0.1 mM), 1  $\mu\text{L}$  de RNAsin (40 unidades), 6  $\mu\text{L}$  de tampón 5x y 1  $\mu\text{L}$  de Transcriptasa Reversa Superscript II (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). La mezcla fue incubada a 43°C por 3 horas y posteriormente la enzima fue inactivada a 65 °C por 10 min.

### **III.5. Amplificación y secuenciación nucleotídica del gen E de aislamientos cubanos de DEN-2**

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los nucleótidos comprendidos entre la posición 701 del gen que codifica para la proteína PrM y 2545 en el gen que codifica para la proteína NS1. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 60  $\mu\text{L}$ , utilizándose 3  $\mu\text{L}$  del ADN copia obtenido mediante RT, 2.5  $\mu\text{L}$  de cada cebador (Den2-PrM-1f y Den2-ns1-1r) a una concentración de 10 pmol/ $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  del tampón de reacción 10x, 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs (10 mM) y 0.5  $\mu\text{L}$  de Taq ADN polimerasa (Sigma). Cada reacción de amplificación transcurrió en 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C (40 s), hibridación a 55°C (1 min) y extensión a 72°C (1 min.). Se realizó una extensión final a 72 °C por 10 min.

En la Tabla 3 se listan los cebadores utilizados para la amplificación y/o secuencia nucleotídica. Para su diseño se emplearon las secuencias nucleotídicas de DEN-2 publicadas en el Genbank.

**Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación y la secuencia nucleotídica del gen E de cepas de DEN-2**

Reacción	Cebadores*	Secuencia (5' → 3')
RT	Den2-3'utr-1r	AGAACCTGTTGATTC
PCR	Den2-PrM-1f Den2-ns1-1r	GAGAAAAAAGATCAGTGGCACTCG GTTTTGAAGGGGATTCTGGTTGGAAGCTT
Secuenciación	Den2s-1f Den2s-351f Den2s-701f Den2s-1051f Den2s-1401f Den2s-1751f Den2s-2101f Den2s-2451f Den2s-2674r Den2s-2324r Den2s-1974r Den2s-1624r Den2s-1274r Den2s-924r Den2s-574r Den2s-224r	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC GAAAGAGATTGGAAGGATGC GAGAAAAAAGATCAGTGGCA CCAACATTGGATTTTGAAGCTG AGGAAAACATGGCAAGGAAA TGTCATCAGGAACTTACTG CTCAACTGGTTTAAGAAAGG TAAAGAACTGAAATGTGGCAG TTACCTCATTTTCTGATAGAAT ATGATGACTCCTATGAGGAT GTGTCTTTTTTCCAAATCCAT TTGATCCTTGTGTGTCCGC ATGCCTCCCTTTCCAAATAA AGCGACAGCTGTCAGTAAG CACACAATTCACCAAGATCT GGTCCTCGTCCTTGCAG

\* Los nombres de los cebadores con una f indican orientación en el sentido del genoma y con una r indican orientación complementaria y reversa. La numeración está basada en la secuencia de la cepa de DEN-2, Jamaica 1409 (No. de acceso al GenBank: M20558).

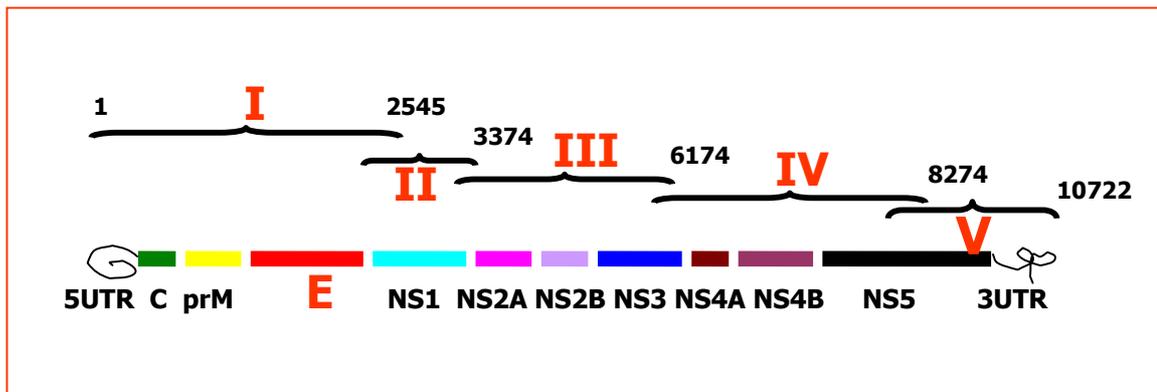
Los productos de PCR obtenidos fueron purificados empleando un estuche comercial de purificación (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA). Posteriormente, se realizó la secuenciación directa de dichos productos utilizando un secuenciador automático de ADN ABI377 (Applied Biosystems, EUA). Se empleó un estuche de reactivos producido para este secuenciador, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de secuenciación se prepararon mezclas conteniendo 2 µL del producto de PCR purificado, 1 pmol del cebador correspondiente, 2 µL de la mezcla terminadora que contenía los cuatro dideoxinucleótidos marcados. La reacción transcurrió en 25 ciclos a 96°C (30 s), 50°C (60 s) y 60°C (4 min.). Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante columnas Centri-Sep (Applied Biosystems, EUA).

Posteriormente fueron secados mediante centrifugación al vacío y resuspendidos en el tampón adecuado para la corrida en el secuenciador.

Las secuencias consensos fueron obtenidas a partir del ensamblaje de las secuencias logradas con cada uno de los cebadores, para lo cual se utilizó el sistema MOLBIOL de la Universidad de Oxford. Las regiones donde solamente un cebador permitía la lectura de la secuencia fueron repetidas hasta lograr secuencias de calidad.

### **III.6. Amplificación y secuenciación nucleotídica del genoma viral completo de aislamientos cubanos de DEN-2**

Las PCR fueron realizadas en las mismas condiciones utilizadas para amplificar el gen E. En este caso se diseñaron cinco juegos de cebadores útiles para amplificar el genoma completo del virus, mediante cinco fragmentos solapados enumerados como (I, II, III, IV y V) (Figura 1). En la Tabla 4 se muestran los juegos de cebadores utilizados.



**Figura 1.** Esquema del diseño de cebadores para la amplificación por PCR del genoma viral completo de los aislamientos de DEN-2

**Tabla 4. Cebadores empleados en la amplificación del genoma viral completo de los aislamientos de DEN-2**

Reacción	Cebadores *	Posición	Secuencia (5' → 3')
RT	Den2-3'utr-1r	10707-10722	AGAACCTGTTGATTC
PCR I	Den2-5'utr-1f	1-28	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAG
	Den2-ns1-1r	2517-2545	GTTTTGAAGGGGATTCTGGTTGGAAGCTT
PCR II	Den2-8f	2451-2472	TAAAGAACTGAAATGTGGCAG
	Den2-53r	3356-3374	AGTGTGCAGGATCGGCAG
PCR III	Den2-10f	3151-3170	CCAAAAAATTTTGCCGGGC
	Den2-45r	6156-6174	TGCCACTCTGTAGGCCAA
PCR IV	Den2-18f	5951-5942	AACCTCTGGAAAATGATGAAG
	Den2-39r	8253-8274	AATCATGTTCACTGATGACAC
PCR V	Den2-24f	8051-8070	CACTCAGAGTCCTCAACTT
	Den2-3'utr-2r	10695-10722	AGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATT

\* Los nombres de cebadores con una f indican orientación en el sentido del genoma y con una r indican orientación complementaria y reversa. La numeración está basada en la secuencia de la cepa Jamaica 1409/83 (No. de acceso al GenBank: M20558).

Para la secuenciación nucleotídica se siguió el protocolo descrito previamente para el gen E y se utilizaron 62 cebadores diseñados tomando como base la secuencia nucleotídica de la cepa de DEN-2, Jamaica 1409/83 (No. de acceso al GenBank: M20558) (Tabla 5)

**Tabla 5. Cebadores utilizados para la secuenciación nucleotídica del genoma completo de las cepas de DEN-2**

Cebadores sentido	Secuencia (5' → 3')	Cebadores antisentido	Secuencia (5' → 3')
Den2s-1	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	Den2s-10724	AGAACCTGTTGATTCAACAG
Den2s-351	GAAAGAGATTGGAAGGATGC	2s-10374	CTTTTAACGTCCTTGGACG
Den2s-701	GAGAAAAAAGATCAGTGGCA	Den2s-10024	GGATCCACACCCTATTCC
Den2s-1051	CCAACATTGGATTTTGAAGCTG	Den2s-9674	TCGTTCCATCCTCTTGAAG
Den2s-1401	AGGAAAACATGGCAAGGAAA	Den2s-9324	TGGTGTGGTCTTTGCACA
Den2s-1751	TGTCATCAGGAACTTACTG	Den2s-8974	TTGCCTTGCCGAACTCCC
Den2s-2101	CTCAACTGGTTTAAGAAAGG	Den2s-8624	TGTTGTCCAAATGGAGTCG
Den2s-2451	TAAAGAACTGAAATGTGGCAG	Den2s-8274	AATCATGTTCACTGATGACAC
Den2s-2801	AGTCTCACAATCAGACCTTT	Den2s-7924	ATGTTGACATGGGGATGGG
Den2s-3151	CCAAAAAATTTGCCGGGC	Den2s-7574	GTTCTCTTCTTGTGTTTGT
Den2s-3501	TTCCTAGGAGTCTTGGGA	Den2s-7224	AGCTTCTCTGGTTGCTTTTG
Den2s-3851	ATGCGTTAGCCCTGGGC	Den2s-6874	TTCCAATCCGAGGTCTTT
Den2s-4201	AATGACATTCCCATGACAGG	Den2s-6524	TCCGGCAGTTCCTGAGA
Den2s-4551	CCCACCAGTGGGAAAAGC	Den2s-6174	TGCCACTCTGTAGGCCAA
Den2s-4901	CTCTGGACTTTTCCCCTG	Den2s-5824	TTAATATAACTGGTTTCATGCA
Den2s-5251	ACCCAGCCATCAGAGC	Den2s-5474	GGAGTGGCTGTATGAAAA
Den2s-5601	GTTTGTTCCAAGTATAAAAGC	Den2s-5124	TTTTGTCTTTCTGCTCCTG
Den2s-5951	AACCTCTGAAAATGATGAAG	Den2s-4774	GCTTCCAGCCTCCTCCA
Den2s-6301	AGATGGTTGGATGCTAGGA 3'	Den2s-4424	AGTATGGTCAGTGTTTGTTC
Den2s-6651	TATCCTCCTATGGTATGCAC	Den2s-4074	TTTTATCGTCAATGCCAGTG
Den2s-7001	CCTCAGTGAATGTGTCCC	Den2s-3724	CTTTGAAAGCTGCTAGTAGG
Den2s-7351	CTCTGCGTGAATCAAGTAT	Den2s-3374	AGTGTGCAGGATCGGCAG
Den2s-7701	CATCAAAAGAGGAGAAAACGG	Den2s-3024	CCAATAACCCATATCGGCA
Den2s-8051	CACTCAGAGTCCTCAACTT	Den2s-2674	TTACCTCATTTTCTGATAGAAT
Den2s-8401	GAAAGAGAATAGAGAAAATAA	Den2s-2324	ATGATGACTCCTATGAGGAT
Den2s-8751	TACCAGAGAAGAATTCACAAG	Den2s-1974	GTGTCTTTTTTCCAAATCCAT
Den2s-9101	GGCTGCACAAGCTAGGC	Den2s-1624	TTGATCCTTGTGTGTCCGC
Den2s-9451	ATCTTCAAAGCATTTCAGCAC	Den2s-1274	ATGCCTCCCTTTCCAAATAA
Den2s-9801	CGGGTGGTCTTTGAAGGA	Den2s-924	AGCGACAGCTGTCAGTAAG
Den2s-10151	AGAACATCCAAACAGCAATAA	Den2s-574	CACACAATTCACCAAGATCT
Den2s-10501	GGTTAGAGGAGACCCCTC	Den2s-224	GGTCTCGTCCCTTGCAG

### III.7. Amplificación y secuenciación nucleotídica del gen E de aislamientos cubanos de DEN-3

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los nucleótidos comprendidos entre la posición 717 del gen que codifica para la proteína prM y la posición 2663 del gen que codifica para la proteína NS1. Se siguió el protocolo de PCR y secuenciación descrito previamente para el gen E de DEN-2. Para la amplificación y la secuenciación nucleotídica, se utilizaron los cebadores diseñados por Uzcategui y colaboradores (184) (Tabla 6).

**Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación y la secuenciación nucleotídica del gen E de aislamientos de DEN-3**

Reacción	Cebador	Posición	Secuencia → 3'
RT PCR	Den3-RT	2728-2744	CCACAACCCATGGAGC
	Den3-Ef	717-737	CGTTAGCTCCCCATGTCGGCA
Secuenciación	Den3-Er	2594-2663	ACCAGAATGGAGAACCCTCTT
	Den3-S1f	912-930	GCTGGTTACCCCATCCAT
	Den3-S2f	1185-1202	AGGAGCAGGACCAGAACT
	Den3-S3f	1455-1473	CTGAATATGGAACCCTCGG
	Den3-S4f	2000-2017	GTGACCAAGAAGGAGGAG
	Den3-S1r	1088-1104	CAGCTGGCGACCCTAAG
	Den3-S2r	2165-2181	GCCATCTTGGGAGACAC
	Den3-S3r	2539-2558	GGCAACAGCCATTGCAGGCG

\* Los nombres de cebadores con una f indican orientación en el sentido del genoma y con una r indican orientación complementaria y reversa.

### III.8. Análisis Filogenético de los aislamientos de DEN-2 utilizando la secuencia nucleotídica del gen E

La secuencia del gen E obtenida para los 20 aislamientos cubanos de DEN-2 fue comparada con una selección global de secuencias del gen E de cepas de DEN-2 depositadas en la base de datos Genbank. Un total de 56 secuencias nucleotídicas de 1620 pb cada una (Tabla 7), fueron alineadas mediante el programa Clustal X (185). Dicho alineamiento fue analizado utilizando el programa Modeltest (186) para determinar el modelo evolutivo que más se ajustaba a los datos. Una vez seleccionado el modelo GTR (siglas en inglés, General Time Reversible), se estimaron a partir de los datos: la composición de bases, la distribución gamma de variación entre sitios y la proporción de sitios invariantes.

Con estos parámetros se realizó un análisis filogenético de Máxima verosimilitud utilizando el paquete PAUP\* (187). Las secuencias utilizadas para enraizar el árbol fueron las correspondientes a las cepas de DEN-2: P8-1407 aislada de un mono centinela de origen Malayo, DAKARa578 aislada de un mosquito *Aegypti tailory sensu lato* colectado en la Costa de Marfil, la cepa selvática de Guinea PM33 974 y la cepa selvática DAKHD10674 aislada en Senegal (67).

El árbol inicial se construyó mediante análisis de Neighbor-joining y fue seguido de rondas sucesivas de cambios de rama mediante el método de "TBR", (del inglés Tree Bisection-Reconnection), identificando los parámetros de sustitución de máxima verosimilitud en cada paso, hasta que se encontró el árbol de mayor verosimilitud. Para evaluar cuan robustos eran los grupos filogenéticos se realizó un análisis de re-muestreo (del inglés, Bootstrapping), utilizando 1000 réplicas de árboles obtenidos por Neighbor-joining utilizando la matriz de sustitución de máxima verosimilitud descrita anteriormente. Todos estos análisis también fueron realizados utilizando el paquete PAUP\* (187).

**Tabla 7. Secuencias de DEN-2 (gen E) utilizadas en el análisis filogenético**

Cepas	Número de acceso al GenBank	Cepas	Número de acceso al GenBank
Tonga/74	X54319	CTD113/97	AF410358
Mexico131/92	AF100469	Filipinas/83	L10045
IQT1797/95	AF100467	Taiwan/87	L10052
Puerto Rico/69	L10046	SLMC-451	AF297009
1421Mexico/83	D45394	DOH-005	AF295697
India/57	L10043	CI-15	AF295696
Trinidad/53	L10053	DOH-077	AF295699
Jamaica1409/83	M20558	Burkina Faso/83	L10042
Brasil/90	L10041	Somalia/84	L10051
BR64022	AF489932	Torres/96	AF004019
PTCOI96/96	AF163096	Indonesia/76	L10044
Perú-6658/01	AY079423	CookIs/97	AF004020
Martinica/98	AF208496	CAMR4/91	AF410379
Ven1693/97	AF363077	CAMR14/98	AF410377
Ven1657/97	AF363072	FJ-10	AF276619
CTD226/98	AF410367	CAMR8/91	AF410373
China04/85	AF119661	CAMR11/93	AF410375
D91-533/91	AF195040	SL714/89	L10055
MalayM1/87	X15434	SL767	M24449
MalayM2/86	X15433	SL206/91	L10049
P7-863/69	AF231716	Malay P8-377/69	AF231715
ThNh-p11/93	U31952	Mal70-P8-1407/70	AF231717
CO167//96	AF100464	IC80-DAKAr578/80	AF231718
D83-307/83	AF195035	Guinea81-PM33974/81	AF231719
PUO-312/80	AF264053	Sen70-DAKHD10674/70	AF231720
16681/64	U87411	Nueva Guinea C/44	AF038403
TH-36/58	D10514	SL77	M24450
I348600	AY702040	Cuba/97	AY702041-60

### **III.9. Análisis Filogenético de los aislamientos de DEN-2 utilizando la secuencia nucleotídica del genoma completo**

Para inferir la historia evolutiva de la cepa de DEN-2 que ocasionó la epidemia de dengue en Santiago de Cuba de 1997 se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando la secuencia nucleotídica del genoma completo (región codificante) de 6 cepas cubanas (Tabla 1) y 41 secuencias de cepas de DEN-2 disponibles en la base de datos GenBank (Tabla 8). En total se analizaron 47 secuencias con una longitud de 10176 pb. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa Clustal X (185). Se estimó un árbol de máxima verosimilitud utilizando el mismo modelo de evolución seleccionado para el análisis del gen E de DEN-2. Para evaluar cuan robustos eran los grupos filogenéticos se realizó un análisis de re-muestreo, utilizando 1000 réplicas de árboles obtenidos por Neighbor-joining a partir de la matriz de sustitución de máxima verosimilitud obtenida según el modelo de evolución seleccionado. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete PAUP\* (187).

**Tabla 8. Secuencias de DEN-2 (genoma completo) utilizadas en el análisis filogenético**

Cepas	Número de acceso al Genbank	Cepas	Número de acceso al Genbank
B64022	AF489932	ThNH81/93	AF169688
China 04	AF119661	ThNH76/93	AF169687
China 43	AF204178	ThNH73/93	AF169686
China 44	AF204177	ThNH69/93	AF169685
C0166/96	AF100463	ThNH63/93	AF169684
C0167/97	AF100464	ThNH62/93	AF169683
C0371/95	AF100461	ThNH54/93	AF169682
Cuba 13/97	AY702034	ThNH55/93	AF169681
Cuba 58/97	AY702035	ThNH45/93	AF169680
Cuba 89/97	AY702036	ThNH36/93	AF169679
Cuba 115/97	AY702037	ThNH29/93	AF169678
Cuba 165/97	AY702038	ThNH-p36/93	AF022441
Cuba 205/97	AY702039	ThNH-p16/93	AF022440
C0390/95	AF100462	ThNH-p14/93	AF022439
11/99	AF359579	ThNH-p12/93	AF022438
IQT1797/95	AF100467	ThNH-p11/93	AF022437
IQT2913/96	AF100468	ThNH52/93	F022436
I348600	AY702040	ThNH28/93	AF022435
Jamaica 1409	M20558	ThNH7/93	AF022434
K0008/94	AF100459	TSV01	AY037116
K0010/94	AF100460	Ven2/87	M32971
Mara4/90	AF100466	131/92	AF100469
Martinica/98	AF208496	16681	U87411
Nueva Guinea C	M29095		

### III.10. Análisis Filogenético de los aislamientos de DEN-3 utilizando la secuencia nucleotídica del gen E

Las secuencias del gen E obtenidas en este estudio para los tres aislamientos cubanos y el aislamiento nicaragüense fueron comparadas con 60 secuencias de DEN-3 obtenidas de la base de datos GenBank las cuales representan cepas aisladas en diferentes regiones geográficas, en diferentes tiempos, incluyendo algunas que han circulado recientemente en el Caribe (Tabla 9). La colección de 64 secuencias de una longitud de 1482 pb se introdujo en el programa Clustal X (185) para obtener el alineamiento que permitió estimar un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando el mismo modelo de evolución descrito previamente para DEN-2. El árbol fue enraizado utilizando las cepas de

DEN-3 aisladas en Puerto Rico, 1963 y 1977 (188). Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete PAUP\* (187).

**Tabla 9. Secuencias de DEN-3 (gen E) utilizadas en el análisis filogenético**

Cepas	Número de Acceso al Genbank	Cepas	Número de acceso al Genbank
D3.Brasil/00	AY038605	D3.Sri Lanka/85	L11436
D3.China.80-2/1980	AF317645	D3.Sri Lanka/89	L11437
D3.Cuba.116/00	AY702032	D3.Sri Lanka/91	L11438
D3.Cuba.580/01	AY702030	D3.Sri Lanka.12661/00	AY099336
D3.Cuba.21/02	AY702031	D3.Tahiti/89	L11619
D3.Fiji/92	L11422	D3.Tailandia.CH53489/73	M86733
D3.Filipinas/56	L11426	D3.Tailandia/62	L11440
D3.Filipinas.H87/57	M93130	D3.Tailandia/73	L11620
D3.Filipinas/83	L11428	D3.Tailandia/86	L11441
D3.India/84	L11424	D3.Tailandia/87	L11442
D3.Indonesia/78	L11426	D3.Tailandia.007/87	AY135419
D3.Indonesia/85	L11428	D3.Tailandia.1384/87	AF533079
D3.Malasia/74	L11429	D3.Tailandia.561/87	AY135419
D3.Malasia/81	L11427	D3.Tailandia.PaH881/88	AF349753
D3.Malasia.LN5547/92	AF147457	D3.Tailandia.303/88	AY145714
D3.Malasia.LN2632/93	AF147459	D3.Tailandia.273/89	AY145715
D3.Malasia.LN1746/93	AF147458	D3.Tailandia.393/91	AY145716
D3.Malasia.LN6083/94	AF147460	D3.Tailandia.538/91	AY145717
D3.Malasia.LN7029/94	AY338493	D3.Tailandia.423/92	AY145718
D3.Malasia.LN8180	AY338492	D3.Tailandia.431/92	AY145719
D3.Martinica.1243/99	AY099337	D3.Tailandia.044/93	AY145720
D3.Martinica.1706/00	AY099339	D3.Tailandia.122/94	AY145722
D3.Martinica.2012/01	AY099340	D3.Tailandia.0014/95	AY145724
D3.Martinica.2023/01	AY099341	D3.Tailandia.330/96	AY145727
D3.Martinica.2336/01	AY099342	D3.Tailandia.0106/97	AY145728
D3.Mexico.6097/95	AY146763	D3.Tailandia.0144/97	AY145729
D3.Myanmar.31985KLA/98	AY145712	D3.Venezuela.LARD6218/00	AY146766
D3.Nicaragua.24/97	AY702033	D3.Venezuela.LARD6411/00	AY146770
D3.Puerto Rico/63	L11433	D3.Venezuela.LARD6722/01	AY146775
D3.Puerto Rico/77	AY146761	D3.Venezuela.LARD7110/01	AY146776
D3.Samoa/86	L11435	D3.Venezuela.LARD7812/01	AY146777
D3.Sri Lanka/81	L11431	D3.Venezuela.LARD6668/01	AY146774

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **IV.1. Caracterización molecular de aislamientos de DEN-2 obtenidos durante la epidemia de Santiago de Cuba, 1997**

#### **IV.1.1. Análisis Filogenético a partir de la secuencia nucleotídica del gen E**

Para este estudio se determinaron las secuencias nucleotídicas del gen E de 20 aislamientos de DEN-2 obtenidos en diferentes momentos de la epidemia de 1997. La comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, reveló un 100 % de identidad de la proteína E para todos los aislamientos estudiados independientemente del cuadro clínico del paciente.

El alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen E determinada para los aislamientos cubanos combinada con una selección de las secuencias de dicho gen, disponibles en la base de datos Genbank, seguida de un análisis de máxima verosimilitud generó el árbol filogenético que se muestra en la Figura 2.

Los aislamientos cubanos de 1997 se agruparon dentro del genotipo Americano/Asiático previamente definido por Twiddy y colaboradores (74). De acuerdo con esta clasificación, dichos aislamientos están estrechamente relacionados con las cepas de DEN-2 que circularon en Venezuela, 1997/98 y Martinica, 1998. Las cepas de Cuba/Venezuela/Martinica también se agruparon con otras cepas americanas de Brasil y Perú; sin embargo, todas muestran un origen común en Asia.

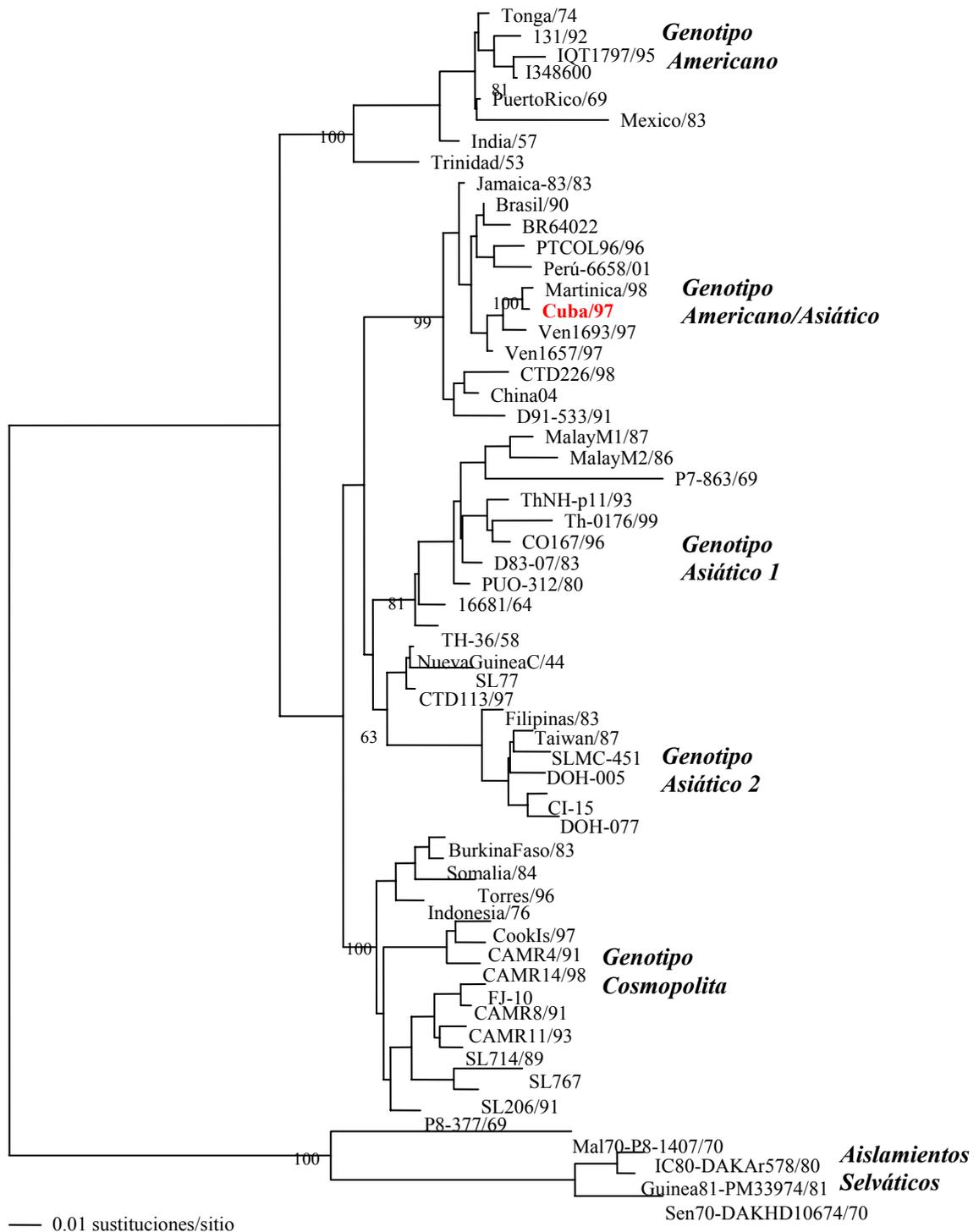


Figura 2. Árbol filogenético generado por análisis de Máxima Verosimilitud de las secuencias nucleotídicas del gen E de 56 cepas de DEN-2. Todas las ramas horizontales están dibujadas a escala y los valores de soporte de remuestreo se indican en los nodos claves.

El análisis filogenético realizado confirmó que la epidemia de DEN-2 ocurrida en Santiago de Cuba fue causada por una cepa de origen Asiático, asociada previamente a epidemias severas en dicha región y que han circulado en Latinoamérica por un período de más de 10 años (189-191). De acuerdo con la información que brinda el árbol filogenético y teniendo en cuenta la similitud entre las cepas de Cuba y Venezuela, existe una posibilidad real de que la introducción haya provenido de dicha área endémica donde se han registrado consecutivamente severas epidemias de dengue (179, 184). Sin embargo, el número de secuencias disponibles correspondientes a cepas de DEN-2 aisladas en la región durante este período no son suficientes para indicar con certeza el país de origen. El frecuente intercambio de Cuba no sólo con Venezuela sino también con el resto de los países de la región, podría explicar esta observación.

Teniendo en cuenta la relación genética encontrada para la cepa cubana podría plantearse que la misma presenta un alto potencial virulento. Este resultado concuerda con el hecho de que la epidemia de dengue de Santiago de Cuba se describe como la más severa ocurrida en Cuba hasta la fecha, a pesar de haber estado limitada a un único municipio del país, además de que se contaba con una mayor experiencia en el manejo clínico de los pacientes. Según lo planteado por Guzmán y colaboradores teniendo en cuenta la proporción de casos graves, así como de casos fatales, dicha epidemia fue 40 veces más severa que la ocurrida en el año 1981 que abarcó toda la isla (17).

Además de las características de la cepa circulante, se conoce que la infección secundaria constituye un factor de riesgo importante para desarrollar la forma severa de la enfermedad (2, 26, 58, 65, 121). Sin embargo, en esta epidemia cubana, el hallazgo más relevante es la ocurrencia de una epidemia severa a 20 años de haber acontecido la primo-infección con DEN-1 (17, 27).

Tomando como base la alta influencia de la infección secundaria como factor de riesgo, unido a la observación epidemiológica de un aumento de la severidad con la progresión de las epidemias en el tiempo, tanto en el año 1981 como en 1997; Guzman y colaboradores (30) plantearon como hipótesis que este incremento en la proporción de casos de FHD/SCD

respecto al número de casos reportados, podría deberse a la aparición de mutantes de escape a la neutralización heterotípica en individuos previamente inmunizados con DEN-1.

En el presente trabajo, se intentó la búsqueda de mutantes de escape a la neutralización, a partir del estudio del gen E del 40% de los aislamientos obtenidos durante la epidemia de 1997. Sin embargo, no se encontró variación alguna en los aislamientos estudiados. Teniendo en cuenta la funcionalidad de la proteína E, como blanco para la formación de anticuerpos neutralizantes y respuesta de células T y que esta proteína constituye además el determinante fundamental del tropismo de los flavivirus (31); podría plantearse que la conservación completa del gen E y por ende de la secuencia aminoacídica de dicha proteína, sugiere que no ocurrió la formación de mutantes de escape a la neutralización. Los resultados obtenidos indican que el gen E no varió con la progresión de la epidemia al menos a nivel de la secuencia viral dominante en la muestra. Uzcategui y colaboradores (179, 184) encontraron resultados similares al estudiar el gen E de cepas de DEN-2 y DEN-3 correspondientes a dos períodos epidémicos diferentes de Venezuela.

En el análisis de la identidad de la proteína E de los aislamientos estudiados, se tuvo en cuenta que dicha proteína presenta dos sitios de glicosilación. Dicho evento post-traducciona l reviste gran importancia por su universalidad y su influencia en la estructura y propiedades de las proteínas (192). Se conoce que si son afectados los sitios de glicosilación de los virus del dengue esto tiene influencia sobre la neurovirulencia en ratones (193), además se plantea que la pérdida de alguno de los dos sitios potenciales de glicosilación tiene influencia sobre la fusión del virus al receptor celular (194). Sin embargo, este evento es dependiente del hospedero, por lo que de existir variaciones en cuanto a glicosilación, aún cuando estas tuvieran importancia funcional, sería considerado como un factor de riesgo individual y por tanto no nos permitiría explicar la observación epidemiológica inicial, con relación al incremento de la severidad con la progresión de la epidemia en el tiempo.

#### **IV.1.2. Análisis de la secuencia aminoacídica deducida para la proteína E**

Con el objetivo de estudiar los cambios aminoacídicos presentes en la proteína E de los aislamientos cubanos al compararlos con cepas de DEN-2 correspondientes a cada uno de los genotipos descritos por Twiddy y colaboradores (74), se realizó el alineamiento de las secuencias disponibles en la base de datos Genbank.

Cuando se compararon las cepas cubanas aisladas en el año 1997 con la cepa Jamaica1409 aislada en el año 1983 (61), la cual marcó la entrada de este genotipo a la región, se encontró un 99.60 % de similitud y un 99.39 % de identidad entre ellas. Solamente se observaron dos cambios aminoacídicos no conservados Leucina (L)/Glutamina (Q) en la posición E131 y Metionina(M)/ Treonina(T) en la posición E340.

Al comparar la secuencia obtenida para las cepas cubanas del año 1997 con el resto de las secuencias alineadas, pudo comprobarse una elevada conservación del dominio B de la proteína para todas las cepas analizadas. La mayoría de los cambios fueron muy puntuales, con excepción del cambio no conservado encontrado en la posición E390, que distingue las cepas pertenecientes al genotipo Americano del resto de los genotipos de DEN-2. Sin embargo, el cambio no conservado M/T en la posición E340 estuvo presente únicamente en las cepas de Venezuela-Cuba-Martinica.

Dentro del dominio A, se observó que el residuo E71 es altamente variable a nivel inter-genotipo pero conservado a nivel intra-genotipo. De esta forma, se encontró la presencia de Ácido Aspártico (D) en las cepas del genotipo Americano, Ácido Glutámico (E) en las cepas de los genotipos Americano/Asiático, Asiático I y II y el Selvático y se encontró Alanina (A) en la mayoría de las cepas agrupadas dentro del genotipo Cosmopolita.

También ubicado en el dominio A, se encontró un cambio no conservado en la posición E203, siendo D para las cepas que se agrupan en los genotipos Americano y Americano/Asiático, pero en su lugar está presente el residuo Asparagina (N) para la mayoría de las cepas de DEN-2 ubicadas en el resto de los genotipos.

De todos los cambios aminoacídicos encontrados el más llamativo fue el de la posición E340 presente en las cepas de Cuba-Venezuela- Martinica. Este cambio no conservado se localizó en una región antigénica importante, que contiene múltiples epítopes de células T y B. Algunos estudios previos, han mostrado que péptidos que comprenden la región E333-E368 inducen la formación de anticuerpos de unión al virus y estimulan la proliferación de células T en ratones (195, 196). En la misma región, Lewis y colaboradores (197) encontraron cambios de la misma naturaleza al comparar la secuencia aminoacídica de la cepa PR159 y su derivado vacunal atenuado la cepa S1. Estos autores sugirieron que este cambio podría ser importante en la atenuación de la cepa vacunal S1 alterando su inmunogenicidad. De esta forma, el cambio aminoacídico en la posición E340, pudiera tener alguna influencia sobre la virulencia de la cepa cubana.

El alto % de identidad encontrado para las cepas de Cuba/1997 y Jamaica1409/83 indicó que después de 14 años de circulación en la región, la cepa aislada en el año 1983 en Jamaica ha experimentado muy pocos cambios, al menos a nivel de la proteína E, sugiriendo que ha ocurrido una escasa evolución *in situ*. Consecuentemente, los aislamientos cubanos han mantenido la presencia de N en al posición E390, pronosticado como posible determinante de virulencia (62, 135-137).

En cuanto a la variación observada a nivel inter-genotipo en el residuo E71, puede plantearse que el fragmento que contiene este motivo está expuesto en al superficie de la proteína E (198), por lo que pudiera estar sometido a una presión selectiva positiva. Coincidentemente, Twiddy y colaboradores (199) mediante estudios filogenéticos de cepas de DEN-2 utilizando el gen E, encontraron presión selectiva positiva en este residuo para cepas de DEN-2 del genotipo Cosmopolita. Por otra parte, el residuo E71 ha estado implicado como determinante de neurovirulencia en ratones (199).

Con relación al cambio observado en la posición E203, podemos decir que fue interesante encontrar que la cepa Tailandesa PUO-312/80 correspondiente al genotipo Asiático I, tuviera el mismo residuo en la posición E203 que las cepas correspondientes a los genotipos Americano y Americano/Asiático. En estudios previos Lewis y colaboradores

(197) habían demostrado la estrecha relación de la cepa Jamaica/83 con la cepa Asiática PUO-312/80.

El análisis aminoacídico realizado mostró la presencia de posibles determinantes de virulencia dentro de las cepas cubanas, existiendo una correspondencia con los resultados obtenidos a través del análisis filogenético. Sin embargo, los estudios seroepidemiológicos realizados por Guzmán y colaboradores (17) mostraron que el virus también se transmitió de manera silente dentro de la población. La transmisión silente fue reportada previamente en Taiwán (200) y también se ha encontrado más recientemente en Brasil (201).

Esto equivale a decir que aún en presencia de una cepa virulenta, es posible encontrar un número notable de casos asintomáticos. Esto apoya la existencia de factores dependientes del hospedero que determinan la susceptibilidad o resistencia a padecer la enfermedad severa, como ha sido extensamente planteado por varios autores (2, 8, 58, 65, 115, 128, 202-204). En este sentido, sería de gran utilidad, diseñar investigaciones donde se incluyan personas asintomáticas con resultados positivos de IgM específica a dengue; con el objetivo de determinar posibles factores asociados al hospedero (Ej. Factores genéticos).

Además de las mutaciones, se han presentado evidencias que sugieren que la recombinación es una de las causas de diversidad genética en los virus del dengue (178-181, 205, 206). En este estudio, no se encontraron cambios en el gen E que indiquen la posibilidad de recombinación, pero tampoco existían evidencias epidemiológicas que apoyaran como hipótesis la aparición de cepas virales recombinantes como ha sido demostrado en regiones endémicas (179, 182).

La situación cubana es única en este sentido, ya que una vez eliminada la epidemia de DEN-2 ocurrida en 1981 no se identificaron nuevos casos de FD/FHD/SCD hasta 1997. Esto puede ser ampliamente explicado por las medidas que fueron tomadas en Cuba para controlar y eliminar el vector transmisor (25). Considerando la situación epidemiológica de Cuba con relación al dengue, era poco probable que se detectara la circulación de una cepa recombinante, dadas las escasas oportunidades que existían para infecciones por varios genotipos como suele ocurrir en condiciones de endemidad.

Por tanto, cuando el DEN-2 re-emergió en Santiago de Cuba en 1997, era razonable suponer que estaba circulando una cepa única, como fue corroborado en este estudio. Tomando en cuenta estos resultados y reflexiones se consideró de extrema necesidad investigar si existía el mismo grado de conservación a lo largo de todo el genoma viral.

#### **IV.1.3. Estudio de la secuencia nucleotídica del genoma viral completo y la secuencia aminoacídica deducida para la poliproteína viral. Análisis Filogenético**

Para este estudio se determinó la secuencia nucleotídica del genoma completo de 6 aislamientos de DEN-2 obtenidos en diferentes momentos de la epidemia de dengue ocurrida en 1997 (Tabla 1).

El alineamiento de las cepas cubanas secuenciadas reveló una marcada conservación de las proteínas estructurales; así como de las regiones no codificantes tanto del extremo 3' como 5'. Contrariamente, fue posible definir un claro patrón de evolución en los genes no estructurales. En particular, las dos cepas del inicio de la epidemia de 1997 (13/97 y 58/97) mostraron secuencias nucleotídicas muy similares, a diferencia de las cepas restantes colectadas 4 meses más tarde. Las sustituciones en NS1 (2911), NS2B (3894) y NS5 (7947, 8868, 9471) reflejan la divergencia entre los aislamientos del inicio y el final de la epidemia (Tabla 10).

La sustitución no sinónima observada en NS1 (2911) generó el cambio aminoacídico conservado Treonina/Serina (T/S), siendo este el único cambio aminoacídico que se relacionó con el patrón de evolución observado. También fue evidente que la diversidad genética de los aislamientos de DEN-2 aumentó con la progresión de la epidemia; el último aislamiento obtenido (205/97), acumuló el mayor número de cambios, incluyendo una sustitución no sinónima en NS5 (9758) la cual generó el cambio aminoacídico conservado Asparagina/Serina (N/S). Finalmente, es de notar que aproximadamente el 50 % de las sustituciones nucleotídicas fueron encontradas en NS5.

**Tabla 10. Mutaciones observadas al comparar la secuencia del genoma completo de los seis aislamientos de DEN-2 de 1997, tomando como referencia la primera cepa aislada en la epidemia.**

Aislamientos y FIS		Posición nucleotídica									
		C 480	NS1 2911	3123	3130	NS2A 3894	NS2B 4356	4407	NS3 5211	5958	NS4A 6612
13/97	30/1/97	T	A	T	T	C	A	A	A	C	G
58/97	5/2/97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
89/97	1/6/97	-	T*	-	-	T	-	-	-	G	A
115/97	10/6/97	-	T*	-	-	T	G	G	G	-	-
165/97	12/6/97	-	T*	C	C	T	-	-	-	-	-
205/97	1/7/97	C	T*	-	-	T	-	-	-	-	-

Aislamientos y FIS		Posición nucleotídica									
		NS4B 7356	NS5 7947	8430	8556	8868	9471	9696	9758	9822	9942
13/97	30/1/97	C	T	G	A	G	C	T	A	G	T
58/97	5/2/97	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89/97	1/6/97	T	G	-	-	A	T	-	-	-	-
115/97	10/6/97	-	G	-	-	A	T	-	-	-	-
165/97	12/6/97	-	G	-	T	A	T	C	-	-	-
205/97	1/7/97	-	G	A	-	A	T	-	G*	A	C

\* Se destacan en verde las mutaciones que generaron cambios aminoacídicos, en los cuadros rojos se señalan las mutaciones que muestran un patrón de evolución. FIS: Fecha de inicio de los síntomas.

El análisis filogenético de máxima verosimilitud realizado sobre la base de 47 secuencias completas (regiones codificantes) de DEN-2, reveló que los seis aislamientos cubanos secuenciados en este estudio conformaron un subgrupo muy apretado con un fuerte soporte de re-muestreo (Figura 3). Además, pudo apreciarse una clara división dentro de los aislamientos cubanos; los obtenidos tempranamente en la epidemia se ubicaron muy cerca de la raíz del subgrupo cubano indicando que ocurrió evolución viral durante el período epidémico.

También es de notar que los aislamientos cubanos se sitúan muy cerca de otra cepa aislada en el Caribe en el mismo período – Martinica/98 – (todos ubicados dentro del genotipo Americano/Asiático) (207) y que a su vez se hallaron bien distantes de las cepas de DEN-2 que estuvieron asociadas con la FD en el continente Sur Americano (Ej. la cepa colombiana I348600 y la cepa peruana IQT1797/95) que fueron clasificadas dentro del genotipo Americano (74). Estos resultados indicaron que la cepa de DEN-2 que afectó Cuba en 1997 fue la misma que estuvo circulando ampliamente en la región del Caribe en los años precedentes, como se había determinado previamente al estudiar el fragmento de unión E/NS1 del primer aislamiento cubano obtenido durante la epidemia de 1997 (161), así como durante el análisis del gen E en el presente estudio.

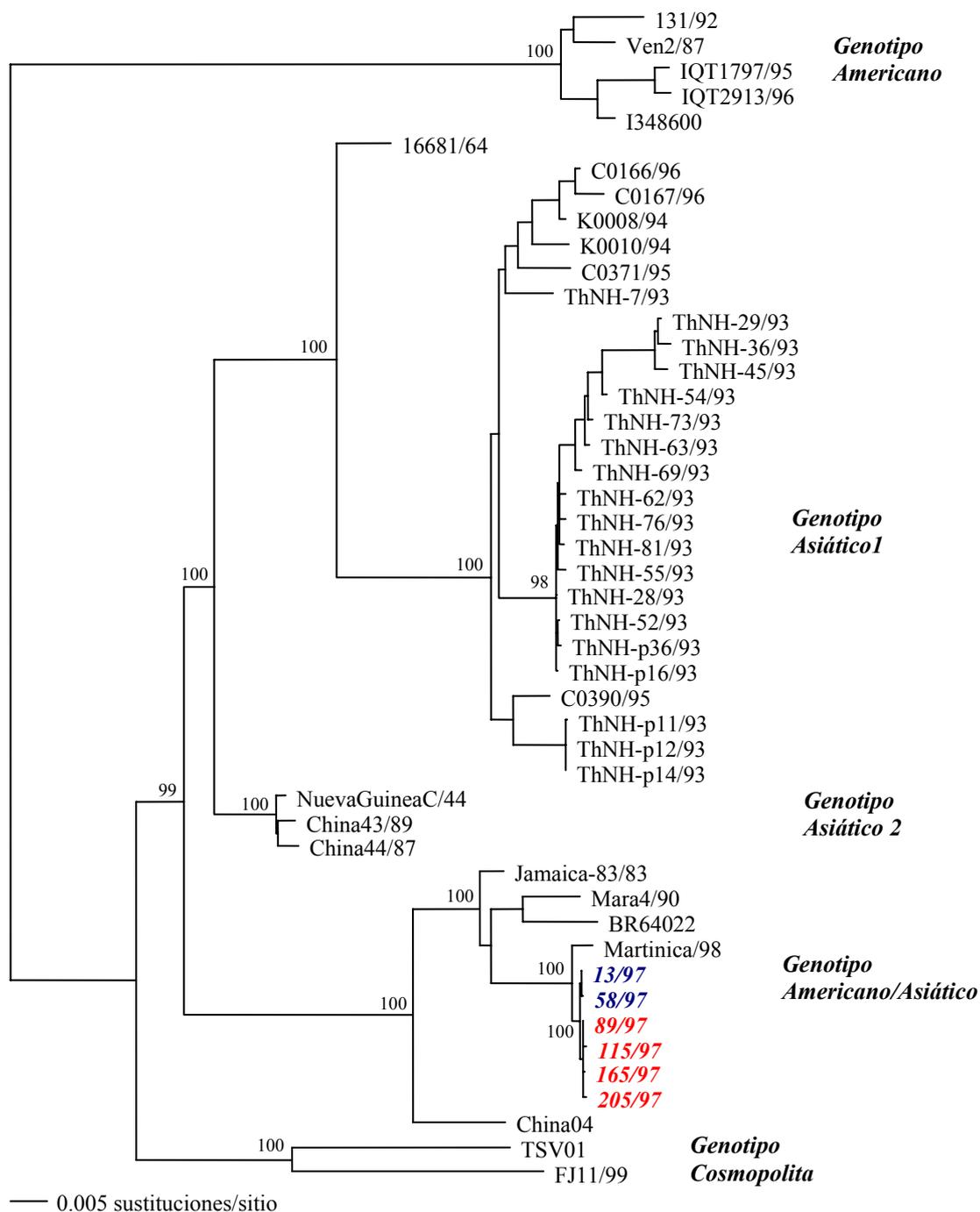


Figura 3. Árbol de Máxima Verosimilitud que muestra la relación evolutiva encontrada al comparar el genoma completo de 47 cepas de DEN-2. Todas las ramas horizontales están dibujadas a escala y los valores de soporte por re-muestreo se indican en los nodos claves

El estudio de la secuencia nucleotídica de 6 aislamientos obtenidos en diferentes momentos de la epidemia mostró que no sólo existía una conservación del gen E sino también del resto de los genes estructurales. Esto indica que si ocurrió la formación de mutantes de escape, los genes estructurales aparentemente no estuvieron involucrados con el fenómeno y en este caso no sería la selección manejada por anticuerpos la fuerza selectiva clave.

Por otra parte, se ha planteado que algunas cepas de DEN-2 difieren en la estructura genómica de su ARN viral en las regiones no codificantes (62), lo que se correlaciona con una mayor virulencia, ya que el ARN viral debe interactuar con las proteínas virales y celulares del hospedero para la formación de los complejos replicativos (208). Específicamente, la región 3' no codificante está involucrada en la iniciación de la síntesis del ARN viral y la región 5' no codificante juega un papel importante en la iniciación de la traducción. Por consiguiente, se ha demostrado que la presencia de mutaciones en las regiones no codificantes influyen tanto en la virulencia como en la atenuación (209). Sin embargo, los aislamientos estudiados mantuvieron conservadas ambas regiones no codificantes.

En contraste, se encontraron 19 sustituciones nucleotídicas en los genes no estructurales, 17 de ellas sinónimas con relación al primer aislamiento obtenido durante la epidemia. Dichas mutaciones de manera general aparecen en correspondencia con el momento de toma de la muestra. Cinco de las sustituciones nos permitieron dividir los aislamientos en dos subgrupos, los que representaron el inicio de la epidemia (Enero-Febrero/1997) y el período final (Junio-Julio/1997), mostrando un claro patrón de evolución viral.

En la Figura 4 puede apreciarse que los cambios que permitieron la división de estas cepas en dos subgrupos del árbol filogenético se encontraron a partir de una cepa aislada en el momento de mayor reporte de casos. En la semana 23 aunque visiblemente comenzó a disminuir el número total de casos reportados, se conoce que continuó aumentando la proporción de muertes/casos de FHD, desde un 2.7% en dicha semana hasta un 17.2 % en la semana 34 (Julio) donde se aislaron las últimas cepas de la epidemia (30).

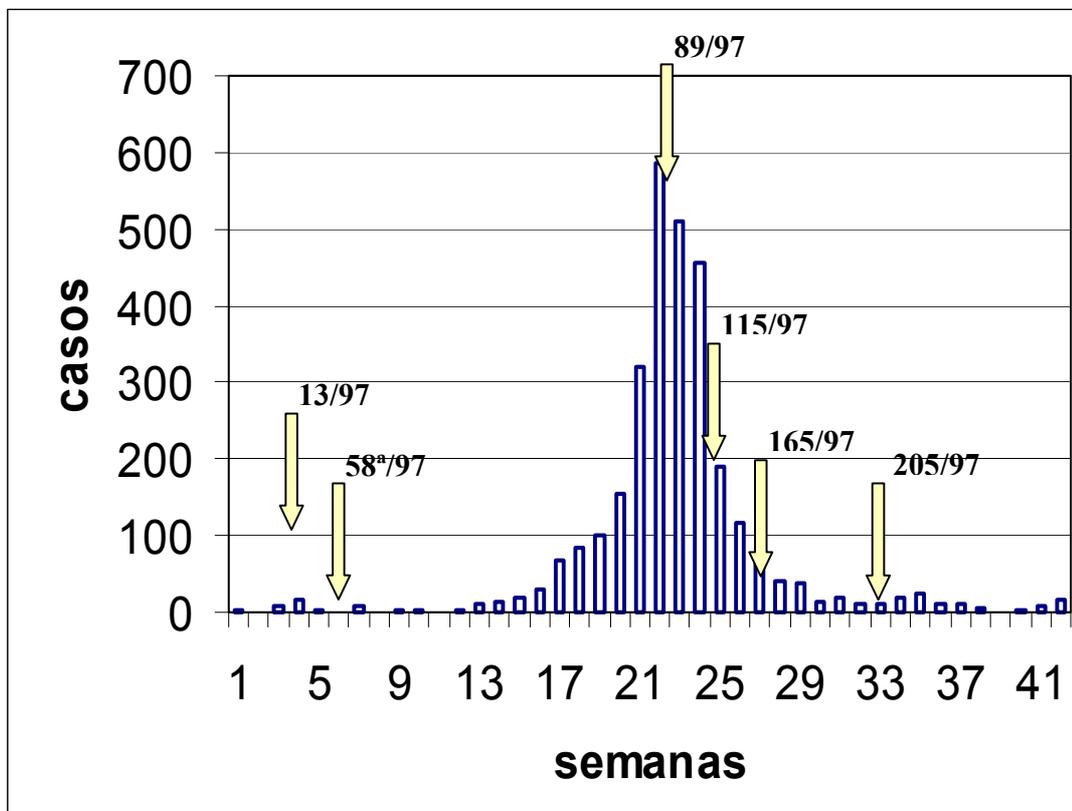


Figura 4. Reporte de casos confirmados de FD y FHD en el municipio de Santiago de Cuba, 1997 (204). Las flechas indican las semanas en que se colectaron las muestras para obtener los aislamientos estudiados por secuenciación nucleotídica.

De las cinco sustituciones nucleotídicas que marcan el patrón de evolución, una de ellas dió lugar a un cambio aminoacídico conservado (T/S) en la proteína NS1. Aunque no fue posible definir la importancia biológica de este cambio (210), es de notar que el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de DEN-2 disponibles en la base de datos Genbank evidenció una notable conservación de la región de NS1 que contiene dicho cambio (Tabla 11).

**Tabla 11. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de un fragmento de 60 aminoácidos de la proteína NS1 que contiene el cambio aminoacídico de la posición 2911.**

Jam/1409	AKMLSTESHN	QTFLIDGPET	AECPNTRAW	NSLEVEDYGF	GVF <b>T</b> TNIWLK	LREKQDVFC
CUBA13/97	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CUBA58/97	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>CUBA115/97</b>	.....	.....	.....	.....	..... <b>S</b> .....	.....
<b>CUBA89/97</b>	.....	.....	.....	.....	..... <b>S</b> .....	.....
<b>CUBA165/97</b>	.....	.....	.....	.....	..... <b>S</b> .....	.....
<b>CUBA205/97</b>	.....	.....	.....	.....	..... <b>S</b> .....	.....
<b>PVO-280</b>	.....	.....	.....	.....	..... <b>S</b> .....	.....K.....A.....
China04	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ThNH-p1693	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-2893	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-p3693	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-5293-C	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH55/93	.....	.....K.....	.....	.....	.....	.....K.....AL.....
ThNH76/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH62/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH81/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-p1193	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-p1493	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-p1293	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH-7/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH69/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH73/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH63/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH54/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH36/93	.....	.....K.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH29/93	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
ThNH45/93	.....	.....N.....	.....	.....	.....V.....	.....K.....A.....
C0167	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
C0166	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
K0008	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
K0010	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
C0390	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
C0371	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....A.....
FJ11/99	.....P.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....R.....
FJ-10	.....P.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....R.....
131/92	.....P.....L.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....
Ven2	.....L.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....
IQT2913	.....L.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....A.....
IQT1797	.....L.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....A.....
BR64022	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Mara4	.....	.....V.....	.....	.....	.....	.....
China 44	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NGCPUO218	.....	.....	.....	.....	.....	.....
China 43	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NewGuineaC	.....	.....	.....	.....	.....	.....
16681	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....
MART/98	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TSV01	.....L.....	.....H.....	.....	.....	.....	.....K.....R.....
DEN-3 H87	..IVTA.TQ.	SS.I...S.	P...SAS.	.VW.	.....	...VYTQL..
DEN-1Sing/90	..IIGADIQ.	T..I...D.	P...DDQ.	.IW.	.....	..DSYTM..
DEN-4	..IFTP.AR.	S.....D.	S...ER.	.....	.M.....M.	F..GSSEV..

\*Se incluyeron las secuencias de DENV-2 disponibles en el Genbank, así como de otros serotipos de dengue (DEN-1 Singapur/90, DEN-3 H87/56 y DEN-4 Dominica) que se encuentran al final del alineamiento.

Las cepas de DEN-2 usualmente presentan un residuo de T en la posición 164 de NS1 como los aislamientos cubanos del inicio, con la excepción de la cepa tailandesa PUO-280 perteneciente al genotipo Asiático I, la cual tiene S en dicha posición como los últimos aislamientos cubanos (211). Adicionalmente, el estudio de algunas propiedades biológicas de estas 6 cepas cubanas reveló una diferencia entre los aislamientos del inicio (13/97 y 58<sup>a</sup>/97) y el final (89/97, 115/97, 165/97 y 205/97), encontrándose una mayor neurovirulencia en ratones lactantes y un incremento del título y del ECP en células C6/36 HT para estos últimos (212).

Como era de esperar, el número de mutaciones aumentó con la progresión de la epidemia. La cepa 205/97, aislada de un fallecido, acumuló 10 mutaciones con respecto al primer aislamiento de la epidemia y una de ellas resultó en un cambio aminoacídico conservado N/S, localizado en el gen NS5, específicamente en el dominio identificado como ARN polimerasa dependiente de ARN.

Es preciso plantear que aunque el 205/97 es el último aislamiento disponible, este no fue obtenido a partir del último caso asociado a la epidemia. Por consiguiente, no fue posible conocer si este cambio se mantuvo en el virus que continuó circulando. Otro elemento a tener en cuenta es que dicho aislamiento fue obtenido de una muestra de bazo (no de suero) y por tanto es posible que la población viral en este tejido difiera de la encontrada en otros aislamientos obtenidos a partir de suero.

Como ha sido planteado por varios autores, uno de los factores asociados a la variabilidad de los virus del dengue es la migración o flujo genético. Dicha migración ocurre no sólo a nivel macroscópico (durante la transmisión del virus de un continente a otro a través del movimiento tanto de mosquitos como de personas infectadas), sino también a nivel microscópico dentro de un individuo. Los virus pueden ser transportados desde el sitio de inoculación hasta los diferentes tejidos, generándose de esta forma una variabilidad espacial intra-hospedero que se explica por las diferencias en cuanto a la permisividad de las células del organismo para la replicación del virus (213).



DENV-2 Jam/1409	KDGRVLVPC	R	NQDELIGRA	RI
DENV-2 IQT2913	....T.....			
DENV-2 IQT1797	....T.....			
DENV-2 BR640	.....			
DENV-2 Mara4	.....			
DENV-2 44	.....	N		
DENV-2 PUO218	.....			
DENV-2 43	.....			
DENV-2 NGC	.....			
DENV-2 16681	.....			
DENV-2 TSV01	.....			
DENV-1 Sing/90	...EI....		V	.V
DENV-4 Dominica	...S....			
DENV-3 H87	...K....	P		
DENV-3 China80-2	...K....	P		
Alfuy	...S....	G		
Valle de Murray	...T....	G		
VON	...T....	G		
Usutu	...T....	G		V

\*Se incluyeron secuencias de DENV-2 disponibles en el Genbank, de otros serotipos de dengue, así como de otros flavivirus.

A pesar del bajo número de mutaciones observadas en los aislamientos virales obtenidos durante la epidemia de 1997, es importante hacer notar que las secuencias comparadas aquí representaron un consenso de todas las observadas dentro de cada paciente. Esto es particularmente importante dado que estudios de poblaciones de virus tomados de un mismo individuo o mosquito han revelado la presencia de un variado espectro de quasiespecies (215-217).

El método de secuenciación directa utilizado en este estudio no toma en cuenta aquellas poblaciones virales presentes en baja frecuencia dentro de la muestra. Por ende, no se puede descartar que tanto en el estudio previo del gen E, como en este relacionado con el estudio del genoma completo, algunas poblaciones minoritarias que podrían afectar la virulencia, incluyendo posibles mutantes de escape a la neutralización no hayan sido analizadas.

Los autores que han estudiado la presencia de quasiespecies en muestras de suero de la fase aguda de la enfermedad, han realizado el clonaje de algunos genes de interés a partir de los productos de PCR, para su ulterior secuenciación (165, 218). Si bien este método ofrece como ventaja que pueden ser estudiadas poblaciones minoritarias, presenta como desventaja que durante el clonaje es posible obtener una cantidad innumerable de colonias, y solamente algunas serán seleccionadas (al azar) para su secuenciación. Usando este método, es posible mostrar que existe un variado espectro de quasiespecies. Sin embargo,

se requiere el estudio de una muestra representativa de clones para cada aislamiento, esto sólo para estudiar un gen en particular. Para estudiar varios aislamientos, a nivel de genoma completo se requeriría el análisis de un número muy elevado de clones, que tiene como desventaja que los errores correspondientes a mutaciones que se introducen a través del proceso de clonación. Aún así, solamente seríamos capaces de demostrar que existe un espectro de quasiespecies, dentro de las que pudiera estar presente una mutante de escape que no necesariamente tiene que ser la responsable del incremento de la virulencia.

Algunos autores niegan la importancia de estas poblaciones minoritarias, basados en estudios evolutivos que muestran la existencia de una fuerte selección purificadora (172). Estos han encontrado que dentro del espectro de quasiespecies presentes en una muestra de suero, la mayor parte contiene mutaciones letales, lo que implica que estas no sean transmitidas a un nuevo susceptible. El análisis de las secuencias de estas mutantes revela que de manera general, los cambios están presentes en regiones muy conservadas, lo que indica que dichas variantes no son seleccionadas y se pierden durante el proceso evolutivo (172).

Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la variabilidad observada en mosquitos es mucho menor que la encontrada en humanos (218), lo que corrobora que la vía de transmisión impone restricciones a la variabilidad de estos virus y podría jugar un papel fundamental en el proceso de selección (171).

Los experimentos de Cologna y colaboradores (219) muestran que tanto en humanos como en mosquitos ocurre una selección de los virus más virulentos. Aquellos virus con potencial para producir FHD/SCD son capaces de eliminar de la competencia a aquellos que exclusivamente son capaces de causar FD.

Con estos elementos y tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, si verdaderamente durante la epidemia cubana hubiese ocurrido la aparición de una variante más virulenta por un mecanismo de escape a la neutralización, debió esperarse que en una fase inicial de la epidemia dicha variante se mantuviera dentro de las poblaciones virales minoritarias y que con la progresión de la epidemia dicha variante más virulenta pudiera

convertirse en mayoritaria y por tanto desplazar a la menos virulenta. Sin embargo, en este trabajo no se encontraron mutaciones en los genes estructurales, ni siquiera en el último aislamiento obtenido durante la epidemia.

Resulta extremadamente complicado definir cuanto tiempo sería necesario para que una variante minoritaria “más virulenta” lograra desplazar a una “menos virulenta”. Se conoce que las poblaciones virales están sujetas a cambios y que en muchos casos esto ocurre a través de procesos completamente estocásticos. Para la eliminación de la epidemia de 1997, se aplicaron medidas anti-vectoriales, que pudieron haber impedido que transcurriera el tiempo “necesario” para la generación de mutantes de escape a la neutralización, capaces de desplazar a la variante mayoritaria. Si consideramos esta hipótesis como cierta, entonces la aparición de cepas más virulentas por un mecanismo de escape a la neutralización, no sería la explicación al fenómeno observado durante la epidemia de 1997, de incremento de la severidad con la progresión de la epidemia.

La caracterización molecular de las cepas correspondientes a esta epidemia, no muestra evidencias contrastantes con los resultados obtenidos a partir de estudios filogenéticos realizados previamente utilizando la secuencia nucleotídica del gen E. Los estudios de Twiddy y colaboradores (74) revelan una baja selección positiva sobre este gen para la mayoría de los serotipos de dengue, siendo nula para algunos de los genotipos de DEN-2. Adicionalmente, algunos estudios evolutivos a largo plazo de diferentes serotipos de dengue en países donde dicha entidad viral ha estado circulando de forma endémica, por períodos prolongados, han revelado una marcada conservación de los genes estructurales y mayor variabilidad en los no estructurales en concordancia con lo obtenido en el estudio de esta epidemia cubana (45, 220, 221).

Aunque el objetivo fundamental de este estudio fue analizar la variación viral en el tiempo, en el análisis se incluyeron aislamientos obtenidos de pacientes con diferentes cuadros clínicos. En este sentido, puede decirse que los cambios aminoacídicos encontrados no pudieron ser consistentemente asociados con la forma clínica, corroborando que las características del hospedero constituyen factores de riesgo importantes para el desarrollo de FHD/SCD. En cambio, un claro patrón de evolución fue documentado, sugiriendo que

la población original de quasiespecies estuvo sujeta a selección y restricción con el progreso de la epidemia.

Podría plantearse que la introducción de una cepa clonal de DEN-2 en una población humana colocando restricciones inmunológicas en la supervivencia viral pudiera permitir la selección de un genotipo de la población heterogénea original. En el caso que nos ocupa, pudo ocurrir un simple proceso de evolución aleatoria producto de una deriva genética. Si tenemos en cuenta la naturaleza estocástica del ciclo de vida de los virus del dengue, en cada evento de alimentación del mosquito puede ocurrir un cuello de botella genético (176) y por otra parte si se producen reducciones en las poblaciones de mosquitos, estos cambios también conducen a cuellos de botella genético. Sin embargo, no es posible la ocurrencia de una selección natural que permitiera el predominio de una población de mayor adecuación o mayor capacidad replicativa o que la evolución observada en este estudio no pudiese demostrar el aumento de virulencia. Este hecho debe ser tema de investigaciones futuras para demostrar si los cambios genéticos observados con la progresión de la epidemia de 1997 tienen influencia o no, en la adecuación del virus.

Recientemente se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos juegan un papel crucial en el control de las infecciones por virus ARN, incluyendo dengue (222). Las variaciones en epítopes que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos son comunes y frecuentemente ofrecen rutas potenciales de escape para virus mutantes. Por tanto, estudios futuros deberán probar si las mutaciones en NS1 y NS5 observadas aquí, se enmarcan dentro de epítopes de anticuerpos o linfocitos T citotóxicos.

Los resultados publicados hasta la fecha indican que las causas de enfermedad severa en dengue para un paciente en particular son de origen multifactorial. Sin embargo, el fenómeno epidemiológico relacionado con el incremento de las tasas de mortalidad durante la epidemia, necesariamente debe estar asociado a factores virales. Los hallazgos obtenidos en este estudio sugieren que se dedique una atención especial al estudio de los genes no estructurales de los virus del dengue; así como, a la búsqueda de modelos que permitan comprobar la influencia de los cambios observados en la virulencia viral y por tanto en la patogenia de la enfermedad.

## **IV.2. Caracterización Molecular de los aislamientos de DEN-3 obtenidos durante las epidemias de Ciudad Habana 2000 y 2001-2002**

### **IV.2.1. Análisis Filogenético a partir de la secuencia nucleotídica del gen E**

Para este estudio se determinó la secuencia nucleotídica del gen E de tres aislamientos cubanos de DEN-3, el primero aislado durante el pequeño brote ocurrido en Ciudad Habana en el año 2000 y los restantes correspondientes a la epidemia de Ciudad Habana ocurrida en el período comprendido entre los años 2001-2002.

Con el objetivo de establecer la relación genética de los aislamientos cubanos con las cepas que habían estado circulando en los últimos años en la región, fueron alineadas las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio para los aislamientos cubanos; así como secuencias del gen E de cepas de DEN-3 disponibles en la base de datos Genbank. En este alineamiento se incluyó además la secuencia nucleotídica del primer aislamiento de DEN-3 obtenido durante la reintroducción del serotipo 3 en la región (Nicaragua, 1994), que fue determinada en el presente estudio.

El árbol filogenético (Figura 5) muestra que las cepas de la región se agruparon con cepas de la India, Samoa y Sri Lanka formando el genotipo III según la clasificación descrita previamente por Lanciotti y colaboradores (188). Dentro del genotipo III puede apreciarse un grupo independiente para las cepas de Latinoamérica con un 100 % de soporte por re-muestreo, en el que están incluidas las tres cepas cubanas. Además, es posible definir una clara dimensión en el tiempo puesto que la cepa más antigua (24/94, Nicaragua 1994) quedó situada en la base del árbol.

Particularmente, los virus cubanos se encontraron divididos en dos subgrupos. La cepa 116/00, aislada en el brote del año 2000 se ubicó muy cercana a cepas de DEN-3 aisladas en Brasil ese mismo año, también se relacionó con cepas aisladas en Martinica en el período comprendido entre los años 1999-2001. Sin embargo, las cepas 580/01 y 21/02, aisladas en la epidemia 2001-2002 de Ciudad Habana, aparecieron en un subgrupo independiente, con un soporte de re-muestreo del 98%.



Figura 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud que muestra la relación evolutiva entre 58 cepas de DEN-3 utilizando la secuencia nucleotídica del gen E. Todas las ramas horizontales están dibujadas a escala y los valores de soporte por re-muestreo se indican en los nodos claves.

El análisis filogenético permite investigar la dispersión de las cepas de virus mediante el estudio de las diferencias genéticas debido a mutaciones que se van acumulando con el tiempo. Lanciotti y colaboradores (188) fueron los primeros en estudiar la evolución molecular dentro de este serotipo, demostrando que había ocurrido una evolución independientemente de la ubicación geográfica de los aislamientos. El análisis filogenético realizado por estos autores permitió clasificar los DEN-3 en cuatro genotipos genéticamente diferentes (I, II, III y IV). Específicamente, dentro del genotipo III quedaron agrupadas las cepas de DEN-3 de Sri Lanka, la India, África y Samoa. Subsecuentemente, Wittke y colaboradores (184) añadieron a este genotipo la cepa brasileña del año 2000 (217). Posteriormente, Uzcategui y colaboradores (184) secuenciaron algunos aislamientos venezolanos del período (2000-2001) y un aislamiento mexicano del año 1995. Todas estas cepas fueron incluidas en el mismo genotipo.

Los resultados del presente trabajo demostraron que los aislamientos cubanos de DEN-3 obtenidos tanto en el brote del año 2000 como en la epidemia de los años 2001-2002 también pertenecen al genotipo III. Como era de esperarse, la cepa nicaragüense correspondiente al primer aislamiento de 1994, también clasificó como genotipo III.

El árbol de máxima verosimilitud obtenido para las secuencias del gen E mostró un grupo bien definido para las cepas Latinoamericanas, excluyendo las cepas de Puerto Rico de los años 60. Todos los aislamientos Latinoamericanos obtenidos después del año 1994, aparecieron a partir del mismo nodo del árbol filogenético, lo que significa que existió una sola introducción del virus y subsecuentemente ocurrieron variaciones sobre las poblaciones de virus de la cepa original.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares a los obtenidos por Messer y colaboradores en el año 2003 (42). Estos autores encontraron una estrecha relación entre cepas Latinoamericanas de DEN-3 aisladas recientemente y las cepas previamente identificadas como genotipo III aisladas en la India y África Oriental. En el citado estudio se escogió para el análisis una zona diferente del genoma viral, estudiándose un fragmento que incluyó los genes C-PrM/M y una porción del gen E. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, utilizando el gen E. Los

aislamientos latinoamericanos del último período mantuvieron un nodo común, que marcó el origen asiático de esta cepa, tal y como se obtuvo en el presente estudio utilizando el gen E.

#### **IV.2.2. Análisis de la secuencia aminoacídica deducida para la proteína E**

Mediante la comparación de la secuencia nucleotídica del gen E de los aislamientos del año 2000 y los años 2001-2002 se constató una homología del 98.9 %, por consiguiente todos los aislamientos estudiados fueron clasificados dentro del mismo genotipo. No obstante, es de destacar que se encontraron un total 15 sustituciones nucleotídicas en dicho gen y aunque 12 de ellas fueron sinónimas, tres resultaron no sinónimas generando tres cambios aminoacídicos en las posiciones E19 Treonina (T)/Prolina (P), E226 Isoleucina (I)/Treonina (T) y E329 Alanina (A)/Valina (V). Los cambios en las posiciones E19 y E226 fueron no conservados.

Por otra parte, fue posible definir diferencias entre dos aislamientos cubanos pertenecientes a la misma epidemia (2001-2002), encontrándose dos sustituciones nucleotídicas en un mismo codón (segunda y tercera posición) que generaron un cambio aminoacídico no conservado D/V en la posición E22. En este caso particular es necesario plantear que los cromatogramas de estas secuencias mostraron una mezcla de poblaciones. En ambos casos fue posible leer A+T y C+G en las posiciones nucleotídicas 62 y 63 respectivamente, siendo diferente la población predominante para cada cepa lo que determinó la aparición del cambio aminoacídico D/V encontrado en la posición E22.

Las secuencias aminoacídicas de las cepas cubanas así como las pertenecientes a la región Latinoamericana agrupadas dentro del genotipo III junto a las cepas India<sup>84</sup>, Sri Lanka<sup>89</sup> y Sri Lanka<sup>91</sup> fueron alineadas y comparadas. Los cambios observados mediante esta comparación se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13. Cambios aminoacídicos observados en el gen E de cepas de DEN-3 aisladas en nuestra región respecto a las aisladas en la India/84 y Sri Lanka/89 y 91**

<i>Cepas</i>	<i>Posición</i>																		
	6	19	22	38	88	199	219	224	226	228	239	246	304	320	321	325	329	338	404
<b>India84</b>	V	T	D	K	Q	M	T	T	T	P	R	Q	F	I	K	K	A	E	A
<b>SLanka89</b>	-	-	-	R	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SLanka91</b>	I	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	R	R	-	-	-
<b>24/94 Nicar</b>	-	P	V	-	-	-	-	A	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Mex6097</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Brasil2000</b>	-	-	-	-	P	-	-	-	-	T	K	P	-	V	-	-	-	-	-
<b>116/00Cuba</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	I	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>580/01Cuba</b>	-	P	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>21/02Cuba</b>	-	P	V	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Lard7984</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Lard6456</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Lard6211</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Lard7812</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	S	-	-	-	V	-	-
<b>Lard5990</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Mart2023/01</b>	-	-	-	-	-	V	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mart2012/01</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	K	-
<b>Mart1706/00</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mart1243/99</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mart1266/00</b>	-	-	-	-	-	-	A	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	-	E

\* Los cambios encontrados entre cepas cubanas de epidemias diferentes se destacan en verde y en malva los correspondientes a cepas de la misma epidemia.

El análisis aminoacídico comparativo realizado entre diferentes cepas del genotipo III, confirmó la existencia de cambios particulares tanto para los aislamientos cubanos como para el resto de las cepas analizadas. Se comprobó la existencia de un cambio aminoacídico localizado en el dominio B de la proteína E que permite dividir los aislamientos de este genotipo en dos subgrupos. Los aislamientos de Nicaragua/1994, México/1996, Cuba/2001-2002 y Venezuela/ 2001-2002 mostraron un cambio no conservado A/V en la posición E329. Sin embargo, los aislamientos de Cuba 2000, Brasil 2000 y Martinica 1999-2001, preservaron el residuo A en dicha posición como las cepas Asiáticas originales aisladas en la India en el año 1984 y Sri Lanka en los años 1989 y 1991.

Varios trabajos han indicado que existen factores dependientes del virus que están involucrados en el incremento de la severidad de la enfermedad (13, 223). Al menos, en los estudios relativos a cepas del serotipo 2, las diferencias genotípicas parecen estar asociadas con las diferencias en la virulencia, poniéndose de manifiesto al provocar epidemias de dengue más severas (62). Además, se ha propuesto que esta variabilidad de los virus podría ocurrir a causa de la interacción entre el virus y el hospedero (30). Sin embargo, los resultados obtenidos para los aislamientos cubanos de DEN-2, en el epígrafe anterior del presente trabajo, muestran evidencias con relación a una extraordinaria conservación del gen E, en virus aislados dentro de una misma epidemia.

Por otra parte, los estudios de Uzcategui y colaboradores (184) muestran una escasa variación genética al comparar 15 aislamientos de DEN-3 obtenidos en Venezuela dentro del período epidémico de los años 2000-2001. Estos autores no encontraron más de dos sustituciones nucleotídicas al comparar las cepas estudiadas y ninguna de estas sustituciones conllevó a un cambio aminoacídico. A pesar de que en el citado estudio se incluyeron aislamientos obtenidos de pacientes con diferentes cuadros clínicos (moderados y severos), el gen E se mantuvo altamente conservado.

En el estudio que nos ocupa, se determinó la secuencia nucleotídica de un número reducido de aislamientos correspondientes a dos epidemias cercanas en el tiempo (Ciudad Habana, 2000 y Ciudad Habana, 2001-2002). Contrariamente, fue posible encontrar 15 sustituciones nucleotídicas, tres de las cuales generaron cambios aminoacídicos.

Por otra parte, aunque las diferencias encontradas entre los aislamientos cubanos de DEN-3 no fueron suficientes para clasificarlos dentro de genotipos diferentes, pudimos constatar que el número de sustituciones encontradas en las cepas aisladas durante la segunda epidemia, está por encima de la tasa de sustituciones por sitio por año, inferida para este serotipo por Twiddy y colaboradores (166). Además, la variabilidad encontrada para estos aislamientos permitió la separación de los mismos en dos subgrupos filogenéticos, en correspondencia con la epidemia en que fueron aislados.

Adicionalmente, existen evidencias fenotípicas de la variabilidad genotípica encontrada en estas cepas cubanas. Al estudiar la capacidad neutralizante de un panel de sueros obtenidos de individuos que sufrieron infección por DEN-3 durante la epidemia de Ciudad Habana, 2001-2002 medida tanto frente a cepas de DEN-3 aisladas en el brote del año 2000 como a cepas aisladas en la epidemia del período 2001-2002. En este ensayo pudo comprobarse una diferencia significativa entre los títulos neutralizantes de los sueros frente a las distintas cepas (224). La diferencia observada en cuanto a la capacidad neutralizante de estos sueros podría explicarse a través de las diferencias aminoacídicas encontradas entre las cepas correspondientes a epidemias diferentes.

En el período inter-epidémico comprendido entre el fin del brote del año 2000 (Diciembre) y el inicio de la epidemia del 2001 (Junio), la mayoría de los febriles y casos sospechosos de dengue fueron estudiados clínica, epidemiológica y serológicamente. Puede plantearse que las observaciones clínicas junto a los estudios seroepidemiológicos realizados en ese período por el Laboratorio Nacional de Referencia de Dengue, sugirieron que no había ocurrido circulación de dengue en dicho período, durante el cual no se observaron muestras positivas de IgM de dengue.

No obstante a las evidencias seroepidemiológicas y las medidas anti-vectoriales tomadas, no era posible excluir una transmisión silente del virus dentro de la población de Ciudad Habana. Los resultados de este estudio sugieren, que el brote del año 2000 ciertamente se había eliminado, como plantearon en ese momento las autoridades de salud y que se produjo una segunda introducción en el año 2001, como resultado de la dispersión de los virus que estaban circulando en ese momento en la región. Siendo en este caso muy poco probable la hipótesis de que en un mero proceso de evolución, durante una transmisión silente, el virus experimentara una variación superior a la tasa

de sustituciones/sitio/año, que ha sido calculada para este serotipo (166). Además debe tenerse en cuenta que el período de supuesta circulación fue menor de 6 meses.

El brote ocurrido en el año 2000 pudo ser eliminado rápidamente gracias a la detección oportuna del caso índice. No obstante, la elevada densidad del vector y la entrada al país de individuos provenientes de países endémicos de dengue, posiblemente en fase virémica, sin dudas pudieron propiciar una segunda introducción del virus en Ciudad Habana en el año 2001 (29).

La introducción secuencial de cepas con diferencias genéticas ha sido descrita en otras regiones. Así por ejemplo, el estudio filogenético de cepas de DEN-1 realizado recientemente por Nuegoonpipat y colaboradores (44) mostró que los aislamientos obtenidos en las Islas del Pacífico y Myanmar correspondieron a introducciones múltiples desde diferentes localidades asiáticas, seguidas de transmisión local. Sin embargo, estos autores no encontraron evidencias de cambios adaptativos en la proteína E.

Además de las diferencias encontradas entre los aislamientos cubanos de epidemias diferentes, también fue posible encontrar diferencias entre aislamientos correspondientes a diferentes momentos de la epidemia del período 2001-2002. En este caso, pudo comprobarse la presencia de al menos dos poblaciones virales en un mismo aislamiento. Sin embargo, la población predominante fue diferente en cada uno de los aislamientos estudiados. Estos resultados podrían relacionarse con el fenómeno de las quasiespecies, ampliamente documentado para DEN-3 (165).

En este sentido, se debe señalar que aunque ambos aislamientos fueron obtenidos en C6/36 HT el aislamiento 580/01 fue logrado a partir de una muestra de tejido (bazo) de un fallecido y el aislamiento 21/02 se obtuvo a partir de una muestra de suero de un paciente que sufría FD.

A partir de este estudio, no podemos definir si la población predominante encontrada para aislamiento obtenido del fallecido tiene mayor adecuación para producir la enfermedad severa y por tanto este cambio tendría implicaciones en la patogénesis. Este resultado indica la necesidad de estudiar el fenómeno observado en un mayor número de aislamientos.

Por otra parte, el tipo de muestra donde se aisló el virus (bazo o suero) pudo estar relacionado con las diferencias observadas en cuanto a la población predominante. En estudios futuros, sería de gran interés, obtener la secuencia del virus para un mismo paciente en diferentes tipos de muestras biológicas.

## **Consideraciones Generales**

La evolución de los virus del dengue ha tenido un impacto notable sobre la virulencia en los humanos y sobre la epidemiología de la enfermedad del dengue a nivel mundial. Aunque existen diferencias antigénicas y genéticas evidentes entre las cepas virales, la falta de un modelo animal para reproducir la enfermedad, ha hecho muy difícil detectar diferencias en cuanto a la virulencia de los virus. No obstante, los estudios filogenéticos realizados hasta la fecha, que incluyen un número elevado de secuencias, han ofrecido evidencias que indican la asociación de genotipos específicos con la presencia de la enfermedad más severa (69).

La mayor capacidad replicativa de algunos virus debe estar relacionada con la patogénesis, si tenemos en cuenta que en algunos estudios realizados en humanos se ha encontrado una fuerte asociación entre la carga viral y la severidad del cuadro clínico del paciente (225). Así mismo, durante la replicación competitiva de cepas de DEN-2 de diferentes genotipos (Asiático y Americano) en células dendríticas, se ha podido constatar una mayor carga viral para la cepa más virulenta, lo que habla a favor de una mayor adecuación de esta, en términos de capacidad replicativa. En un ensayo de competencia desarrollado en mosquitos, utilizando estas mismas cepas, pudo observarse un desplazamiento de la cepa menos virulenta (productora de FD en humanos) por la más virulenta (productora de FHD/SCD en humanos) (219).

Obviamente, del contexto inmunológico en que vayan apareciendo los virus de distintos serotipos y del genotipo específico, dependerá la evolución de estos virus en las diferentes epidemias. De esta forma, no sólo existen evidencias epidemiológicas sobre la mayor virulencia de algunos genotipos. El estudio de la dinámica poblacional de los virus del dengue, a través de modelos matemáticos (226), ha mostrado que el DEN-2 del genotipo Americano/Asiático, encontrado en varios países de la región desde la

década de los 80, presenta una tasa de crecimiento poblacional que es la más alta encontrada hasta el momento (227). Este hecho claramente demuestra el potencial epidémico de estos virus en poblaciones susceptibles.

En el presente trabajo, se ha demostrado la presencia de cepas de genotipos con alto potencial virulento y epidémico (DEN-2 (Genotipo Americano/Asiático) y DEN-3 (Genotipo III)), como agentes etiológicos de las epidemias cubanas más recientes. Además se ha estudiado la evolución de estos virus en el transcurso de las epidemias buscando explicaciones a las peculiaridades observadas en estas.

Durante la caracterización molecular de las cepas cubanas no se encontró una variación genotípica elevada. Dicho resultado se sustenta sobre la base de los conocimientos que ya se tienen de esta entidad viral (166, 171). Los virus del dengue, como virus ARN, muestran una variación genética sustancial dentro de los diferentes hospederos (Ej. mosquitos y humanos) pero aún con bajas tasas de sustitución nucleotídica a largo plazo. Holmes y colaboradores (172) sugirieron que la variación genética intra-hospedero se corresponde con un patrón de mutaciones desfavorables para la adecuación del virus, teniendo en cuenta que la mayoría de los sitios que exhiben variaciones no sinónimas a nivel intra-hospedero son invariantes a niveles filogenéticos profundos.

Esta pérdida de variaciones no sinónimas a largo plazo es indicativa de la extensa selección purificadora. Consecuentemente, aunque los arbovirus son capaces de adaptarse exitosamente a diversos tipos de células, ellos se caracterizan por una elevada tasa de mutaciones letales, lo que reduce notablemente el número de mutantes que generan caracteres heredados (172).

El estudio descrito en esta tesis, muestra algunos hallazgos como la conservación de los genes estructurales y la aparición de cambios en las proteínas no estructurales con la progresión de la epidemia. Además, resultó interesante la presencia de cambios nucleotídicos no sinónimos en aislamientos de DEN-2 y DEN-3 obtenidos a partir de piezas de tejido de fallecidos. Estos resultados apuntan hacia la necesidad de estudios más profundos que permitan comprobar si verdaderamente los cambios encontrados tienen repercusión sobre la capacidad replicativa del virus. La falta de un modelo animal como se planteó anteriormente incide negativamente en que se pueda llegar con

rapidez a resultados más concluyentes. No obstante, se tienen evidencias de la expresión fenotípica de los cambios genotípicos encontrados, ya sea por la mejor replicación en cultivos de células de mosquito o por la mayor neurovirulencia en ratones lactantes. Dicha expresión también pudiera ser real para humanos (212).

La variabilidad encontrada en los genes no estructurales está indicando una posible ruta de escape a la respuesta celular citotóxica del hospedero, infectado secundariamente en la mayoría de los casos severos. Aunque existen pocos estudios con relación al mapeo de epítopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos en los genes no estructurales, las evidencias encontradas recientemente para NS3 por Mongkolsapaya y colaboradores (222) sugieren que los genes no estructurales pueden estar involucrados en este tipo de mecanismo de escape. Unido a esto, desde el punto de vista filogenético, la mayor variabilidad de los genes no estructurales con respecto a los estructurales es un hecho que no es único de epidemias cubanas, se ha observado también en estudios filogenéticos a largo plazo en Brasil(220), Puerto Rico (221) y Tailandia (45).

Por otra parte, es importante señalar que la conservación de los genes que codifican para las proteínas estructurales, observada en este estudio -al menos para la población predominante en la muestra-, es un indicativo de que no existió selección manejada por anticuerpos. Sin embargo, no se puede descartar que determinadas poblaciones, a pesar de ser minoritarias, pudieran tener una influencia en la patogenia de la enfermedad.

Los estudios realizados con el virus de la Hepatitis C perteneciente a la familia *Flaviviridae*, demuestran que la composición y dinámica de quasiespecies de la región NS5A pueden jugar un papel importante en el pronóstico de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento antiviral con interferón y Ribavirina (228).

En este sentido, la heterogeneidad poblacional en los virus del dengue ha sido bien estudiada para el serotipo 3 utilizando la secuenciación clonal (165, 218). Aunque no se ha demostrado la influencia de esta dinámica de quasiespecies en la patogenia de la enfermedad; recientemente Chao y colaboradores encontraron una heterogeneidad significativa en el gen E en aislamientos de DEN-3 obtenidos durante una epidemia ocurrida en Taiwán (229).

Teniendo en cuenta las evidencias planteadas por Chao y colaboradores (229) para el gen E, cabría preguntarse si la variante viral que encontramos como predominante en los aislamientos cubanos de DEN-2, es una mutante de escape. Habitualmente, los aislamientos de dengue se obtienen a partir de muestras tomadas de pacientes en los que la enfermedad puede ser leve o muy severa, pero que acuden al médico porque presentan algún síntoma. Nada se conoce sobre la secuencia nucleotídica o la composición poblacional de los virus que son capaces de producir viremia de forma asintomática. Los individuos asintomáticos se identifican a posteriori mediante encuestas seroepidemiológicas y por tanto no se cuenta con el aislamiento viral. Ellos deben contribuir a la transmisión viral silente pero por razones obvias no son estudiados.

Otra posibilidad sería que la composición y/o dinámica de quasiespecies varíe de acuerdo con el serotipo y que los resultados obtenidos al estudiar cepas de DEN-3 no sean aplicables en un 100 % a DEN-2. Se conoce que no existe la misma presión selectiva positiva sobre los cuatro serotipos del dengue, de hecho varía al comparar los diferentes genotipos. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, en el caso de DEN-2 debe profundizarse en la dinámica de quasiespecies de los genes no estructurales. Para DEN-3, a pesar del limitado tamaño de la muestra estudiada, es posible sugerir una profundización en el gen E, así como iniciar los estudios a nivel de genoma viral completo.

Los resultados presentados aquí evidencian la complejidad de los mecanismos de evolución de los virus del dengue, así como, la necesidad de investigar acerca de las consecuencias de esta evolución sobre la patogénesis viral. Los conocimientos derivados de este estudio constituyen un punto de partida para la profundización en el papel que juegan los factores virales en el desarrollo de las formas más severas de la enfermedad. Sin embargo, se impone un análisis multifactorial, pues en esta dirección ni los factores dependientes del hospedero, ni el contexto epidemiológico pueden ser obviados.

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES**

1. La conservación del gen E en aislamientos de DEN-2 obtenidos en diferentes momentos de la epidemia del año 1997, sugiere que el incremento de severidad observado en dicha epidemia no está relacionado con la aparición de mutantes de escape a la neutralización.
2. Los análisis filogenéticos realizados a partir del gen E y del genoma viral completo confirman que la epidemia de DEN-2 ocurrida en Santiago de Cuba en el año 1997, fue causada por una cepa de origen Asiático asociada con alto potencial virulento, clasificada dentro del genotipo Americano/Asiático.
3. El estudio del genoma viral completo de aislamientos de DEN-2 obtenidos en diferentes momentos de la epidemia del año 1997, permitió constatar que el virus circulante tuvo variaciones genéticas, con la progresión de la epidemia en el tiempo, las cuales pudieran tener influencia sobre la capacidad replicativa del virus.
4. Las cepas de DEN-3 que circularon en Cuba en los períodos epidémicos de los años 2000 y 2001-2002 pertenecen al genotipo III, introducido en América Latina en el año 1994.
5. El análisis filogenético indica que en el período comprendido entre los años 2000-2001 en Cuba ocurrieron dos introducciones de DEN-3 cercanas en el tiempo.

## **CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES**

- 1.** Realizar experimentos que permitan comprobar si los cambios genotípicos observados al comparar cepas de DEN-2 tienen influencia sobre la capacidad replicativa del virus.
- 2.** Estudiar las regiones no estructurales del genoma en un mayor número de cepas de DEN-2 de la epidemia de Santiago de Cuba, 1997.
- 3.** Estudiar un mayor número de cepas de DEN-3 de diferentes momentos de la epidemia tomando como base para la comparación el genoma completo del virus, con el objetivo de definir si existe variación genética con la progresión de la epidemia.
- 4.** Definir si existe variabilidad genética entre cepas aisladas del mismo paciente, a partir de diferentes muestras biológicas.

## CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1(2):55-7.
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003;27(1):1-13.
3. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985;229(4715):726-33.
4. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999;257(1):1-6.
5. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication no.548. Washington: PAHO. 1994.
6. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 1989;67(4):375-80.
7. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239(4839):476-81.
8. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(5):821-3.
9. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 1977;265(5596):739-41.
10. Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy* 1982;31:301-64.

11. Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR, Jr. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg* 1978;27(3):581-9.
12. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38(1):172-80.
13. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997;230(2):244-51.
14. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol* 2000;8(2):74-7.
15. Rosen L. Dengue hemorrhagic fever. *Bull Soc Pathol Exot* 1996;89(2):91-3.
16. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42(2):179-84.
17. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000;152(9):793-9.
18. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 4:S830-9.
19. Pittaluga G. Sobre un brote de dengue en la Habana. *Rev Med Trop Paras Bact Clin y Lab* 1945;11(1).
20. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977:some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication 1979;375:40-43.
21. Cantelar de Francisco N, Fernandez A, Albert Molina L, Perez Balbis E. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Rev Cubana Med Trop* 1981;33(1):72-8.

22. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ* 1987;21(3):270-9.
23. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, et al. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(3):241-6.
24. Sariol CA, Pelegrino JL, Martinez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61(6):994-1000.
25. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 1998;4(1):89-92.
26. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999;3(3):130-5.
27. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica* 2002;11(4):223-7.
28. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2(1):33-42.
29. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis* 2004;10(4):719-22.
30. Guzman MG, Kouri G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet* 2000;355(9218):1902-3.
31. Despres P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 1993;196(1):209-19.

32. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996;121(2):102-10.
33. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):480-96.
34. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*: CAB International; 1997. p. 1-22.
35. Graham H. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med* 1903;6:209.
36. Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev* 1950;14(3):225-32.
37. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1952;1(1):30-50.
38. Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians* 1960;73:140-155.
39. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore* 1998;27(2):227-34.
40. Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever--do we know its cause? *Am J Trop Med Hyg* 1973;22(1):82-91.
41. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 1980;58(1):1-21.
42. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):800-9.

43. Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, et al. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(6):765-73.
44. Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai le Q, et al. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology* 2004;329(2):505-12.
45. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* 2004;329(1):168-79.
46. Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 2003;61:235-89.
47. Bartley LM, Donnelly CA, Garnett GP. The seasonal pattern of dengue in endemic areas: mathematical models of mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(4):387-97.
48. Saugrain J, Moreau JP, Rosen L. Dengue epidemic in Tahiti in 1971. Evolution of hemorrhagic tendency and comparisons with previous epidemics. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1973;66(3):381-5.
49. Maguire T, Miles JA, Macnamara FN, Wilkinson PJ, Austin FJ, Mataika JU. Mosquito-borne infections in Fiji. V. The 1971-73 dengue epidemic. *J Hyg (Lond)* 1974;73(2):263-70.
50. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg* 1974;23(3):495-506.
51. Condon R, Taleo G, Stewart T, Sweeney T, Kiedrzyński T. Dengue surveillance in the Pacific Islands. *Pac Health Dialog* 2000;7(2):122-6.
52. Ashford DA, Savage HM, Hajjeh RA, McReady J, Bartholomew DM, Spiegel RA, et al. Outbreak of dengue fever in Palau, Western Pacific: risk factors for infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(2):135-40.

53. Kanesa-thasan N, Iacono-Connors L, Magill A, Smoak B, Vaughn D, Dubois D, et al. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *Lancet* 1994;343(8898):678.
54. Hyams KC, Oldfield EC, Scott RM, Bourgeois AL, Gardiner H, Pazzaglia G, et al. Evaluation of febrile patients in Port Sudan, Sudan: isolation of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35(4):860-5.
55. Calisher CH, Nuti M, Lazuick JS, Ferrari JD, Kappus KD. Dengue in the Seychelles. *Bull World Health Organ* 1981;59(4):619-22.
56. Rodier GR, Parra JP, Kamil M, Chakib SO, Cope SE. Recurrence and emergence of infectious diseases in Djibouti city. *Bull World Health Organ* 1995;73(6):755-9.
57. PAHO. Dengue in the Caribbean, 1977. Proceedings of a Workshop held in Montego Bay, Jamaica, 8-11 May, 1978. PAHO Scientific Publication 375. 1979.
58. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(5):816-20.
59. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1983;25(1):53-4.
60. Hospedales CJ. An update on Dengue fever in the Caribbean. *West Indian Med J* 1990;39(2):131.
61. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2):479-93.
62. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73(6):4738-47.

63. Guzman MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(2):114-7.
64. Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001;43(1):55-7.
65. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998;352(9132):971-7.
66. Guzman MG, Kouri G, Pelegrino JL. Emerging viral diseases. *Rev Cubana Med Trop* 2001;53(1):5-15.
67. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 2000;74(7):3227-34.
68. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;3(1):19-28.
69. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;59:315-41.
70. Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, Holmes EC. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res* 2003;59:277-314.
71. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 1998;72(1):73-83.
72. Gaunt MW, Sall AA, Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 8):1867-76.
73. Ferguson N, Anderson R, Gupta S. The effect of antibody-dependent enhancement on the transmission dynamics and persistence of multiple-strain pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(2):790-4.

74. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 2002;298(1):63-72.
75. Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 7):1679-89.
76. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 1993;193(2):888-99.
77. Condit RC. Principles of Virology. In: Howley PM, editor. *Fields Virology*. Fourth edition ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
78. Rice CM. Overview of flavivirus molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990;21(4):670-7.
79. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1043-1125.
80. Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 2):175-82.
81. Vazquez S, Guzman MG, Guillen G, Chinea G, Perez AB, Pupo M, et al. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine* 2002;20(13-14):1823-30.
82. Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields BM, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 931-960.
83. Mandl CW, Guirakhoo F, Holzmann H, Heinz FX, Kunz C. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol* 1989;63(2):564-71.

84. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
85. Henschal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990;3(4):376-96.
86. Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 1993;67(3):1672-5.
87. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002;108(5):717-25.
88. Young PR. Antigenic analysis of dengue virus using monoclonal antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990;21(4):646-51.
89. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002;186(8):1165-8.
90. Shafee N, AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 8):2191-5.
91. Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *J Virol* 1999;73(10):8083-94.
92. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods* 2003;114(1):45-54.
93. Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 1993;197(1):265-73.

94. Preugschat F, Strauss JH. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology* 1991;185(2):689-97.
95. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 1991;65(5):2467-2475.
96. Brooks AJ, Johansson M, John AV, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J Biol Chem* 2002;277(39):36399-407.
97. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 4):735-45.
98. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA, Chu MC. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* 1990;177(2):668-75.
99. Heinz FX, Auer G, Stiasny K, Holzmann H, Mandl C, Guirakhoo F, et al. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch Virol Suppl* 1994;9:339-48.
100. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 961-1034.
101. Gubler DJ, Clark GG. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(6 Suppl):50-60.
102. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2000;2(9):1041-50.
103. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica* 2000;16(1):205-11.

104. Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr* 1997;131(4):516-24.
105. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *Bmj* 2002;324(7353):1563-6.
106. Martinez-Torres E. Dengue and hemorrhagic dengue: the clinical aspects. *Salud Publica Mex* 1995;37 Suppl:S29-44.
107. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. WHO, Geneva; 1997.
108. Nimmannitya S. Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. In: Cook GC, editor. *Manson's Tropical Diseases*. 20th ed. London: Saunders WB; 1998.
109. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63(1-2):5-11.
110. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13(2):261-76.
111. Rigau-Perez JG. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. Puerto Rico Association of Epidemiologists. *Rev Panam Salud Publica* 1997;1(5):381-8.
112. Diaz A, Kouri G, Guzman MG, Lobaina L, Bravo J, Ruiz A, et al. Description of the clinical picture of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ* 1988;22(2):133-44.
113. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000;355(9209):1053-9.
114. Pancharoen C, Thisyakorn U. Neurological manifestations in dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32(2):341-5.

115. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 1992;4(2):121-7.
116. Porter KR, Beckett CG, Kosasih H, Tan RI, Alisjahbana B, Rudiman PI, et al. Epidemiology of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in a Cohort of Adults Living in Bandung, West Java, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72(1):60-66.
117. Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31(3 Pt 1):548-55.
118. Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology* 1986;58(3):429-36.
119. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol* 1990;64(9):4356-63.
120. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994;19(3):500-12.
121. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120(5):653-69.
122. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38(2):411-9.
123. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(4):444-51.
124. Bielefeldt-Ohmann H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol* 1997;5(10):409-13.

125. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res* 2003;60:397-419.
126. Livingston PG, Toomey S, Kurane I, Janus J, Ennis FA. Modulation of the functions of dengue virus-specific human CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell clone by IL-2, IL-7 and IFN gamma. *Immunol Invest* 1995;24(4):619-29.
127. Sierra B, Garcia G, Perez AB, Morier L, Rodriguez R, Alvarez M, et al. Long-term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Infect Dis* 2002;6(2):125-8.
128. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 1997;142(5):897-916.
129. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol* 2001;63(2):143-9.
130. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987;18(3):316-20.
131. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26(3):337-43.
132. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J* 1986;Suppl:40-2.
133. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1999;354(9188):1431-4.
134. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 2002;360(9329):310-2.

135. Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996;77 ( Pt 10):2541-5.
136. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(5):427-34.
137. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003;77(7):3929-38.
138. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 2000;74(17):7814-23.
139. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181(1):2-9.
140. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2005;2(1):1.
141. Guzman MG, Kouri G, Soler M, Bravo J, Rodriguez de La Vega A, Vazquez S, et al. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87(4):559-64.
142. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(6):621-7.
143. Vorndam AV, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Kuno G, editor. *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997. p. 313-333.
144. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004;8(2):69-80.

145. Balmaseda A, Guzman MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Tellez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(2):317-22.
146. Henschal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(1):164-9.
147. Henschal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34(1):162-9.
148. Clarke DH, Casals J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
149. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(2):108-12.
150. Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, Gubler DJ. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(5):757-62.
151. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* 2003;110(2):179-84.
152. Sathish N, Manayani DJ, Shankar V, Abraham M, Nithyanandam G, Sridharan G. Comparison of IgM capture ELISA with a commercial rapid immunochromatographic card test & IgM microwell ELISA for the detection of antibodies to dengue viruses. *Indian J Med Res* 2002;115:31-6.
153. Parida MM, Upadhyay C, Saxena P, Dash PK, Jana AM, Seth P. Evaluation of a dipstick ELISA and a rapid immunochromatographic test for diagnosis of Dengue virus infection. *Acta Virol* 2001;45(5-6):299-304.
154. Groen J, Koraka P, Velzing J, Copra C, Osterhaus AD. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(6):867-71.

155. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Deteccion de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper. *Rev Panam Salud Publica* 1998;3(3):174-8.
156. Deubel V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Kuno G, editor. *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997. p. 335-366.
157. Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, et al. Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples. *Rev Panam Salud Publica* 1998;4(1):1-5.
158. dos Santos CL, Bastos MA, Sallum MA, Rocco IM. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45(1):11-6.
159. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(3):545-51.
160. Alvarez M, Guzman MG, Rosario D, Vazquez S, Pelegrino JL, Sariol CA, et al. Secuenciacion directa de un producto amplificado de una muestra de suero. Direct sequencing of an amplified product from a serum sample. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(1):53-5.
161. Rosario D, Alvarez M, Vazquez S, Amin N, Rodriguez-Roche R, Guzman MG. Application of Molecular Method to the diagnosis and Characterization of a dengue outbreak in Cuba. *Biotechnologia Aplicada* 2001;18(4):203-206.
162. Sithiprasasna R, Strickman D, Innis BL, Linthicum KJ. ELISA for detecting dengue and Japanese encephalitis viral antigen in mosquitoes. *Ann Trop Med Parasitol* 1994;88(4):397-404.

163. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1053-7.
164. De Filippis VR. Virus Evolution. In: Howley PM, editor. *Fields Virology*. Fourth ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams& Wilkins; 2001.
165. Wang WK, Lin SR, Lee CM, King CC, Chang SC. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol* 2002;76(9):4662-5.
166. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* 2003;20(1):122-9.
167. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutation and fitness for survival. *Ann Rev Microbiol* 1997;51:151-178.
168. Duarte E, Clarke D, Moya A. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6015-19.
169. Holland JJ, De la Torre JC, Steinhauer DA. RNA population as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:1-20.
170. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with RNA virus Polymerase. *Gene* 1992;122:281-288.
171. Woelk CH, Holmes EC. Reduced positive selection in vector-borne RNA viruses. *Mol Biol Evol* 2002;19(12):2333-36.
172. Holmes EC. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. *J Virol* 2003;77(20):11296-8.
173. Sala M, Wain-Hobson S. Drift and conservation in RNA Virus evolution. Are they adapting or merely changing? In: Domingo E, Webster RG, Holland JJ, editors. *Origin and evolution of viruses*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 115-140.
174. Trent DW, Grant JA, Rosen L, Monath TP. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 1983;128(2):271-84.

175. Monath TP, Wands JR, Hill LJ, Brown NV, Marciniak RA, Wong MA, et al. Geographic classification of dengue-2 virus strains by antigen signature analysis. *Virology* 1986;154(2):313-24.
176. Sittisombut N, Sistayanarain A, Cardoso MJ, Salminen M, Damrongdachakul S, Kalayanarooj S, et al. Possible occurrence of a genetic bottleneck in dengue serotype 2 viruses between the 1980 and 1987 epidemic seasons in Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57(1):100-8.
177. Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* 1992;56(1):61-79.
178. Twiddy SS, Holmes EC. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 2):429-40.
179. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 2001;82:2945-2953.
180. Worobey M, Rambaut A, Holmes EC. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(13):7352-7.
181. Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol* 1999;16(3):405-409.
182. Tolou HJ, Couissinier-Paris P, Durand JP, Mercier V, de Pina JJ, de Micco P, et al. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 6):1283-90.
183. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3508-10.
184. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 6):1569-75.

185. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997;24:4876-4882.
186. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14(9):817-8.
187. Swofford DL. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2002.
188. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 1994;75 ( Pt 1):65-75.
189. Foster JE, Bennett SN, Carrington CV, Vaughan H, McMillan WO. Phylogeography and molecular evolution of dengue 2 in the Caribbean basin, 1981-2000. *Virology* 2004;324(1):48-59.
190. Singh UB, Maitra A, Broor S, Rai A, Pasha ST, Seth P. Partial nucleotide sequencing and molecular evolution of epidemic causing Dengue 2 strains. *J Infect Dis* 1999;180(4):959-65.
191. Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Garcia-Rejon JE, et al. Introduction of the American/Asian Genotype of Dengue 2 Virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71(4):485-492.
192. Winkler G, Heinz FX, Kunz C. Studies on the glycosylation of flavivirus E proteins and the role of carbohydrate in antigenic structure. *Virology* 1987;159(2):237-43.
193. Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, Lai CJ. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J Virol* 1993;67(11):6567-75.
194. Guirakhoo F, Hunt AR, Lewis JG, Roehrig JT. Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology* 1993;194(1):219-23.

195. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Beaty BJ, Mathews JH. Enhancement of the antibody response to flavivirus B-cell epitopes by using homologous or heterologous T-cell epitopes. *J Virol* 1992;66(6):3385-90.
196. Roehrig JT, Risi PA, Brubaker JR, Hunt AR, Beaty BJ, Trent DW, et al. T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. *Virology* 1994;198(1):31-8.
197. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 1993;197(1):216-224.
198. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995;375(6529):291-8.
199. Bray M, Men R, Tokimatsu I, Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol* 1998;72(2):1647-51.
200. Chen WJ, Chen SL, Chien LJ, Chen CC, King CC, Harn MR, et al. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(1):12-6.
201. Teixeira Mda G, Barreto ML, Costa Mda C, Ferreira LD, Vasconcelos PF, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 2002;7(9):757-62.
202. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001;8(5):377-88.
203. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 2002;60(4):309-18.
204. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6(1):16-25.

205. Holmes EC. Molecular epidemiology of dengue virus--the time for big science. *Trop Med Int Health* 1998;3(11):855-6.
206. AbuBakar S, Wong PF, Chan YF. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 10):2437-42.
207. Tolou H, Couissinier Paris P, Mercier V, Pisano MR, de Lamballerie X, de Micco P, et al. Complete genomic sequence of a dengue type 2 virus from the French West Indies. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277(1):89-92.
208. Blackwell JL, Brinton MA. BHK cell proteins that bind to the 3' stem-loop structure of the West Nile virus genome RNA. *J Virol* 1995;69(9):5650-8.
209. Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol* 1996;70(6):3930-7.
210. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 1999;73(6):4611-21.
211. Blok J, Gibbs AJ, McWilliam SM, Vitarana UT. NS 1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. *Arch Virol* 1991;118(3-4):209-23.
212. López L. Estudio de propiedades biológicas de cepas de Dengue de los serotipos 2 y 3 causantes de las epidemias de 1997 (Santiago de Cuba) y 2001-2002 (Ciudad de la Habana). Tesis de Maestría: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2003.
213. Moya A, Holmes EC, González-Candelas F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature* 2004;2:1-10.
214. Innis BL. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. In: Porterfield JS, editor. *Exotic Viral Infections*. London: Chapman & Hall; 1995. p. 103-140.

215. Wang SH, Syu WJ, Huang KJ, Lei HY, Yao CW, King CC, et al. Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 12):3093-102.
216. Wang WK, Sung TL, Lee CN, Lin TY, King CC. Sequence diversity of the capsid gene and the nonstructural gene NS2B of dengue-3 virus in vivo. *Virology* 2002;303(1):181-91.
217. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002;301(1):148-56.
218. Lin SR, Hsieh SC, Yueh YY, Lin TH, Chao DY, Chen WJ, et al. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. *J Virol* 2004;78(22):12717-21.
219. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005;79(2):853-9.
220. dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoso SP, Rey F, Deubel V, et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res* 2002;90(1-2):197-205.
221. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, et al. Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol Biol Evol* 2003;20(10):1650-58.
222. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003;9(7):921-7.
223. Rosen L. Disease exacerbation caused by sequential dengue infections: myth or reality? *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 4:S840-2.

224. Pavon-Oro A. Anticuerpos neutralizantes en sueros humanos frente a diferentes aislamientos del virus dengue-3. Tesis de Diploma: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"; 2004.
225. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003;305(2):330-8.
226. Pybus OG, Rambaut A. Genie: estimating demographic history from molecular phylogenies. *Bioinformatics* 2002;18:1404-05.
227. Twiddy SS, Pybus OG, Holmes EC. Comparative population dynamics of mosquito-borne flaviviruses. *Infect Genet Evol* 2003;3(2):87-95.
228. Farci P, Shimoda A, Coiana A. The outcome of acute Hepatitis C predicted by the evolution of viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-44.
229. Chao DY, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJ. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virol J* 2005;2(1):72.

## **CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS**

1. **Rodriguez-Roche R**, Alvarez M, Guzman MG, Morier L and Kouri G. Isolation of Dengue 2 Virus in C6/36HT Cells by Rapid Centrifugation/Shell Vial Assay. Comparison with Conventional Virus Isolation Method. **J Clin Microbiol** **2000**; 38(9): 3508-3510.
2. **Rodriguez-Roche, R.**, Alvarez, M., Gritsun, T., Halstead, S., Kourí, G., Gould, E.A. and Guzman, M.G. Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. **Virology** **2005**; 334(2), 154-159.
3. **Rodriguez-Roche, R.**, Alvarez, M., Gritsun, T., Rosario, D., Halstead, S., Kouri, G., Gould, E.A. and Guzman, M.G. (2005) Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. **Arch Virol** **2005**; 150(3), 415-25.
4. **Rodriguez-Roche, R.**, Alvarez, M., Holmes, E.C., Bernardo, L., Kourí, G., Gould, E.A., Halstead, S. and Guzman, M.G. Dengue virus type 3, Cuba, 2000-2002. **Emerg Infect Dis** **2005**; 11(5):173-174.
5. Guzmán MG, Rosario D, Muné M, Alvarez M, **Rodríguez Roche R** y Kourí G. Relación Genética del virus dengue 3 aislado en la epidemia de FHD en Nicaragua, 1994. **Rev Cubana Med Trop** **1996**; 48(2): 117-121.
6. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, **Rodriguez Roche R**, Kouri G, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. **Bol Oficina Sanit Panam** **1996**;121(2):102-10.
7. Guzman MG, Alvarez M, **Rodriguez Roche R**, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, Cabrera MV and Kouri G. Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases in Cuba, 1997. **Int J Infect Dis** **1999**; 3(3): 130-135.

8. Pelaez, O., Guzman, M.G., Kouri, G., Perez, R., San Martin, J.L., Vazquez, S., Rosario, D., Mora, R., Quintana, I., Bisset, J., Cancio, R., Masa, A.M., Castro, O., Gonzalez, D., Avila, L.C., **Rodriguez-Roche, R.**, Alvarez, M., Pelegrino, J.L., Bernardo, L. and Prado, I. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. **Emerg Infect Dis** 2004; 10(4), 719-722.

### **Eventos Científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis.**

1. Congreso Internacional Biotecnología Habana 2003.
  - Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of e gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun t, Holmes E, Rosario D, Halstead S, Kouri G, Gould E and Guzman M.
2. II International Congress on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, Havana Cuba 2004.
  - Dengue virus type 3 in Cuba: evolution from a small outbreak in 2000 to a major epidemic in 2001 Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Holmes E, Bernardo L, Kouri G, Gould E, Halstead S and Guzman M.
  - Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of e gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Holmes E, Rosario D, Halstead S, Kouri G, Gould E and Guzman M.
3. Theoretical and Practical Course on genomics. ICGEB-OPS-RELAB, UNAM, Mexico, 2005
  - Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould E and Guzman M.
4. 14 Congreso Científico Internacional CNIC, Cuba, 2005
  - Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould E and Guzman M.

- Dengue virus type 3 in Cuba: evolution from a small outbreak in 2000 to a major epidemic in 2001. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Holmes E, Bernardo L, Kouri G, Gould E, Halstead S and Guzman M.
  - Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of e gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Holmes E, Rosario D, Halstead S, Kouri G, Gould E and Guzman M.
5. 11th International Workshop on Viral Evolution and Molecular Epidemiology, Brasil, 2005.
- Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Bernardo L, Halstead S, Kouri G, Gould E and Guzman M.

### **Tesis relacionadas con el tema propuesto**

1. Estudio de las propiedades biológicas de cepas de dengue de los serotipos 2 y 3 causantes de las epidemias de 1997 (Santiago de Cuba) y 2001-2002 (Ciudad de la Habana). Tesis de Maestría, 2003. Lic. Liudmila López Matilla.
2. Anticuerpos neutralizantes en sueros humanos frente a diferentes aislamientos cubanos del virus dengue-3. Tesis de Diploma, 2004. Alequis Pavón Oro.

## **Anexo 1. Listado de Aminoácidos.**

<b>Nombre del aminoácido</b>	<b>Código de una letra</b>
Isoleucina	<b>I</b>
Valina	<b>V</b>
Leucina	<b>L</b>
Fenilalanina	<b>F</b>
Cisteína	<b>C</b>
Metionina	<b>M</b>
Alanina	<b>A</b>
Glicina	<b>G</b>
Treonina	<b>T</b>
Triptófano	<b>W</b>
Serina	<b>S</b>
Tirosina	<b>Y</b>
Prolina	<b>P</b>
Histidina	<b>H</b>
Ácido glutámico	<b>E</b>
Glutamina	<b>Q</b>
Ácido aspártico	<b>D</b>
Asparagina	<b>N</b>
Lisina	<b>K</b>
Arginina	<b>R</b>