



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Epidemiología y evolución molecular del virus
del dengue en Veracruz, México**

TESIS

Que presenta

M. en C. Ericel Hernández García

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de la tesis:

DRA. MARIA DE LOURDES MUÑOZ MORENO

Ciudad de México

NOVIEMBRE, 2022.

ASESORES

DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ CRUZ - CINVESTAV-IPN

DR. JAVIER HERNÁNDEZ SÁNCHEZ - CINVESTAV-IPN

DR. LUIS KAMEYAMA KAWABE - CINVESTAV-IPN

**DR. NORMAND GARCÍA HERNÁNDEZ- CENTRO MÉDICO
NACIONAL SIGLO XXI**

AGRADECIMIENTOS AL CONACYT

AGRADEZCO ENORMEMENTE EL APOYO OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) MEDIANTE EL OTORGAMIENTO DE UNA BECA CON NÚMERO 49406, GRACIAS A LA CUAL PUDE LLEVAR A CABO MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO EN CIENCIAS.

AGRADECIMIENTOS

MUY ESPECIALMENTE A LA DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO POR PERMITIRME ESTAR EN SU EXCELENTE GRUPO DE TRABAJO Y DE QUIÉN HE APRENDIDO MUCHO, Y QUE A PESAR DE TODO ME HA APOYADO BASTANTE, MI ETERNO AGRADECIMIENTO PARA USTED DRA.

AL DR. ALEJANDRO CISNEROS, QEPD, ME HUBIESE GUSTADO QUE USTED ESTUVIERA PRESENTE, MI ESTIMADO MAESTRO Y AMIGO, DESGRACIADAMENTE LA VIDA NO QUISO QUE ESO SUCEDIERA, PERO LE ESTARÉ AGRADECIDO TODA MI VIDA POR TODAS SUS ENSEÑANZAS.

A LA DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ, AL DR. LUIS KAMEYAMA, AL DR. JAVIER HERNÁNDEZ Y AL DR. ÁLVARO DÍAZ, GRACIAS POR SU APOYO.

A MIS PADRES, GABRIELA GARCÍA Y ÁLVARO HERNÁNDEZ, GRACIAS A QUIÉNES ME PERMITIERON LLEGAR A ESTE MOMENTO POR SU VALIOSO APOYO, A PESAR DE TODAS LAS ADVERSIDADES QUE SE PRESENTARON, ELLOS SUPIERON SORTEARLAS Y ME DIERON LO MAS VALIOSO QUE HAY DESPUÉS DE LA VIDA, LA EDUCACIÓN.

A MIS HERMANOS ÁNGEL, SONIA Y CECILIA, MIS HIJOS, MI CUÑADO ÓSCAR Y MI TÍO ELISEO Y SU FAMILIA.

A MI GRAN AMIGO MIGUEL DÁVILA, TANTO TIEMPO SIN VERTE, PERO HAS SIDO DE LAS PERSONAS QUE MAS AGRADEZCO SE HAYAN CRUZADO EN MI VIDA.

A GERARDO PÉREZ (EL DOCTOR JERRY), DE QUIÉN APRENDÍ LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO NECESARIAS PARA DESARROLLAR MI PROYECTO Y EN QUIÉN ENCONTRÉ ADEMÁS UN GRAN AMIGO.

AL MAESTRO JORGE, POR TODOS LOS MOMENTOS AGRADABLES QUE HE VIVIDO CON USTED Y QUE ME HA AYUDADO A SALIR ADELANTE, ADEMÁS DE SER UN GRAN AMIGO.

AL DR. ARISTEO SEGURA Y EL DR JAIME VARGAS, GRACIAS POR TODO EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO EN LA FCQ, ADEMÁS DE SU APRECIABLE AMISTAD.

A MIS AMIGOS GALLETON, DRA. ADRIANA, ESPERANZA, LUZ, MARIO, JUAN PA, ALEJANDRA, LOLIS Y JEYKO, QUIENES ME HAN AYUDADO BASTANTE DÁNDOME ÁNIMOS, Y MUY ESPECIALMENTE JOCELYN, GRACIAS A TI NO HE TIRADO LA TOALLA TANTAS VECES, MUCHAS GRACIAS.

A LA DRA. ADRIANA, MI GRANA AMIGA DE LA FACULTAD, GRACIAS POR TODO, NO TENGO PARALABRAS PARA DESCRIBIR TU AMISTAD.

A TODOS AQUELLOS QUE HAN APORTADO SU GRANITO DE ARENA PARA MI FORMACIÓN, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

Contenido

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	0
AGRADECIMIENTOS AL CONACYT	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. MARCO TEÓRICO	14
2.1. Epidemiología	14
2.2. Clasificación y diagnóstico de la enfermedad.	16
2.3. El virus del dengue.....	18
2.3.1. Los arbovirus.....	18
2.3.2. Familia Flaviviridae	19
2.3.3. Virus del dengue	20
2.4. El vector del dengue.	38
2.4.1. Características del vector.	40
2.4.2. Interacción mosquito-DENV.	43
2.4.3. Capacidad y competencia vectorial.	44
2.5. Interacción DENV-humano.....	45
2.6. Patogénesis del DENV	50
2.7. Dispersión mundial del dengue	54
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	57
IV. JUSTIFICACIÓN.....	58
V. OBJETIVOS.....	59
5.1. Objetivo general	59
5.2. Objetivos específicos	59
VI. HIPÓTESIS	60
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	61
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62

8.1. Análisis epidemiológico del DENV en México y el Estado de Veracruz	62
8.2. Identificación de serotipos	63
8.2.1. Cultivo de células C6/36 de <i>Aedes albopictus</i>	63
8.2.2. Activación y aislamiento de DENV en cultivo de células C6/36 en tubos de cultivo	63
8.2.3. Extracción de RNA	64
8.2.4. Serotipificación	65
8.3. Identificación de los factores climáticos presentes en el año 2009.	66
8.4. Análisis filogenético de la región C-prM	67
8.4.1. Amplificación de la región C-prM.	67
8.4.2. Secuenciación de la región C-prM	67
8.5. Análisis filogenético	67
IX. RESULTADOS	68
9.1. Análisis epidemiológico del DENV en México y Veracruz en el periodo 1990-2022	68
9.2. Frecuencia de serotipos	74
9.3. Análisis filogenético	75
X. DISCUSIÓN	83
XI. CONCLUSIONES	87
XII. BIBLIOGRAFÍA	89
XIII. ANEXO I.	105
XIV. ANEXO II. PUBLICACIONES	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los serotipos y genotipos del dengue (Harapan <i>et al.</i> , 2020).	22
Tabla 2. Comparación de los genomas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles gambiae</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i> (Severson and Behura, 2012).	43
Tabla 3. Oligonucleótidos para la serotipificación de los sueros infectados con DENV.....	66
Tabla 4. Oligonucleótidos que se emplearon para amplificar y secuenciar la región C-prM.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El dengue en el mundo.	15
Figura 2. Clasificación de la enfermedad del dengue.....	18
Figura 3. Estructura del DENV maduro e inmaduro.	20
Figura 4. Genoma de los flavivirus.....	21
Figura 5. Región 5' no codificante del virus del dengue.	23
Figura 6. Estructura de la región SLA.	23
Figura 7. Region 3' UTR.	24
Figura 8. Participación de la región 3' UTR.....	25
Figura 9. Equilibrio entre formas lineales y circulares del genoma del dengue.	26
Figura 10. Localización de la proteína C.....	27
Figura 11. Estructura de la proteína E.	30
Figura 12. Organización estructural de la proteína E durante el ciclo vital del DENV.	30
Figura 13. Modelo de la hiperpermeabilidad vascular inducida por NS1 de DENV.	33
Figura 14. Figura 14. Papel de NS2A en la replicación del RNA del DENV.	34
Figura 15. Estructura de la proteína NS2A.	35
Figura 16. Papel de la proteína NS3 en la trombocitopenia.	37
Figura 17. <i>Aedes aegypti</i> como vector del DENV.	40
Figura 18. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 19. Barreras de transmisión del DENV en el mosquito. Diagrama generalizado de las posibles barreras de transmisión a las que se enfrenta un arbovirus en un mosquito (tomado de Lambrechts & Lequime, 2016).	44
Figura 20. Ciclo urbano de infección del humano y el mosquito por el DENV.	46
Figura 21. Inicio de la infección por virus del dengue y diseminación a los demás órganos.....	47
Figura 22. Entrada del DENV en la célula huésped. El virus del dengue usa los receptores y factores de unión de la membrana plasmática para entrar al citoplasma. (tomado de Khetarpal & Khanna, 2016).....	48
Figura 23. Ciclo vital del virus del dengue.....	49
Figura 24. Aumento dependiente de anticuerpos por la infección del DENV.	51
Figura 25. Modelo de la disfunción endotelial en la infección por dengue. ...	53
Figura 26. Mecanismo de la muerte celular de macrófagos/monocitos infectados con dengue.....	54
Figura 27. Expansión geográfica del virus del dengue en el mundo.	56

Figura 28. Casos de dengue en México y el Estado de Veracruz.	68
Figura 29. Incidencia de dengue y dengue severo en el Estado de Veracruz y México.	70
Figura 30. Porcentaje de variación en tándem de la fiebre de dengue (D) y el dengue severo (SD).....	72
Figura 31. Gráfica de la diferencia absoluta de porcentajes.....	73
Figura 32. Serotipificación de sueros infectados con el virus del dengue.....	74
Figura 33. Frecuencia de los serotipos obtenidos por PCR de punto final con los primers de Seah et al. (1995).	75
Figura 34. Árbol filogenético de DENV2 de 384 pb.	77
Figura 35. Árbol filogenético de DENV2 con secuencias recortadas a 142 pb.	78
Figura 36. Árbol filogenético de DENV4 de 567 pb.	79
Figura 37. Árbol filogenético de DENV4 de 365 pb.	80
Figura 38. Árbol filogenético de DENV1.....	81
Figura 39. Árbol filogenético de DENV3.....	82

RESUMEN

El dengue es una enfermedad infecciosa transmitida principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* y ocasionada por el virus del dengue (DENV) que pertenece a la familia *Flaviviridae*. El DENV presenta un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 10.7 kb de longitud. La infección con alguno de los cuatro serotipos reconocidos (DENV1, 2, 3 y 4) se manifiesta en fiebre indiferenciada conocida como fiebre de dengue o dengue severo, donde se presentan hemorragias que pueden ser internas o externas, anteriormente conocida como fiebre hemorrágica por dengue o síndrome de choque por dengue, los cuales pueden llevar a la muerte. En el 2009, ocurrió uno de los brotes epidémicos con mayor número de individuos infectados con dengue en México, en donde el Estado de Veracruz ocupó el tercer lugar en casos totales pero el primer lugar en casos de dengue severo. Un total de 65 muestras del Estado de Veracruz fueron estudiadas y se encontró que la mayor proporción fue de DENV2, seguido por DENV1, DENV3 y DENV4. Se obtuvieron secuencias de cada serotipo y al ser analizadas se encontró que los genotipos V de DENV1 y III de DENV3 se encuentran presentes como ha sido desde su introducción en la década de 1980. Asimismo, se identificó la introducción del genotipo asiático II del DENV2 y el genotipo I del DENV4, lo que representa el primer reporte de este genotipo en México y el segundo país en el continente americano, ya que Brasil también identificó el genotipo I del DENV4.

ABSTRACT

Dengue is an infectious disease transmitted mainly by the mosquito *Aedes aegypti*, which is caused by the dengue virus (DENV) that belongs to the *Flaviviridae* family. DENV has a positive polarity single-stranded RNA genome, with approximately 10.7 kb in length. Infection with one of the four recognized serotypes (DENV1, 2, 3 and 4) is expressed in undifferentiated fever known as dengue fever or in severe DEN, which causes bleeding or dengue shock syndrome, which can lead to death. In 2009, one of the outbreaks occurred with the largest number of individuals infected with DF and DHF in Mexico, where the state of Veracruz ranked third in total cases but the first in severe dengue. A total of 65 samples were studied from the State of Veracruz and it was found that the highest proportion was DENV2, followed by DENV1, DENV3 and DENV4. Sequences of each serotype were obtained and upon analysis it was found that DENV1 genotype I and DENV3 genotype III are present as they have been since their introduction in the 1980s. Furthermore, DENV2 Asian II genotype and DENV4 genotype I were detected, which represents the first report of this genotype in Mexico and the second country in the Americas, since Brazil was the first country that reports DENV4 genotype I.

I. INTRODUCCIÓN

El dengue es la infección viral transmitida por artrópodos más común en todo el mundo con una estimación de 400 millones de infecciones, lo que representa más del triple que lo estimado por la Organización Mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés), que establece que las manifestaciones clínicas en promedio son de 96 millones; además de que la población en riesgo representa el 50% del total mundial (Yang *et al.*, 2021; Nealon *et al.*, 2020). Estudios recientes establecen que los casos de dengue se han incrementado dramáticamente los últimos 70 años, los casos sintomáticos van de los 24 a los 130 millones de personas, mientras que la cantidad de muertes van de 10,000 a 50,000, asimismo se estima que las pérdidas económicas ocasionadas por el virus son de los 4,000 a los 39,000 millones de dólares anuales (Castro *et al.*, 2017; Nealon *et al.*, 2020; Ramos-Castañeda *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2021).

La intensidad en los brotes de dengue depende de factores como el crecimiento poblacional, urbanización rápida y no planeada en regiones con condiciones insalubres, deterioro de los sistemas de salud, decremento en el acceso al cuidado de la salud, control del vector inadecuado, globalización de la economía, migración y cambio climático (Ishak *et al.*, 2020; Nealon *et al.*, 2020; Ramos-Castañeda *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2021).

El dengue es causado por el virus del mismo nombre (DENV), del cual se reconocen cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4), los cuales exhiben una homología de secuencia del 65-75 % (Bifani *et al.*, 2022; Ishak *et al.*, 2020). La infección por cualquiera de esos serotipos puede resultar en una amplia variedad de manifestaciones clínicas, por lo que la secuencia de las infecciones puede ser un determinante en la severidad de la enfermedad (Halstead, 2019). El incremento en la incidencia y la severidad de la enfermedad es atribuido en parte a la expansión geográfica del vector (el mosquito *Aedes aegypti*), lo cual ha favorecido la cocirculación de los cuatro serotipos en las áreas urbanas (Bifani *et al.*, 2022; Castro *et al.*, 2017; Chin-Inmanu *et al.*, 2021).

En México, Undurraga *et al.* (2015) estimaron que en promedio ocurren 139,000 infecciones por dengue anualmente y que el costo de la enfermedad es de 170 millones de dólares anuales, más de lo reportado previamente. Además, otros factores como la introducción de nuevas cepas y la hiperendemicidad favorecen la creciente cantidad de casos anuales a nivel mundial (Halstead, 2019).

El presente trabajo tuvo por objeto estudiar el brote epidémico del 2009 en Veracruz, uno de los años con mayor cantidad de casos de dengue en la historia de México y especialmente de casos de dengue severo, lo anterior con la finalidad de determinar las posibles causas que dieron origen a ese brote.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Epidemiología

El primer registro de una enfermedad clínicamente compatible como dengue data de los siglos III y IX en China, en el cual se describió a la enfermedad como “agua envenenada” (debido a la asociación con los mosquitos que volaban sobre el agua) y su descripción clínica incluyó fiebre, sarpullido, mialgia, artralgia y algunas manifestaciones hemorrágicas. Siglos después, casos compatibles se reportaron en Panamá en 1635; en Yakarta, Cairo, Filadelfia, Cádiz y Sevilla entre 1779 y 1788 (Valderrama *et al.*, 2017).

El vector del DENV se expandió en América en 1600 con la trata de esclavos, en la medida que la industria del transporte marítimo mundial y las ciudades portuarias, crecieron y se volvieron más urbanizadas entre los siglos XVIII y XIX, creando las condiciones ideales para la dispersión del mosquito *Aedes aegypti*, vector principal del virus del dengue, lo que produjo grandes epidemias (Pang *et al.*, 2017; Souza-Salles *et al.*, 2018).

La etiología del dengue fue sugerida experimentalmente en el siglo XIX, pero el agente causante se aisló hasta la Segunda Guerra Mundial, cuando los avances en tecnología lo facilitaron a investigadores japoneses y estadounidenses, lo que propició la identificación de los primeros dos serotipos del virus, seguido de los serotipos 3 y 4 cuando casos de fiebre hemorrágica de dengue (DHF) emergieron en centros urbanos de Filipinas y Tailandia. La rápida urbanización del sureste de Asia lideró la transmisión incrementada del virus y generó hiperendemicidad para los cuatro serotipos (Valderrama *et al.*, 2017).

La primera epidemia conocida de dengue hemorrágico ocurrió en Filipinas (en la ciudad de Manila) entre 1953 y 1954, apareciendo después en Vietnam y Tailandia en 1958; Laos, Singapur y Malasia en 1962 y la India en 1963. Durante los años siguientes la enfermedad se diseminó en forma epidémica por el sureste de Asia, llegando a ser la causa principal de hospitalización y muerte entre los niños de la región a mediados de la década de 1970 (Pang *et al.*, 2017).

En América, el declive hacia 1970 y la reemergencia del dengue epidémico en la década de 1980 fueron relacionados principalmente a la presencia o ausencia del vector *Aedes aegypti* y la infestación por *Ae. albopictus* (Kumar *et al.*, 2020; Mahmud *et al.*, 2019; Valderrama *et al.*, 2017; Souza-Salles *et al.*, 2018).

Durante los últimos 60 años, se ha observado un incremento significativo en el número de casos de dengue reportados en todo el mundo por la WHO, que van desde los 900 casos anuales en la década de 1950, hasta la actualidad donde se estima que el número de individuos infectados oscila entre 50 y 100 millones anualmente con una mortalidad entre 25,000 y 50,000 individuos; actualmente alrededor de la mitad de la población mundial corre el riesgo de contraer esta enfermedad. Más de 100 países son afectados mundialmente con una distribución principalmente entre los trópicos de Cáncer y de Capricornio (Fig. 1) (CDC, 2022; Kumar *et al.*, 2020).

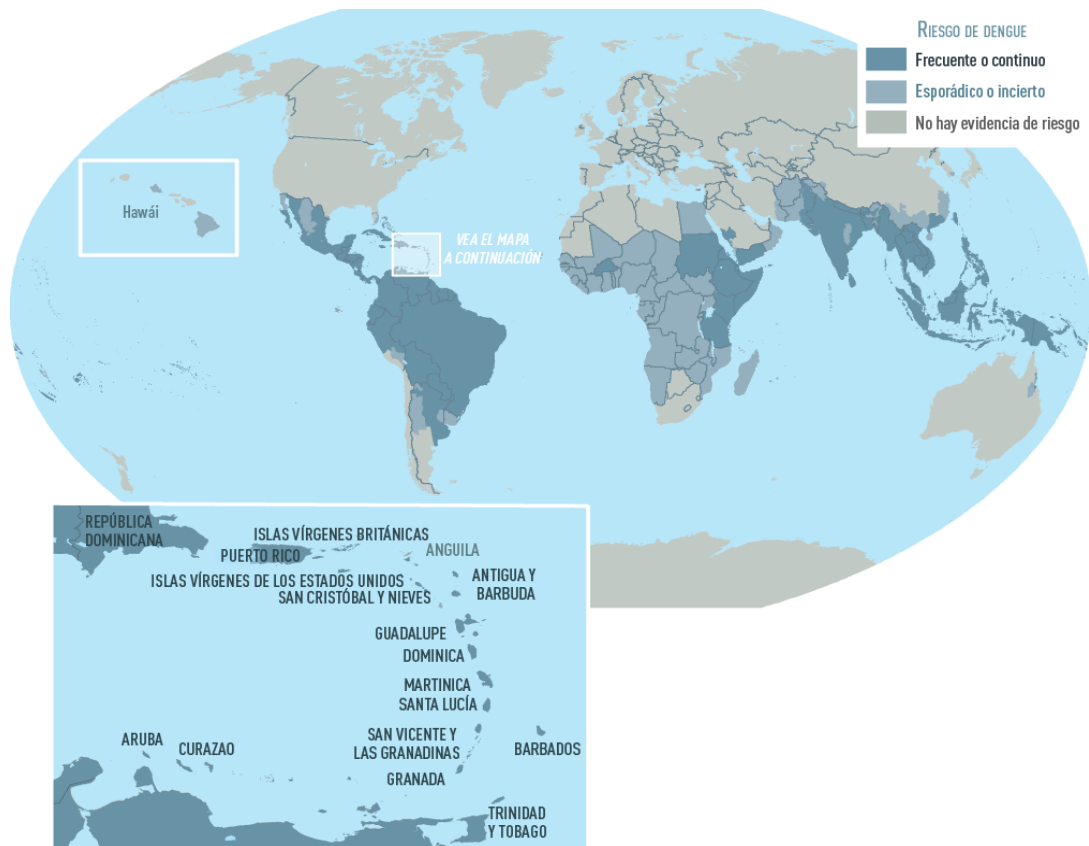


FIGURA 1. EL DENEGUE EN EL MUNDO. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL DENEGUE Y SU RIESGO DE INFECCIÓN DE ACUERDO CON EL CENTRO PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES (TOMADO DE CDC, 2022).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, en el continente americano en el 2011 hubo un total de 1,073,978 casos de dengue, de los cuales 19,450 fueron dengue severo y 758 personas murieron, con una incidencia de 133 casos/100,000 habitantes. Para el 2012, un total de 1,162,998 casos fueron reportados, lo que representa un incremento comparado con el 2011, además de que la cantidad de casos severos aumentó considerablemente a 32,408 (casi 60% más con respecto al año anterior), y la cantidad de muertes subió un 7% (807). El año 2013 significó un aumento de poco más del doble de casos con un total de 2,384,234 y un total de 1,403 muertes. Para 2014 los casos disminuyeron hasta 1,171,029 casos totales con 15,744 de dengue severo. Para 2015 se incrementó a más del doble con 2,430,178, los casos severos disminuyeron a 12,824. En el 2016 se presentaron un total de 2,168,146 casos totales con 4,366 de dengue severo. En el 2017 los casos de dengue disminuyeron drásticamente a 577,697, pero la cantidad de dengue severo fue similar al 2016. Lo anterior refleja las fluctuaciones que ocurren en la epidemiología del dengue (Souza-Salles *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020).

2.2. Clasificación y diagnóstico de la enfermedad.

La WHO ha hecho intentos por clasificar al dengue de acuerdo con la sintomatología observada. En 1975 el dengue fue clasificado como fiebre indiferenciada, fiebre de dengue y fiebre hemorrágica de dengue; el criterio de clasificación fue desarrollado para distinguir entre dengue y otras enfermedades febriles y éste fue revisado en 1986 y 1997. Además de las características clínicas, el diagnóstico de dengue requería evidencia epidemiológica o de laboratorio para determinar una infección de fiebre de dengue (DF). Por otro lado, para determinar un caso como fiebre hemorrágica de dengue (DHF), cuatro factores eran requeridos: fiebre, manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia y evidencia de fuga de plasma. El diagnóstico de DHF no requería evidencia de laboratorio (Dussart *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo anterior, el dengue resulta en manifestaciones clínicas progresivamente severas conocidas como DF, DHF y el síndrome de choque del dengue (DSS). Causa fiebre, mialgia, artralgia, dolor abdominal, salpullido y viremia (Chen *et al.*, 2019). A medida que la fiebre disminuye, la DHF/DSS se manifiesta con una repentina pérdida de plasma que puede provocar hemoconcentración, derrame pleural, ascitis, trombocitopenia, anomalías de la coagulación y en algunos casos raros encefalitis (Elong-Ngono & Shresta, 2018).

La DF es una enfermedad aguda asociada con la repentina ocurrencia de fiebre que dura de 2 a 7 días, dolor de estómago, dolor retro orbital, mialgia, dolor en las articulaciones de los huesos y sarpullido, muchas veces también acompañado de leucopenia, ocasionalmente de trombocitopenia ($<100,000$ plaquetas/ mm^3) y hemorragia cutánea (Low *et al.*, 2018; Dussart *et al.*, 2020). La WHO clasificó en su momento la DHF/DSS en cuatro grados: los grados I y II representan casos sin choque (casos de DHF), mientras que los grados III y IV son casos más severos acompañados de choque (casos de DSS). Sin embargo, este sistema de clasificación fue reevaluado para una mayor utilidad clínica ya que no es lo suficientemente preciso en la clasificación correcta de la enfermedad. La DHF es muy similar a DF durante la etapa febril temprana, pero esos síntomas se combinan con manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia y filtración de plasma (grados I y II) como resultado del incremento en la permeabilidad vascular (Dussart *et al.*, 2020).

El DSS ocurre al mismo tiempo o poco después de la defervescencia y está caracterizado por una rápida disminución en el pulso (≤ 20 mmHg) o hipotensión, con piel húmeda y fría en la etapa temprana del choque (grado III). Si el paciente no es atendido pronto y apropiadamente, puede iniciarse un estado de choque profundo, el pulso y la presión sanguínea llegan a ser indetectables (grado IV), resultando en la muerte del paciente entre 12 y 36 horas después del comienzo del choque (Chen *et al.*, 2020).

Para el 2009, los criterios de clasificación cambiaron, el dengue fue designado como dengue con o sin señales de advertencia y dengue severo (Fig. 2),

aunque los síntomas listados en esta nueva clasificación fueron más numerosos y menos específicos que aquellos de 1997, aunque su intención fue mejorar el manejo clínico (Chen *et al.*, 2019).

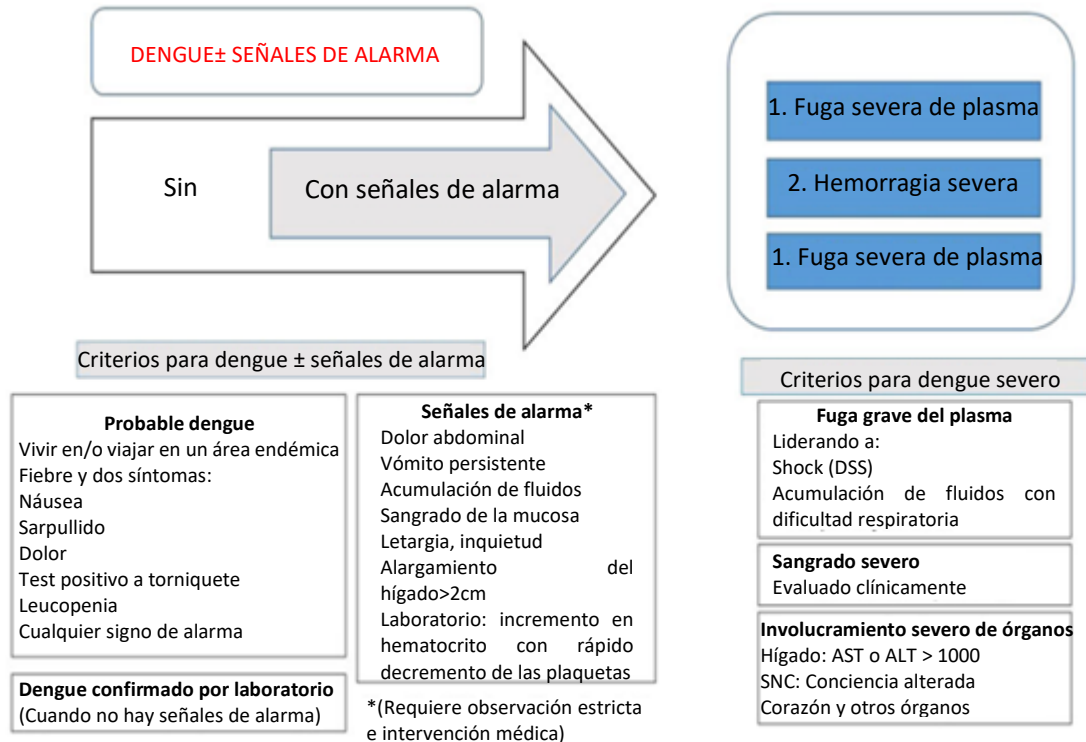


FIGURA 2. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL DENGUE. CLASIFICACIÓN ACTUAL DEL DENGUE DE ACUERDO CON LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, LA CUAL LO DIVIDE EN DENGUE CON/SIN SEÑALES DE ALARMA Y DENGUE SEVERO (TOMADO DE MORRA ET AL., 2018).

De acuerdo con la clasificación del 2009, el diagnóstico del dengue requiere de la presencia de fiebre y al menos dos características clínicas o cualquier señal de advertencia, además evidencia epidemiológica o de laboratorio. El dengue severo es definido con alguna de las siguientes características: fuga de plasma severo liderando a choque o dificultad respiratoria, hemorragia severa o falla de órganos (Low *et al.*, 2018; Morra *et al.*, 2018).

2.3. El virus del dengue.

2.3.1. Los arbovirus

El DENV pertenece al grupo de virus denominados Arbovirus (del inglés arthropod-borne virus) ya que en su ciclo requieren un vector artrópodo

hematófago y un hospedero vertebrado. Los Arbovirus son predominantemente virus de RNA en las familias *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* y *Flaviviridae*, además del género *Thogotovirus* (Familia *Othomyxoviridae*) y un virus de cadena sencilla de DNA de la familia *Asfarviridae* (el Virus de la fiebre porcina africana) (Huang *et al.*, 2019).

Los arbovirus son responsables de un gran impacto en la salud pública a nivel mundial, ya que existen más de 500 arbovirus, de los cuales 150 especies afectan a los humanos, entre ellos los virus de la encefalitis equina del este, la encefalitis equina del oeste, la encefalitis equina venezolana, el virus Sindbis, el virus del río Ross y el virus Chikungunya dentro de la familia *Togaviridae*; además de la familia *Bunyaviridae* están los virus de la encefalitis de California, el virus de la fiebre del valle Rift y el virus Lacrosse (Holbrook, 2017; Young 2018).

2.3.2. Familia Flaviviridae

La familia *Flaviviridae* incluye virus causantes de enfermedades muy severas y de alta mortalidad en humanos y en animales, siendo dos grupos principales de flavivirus, los transmitidos por las garrapatas y aquellos transmitidos por mosquitos. Los flavivirus transmitidos por garrapatas son un grupo monofilético que consiste en un serocomplejo. Los flavivirus transmitidos por mosquitos son un grupo más diverso, consiste en los serocomplejos del virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del dengue (DENV), entre otros. Estudios de tiempo de divergencia genética sugieren que los flavivirus surgieron de un ancestro común hace unos 100,000 años con la separación de los virus transmitidos por garrapatas, de los transmitidos por mosquitos hace unos 40,000 años (Holbrook, 2017; Simmonds *et al.*, 2017).

Los flavivirus fueron primero clasificados dentro del grupo de los togavirus basados en la evaluación serológica, pero los avances en Biología Molecular los separaron en la familia *Flaviviridae* en 1984 por sus diferencias en estructura, secuencia de su genoma y procesos de replicación. Han sido descubiertos flavivirus que no son transmitidos por vectores, así como algunos

específicos de insectos. Los virus transmitidos por mosquitos pueden agruparse en los transmitidos por los mosquitos del género *Culex* y los transmitidos por el género *Aedes*, como el DENV (Holbrook, 2017).

2.3.3. Virus del dengue

El DENV es un virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con una longitud de aproximadamente 10,700 bases (Ramos-Castañeda *et al.*, 2017). Con un diámetro de aproximadamente 500 Å (~50 nm), una superficie relativamente lisa y simetría icosaédrica en su estado maduro (Fig. 3) (Begum *et al.*, 2019).

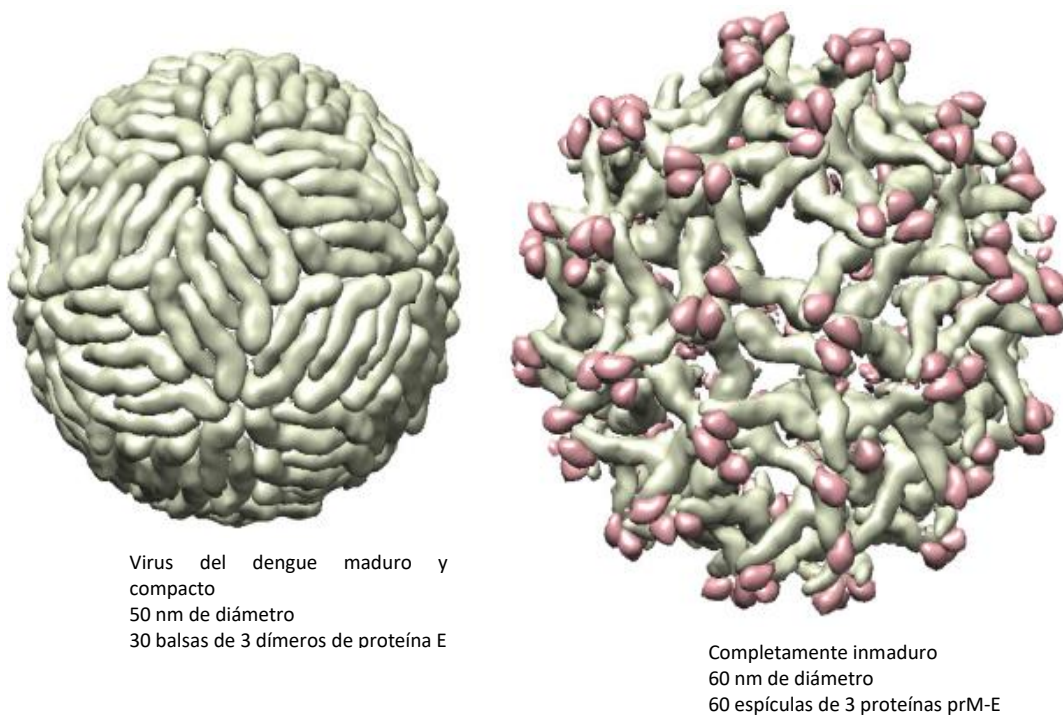


FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL DENV MADURO E INMADURO.

EL VIRUS DEL DENGUE SE PRESENTA EN DOS FORMAS, MADURA E INMADURA, LAS CUALES DIFIEREN EN QUE EL PÉPTIDO PR SIGUE UNIDO A LA PROTEÍNA M EN LA FORMA INMADURA Y ES CORTADO EN LA FORMA MADURA, LA CUAL ES MÁS COMPACTA (TOMADO DE MORRONE & LOK, 2019).

Está organizado en una región 5' no-traducida (5'-UTR, por sus siglas en inglés) o no codificante (NCR, por sus siglas en inglés), que contiene un capuchón (cap) tipo 1 (m7GpppAmp), tres genes estructurales que codifican para las proteínas de la cápside (C), premembrana/membrana (prM/M) y la envoltura (E), siete genes no estructurales que codifican para las proteínas

NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, y una región 3'UTR la cual carece de cola poli-A (Fig. 4). Las proteínas estructurales forman la partícula viral y las proteínas no estructurales participan en la replicación del genoma de RNA, el ensamblaje del virion y la evasión de la respuesta inmune innata (tomado de Khetarpal & Khanna, 2016).

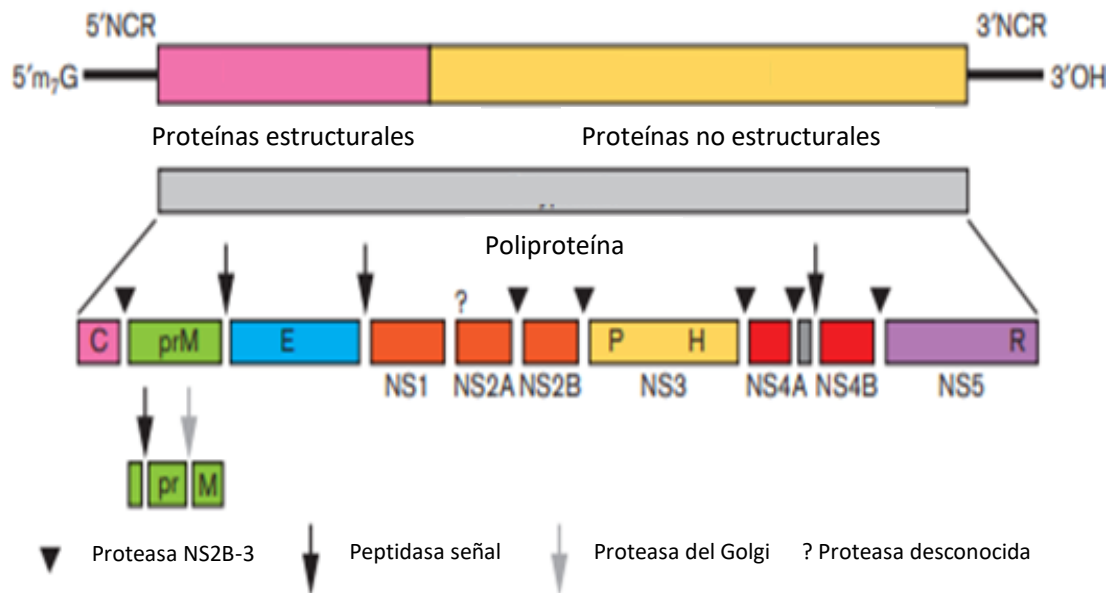


FIGURA 4. GENOMA DE LOS FLAVIVIRUS. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y PROCESAMIENTO DE LA POLIPROTEÍNA DE LOS MIEMBROS DEL GÉNERO FLAVIVIRUS (TOMADO DE SIMMONDS *ET AL.*, 2017).

2.3.3.1. Serotipos y genotipos del DENV.

Katzelnick *et al.* (2017) han establecido que la complejidad de la transmisión del DENV y la dinámica de la enfermedad son exacerbados por la existencia de cuatro serotipos de dengue (DENV-1, -2, -3 y -4) altamente relacionados. Esta diversidad de virus del dengue se puede atribuir a su RNA polimerasa, ya que al no tener actividad de corrección de pruebas, se piensa que produce al menos una mutación por cada replicación de su genoma. Cada serotipo a su vez se divide en genotipos, los cuales tienen una divergencia del 6% (Tabla 1; Ramos-Castañeda *et al.*, 2017; Zomosa-Signoret *et al.*, 2020).

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS SEROTIPOS Y GENOTIPOS DEL DENGUE (HARAPAN ET AL., 2020).

Serotipo	Genotipo	Distribución
1	I	Sureste de Asia, China y Este de África
	II	Tailandia
	III	Malasia
	IV	Islas del Pacífico Oeste y Australia
	V	América, Oeste de África y Asia
2	Asiático I	Malasia y Tailandia
	Asiático II	Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas
	Cosmopolita	Australia, África, islas del Pacífico, India y Este Medio
	Americano	Latinoamérica, Caribe, India e Islas del Pacífico
	Asiático Americano	América, Tailandia y Vietnam
	Selvático	Este de África y Sureste de Asia
3	I	Indonesia, Malasia, Filipinas e islas del Pacífico sur
	II	Tailandia, Vietnam y Bangladesh
	III	Sri Lanka, India, África, Samoa y Tailandia
	IV	Puerto Rico, Latinoamérica y Tahití
4	I	Tailandia, Filipinas, Sri Lanka, Japón y Brasil
	II	Indonesia, Malasia, Tahití y América
	III	Tailandia
	IV	Malasia

2.3.3.2. UTRs

Las 5' UTR's de los DENV varían entre 95 y 100 nucleótidos de longitud, contienen dos dominios de RNA con distintas funciones durante la síntesis del RNA viral (Fig. 5). El primer dominio de aproximadamente 80 bases está predicho para doblarse en una gran estructura de tallo-burbuja (SLA, del inglés Stem-Loop A) que actúa como promotor para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, por sus siglas en inglés) de NS5, ya que se ha observado que la unión directa de NS5 a SLA es necesaria para la síntesis de RNA viral (Fig. 6). SLA fue predicho para tener una forma de "Y", lo cual ha sido confirmado

mediante pruebas enzimáticas y químicas. Además, se ha determinado la presencia de tres regiones helicoidales (S1, S2 y S3) interrumpidas por abultamientos y regiones de hebra sencilla altamente reactivas, lo cual está de acuerdo con la presencia de un tallo-burbuja superior y otro tallo-burbuja lateral (Bujalowski *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2019).

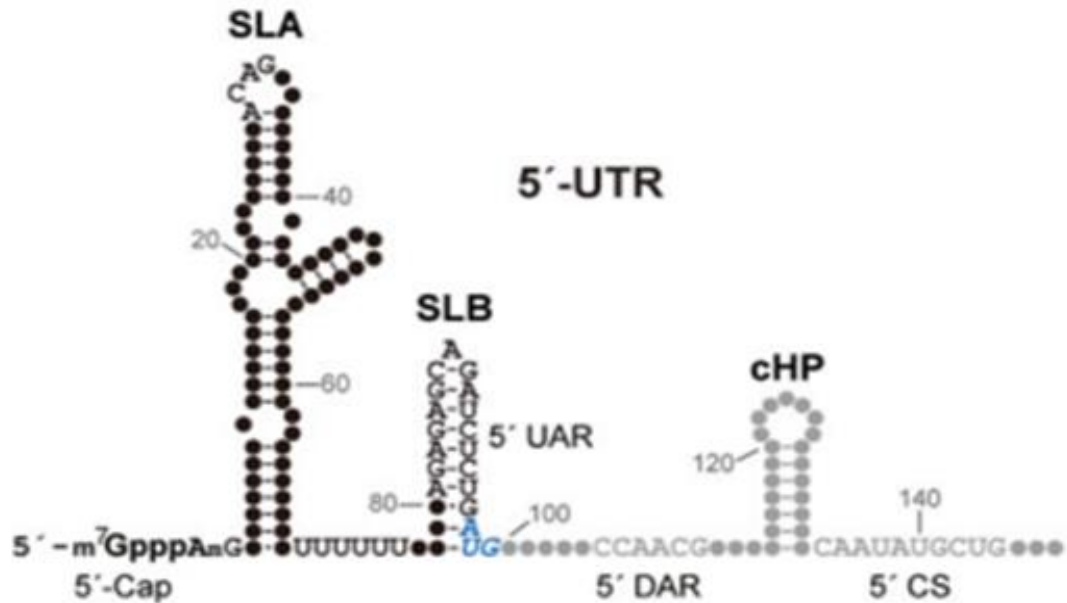


FIGURA 5. REGIÓN 5' NO CODIFICANTE DEL VIRUS DEL DENGUE. SE OBSERVA LA PRESENCIA DE LA ESTRUCTURA SLA, LA CUAL ES FUNCIONA COMO PROMOTOR DE LA RNA POLIMERASA DEL VIRUS DEL DENGUE. EN AZUL ESTÁ EL SITIO DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN (TOMADO DE HODGE *ET AL.*, 2019).

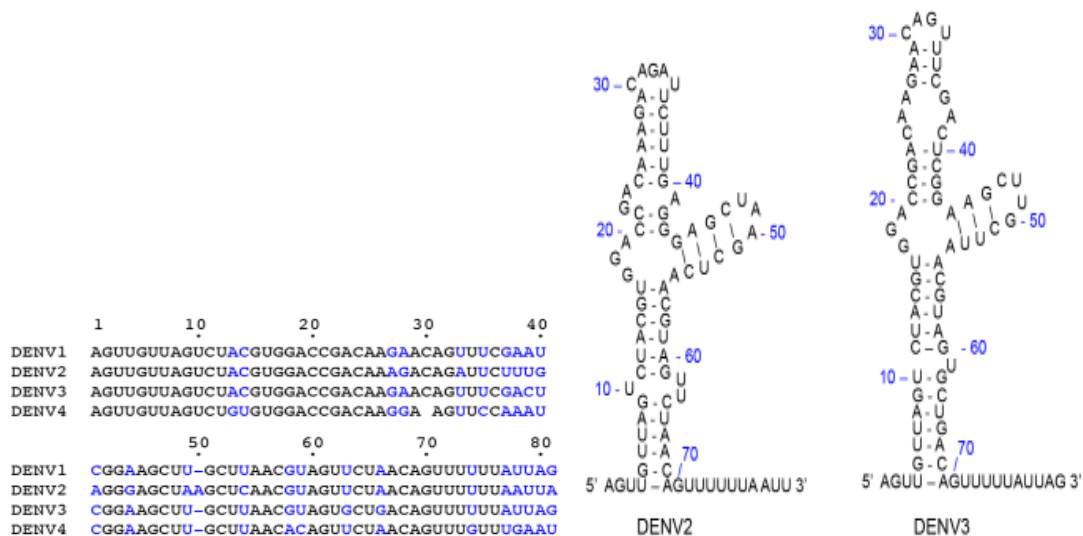


FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LA REGIÓN SLA. SECUENCIA (IZQUIERDA) Y ESTRUCTURA DEL SLA DE DENV DE LA REGIÓN 5' UTR (TOMADO DE BUJALOWSKI *ET AL.*, 2017).

El segundo dominio está predicho para formar una estructura corta de tallo-burbuja (SLB, por sus siglas en inglés) y contiene secuencias esenciales para la interacción RNA-RNA de largo alcance y la replicación del genoma (Fig. 7). Esos dominios están separados por una secuencia oligo-U la cual funciona como un espaciador para la correcta función de las dos estructuras de tallo-burbuja. Dentro de la región codificante, justo río abajo del codón de inicio de la traducción AUG, se localiza una estructura muy estable tipo horquilla (cHP), la cual no forma parte del 5' UTR, pero es necesaria para la replicación del RNA viral (Ahmad & Poh; Bujalowski *et al.*, 2017).

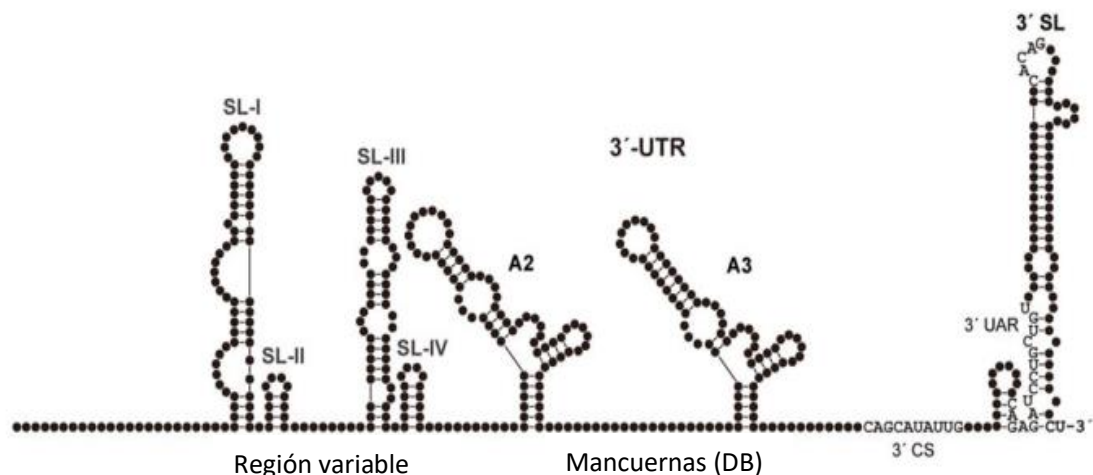


FIGURA 7. REGION 3' UTR. ESTRUCTURA DE LA REGIÓN 3' NO CODIFICANTE DEL VIRUS DEL DENGUE, SE OBSERVAN VARIAS ESTRUCTURAS DE TALLO BURBUJA (TOMADO DE HODGE *ET AL.*, 2019).

La 3' UTR consta de aproximadamente 450 nucleótidos y se le puede dividir en tres dominios (Fig. 7). El dominio I es el más variable del 3' UTR y se localiza inmediatamente después del codón de paro, su tamaño varía entre los diferentes serotipos y va de menos de 50 nucleótidos a los 120. El dominio II presenta una estructura en forma de pesa (DB, dumbbells) que está duplicada en tándem; los elementos DB contienen secuencias conservadas llamadas CS2 y RCS2 las cuales están presentes en todos los flavivirus portados por mosquitos y que han sido propuestas para estar involucradas en dos

estructuras de tipo pseudonudo (Bujalowski *et al.*, 2017; Hodge *et al.*, 2019). Cerikan *et al.* (2020) demostraron que una función importante de la región 3' UTR es la formación de paquetes de vesículas no replicativas en la infección del DENV, que funciona para la traducción de las proteínas virales (Fig. 8).

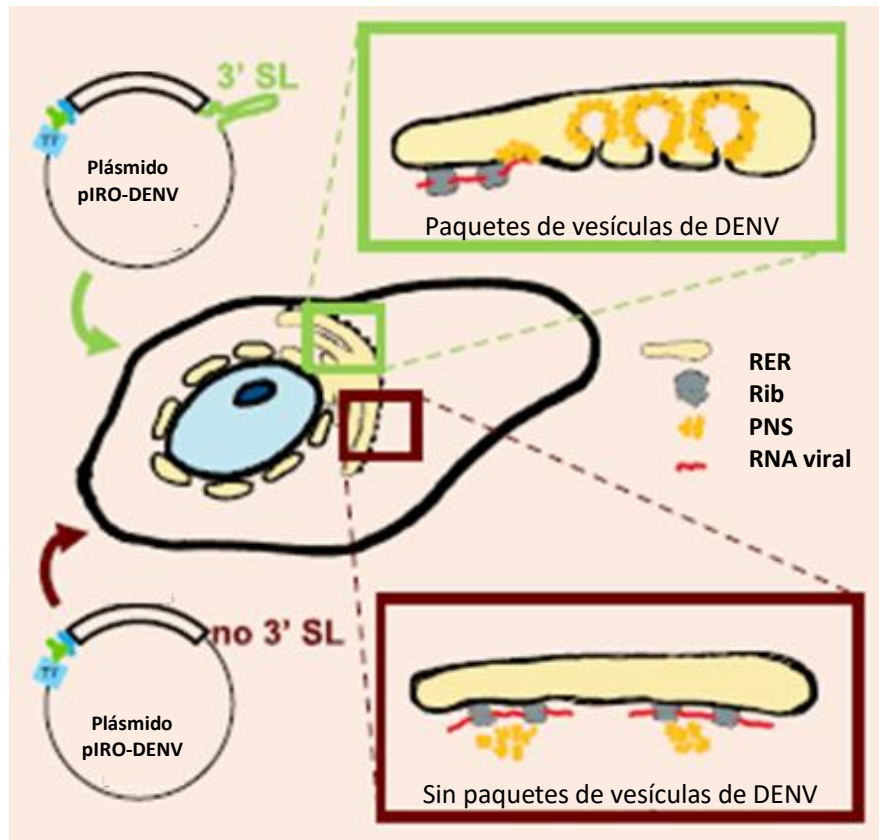


FIGURA 8. PARTICIPACIÓN DE LA REGIÓN 3' UTR. UN PLÁSMIDO CON LA REGIÓN 3' UTR Y OTRO SIN LA REGIÓN 3' UTR FUERON PROBADOS, SOLO EL PLÁSMIDO CON LA REGIÓN 3' UTR PRODUJO VESÍCULAS DE DENGUE. RER, RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO; RIB, RIBOSOMA; PNS, PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (TOMADO DE CERIKAN *ET AL.*, 2020).

El dominio III es el más conservado de la región 3'UTR, contiene un elemento CS1 seguido por un tallo-burbuja terminal (3'SL). El CS1 es importante porque contiene una secuencia involucrada en la interacción RNA-RNA entre los extremos del genoma del virus. La estructura 3' terminal contiene un corto tallo-burbuja de 14 nucleótidos denominado sHP y un gran tallo de 79 nucleótidos (Ahmad & Poh, 2019; Hodge *et al.*, 2019).

Las regiones 5' UTR y 3' UTR son muy importantes para la replicación y transcripción del DENV, ya que se ha demostrado que el equilibrio entre las

formas lineal y circular favorece la producción de partículas virales (Fig. 9) (Bujalowski *et al.*, 2017; Hodge *et al.*, 2019).

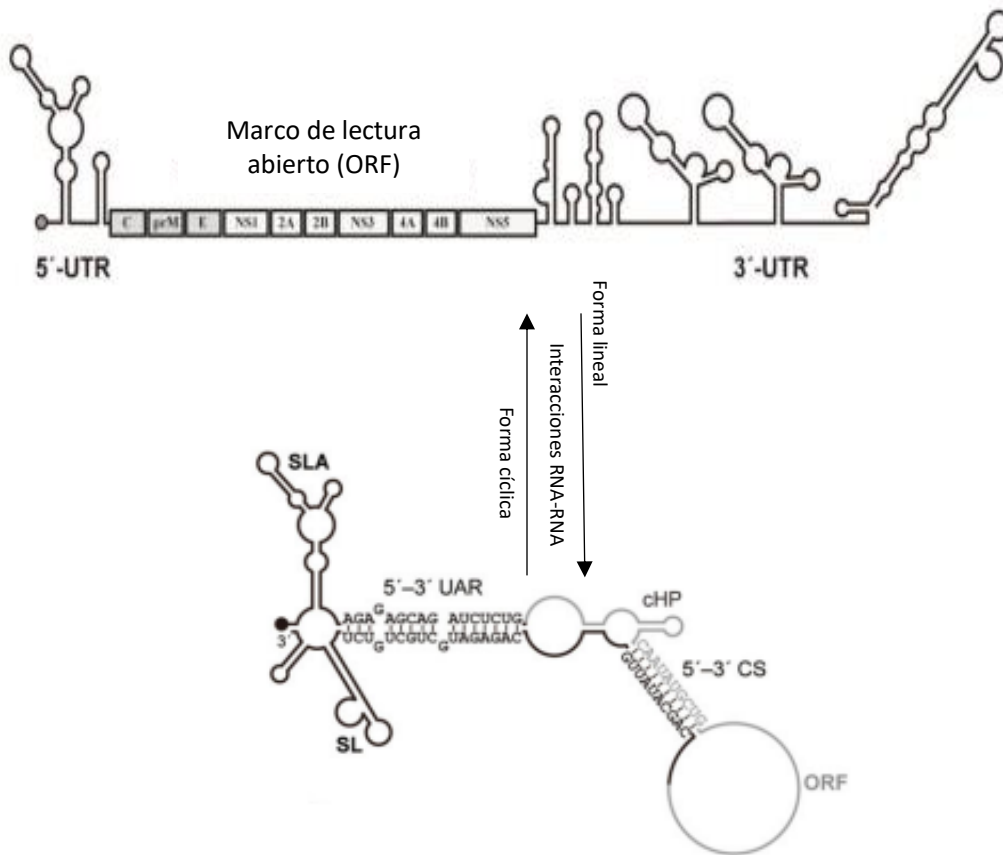


FIGURA 9. EQUILIBRIO ENTRE FORMAS LINEALES Y CIRCULARES DEL GENOMA DEL DENGUE. LOS ESTUDIOS HAN MOSTRADO QUE LA REPLICACIÓN EFICIENTE DEL DENV SE DEBE A UN EQUILIBRIO ENTRE LAS FORMAS LINEAL Y CIRCULAR DEL DENV (TOMADO DE HODGE *ET AL.*, 2019).

2.3.3.3. Proteína C.

La proteína C es un homodímero de 12 kDa con alta carga positiva y es esencial para la maduración de las partículas virales y el ensamblaje de la nucleocápside. Contiene cuatro hélices alfa ($\alpha 1$ - $\alpha 4$), donde las primeras tres hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) forman un paquete que comprende el núcleo del monómero. La $\alpha 4$ es la hélice más larga, se extiende desde el núcleo del monómero y presenta alta densidad de residuos básicos en la superficie que es accesible a solventes, la cual fue propuesta para interactuar con el RNA viral. En el lado opuesto de la molécula, la superficie formada por las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 2'$ y $\alpha 1$ - $\alpha 1'$

no tiene carga y se propuso que interactúa con la membrana (Lazo *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2017; Rana *et al.*, 2019; Gabriel *et al.*, 2020).

La proteína C se puede localizar en el citoplasma o en el núcleo de células infectadas, presenta 3 señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés), KKAR, KKSK y la señal bipartita RKeigrmInInRRRR; sin embargo, no se conoce el papel específico de la proteína C en el núcleo ya que, al generar mutaciones en las NLS, se observó que la localización nuclear no era necesaria para la replicación viral (Fig. 10) (Byk & Gamarnik, 2016; Faustino *et al.*, 2019; Lazo *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2017).

Se ha observado que la proteína C se acumula progresivamente alrededor de gotas lipídicas, para lograr ello, la cápside se transporta de la membrana del retículo endoplásmico a las gotas lipídicas gracias a la proteína GBF1, que utiliza COPI como sistema de transporte, lo cual favorece la formación de la partícula viral (Fig. 10) (Gabriel *et al.*, 2020).

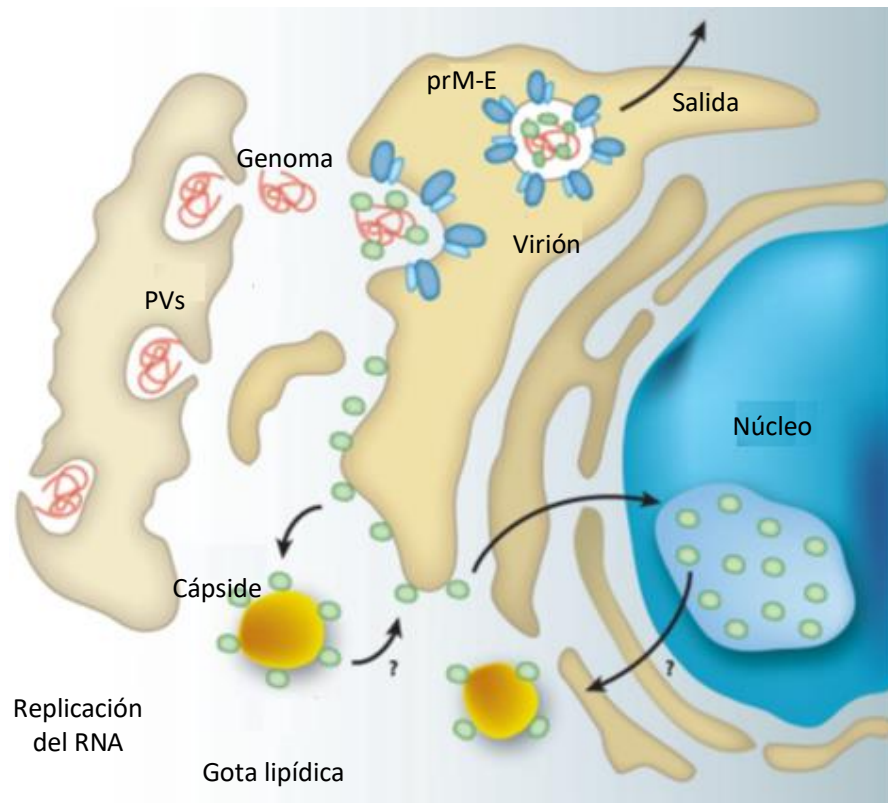


FIGURA 10. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA C.
LA PRESENCIA DE LA PROTEÍNA C EN LAS GOTAS LIPÍDICAS FAVORECE LA FORMACIÓN DE LOS VIRIONES, ADEMÁS, LA PROTEÍNA C EN LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO INTERACTUA CON LAS PROTEÍNAS PRM Y E (TOMADO DE BYK & GAMARNIK, 2016).

2.3.3.4. Proteína prM

La proteína prM/M es una proteína N-glicosilada de 27-31 kDa y 166 aminoácidos que es procesada en la red trans-Golgi durante las últimas etapas de ensamblaje del virus. Al ser procesada por la proteína furina, el corte de prM en el aminoácido 91 genera un péptido soluble llamado “pr” y la proteína M que se mantiene asociada al virión. La proteína prM es chaperona de la proteína E durante el ensamblaje y maduración del virus. Después de que la poliproteína viral es procesada por la señalasa de la célula huésped en las uniones C-prM, prM-E y E-NS1, prM y E que se asocian no covalentemente en el retículo endoplásmico formando heterodímeros que se incorporan al virión en formación. La interacción entre prM y E es importante para el plegamiento y transporte de E al evitar que le ocurran rearrreglos prematuros que pueden ser inducidos por el pH ácido de la red trans-Golgi (Pan *et al.*, 2019).

Una vez procesada, M es una proteína de 76 aminoácidos y un peso molecular de alrededor de 8 kDa. El dominio N-terminal de M consta de 38 aminoácidos y está en el lado externo de la membrana, mientras que el extremo C-terminal contiene una región transmembranal altamente hidrofóbica que ancla a la proteína en la bicapa lipídica y que fue propuesto para producir actividad de canal de iones, aunque en un modelo de bicapas lipídicas artificiales (Wirawan *et al.*, 2019; Yong *et al.*, 2021).

Además de ser chaperona de E, nuevas funciones de la proteína prM han sido descubiertas recientemente. La proteína prM se une a la claudina-1, una proteína de la familia de las claudinas que son proteínas de uniones estrechas, por lo que funcionan como una barrera en células epiteliales y endoteliales para protegerlas del ambiente externo (Lazo *et al.*, 2019). La Claudina-1 funciona como un receptor/correceptor para la entrada del DENV; además, se observó que la expresión de la Claudina-1 se incrementa en la fase temprana de la infección y disminuye en las últimas etapas, de modo que esta expresión diferencial podría ser la estrategia del virus para facilitar su entrada eficiente

en etapas tempranas y a su vez prevenir la superinfección en las últimas etapas de la infección (Yong *et al.*, 2021).

En el C-terminal la proteína prM presenta un dominio α -helicoidal (MH) que se cree está involucrado en el ensamblaje y entrada del virus en la célula, ya que fue observado que partículas virales con el dominio MH mutado no son infectivas. Más tarde, ese dominio C-terminal fue demostrado para interactuar con la cadena ligera Tctex-1 de la dineína humana probablemente favoreciendo el tráfico del virus en las células infectadas (Lazo *et al.*, 2019). Pan *et al.* (2019) observaron que la proteína M puede interactuar con NLRP3 activando el inflamosoma, que en ratones a su vez induce a la interleucina 1 β lo que resulta en la fuga vascular.

2.3.3.5. Proteína E

La proteína E media la unión del virus y la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped, su peso es de 53 kDa y se encuentra N-glicosilada. La estructura cristalina de la proteína E ha mostrado que a pH neutro cada una de sus subunidades contiene tres dominios en forma de barril β que se encuentra orientada paralela a la membrana viral (Fahimi *et al.*, 2018; Khetarpal & Khanna, 2016; Thomas *et al.*, 2020).

El dominio estructural central (dominio I) contiene el N-terminal y es flanqueado por un dominio de dimerización alargado (dominio II), el cual contiene el péptido de fusión en su extremo distal. Al otro lado del dominio I se encuentra el dominio III, el cual es un dominio parecido a una inmunoglobulina y que presenta sitios de unión al receptor. Los dominios I y II están conectados por cuatro cadenas peptídicas, mientras que los dominios I y III están conectados por un solo péptido. El péptido de fusión se encuentra entre los dominios I y III del monómero adyacente dentro de un dímero (Figs. 11y 12) (Urakami *et al.*, 2017; Zomosa-Signoret, 2020; Thomas *et al.*, 2020).

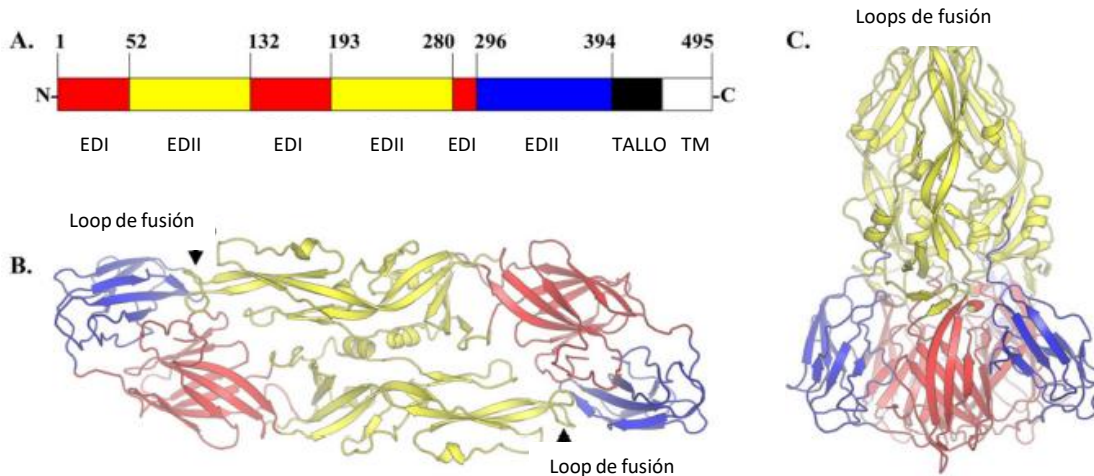


FIGURA 11. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA E. A. DOMINIOS DISCONTINUOS. B. DÍMERO DE LA PROTEÍNA E MADURA. C. ESTRUCTURA TRIMÉRICA (TOMADO DE ANASIR ET AL., 2020).

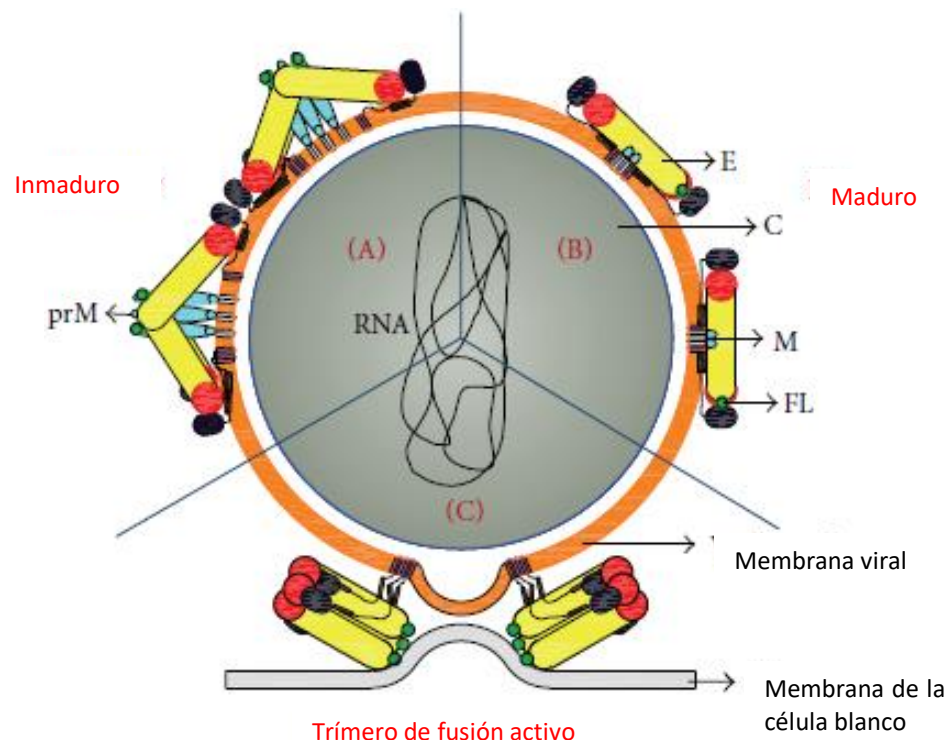


FIGURA 12. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA E DURANTE EL CICLO VITAL DEL DENV. (A) EL VIRUS INMADURO CONTIENE 60 ESPÍCULAS TRIMÉRICAS DE PROTEÍNA E Y PRM HETERODIMÉRICA. (B) EL VIRUS MADURO CONTIENE 90 HOMODÍMEROS DE PROTEÍNA E. (C) LOS HOMODÍMEROS SE ORGANIZAN EN HOMOTRÍMEROS EN LOS CUALES EL BUCLE DE FUSIÓN (FL) ES EXPUESTO (TOMADO DE KHETARPAL & KHANNA, 2016).

El dominio III de E tiene un papel importante en la patogénesis de la DHF/DSS, ya que este dominio provoca (ya sea en la proteína completa o solo) aumento en la expresión de trombomodulina, el cual es un factor anticoagulante y que

en un proceso de infección con DENV favorece el daño de las células endoteliales y anomalías en la coagulación y por tanto la hemorragia (Fahimi *et al.*, 2018; Urakami *et al.*, 2017).

La proteína E puede interactuar con la proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (también llamada proteína regulada por glucosa o GRP78, por sus siglas en inglés) de la familia de las chaperonas HSP70, la cual funciona dentro del retículo endoplásmico como una chaperona molecular involucrada en el correcto doblamiento y ensamblaje de las proteínas de membrana y de algunos virus, entre ellos el DENV. Además de BiP, también fueron identificadas como proteínas que interactúan con la proteína E la calnexina y la calreticulina, chaperonas semejantes a lectinas que interactúan con proteínas glicosiladas y son importantes para el procesamiento y maduración de glicoproteínas virales como la proteína E del DENV (Zhang *et al.*, 2019).

Khan *et al.* (2019) encontraron que el dominio III de la proteína E induce respuesta proinflamatoria por la producción de citoquinas proinflamatorias como interleucina (IL) 1 β y factor de necrosis tumoral (TNF) α por la vía NF- κ β . El aumento en la maduración de IL-1 β provoca el incremento de especies reactivas de oxígeno y eflujo de potasio. Observaron que la producción de IL-1 β está mediada por la caspasa 1 y activación del inflamosoma NLRP3.

2.3.3.6. Proteína NS1

NS1 es una proteína de anclaje dimérica de 48 kDa con 12 residuos de cisteína, 6 uniones disulfuro y 2 glicanos N-ligados bien conservados; esta proteína se puede encontrar en formas intra- y extracelular. En células de mamífero NS1 es sintetizada como un monómero soluble, dimeriza después de modificaciones post-traduccionales en el lumen del retículo endoplásmico y se acumula extracelularmente en oligómeros de alto orden, incluyendo hexámeros (Chen *et al.*, 2018; Glasner *et al.*, 2018). La fracción soluble de NS1 se une a la membrana de células no infectadas por medio de interacciones con glicosaminoglicanos sulfatados. NS1 ha sido implicada en la

patogénesis de DHF/DSS, ya que se han observado altos niveles de NS1 en suero de pacientes infectados con dengue, correlacionando con la severidad de la enfermedad (Dai *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

NS1 es esencial para la replicación que ocurre en estructuras de membrana derivadas del retículo endoplásmico llamadas paquetes de vesículas, en cuya formación están implicadas NS4A, NS4B y NS1 (Rastogi, Sharma & Singh, 2016). NS1 es expresada como un monómero en las células infectadas, después de la modificación post-traducciona en el lumen del retículo endoplásmico, forma homodímeros que se asocian con las membranas de los organelos y la membrana celular, aparentemente mediante el anclaje de NS1 al glicosil fosfatidilinositol y a balsas lipídicas. Por otro lado, NS1 es la única proteína secretada por las células infectadas, siendo secretada como un hexámero compuesto de tres dímeros con una cavidad central hidrofóbica que puede llevar 70 moléculas lipídicas de manera similar a una lipoproteína de alta densidad (Chen *et al.*, 2018; Glasner *et al.*, 2018).

Una de las funciones de NS1, es evadir la neutralización del DENV mediada por el Complemento. NS1 es capaz de interactuar con C1s (proteasa específica del Complemento) lo cual promueve la degradación de C4 a C4b, luego NS1 recluta a la proteína de unión a C4b (C4BP, por sus siglas en inglés) inactivando a C4b de la vía clásica y las convertasas C3 y C5 de la vía de lectinas lo que finalmente conlleva a la evasión del sistema del Complemento (Rastogi *et al.*, 2016).

NS1 también fue propuesta para inhibir la activación de la protrombina a trombina, lo que puede contribuir en la prolongación del tiempo de la tromboplastina parcial activada (tiempo que tarda la sangre en coagular) y por consiguiente favorecer la hemorragia en pacientes con DHF (Chen *et al.*, 2018; Rastogi, Sharma & Singh, 2016; Glasner *et al.*, 2018).

NS1 induce fuga vascular vía TLR4 y anticuerpos anti NS1, además de que la autofagia de las células endoteliales inducida por el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) induce fuga vascular (Chuang *et al.*, 2015). Cuando NS1 se une a TLR4 en las células endoteliales, se induce la expresión

y secreción de MIF, el cual se une al receptor CXCR2/CXCR4 y a CD74 sobre las células endoteliales mediante señalización paracrina o autocrina, induciéndose la autofagia a través de PI3K; finalmente, los autofagosomas median la degradación de proteínas de unión celular, resultando en disfunción de la barrera endotelial y por tanto fuga vascular (Fig. 13) (Chen *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018; Chuang *et al.*, 2015).

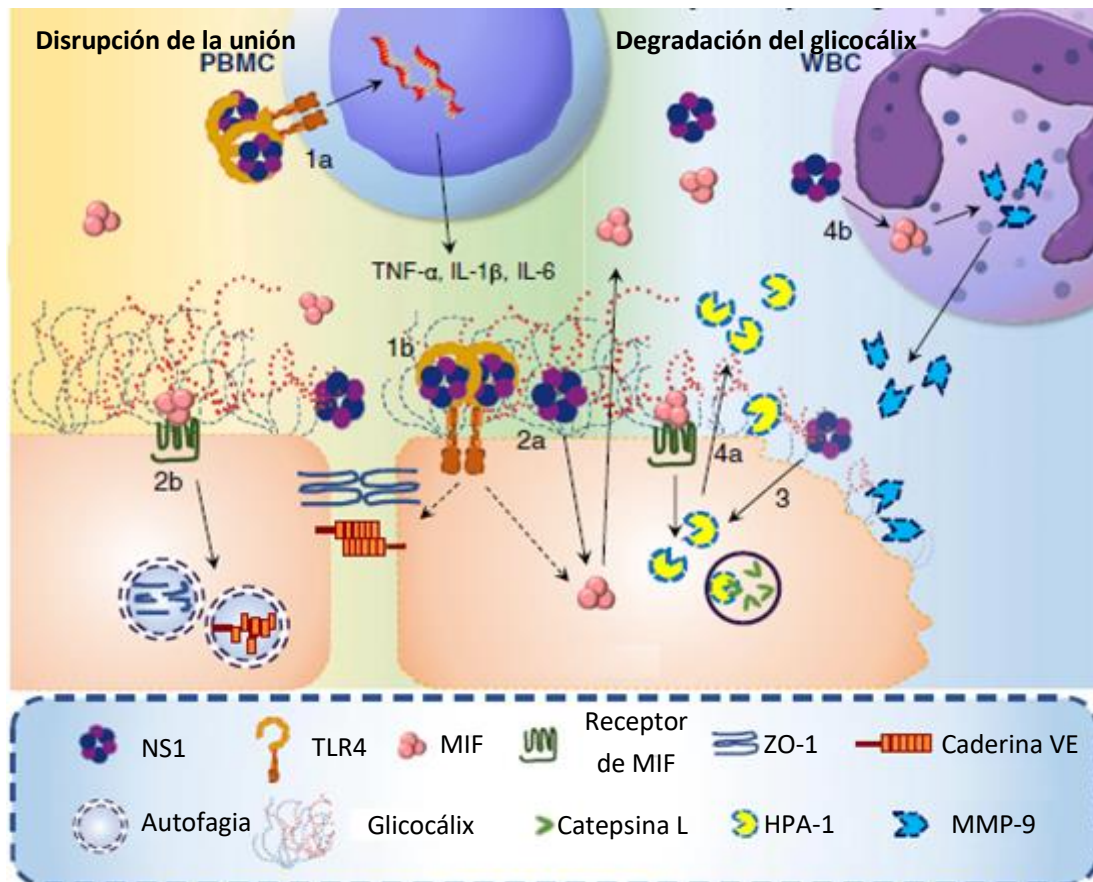


FIGURA 13. MODELO DE LA HIPERPERMEABILIDAD VASCULAR INDUCIDA POR NS1 DE DENV.
 (1A) NS1 SE UNE A TLR4 DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS (PBMC) E INDUCE LA EXPRESIÓN DE TNF- α , IL1 β E IL-6, LOS CUALES ELIMINAN LAS UNIONES ESTRECHAS, LIDERANDO A FUGA VASCULAR. (1B) NS1 SE UNA A TLR4 U OTRAS MOLÉCULAS (2A) DE CÉLULAS ENDOTELIALES E INDUCE LA SECRECIÓN DE MIF. (2B) LA UNIÓN DE MIF A SU RECEPTOR EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCE LA DISRUPCIÓN DE LAS UNIONES MEDIANTE DEGRADACIÓN AUTOFÁGICA DE LAS PROTEÍNAS ZO-1 Y CADERINA VE. (3) LA UNIÓN DE NS1 A CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCE HPA-1 MEDIANTE LA CATEPSINA L, LIDERANDO A DEGRADACIÓN DEL GLICOCÁLIX Y FUGA VASCULAR. (4A) NS1 INDUCE SECRECIÓN DE MIF Y HPA-1 DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y (4B) SECRECIÓN DE MMP-9 DE CÉLULAS BLANCAS (WBC) TAMBIÉN PUEDE CONTRIBUIR A LA DEGRADACIÓN DEL GLICOCÁLIX (TOMADO DE CHEN *ET AL.*, 2018).

2.3.3.7. Proteína NS2A.

NS2A, de 22 kDa, consta de 231 aminoácidos y está involucrada en la coordinación del cambio entre el empaquetamiento y la replicación del RNA. NS2A recluta al RNA viral, las proteínas estructurales C-prM-E y la proteasa al sitio de ensamblaje y coordina la formación de la nucleocápside y el virion (Reddy *et al.*, 2018). Los últimos 285 nucleótidos en el extremo 3' UTR del RNA, funcionan como secuencia señal de reclutamiento, la cual se une al loop citosólico de NS2A, reclutándose el complejo de replicación al sitio de ensamblaje; luego se recluta la proteasa NS2B-NS3 y la poliproteína C-prM-E y se corta esta última, finalmente la proteína C madura se ensambla sobre el RNA genómico y forma la nucleocápside, luego se unen prM y E para formar el virion (Fig. 14) (Xie *et al.*, 2019).

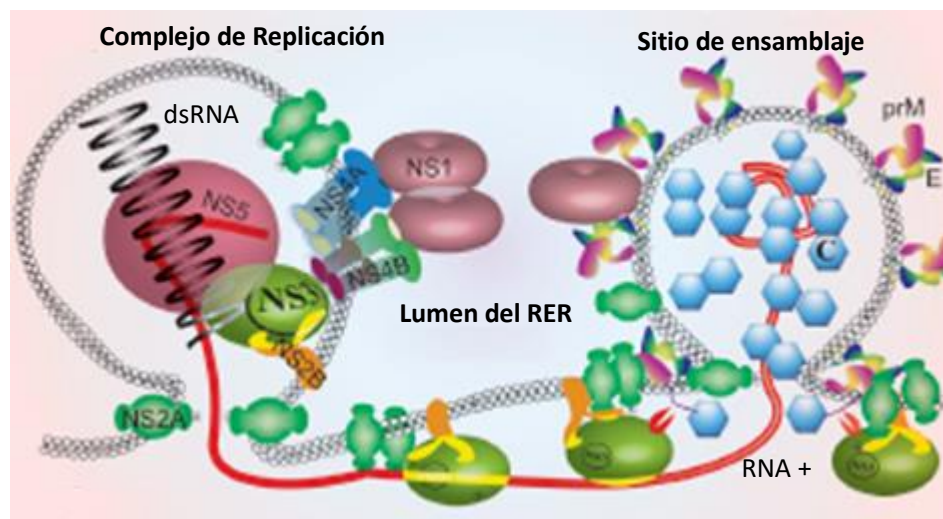


FIGURA 14. FIGURA 14. PAPEL DE NS2A EN LA REPLICACIÓN DEL RNA DEL DENV. RECLUTAMIENTO POR PARTE DE NS2A DEL COMPLEJO DE REPLICACIÓN AL SITIO DE ENSAMBLAJE EN LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (TOMADO DE XIE *ET AL.*, 2019).

La expresión de NS2A y NS2B, tras la infección por DENV, activa al inflamósoma NLRP3, actuando como viroporinas putativas (Shrivastava *et al.*, 2020). Wu *et al.* (2016) mostraron que NS2A provoca efecto citopático en células HEK-293 y que al mutar los segmentos transmembrana predichos (pTMS) 1 y 2, la tasa de producción de virus disminuye 1000 veces (Fig. 15).

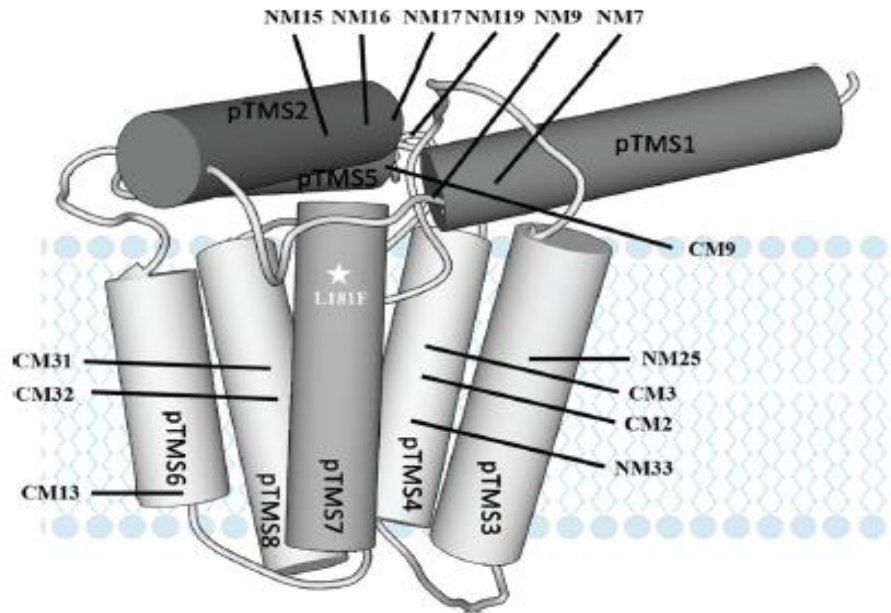


FIGURA 15. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA NS2A. DOMINIOS TRANSMEMBRANALES PREDICHOS (pTMS) DE LA PROTEÍNA NS2A EN LA MEMBRANA (TOMADO DE WU ET AL., 2016).

2.3.3.8. Proteína NS2B.

NS2B es una proteína de 14 kDa asociada a la membrana que tiene tres regiones hidrofóbicas que flanquean un dominio hidrofílico de alrededor de 40 aminoácidos. Junto con NS3 forma el complejo de proteasa viral, el cual funciona como cofactor en la activación estructural de la serín-proteasa de NS3 (Lin *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2018).

La región hidrofílica es necesaria y suficiente para la activación de la proteasa de NS3 *in vivo* e *in vitro*, mientras que las regiones hidrofóbicas son requeridas para la inserción co-traduccional de toda la proteína NS2B en la membrana y la eficiente activación del dominio de proteasa de NS3, observándose que los residuos W62, L75 e I79 de NS2B son esenciales. NS2B es necesaria para la promoción de la asociación a la membrana del complejo NS3 (Lin *et al.*, 2016; Shrivastava *et al.*, 2020).

NS2B también fue demostrada para inhibir al interferón tipo I mediante la degradación del sensor de DNA, la sintasa de GMP-AMP cíclico (cGAS). NS2B marca a cGAS para su degradación lisosomal, lo que impide la detección del

DNA mitocondrial durante la infección por DENV, lo que subsecuentemente inhibe la producción de interferón tipo I (Aguirre *et al.*, 2017; Aguirre & Fernández-Sesma, 2017; Kao *et al.*, 2018).

2.3.3.9. Proteína NS3.

NS3 es una proteína multifuncional de 70 kDa con 618 aminoácidos de longitud. En 180 aminoácidos del extremo N-terminal se encuentra codificada una proteasa que está involucrada en el procesamiento de la poliproteína viral que es inactiva por sí sola, ya que requiere de la porción central hidrofílica de la proteína NS2B para formar la proteasa activa y que es utilizada en el procesamiento de la poliproteína viral. El complejo activo formado por NS2B/NS3 evade la respuesta inmune por inhibición del Interferón tipo I (Gebhard *et al.*, 2016; Li & Kang, 2020; Lin *et al.*, 2016).

El extremo C-terminal de NS3 contiene dominios conservados encontrados en las familias de las helicasas DExD/H, por lo que también posee la capacidad de hidrolizar ATP para desdoblar RNA de doble hebra. NS3 es una proteína muy importante ya que ha sido observado que, si su actividad de helicasa o proteasa están defectuosas el DENV no es capaz de replicarse. Otra función importante de NS3 es la de RNA trifosfatasa (RTPasa), cuya actividad enzimática cataliza el corte de la unión de anhídrido fosfórico en el RNA 5' trifosforilado el cual es el primer paso en la formación del cap en el extremo 5' (Gebhard *et al.*, 2016; Li & Kang, 2020).

Aunado a las funciones ya descritas, NS3 recluta a la sintasa de ácidos grasos (FASN, por sus siglas en inglés). Al reclutar a FASN, NS3 promueve e incrementa la síntesis de ácidos grasos en células infectadas con DENV, sugiriendo que el virus utiliza la vía de síntesis de ácidos grasos para establecer sus complejos de replicación (Lin *et al.*, 2017). NS3 también se puede localizar en la matriz mitocondrial cortando a la proteína GrpEL1, lo cual reduce la actividad de la proteína chaperona mitocondrial Hsp70 (mtHsp70), liderando a trombocitopenia (Fig. 16) (Gandikota *et al.*, 2020).

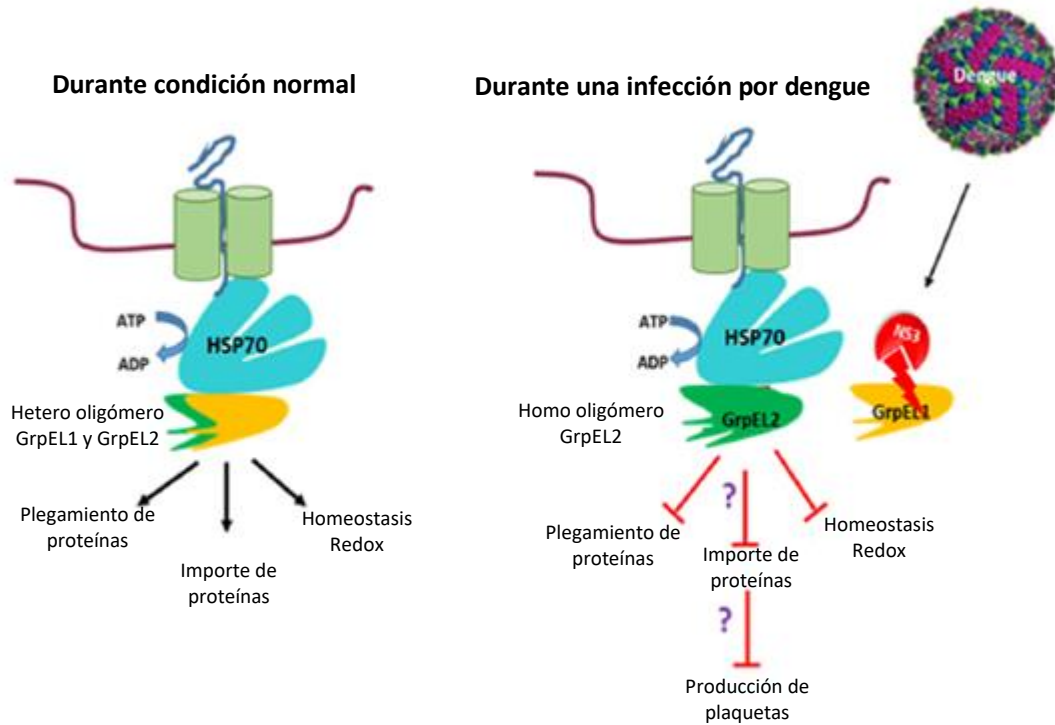


FIGURA 16. PAPEL DE LA PROTEÍNA NS3 EN LA TROMBOCITOPENIA.
 EN EL ESTADO FISIOLÓGICO NORMAL, GRPEL1 Y GRPEL2 FORMAN HETEROOLIGOMEROS Y REGULAN EL CICLO DE LA mTHSP70. DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE, LA PROTEASA NS3 SE LOCALIZA EN LA MATRIZ MITOCONDRIAL Y CORTA A LA PROTEÍNA GRPEL1 Y REDUCE LA ACTIVIDAD DE mTHSP70, LO CUAL FINALMENTE LIDERA A TROMBOCITOPENIA (TOMADO DE GANDIKOTA *ET AL.*, 2020).

2.3.3.10. Proteína NS4A.

NS4A es una proteína asociada a membrana de 16 kDa que consiste en cuatro hélices transmembranales y una región citosólica N-terminal. NS4A es cortada por el complejo de la proteasa NS2B-NS3 en el citoplasma mientras que el dominio transmembranal es cortado por la señalasa del hospedero en el lumen del retículo endoplásmico (RE). La proteína madura NS4A entonces promueve rearrreglos de la membrana por inducción de curvatura de la membrana del RE. También ha sido observado que NS4A colocaliza con RNA de doble hebra al unirse con la proteína de unión al tracto de polipirimidinas de la célula huésped, promoviendo la estabilidad del RNA de doble hebra de intermediarios genómicos virales. Además, NS4A junto con NS1 interactúan para que la síntesis de RNA sea eficiente, lo que sugiere que NS4A funciona como sitio de acoplamiento para el complejo de replicación (Reddy *et al.*, 2018).

2.3.3.11. Proteína NS4B.

NS4B es una proteína integral que posee cinco dominios transmembrana predichos. El péptido 2K que se localiza entre NS4A y NS4B se piensa que sirve como una señal de translocación cotraduccional de NS4B al lumen del retículo endoplásmico y es removido por una peptidasa señal de la célula hospedera. NS4B es necesaria para la replicación, no tiene actividad enzimática y por tanto no se conoce como actúa en dicho proceso, pero se ha visto que está presente en el complejo de replicación. También se ha observado que se asocia con NS3 para la helicasa y NS4A en el complejo de replicación (Li & Kang, 2022).

2.3.3.12. Proteína NS5.

NS5 es la proteína de DENV más grande con un peso molecular de 102 kDa y también la más conservada, con una identidad de secuencia del 70% entre los cuatro serotipos. Presenta los dominios de metil transferasa (MTasa) en su extremo N-terminal y de RNA polimerasa dependiente de RNA en el extremo C-terminal (RdRp). El dominio MTasa, que comprende los residuos 1-265, es responsable de poner la capucha del RNA viral y tiene un dominio putativo de guanidil transferasa y actividad de metilación N7 y 2'O ribosa; el dominio RdRp, de los residuos 276-900, es el que replica el RNA viral. Ambos dominios están conectados por un ligador de 5-6 residuos (266-271), que es importante en la conformación de NS5 y la actividad proteica. Por otro lado, NS5 también puede inhibir la respuesta inmune del interferón, mediante la interacción con el transductor de señal y activador de la transcripción 2 (STAT2) o por modulación del empalme del RNA dentro de la célula huésped (El Sahili & Lescar, 2017; Fajardo Jr, *et al.*, 2020; Teramoto *et al.*, 2017).

2.4. El vector del dengue.

Los mosquitos de la familia Culicidae (Orden Diptera) son remarcablemente adaptativos y cuentan con más de 3,500 especies descritas hasta ahora, con alta probabilidad de que muchas otras, probablemente especies crípticas,

permanezcan aún sin ser descubiertas. Dentro de los culícidos, se encuentran los mosquitos *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*, vectores de *Plasmodium falciparum*, la filariasis linfática y el DENV, respectivamente (Ortega-Morales *et al.*, 2019; Vanickova *et al.*, 2017).

El DENV es transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*, pero también por *Ae. albopictus*, ambos de distribución cosmopolita. Ambas especies son invasivas y se encuentran ampliamente distribuidas en regiones tropicales y templadas además de que coexisten con los humanos en áreas urbanas y suburbanas debido a los contenedores artificiales de agua. En algunos lugares, el DENV también puede ser transmitido por vectores endémicos como *Ae. polynesiensis* en la Polinesia Francesa (Jones *et al.*, 2020).

Ae. aegypti tiene una distribución entre las latitudes 30° N y 20° S, aunque puede extenderse hasta los 45° N y 40° S cuando coincide con una isoterma de 10 °C en verano. Se le encuentra a una altitud promedio de 1500 msnm, pero en África ya se ha encontrado hasta los 2,400 msnm y en América a 2,200 msnm en Colombia. Su tamaño promedio es de 4-7 mm, los adultos tienen escamas blancas en la superficie dorsal de su tórax y un abdomen color marrón oscuro a negro el cual puede tener escamas blancas. Los segmentos del tarso de las patas traseras tienen bandas blancas basales que parecen formar rayas (Brady & Hay, 2019).

Aedes aegypti se originó en África Sub-Sahariana como una especie selvática y fue introducida al continente americano por medio de los barcos provenientes de Europa a finales del siglo XV. Ambas especies de mosquito llegaron a ser domésticas y ahora son endémicas en América y Asia. *Aedes albopictus* estuvo restringido a Asia hasta finales del siglo XX, sin embargo, ha sido introducido en América y expandió su territorio en más del 40% en los últimos 30 años. *Aedes aegypti* es un excelente vector para el virus del dengue, así como otros arbovirus, debido a su gran capacidad de adaptación a las poblaciones humanas, se alimenta varias veces al día, pone muchos huevos en diversos lugares y se ha vuelto resistente a muchos insecticidas (Fig. 17) (Brady & Hay, 2019; Jones *et al.*, 2020).

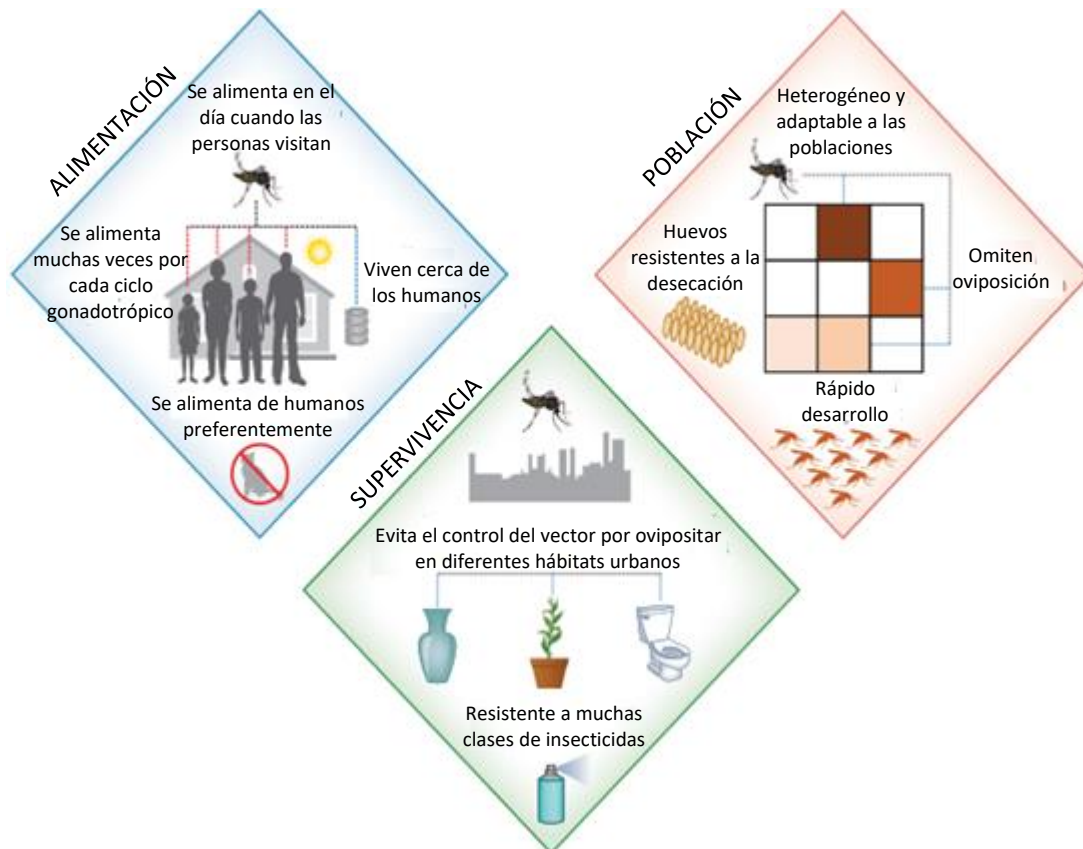


FIGURA 17. *Aedes aegypti* como vector del DENV. ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE HACEN DE *Aedes aegypti* UN VECTOR ALTAMENTE EFECTIVO DEL VIRUS DEL DENGUE (TOMADO DE BRADY & HAY, 2019).

2.4.1. Características del vector.

La clasificación completa de los principales vectores es (Jones *et al.*, 2020):

Phyllum: Arthropoda

Orden: Diptera

Suborden: Nematocera

Familia: Culicidae

Subfamilia: Culicini

Género: *Aedes*

Especies: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*

Las hembras de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son hematófagas y desarrollan su ciclo biológico donde habita el hombre; los machos se alimentan de néctares de flores que se encuentran cercanos a las fuentes de alimentación de las hembras para realizar el apareamiento. A diferencia de otros mosquitos, *Ae. aegypti* se alimenta varias veces de uno o varios huéspedes, hasta

satisfacer sus necesidades alimenticias, factor importante en su capacidad como vector de enfermedades; además, los factores climáticos como el cambio en la temperatura ambiental provocan el aumento en la tasa de transmisión del DENV más de dos veces por cada 10 °C al ocasionar una mayor frecuencia en las picaduras debido a una mayor actividad del mosquito (Brady & Hay, 2019; Jones *et al.*, 2020).

El rango de temperatura óptima a la cual la población de *Ae. aegypti* sobrevive en estado larvario varía entre los 15 y 35 °C, mientras que para el estado adulto es de 15 a 30 °C, la tasa de oviposición sigue una relación lineal positiva más allá de los 30 °C. La hembra deposita los huevos en el agua y estos se desarrollan hasta una fase larvaria. La fase aérea del mosquito inicia cuando emergen de la última fase acuática (pupa), es relativamente fácil de reconocer debido a los colores y formas que los caracterizan por su color negro con escamas de color plateado en el tórax y apéndices locomotores (Fig. 18). Las escamas de la región dorsal del tórax (mesonoto), dan la apariencia de una lira para *Ae. aegypti* y una línea recta en *Ae. albopictus* (CDC, 2022).

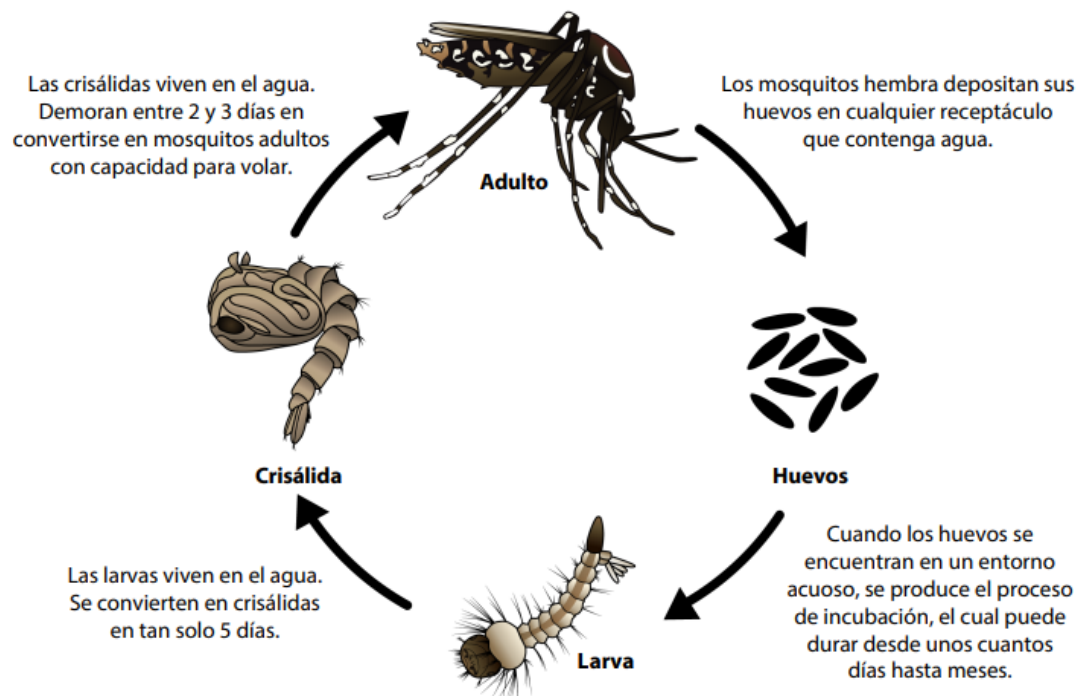


FIGURA 18. CICLO DE VIDA DE *AEDES AEGYPTI*. EL MOSQUITO HEMBRA ADULTO DEPOSITA SUS HUEVOS EN UN LUGAR CONTENIENDO AGUA Y SON INCUBADOS HASTA QUE EMERGEN LAS LARVAS, LAS CUÁLES SE CONVIERTEN CRISÁLIDAS Y ESTAS FINALMENTE EN ADULTOS (TOMADO DE CDC, 2022).

Debido a que se ha observado una baja actividad de dengue en poblaciones humanas donde la especie predominante es *Ae. albopictus*, además de que en ellas existe un alto número de casos importados ocasionados por la ocurrencia de actividad epidémica de dengue en poblaciones cercanas, se observó que *Ae. albopictus* es menos eficiente como vector del dengue que *Ae. aegypti*. Esto ha sido explicado en base a la ecología de ambas especies, ya que *Ae. aegypti* está bien adaptado a los ambientes urbanos donde vive en asociación con los humanos, mientras que *Ae. albopictus* está mucho más adaptado al ambiente peridoméstico donde se encuentra en contacto principalmente con animales de los cuales se alimenta y con vegetación que provee a sus larvas de lugares de desarrollo y descanso (Brady & Hay, 2019). No obstante que *Ae. aegypti* es más eficiente como vector del dengue, *Ae. albopictus* ha cobrado gran importancia debido a su rápida diseminación en el planeta, ya que originalmente su distribución era únicamente en el sureste de Asia, pero ahora se encuentra también en Europa, América y África (Jones *et al.*, 2020).

Con respecto a México, el mosquito se distribuye en varios estados, especialmente al sur del país, la ciudad de México en particular es una zona que ha sido considerada libre de contagio autóctono de dengue, sin embargo, debido al cambio climático, hace tiempo se estimó que el mosquito llegaría a la Ciudad en algún momento. Al respecto, Mejía-Guevara *et al.* (2020) mostraron que el mosquito ya se encuentra en la Ciudad de México y está en un periodo de colonización incipiente, por lo que no se descarta que en poco tiempo esté completamente diseminado en la Ciudad y los casos autóctonos de dengue comiencen a surgir.

Recientemente se hicieron esfuerzos por secuenciar el genoma del mosquito *Aedes*, en virtud de que la secuenciación del mosquito *Anopheles gambiae* (278 Mb) ha acelerado la investigación para el desarrollo de estrategias de control de la malaria, por lo que en el año 2007 se publicó en la revista Science el genoma de *Ae. aegypti* (1380 Mb) (Brady & Hay, 2019). Severson and Behura (2012) comparan el genoma de *Ae. aegypti* con aquellos de *A.*

gambiae y *Culex quinquefasciatus* (Tabla 2). Encontrando que la diferencia entre el gran tamaño del genoma de *Ae. aegypti* comparado con los de *A. gambiae* y *C. quinquefasciatus*, se debe principalmente a la gran cantidad de elementos transponibles que existen en *Ae. aegypti* (50% del total de su genoma) y al tamaño de sus intrones, lo que provoca que el tamaño promedio de sus genes sea casi 3 veces más grande que en *A. gambiae* y *C. quinquefasciatus* (Tabla 2) (Severson and Behura, 2012).

TABLA 2. COMPARACIÓN DE LOS GENOMAS DE *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* Y *Culex quinquefasciatus* (SEVERSON AND BEHURA, 2012).

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)	Total de genes	Tamaño promedio de los genes	Tamaño promedio de Exones	Tamaño promedio de Intrones
<i>Ae. Aegypti</i>	1380	15419	15488	405	3793
<i>A. gambiae</i>	278	12457	5145	378	875
<i>C. quinquefasciatus</i>	579	18883	5673	356	1043

2.4.2. Interacción mosquito-DENV.

El periodo de incubación extrínseco del virus en el mosquito va de 10 a 14 días, periodo en el cual el DENV es capaz de inhibir las tres principales vías de activación de la respuesta inmune que en los insectos son: la vía Toll, la deficiencia inmune (IMD, por sus siglas en inglés) y la vía cinasa Janus-transductor de señal y activador de la transcripción (JAK-STAT, por sus siglas en inglés). El proceso de infección en el mosquito es el resultado de la ingestión de sangre de animales o humanos virémicos y esto resulta en la infección de las células epiteliales del intestino medio (CEIM), aquí el paso de la “barrera de infección del intestino medio” (MIB, por sus siglas en inglés) requiere que el DENV sea capaz de unirse a la membrana de las CEIM, para después penetrar y replicarse dentro de ellas (Lambrechts & Lequime, 2016; Valderrama *et al.*, 2017).

Una vez que el DENV se ha establecido en las CEIM, ahora tiene que pasar la “barrera de escape del intestino medio” (MEB, por sus siglas en inglés)

pasando a través de la lámina basal para diseminarse a través del hemocele y establecer una infección secundaria en otros órganos. Una última barrera potencial implica la infección de las glándulas salivales y posterior escape al lumen de estas, a partir de las cuales el virus es transmitido a otro huésped (Fig. 19) (Lambrechts & Lequime, 2016; McCracken *et al.*, 2020).

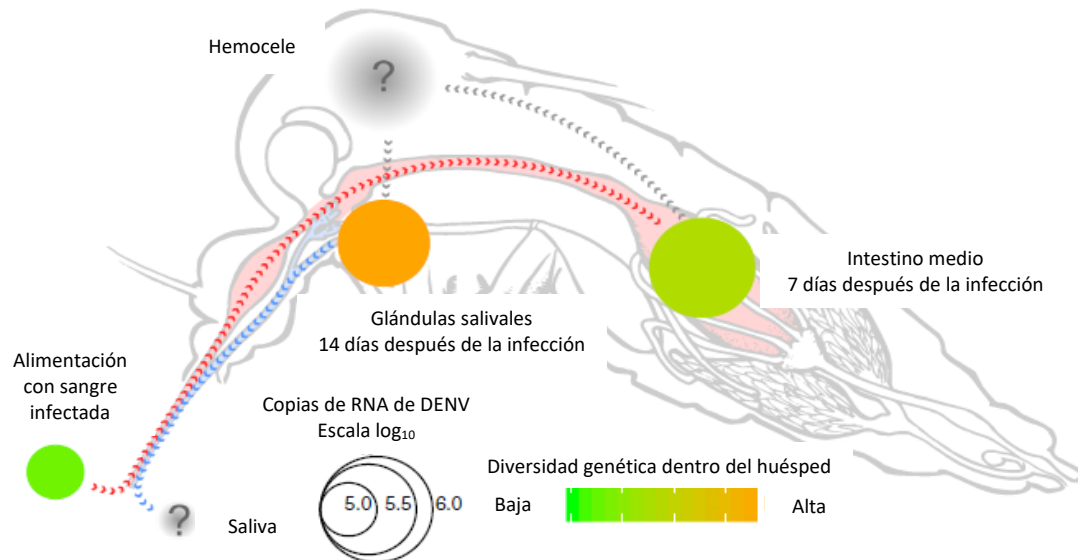


FIGURA 19. BARRERAS DE TRANSMISIÓN DEL DENV EN EL MOSQUITO. DIAGRAMA GENERALIZADO DE LAS POSIBLES BARRERAS DE TRANSMISIÓN A LAS QUE SE ENFRENTA UN ARBOVIRUS EN UN MOSQUITO (TOMADO DE LAMBRECHTS & LEQUIME, 2016).

La entrada del virus en las células del mosquito es debida a endocitosis mediada por receptor en vesículas revestidas por clatrina, aunque también se ha sugerido que la penetración directa del virus puede ocurrir bajo ciertas circunstancias. Una vez infectada, la hembra del mosquito incrementa notablemente su actividad locomotora hasta en un 50 % más que una hembra no infectada, aunque es necesario profundizar aún más para determinar si este comportamiento puede tener implicaciones en la dinámica de transmisión del DENV (Lambrechts & Lequime, 2016; Valderrama *et al.*, 2017).

2.4.3. Capacidad y competencia vectorial.

La capacidad vectorial abarca todos los factores ambientales, de comportamiento y moleculares que subrayan el papel de los insectos en la transmisión del patógeno, mientras que la capacidad vectorial la definen como la habilidad intrínseca de un vector para llegar a ser infectado con, permitir la

replicación de, y finalmente transmitir un patógeno a un huésped susceptible (Kramer, 2016). La competencia vectorial en los mosquitos está influida por la existencia de barreras de transmisión viral genéticamente determinadas por la MIB y la MEB. De manera similar a otras interacciones huésped-patógeno, la competencia del vector de *Aedes* para los virus del dengue parece estar determinada por interacciones genotipo/genotipo, de modo que el resultado de la infección depende de la combinación específica mosquito-DENV (Kramer, 2016).

2.5. Interacción DENV-humano.

La transmisión del DENV está dada por la interacción entre la gente, los mosquitos, el virus y los factores ambientales; además, el movimiento humano es un factor importante en la dinámica de transmisión y dispersión del virus. El DENV está completamente adaptado al humano y a sus vectores, siendo el mosquito *Aedes aegypti* el principal (Begum *et al.*, 2019).

La infección con DENV es iniciada por la inoculación directa del virus a la corriente sanguínea por el mosquito. El periodo de incubación del virus en el humano es de 4-7 días en promedio, aunque se ha establecido que puede ir desde los 2-14 días (Guzman *et al.*, 2016). El DENV, después de la picadura del mosquito, entra primero en la piel infectando a las células de la dermis y epidermis. Las células de la piel juegan un papel importante en el tropismo del virus, como es el caso de las células de Langerhans, macrófagos dérmicos, monocitos, células dendríticas dérmicas, queratinocitos, endotelio, fibroblastos y mastocitos (Fig. 20) (Guzman *et al.*, 2016; Begum *et al.*, 2019).

El DENV desencadena una gran cantidad de reacciones, a partir de su unión a receptores de sus células blanco hasta su empaquetamiento y salida de la célula y se forma un virus maduro capaz de infectar nuevas células; se ha observado que los órganos donde ocurre una mayor tasa de replicación viral son la piel, sangre periférica, bazo, ganglios linfáticos e hígado (Begum *et al.*, 2019).

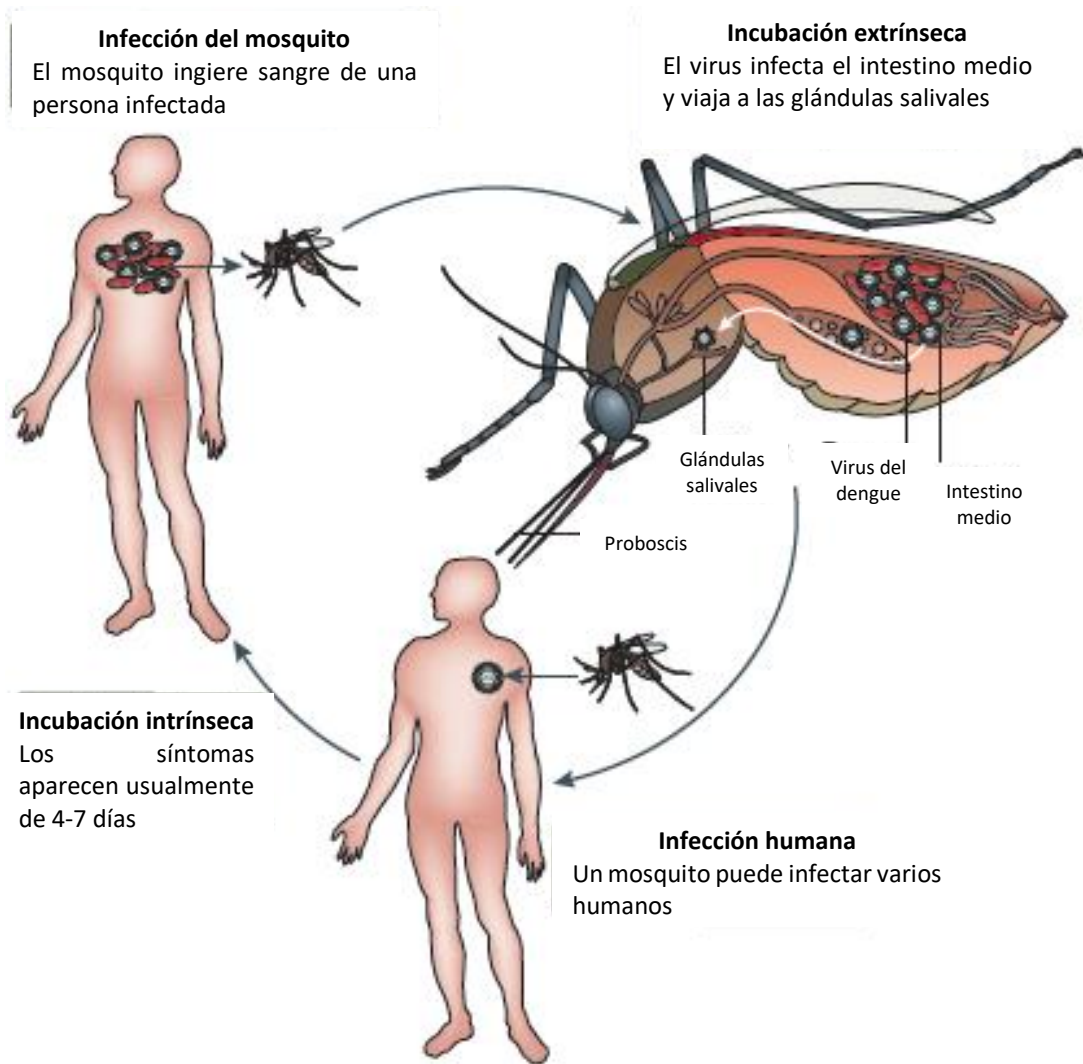


FIGURA 20. CICLO URBANO DE INFECCIÓN DEL HUMANO Y EL MOSQUITO POR EL DENV. EL MOSQUITO HEMBRA SE ALIMENTA DE UNA PERSONA INFECTADA CON DENGUE, EL CUAL A SU VEZ INFECTA EL INTESTINO MEDIO DEL MOSQUITO Y EVENTUALMENTE LLEGA A LAS GLÁNDULAS SALIVALES, EL MOSQUITO ENTONCES PUEDE INFECTAR A MUCHAS PERSONAS AL ALIMENTARSE DE ELLAS (TOMADO DE GUZMAN *ET AL.*, 2016).

En la piel, en la capa de la epidermis la infección es baja, pero las células de Langerhans son el blanco de infección; en la dermis el blanco primario del DENV son las células dendríticas. Los mastocitos son activados y degranulados, su activación recluta células asesinas naturales al sitio de infección y las células dendríticas infectadas llevan al DENV a los nodos linfáticos (Fig. 21) (Rathore & Saint John, 2018; King *et al.*, 2020).

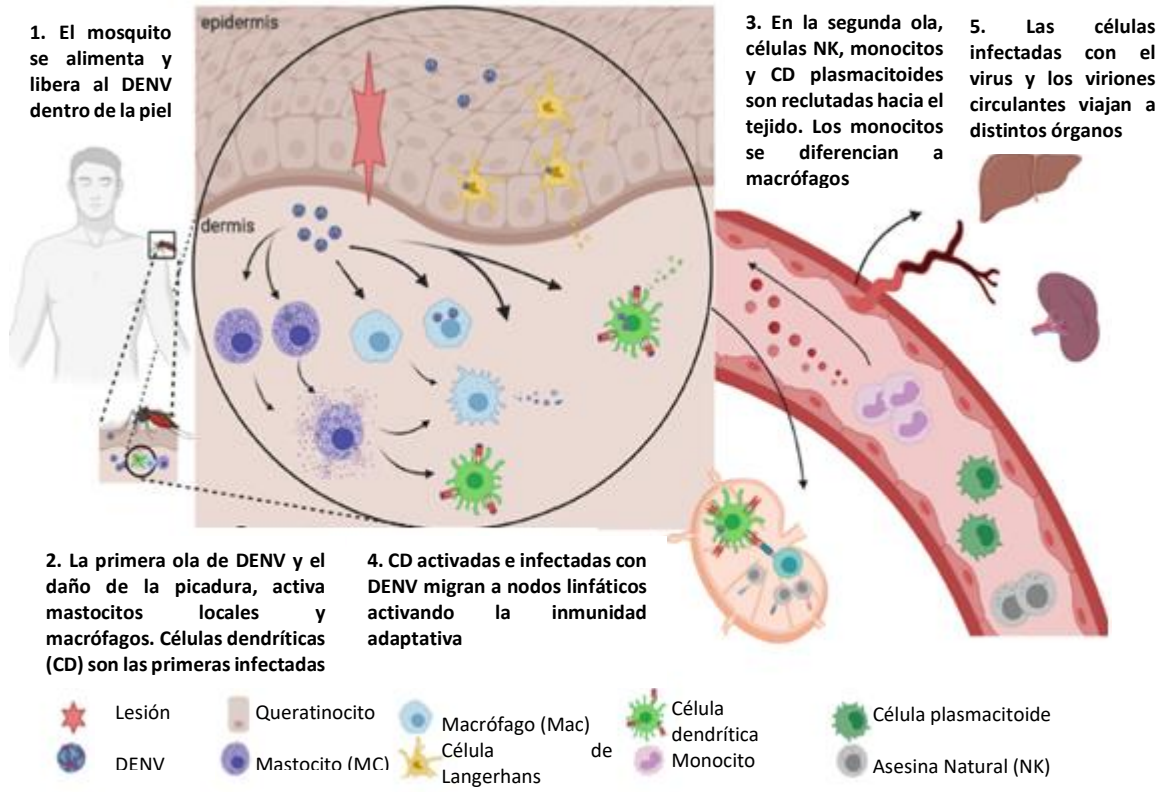


FIGURA 21. INICIO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEL DENGUE Y DISEMINACIÓN A LOS DEMÁS ÓRGANOS. LA PICADURA DEL MOSQUITO LIBERA AL DENV HACIA LA PIEL, ACTIVANDO MASTOCITOS Y MACRÓFAGOS; EN LA SEGUNDA OLA, CÉLULAS NK, MONOCITOS Y CÉLULAS PLASMACITOIDES SON RECLUTADAS AL TEJIDO INFECTADO. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS SON INFECTADAS Y ESTAS MIGRAN A NODOS LINFÁTICOS ACTIVANDO LA INMUNIDAD ADAPTATIVA. FINALMENTE, LAS CÉLULAS INFECTADAS, ASÍ COMO VIRIONES LIBRES, VIAJAN AL RESTO DE ÓRGANOS (TOMADO DE KING ET AL., 2020).

El DENV se une a la superficie de la célula huésped mediante la interacción de la proteína E con receptores de la célula, como DC-SIGN, y entra por endocitosis mediada por receptor en vesículas revestidas por clatrina. Como se observa en la figura 22, el virus se une directamente al receptor (A) o usa muchos factores de unión (B) que disparan la vía endocítica en la vía dependiente de clatrina. La vesícula endocítica se convierte en un endosoma tardío, en el cual la acidificación causa cambios conformacionales sobre los dímeros de proteína E que se convierten en trímeros fusogénicos y se forman poros y el genoma es liberado al citoplasma (Fig. 22) (Guzman *et al.*, 2016; King *et al.*, 2020).

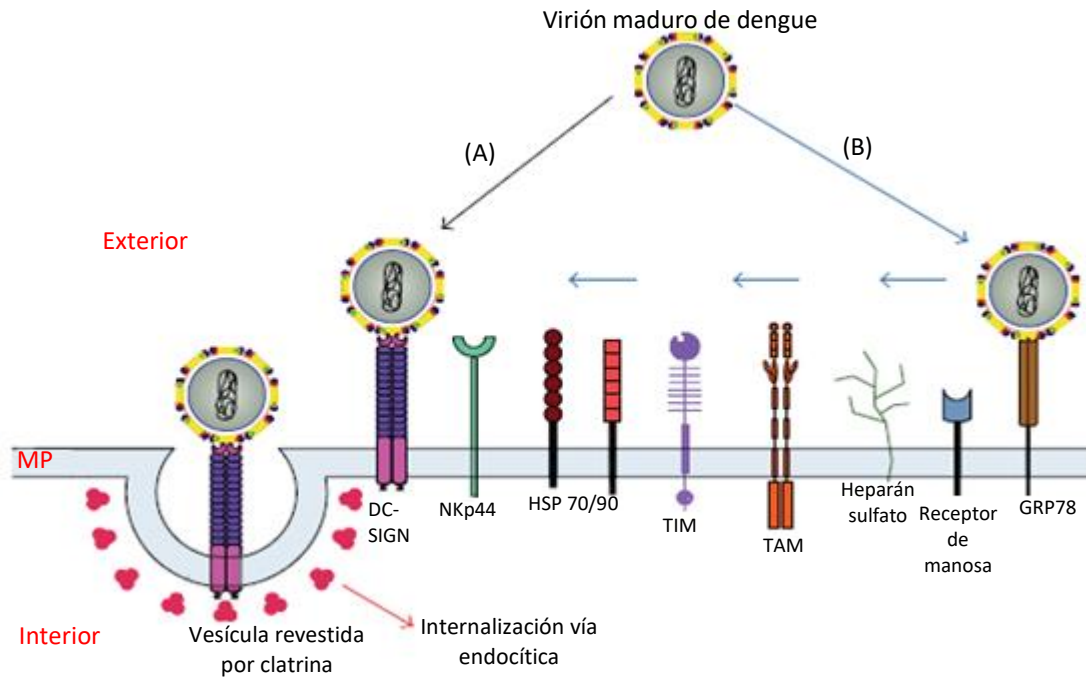


FIGURA 22. ENTRADA DEL DENV EN LA CÉLULA HUÉSPED. EL VIRUS DEL DENGUE USA LOS RECEPTORES Y FACTORES DE UNIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA PARA ENTRAR AL CITOPLASMA. (TOMADO DE KHETARPAL & KHANNA, 2016).

Dentro de la célula huésped, un rearrreglo de la proteína E dependiente de pH facilita la fusión de la membrana del endosoma con la membrana del DENV, el DENV pierde su nucleocápside y su RNA es liberado y traducido en una sola poliproteína, la cual es procesada tanto co-traduccional como post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales en las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las 7 NS (Guzman *et al.*, 2016; Ketharpal & Khanna, 2016; Martín-Acebes, Vázquez-Calvo & Saiz, 2016). La proteína E es glicosilada gracias al complejo dolicol fosfato manosa sintetasa y esto permite el plegamiento apropiado de la proteína (Labeau *et al.*, 2020). Una vez que las proteínas individuales se han traducido y plegado, las proteínas NS inician la replicación del genoma viral. El RNA recién sintetizado es luego empaquetado por la proteína C formando la nucleocápside (Fig. 23) (Martín-Acebes, Vázquez-Calvo & Saiz, 2016).

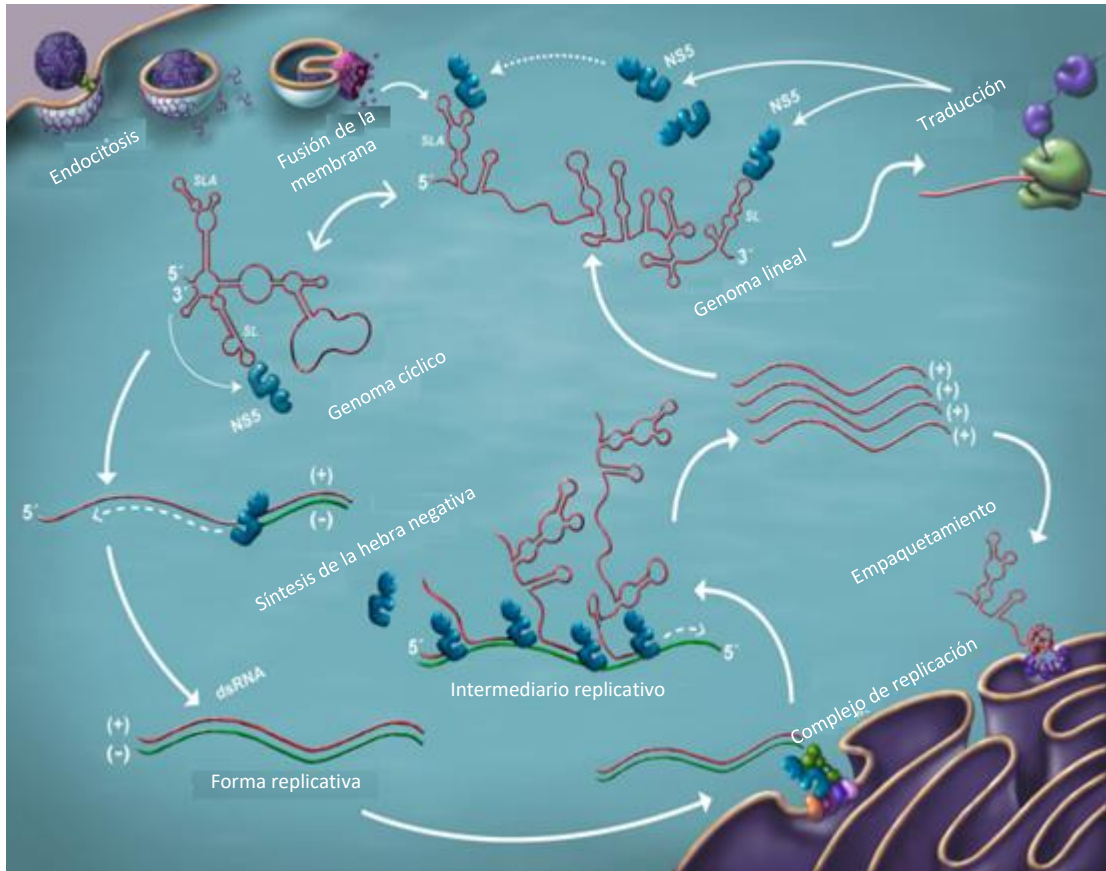


FIGURA 23. CICLO VITAL DEL VIRUS DEL DENGUE.

EL VIRUS SE UNE A SU RECEPTOR FAVORECIENDO LE ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR. UNA VEZ DENTRO, SE FUSIONA CON LA MEMBRANA DE LA VESÍCULA Y EL GENOMA ES LIBERADO. LAS FORMAS LINEALES FAVORECEN LA TRADUCCIÓN MIENTRAS QUE LAS FORMAS CÍCLICAS FAVORECEN LA REPLICACIÓN (TOMADO DE HODGE *ET AL.*, 2019).

Las proteínas prM y E forman heterodímeros orientados hacia el lumen del RE, luego los heterodímeros se asocian en trímeros y esta interacción induce una superficie curvada cristalina lo cual guía al virus a su encapsulamiento dentro del RE. El virus inmaduro formado en el RE va madurando conforme pasa por los compartimentos de los organelos de la vía secretoria. El pH fuertemente ácido (5.8-6) de la red trans-Golgi (TG) fomenta la disociación de los heterodímeros prM/E lo que lleva a la formación de dímeros sobre la superficie de la partícula viral, con la proteína prM cubriendo al péptido fusión de la proteína E (Fig. 23) (Guzman *et al.*, 2016; Martín-Acebes, Vázquez-Calvo & Saiz, 2016).

Luego, la furina, una endoproteasa celular localizada principalmente en la red TG corta a prM generando las partículas maduras M y al polipéptido “pr”, los cuales se mantienen asociados hasta que el virus es secretado al espacio extracelular (Pierson & Diamond, 2015). Lo anterior permite que la proteína E forme homodímeros los cuales se piensa que son estabilizados por las proteínas M y “pr” previniéndose así cambios conformacionales de la proteína E que pudieran llevar a la fusión a la membrana de los organelos de la vía secretoria de una manera prematura. Una vez que el virus ha sido secretado y el polipéptido “pr” se ha disociado de M, los nuevos virus están completamente maduros y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección celular (Fig. 23) (Guzman *et al.*, 2016; Morrone & Lok, 2019; Hodge *et al.*, 2019).

2.6. Patogénesis del DENV

Los pacientes que adquieren el virus por primera vez son generalmente asintomáticos y desarrollan respuestas inmunes de protección contra cepas homólogas al serotipo viral y la exposición de estos individuos a una segunda infección con un serotipo diferente se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de DHF/DSS (Dai *et al.*, 2016; Gan, Ting & Chan, 2017; Katzelnick, Coloma & Harris, 2017; Halstead, 2019). Los mecanismos por los cuales el DENV causa DHF/DSS están todavía siendo investigados, pero al menos hay tres componentes necesarios para ello: la desregulación de la inmunidad mediada por células, el aumento dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés) y la activación del sistema del complemento (Fig. 24) (Pang *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2020).

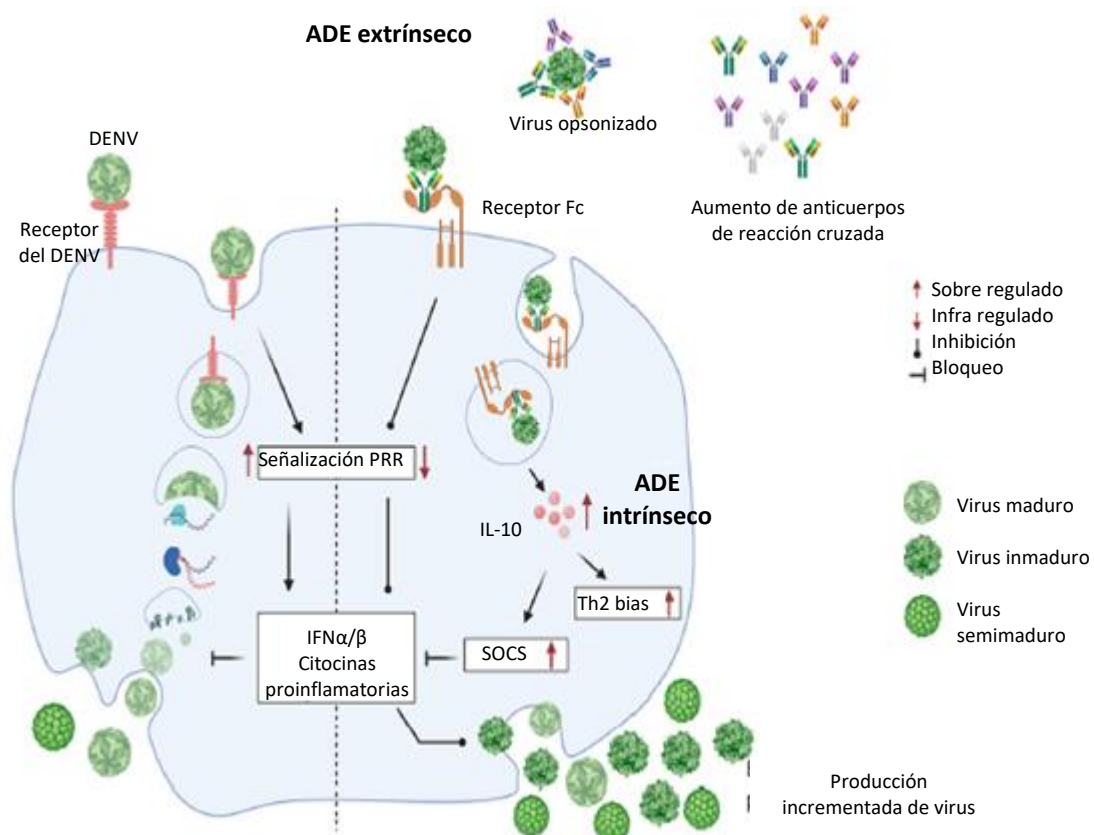


FIGURA 24. AUMENTO DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS POR LA INFECCIÓN DEL DENV.

LA INFECCIÓN PRIMARIA POR EL VIRUS INDUCE ANTICUERPOS PROTECTORES QUE PUEDEN NEUTRALIZAR AL MISMO SEROTIPO EN UNA INFECCIÓN POSTERIOR. EN UNA INFECCIÓN SECUNDARIA HETEROTÍPICA DE DENV, LOS ANTICUERPOS GENERADOS EN LA PRIMERA INFECCIÓN OCASIONAN UNA REACCIÓN CRUZADA FORMANDO UN COMPLEJO INMUNE. ENTONCES EL COMPLEJO VIRUS-ANTICUERPO INTERACTÚA CON LOS RECEPTORES Fc, EXPRESADOS EN LA MEMBRANA DE MACRÓFAGOS Y FAGOCITOS, DE ESTE MODO EL VIRUS SE PROPAGA DENTRO DE ESAS CÉLULAS INMUNES AUMENTANDO LA INFECTIVIDAD (TOMADO DE SHUKLA *ET AL.*, 2020).

Durante la infección, las células del linaje fagocito mononuclear (monocitos, macrófagos y células dendríticas) son el blanco primario del DENV, aunque algunos estudios reportan también el reconocimiento de antígenos en hepatocitos y células endoteliales (Castillo *et al.*, 2018). El receptor Fc (FcR, por sus siglas en inglés), encontrado en la mayoría de los fagocitos incluyendo a las células dendríticas y macrófagos, es el factor principal en el ADE (Halstead, 2019; Khandia *et al.*, 2018). El FcR es un complejo de multisubunidades que se une a inmunoglobulinas tipo IgG. Las vías de señalización mediadas por FcR generalmente llevan a la activación de las células inmunes. La interacción normal entre el virus y sus anticuerpos conlleva a la neutralización del virus, sin embargo, en las infecciones con

serotipos diferentes de DENV, los anticuerpos son no neutralizantes y provocan un aumento en el título viral, ocasionado por la interacción aditiva entre virus y anticuerpos (Katzelnick, Coloma & Harris, 2017; Khandia *et al.*, 2018 Pang *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2020).

En el caso de la desregulación de la respuesta inmune originada por células T, la cascada de reacciones inicia con la infección por DENV de células dendríticas inmaduras cuyo receptor putativo y blanco inicial es la molécula de adhesión intercelular 3 no integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN, por sus siglas en inglés) (Halstead, 2019). Las células dendríticas inmaduras contienen gran cantidad de DC-SIGN mientras que las maduras tienen niveles bajos de esta molécula, por lo que en ellas se favorece el ADE vía FcR. Una vez infectadas las células dendríticas inmaduras, interaccionan y activan a las células T las cuales producen grandes cantidades de citocinas, es lo que se conoce como “tormenta de citocinas” y que caracteriza a los casos de DHF/DSS (Wang *et al.*, 2019).

La disfunción endotelial que causa las hemorragias son lo que distingue al dengue severo. Las hemorragias son evidentes a los 3-6 días después del comienzo de la enfermedad, siendo esta la fase crítica, la cual sigue inmediatamente al pico de la viremia, durando de 24-48 horas en general revirtiendo rápidamente, mostrando que este resulta de procesos inflamatorios y no por la infección en el endotelio, siendo las citoquinas los factores esenciales en ello (Bhatt *et al.*, 2021).

En cuanto a los factores virales, la proteína NS1 interrumpe en el glicocáliz de las células endoteliales y de esa manera contribuye al desarrollo de las hemorragias. En las células endoteliales, NS1 induce la degradación del ácido siálico y heparán sulfato, efecto provocado por la inducción de la expresión de sialidasas y heparanasa. NS1 también activa a la catepsina 1 en las células endoteliales, una cisteína proteasa del lisosoma, que activa a la heparanasa por corte enzimático (Bhatt *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2018; Puerta-Guardado, Glasner & Harris, 2016). Puerta-Guardado *et al.* (2019) también descubrieron que existe un tropismo de NS1 para producir la disfunción endotelial, hacia las

células endoteliales de pulmón, dermis, vena umbilical, cerebro e hígado. Este proceso es inhibido por la mutación N207Q en la proteína NS1, pues es un sitio esencial en el proceso de hiperpermeabilidad (Wang *et al.*, 2019).

Se ha observado que muchos otros mediadores inflamatorios lipídicos están elevados en la infección por dengue, como el factor activador de las plaquetas (PAF) y los leucotrienos (Halstead, 2019; Wang *et al.*, 2020). Otros mediadores inflamatorios como el factor de crecimiento endotelial vascular y la angiopoyetina 2 se encuentran a niveles elevados en la fiebre hemorrágica, favoreciendo la inducción de la actividad de las fosfolipasas, que a su vez induce PAF. Las plaquetas contribuyen en la disfunción endotelial por la producción de interleucina 1B por medio del inflamosoma NLRP3 y por la inducción de citoquinas inflamatorias por los monocitos (Fig. 25) (Malavige & Ogg, 2017; Troupin *et al.*, 2016).

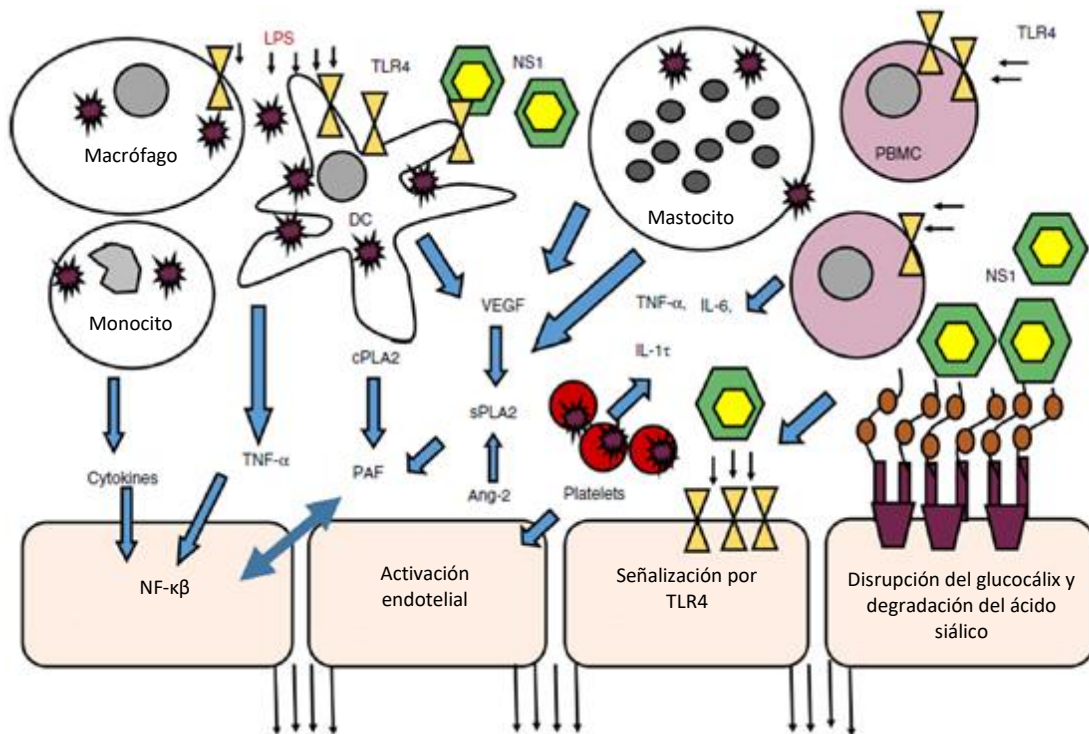


FIGURA 25. MODELO DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL EN LA INFECCION POR DENGUE. LA INFECCION POR DENGUE ACTIVA MUCHAS VIAS DE SEÑALIZACION, LAS CUALES EN CONJUNTO, LLEVAN A LA DISFUNCION ENDOTELIAL (TOMADO DE MALAVIGE & OGG, 2017).

ocasionando también que las regiones tropicales llegaran a ser hiperendémicas. Esta rápida propagación comenzó con una pandemia en el Sureste de Asia en la década de 1950, la cual fue asociada con el crecimiento urbano regional después de la segunda guerra mundial, luego en las décadas de 1970 y 1980 ocurrió una gran expansión geográfica del virus junto con su vector, generando un incremento en la frecuencia y magnitud de las epidemias, así como de la severidad de la enfermedad (Fig. 27) (Guzman *et al.*, 2016).

En América, el dengue se sugiere se introdujo en los 1600s, a partir de ahí, epidemias recurrentes con enfermedad semejante a dengue se dieron en el siglo XVII. El primer brote reconocido como dengue en América se reportó en 1635 en las islas caribeñas de Martinica y Guadalupe, posteriormente en 1780 se reportó un brote de dengue en Filadelfia. Entre 1947 y 1970 se realizó una campaña de erradicación del mosquito disminuyendo fuertemente la población del vector y por tanto del virus, sin embargo, el abandono de esa campaña, así como el deterioro de los programas de salud promovieron la repoblación del vector y a partir de entonces los casos de dengue han ido en aumento (Brady & Hay, 2019).

Una de las razones del aumento de las epidemias y de la distribución geográfica del dengue en la década de 1970 (Fig. 27), se debió al aumento en la cantidad de usuarios de avión como medio de transporte, lo cual favoreció epidemias frecuentes seguidas de transmisiones interepidémicas silentes o no detectadas. Además, las epidemias pueden ocurrir debido a que la inmunidad colectiva a algún serotipo disminuye o por la introducción de una nueva cepa (Guzman *et al.*, 2016).

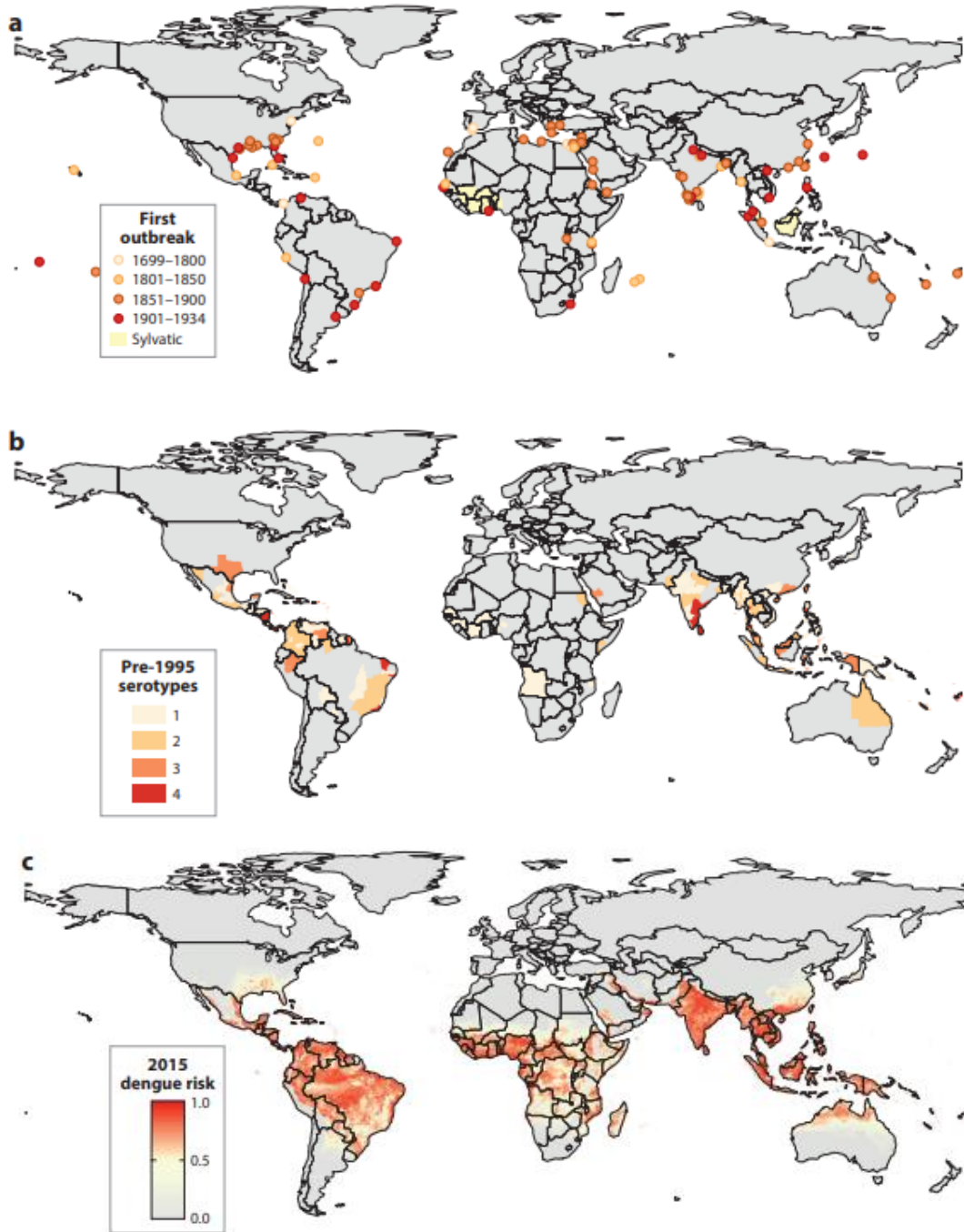


FIGURA 27. EXPANSIÓN GEOGRÁFICA DEL VIRUS DEL DENGUE EN EL MUNDO. (BRADY & HAY, 2019).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es la enfermedad arboviral más común en todo el mundo. Se tienen estimaciones de casi 400,000 personas infectadas al año y con más de la mitad de la población mundial en riesgo de adquirir la enfermedad, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. Con respecto al continente americano, alrededor de 500 millones de personas están en riesgo de contraer dengue. Por otro lado, el número de caso de dengue en América se incrementó drásticamente en las últimas cuatro décadas, ya que de 1.5 millones de casos acumulados en la década del 80, pasó a 16.2 millones en la década del 2010-2019. En el 2013, por ejemplo, se registraron por primera vez más de 2 millones de casos en el continente, con una incidencia de 430.8 por cada 100 mil habitantes; además, se registraron 37,692 casos de dengue grave y 1,280 muertes en el continente. Para el 2019 se registraron un poco más de 3.1 millones de casos, con 28 mil casos graves y 1,534 muertes (CDC, 2022; WHO, 2022).

El costo económico debido a las infecciones del dengue va de los 4000 -39000 millones de dólares, además, el mosquito expande cada vez más su área de distribución. Aunado a lo anterior, los cuatro serotipos de dengue circulan en América y particularmente en México existe cocirculación de los cuatro serotipos, por lo cual nuestro país se considera endémico con respecto al virus del dengue, además de que este factor favorece el desarrollo de dengue severo. Otros factores como la gran cantidad de lluvias, debido a la abundancia de agua y la generación de fuentes naturales de oviposición del vector, ayudan en la dispersión del virus y por tanto en la generación de más casos de dengue (CDC, 2022).

IV. JUSTIFICACIÓN

México es un país en el cual el dengue es una enfermedad endémica y que, de acuerdo con los reportes de la Secretaría de Salud, el número de individuos infectados se ha ido incrementando fuertemente a partir del año 2000, siendo el 2009 uno de los años con mayor cantidad de casos totales, así como de dengue severo. En aquel año, el Estado de Veracruz ocupó el tercer lugar en casos totales de todo el país, sin embargo, ocupó el primer lugar en casos de dengue severo; lo más importante de ese brote de dengue en Veracruz es que la proporción de casos de dengue clásico contra los de dengue hemorrágico fue prácticamente de 1:1.

Previamente, los estudios de Gardella-García *et al.* (2008) y Perez-Ramirez *et al.* (2009) habían mostrado que el serotipo predominante en Veracruz era el DENV2 genotipo Asiático Americano. Cuando se estudió el brote epidémico del 2009 (Hernández, 2009), se encontró de igual manera al DENV2, pero solo se determinó el serotipo y no el genotipo, además se determinó la presencia de los otros tres serotipos.

Por lo anterior, resulta muy importante determinar las causas del brote epidémico del 2009, ya que ha sido uno de los años con mayor cantidad de casos en la historia de Veracruz, además de que la cantidad de casos de dengue no grave y severo casi estuvieron en una proporción de 1:1; lo anterior puede deberse a la virulencia *per se* del serotipo presente, la introducción de nuevos genotipos, mutaciones que se hayan generado y/o las condiciones climatológicas presentes en el año 2009.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar la epidemiología molecular del virus del dengue en el Estado de Veracruz mediante el análisis filogenético de secuencias de los pacientes infectados con dengue de diferentes brotes epidémicos.

5.2. Objetivos específicos

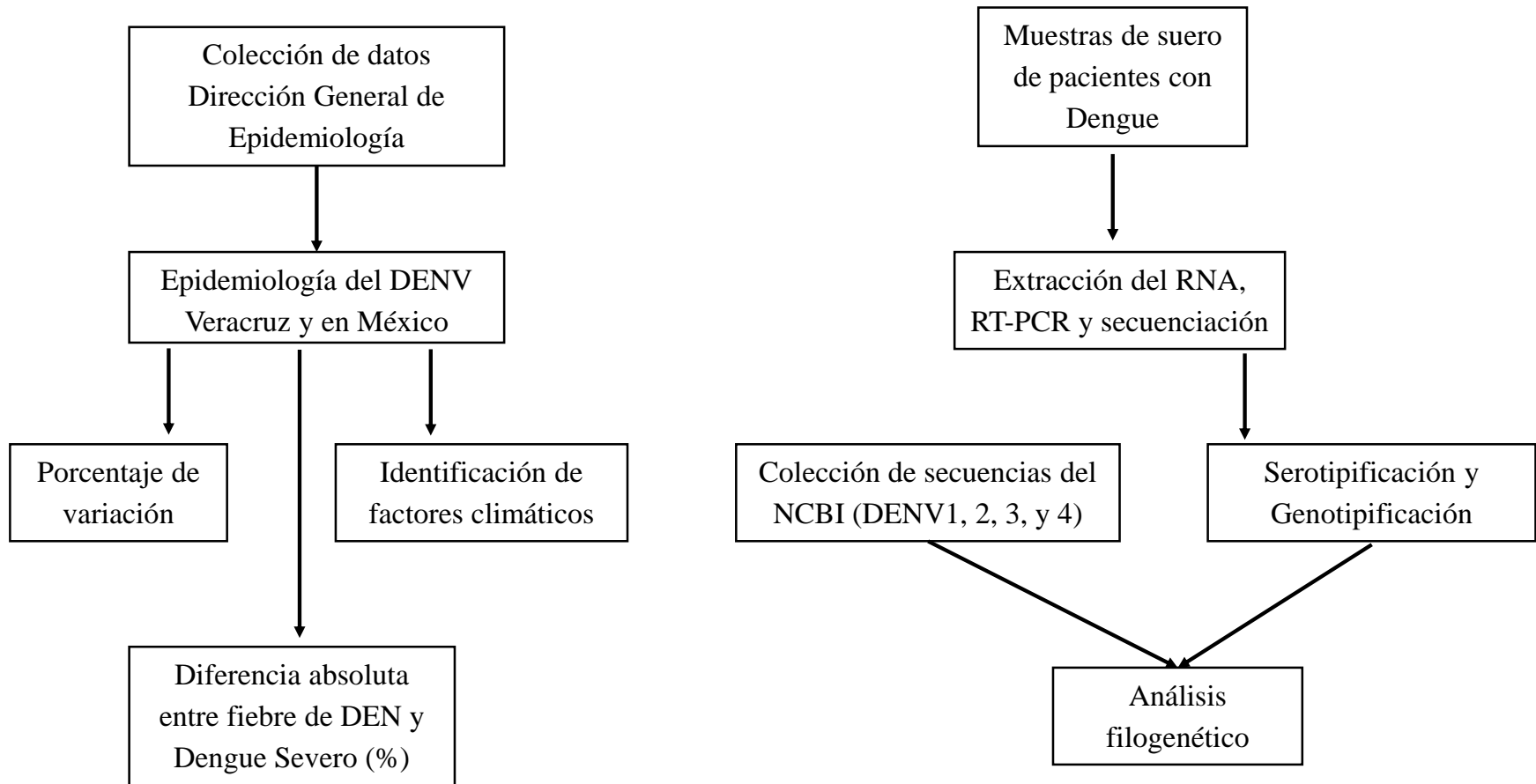
- Analizar la epidemiología del dengue en México y Veracruz de 1990 al 2022.
- Identificar los cambios climáticos que pudieron haber favorecido el brote epidémico del 2009.
- Identificar los serotipos y genotipos presentes en el brote epidémico del 2009.
- Realizar el análisis filogenético de las secuencias del DENV de la epidemia del 2009 para conocer la evolución molecular del virus del dengue a través del tiempo.

VI. HIPÓTESIS

H0: La alta proporción de casos de dengue severo en el 2009 en Veracruz fue causada por la virulencia del serotipo, la introducción de algún genotipo y/o por las condiciones climatológicas.

HA: La alta proporción de casos de dengue severo en el 2009 en Veracruz no fue causada por la virulencia del serotipo, la introducción de algún genotipo o por las condiciones climatológicas.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Análisis epidemiológico del DENV en México y el Estado de Veracruz

Se realizó un análisis epidemiológico de los casos totales de dengue, fiebre de dengue y dengue severo en México y el Estado de Veracruz, para lo cual se obtuvieron los datos de la Dirección General de Epidemiología (2022) dependiente de la Secretaría de Salud de México. A partir de los datos obtenidos se construyó una gráfica de la incidencia de dengue en México y el Estado de Veracruz mostrando la proporción de casos de fiebre de dengue y dengue severo.

El porcentaje de variación entre años epidemiológicos en tándem para el Estado de Veracruz y México fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\left[\left[\frac{\text{Valor final}}{\text{Valor inicial}} \right] - 1 \right] \cdot 100$$

Donde:

Valor final = número de casos (de fiebre de dengue o dengue severo) en el año de interés.

Valor inicial = número de casos (de fiebre de dengue o dengue severo) en el año precedente al de interés.

Posteriormente, la diferencia absoluta de porcentaje entre fiebre de dengue y dengue severo fue calculada de la siguiente manera:

$$\left[\frac{\text{Primer valor} - \text{Segundo valor}}{(\text{Primer valor} + \text{Segundo valor}) / 2} \right] \cdot 100$$

Donde:

Primer valor: número de casos de fiebre de dengue

Segundo valor: número de casos de dengue severo

A partir de los resultados obtenidos con los cálculos realizados, se construyeron las gráficas de porcentaje de variación y de diferencias absolutas de porcentaje.

8.2. Identificación de serotipos

8.2.1. Cultivo de células C6/36 de *Aedes albopictus*

Para preparar un litro de medio mínimo esencial (MEM) Eagle (No. Cat. 11090-073 GIBCO) se disolvió un sobre de MEM en 800 ml de agua destilada y se adicionaron 10 ml de solución de aminoácidos no esenciales 100X (concentración final 1X, No. Cat. 11140-076 GIBCO), 100 ml de solución de antibiótico (concentración final de 100 U de penicilina, No. Cat.15140-122 GIBCO), 10 ml de L-glutamina 200 mM (concentración final de 1 mM, No. Cat. 25030-081 GIBCO), 10 ml de solución de vitaminas 100X (concentración final 1X, No. Cat. 11120-052 GIBCO) y 10 ml de HEPES 1M (concentración final de 10 mM). El pH se ajustó a 6.8 con NaOH o HCl. Se agregaron 50 ml de suero fetal bovino y se aforó a 1 L con agua destilada y estéril. Finalmente, el medio se filtró con membranas de 0.22 µm. Para probar la esterilidad del medio, se incubó una alícuota de 5 ml a 37 °C en una botella de cultivo sin células por una semana.

Una vez comprobada la esterilidad del medio, se usó para mantener los cultivos de células C6/36 en botellas utilizando 5 ml de medio y se dejó incubando a 37 °C por una o dos semanas hasta su uso.

8.2.2. Activación y aislamiento de DENV en cultivo de células C6/36 en tubos de cultivo.

A un cultivo semiconfluyente (80-90 % de confluencia) de células C6/36 (de intestino de *Ae. albopictus*), se le despegó la monocapa de células golpeando los costados de la caja. Habiéndose despegado la monocapa se absorbió la suspensión celular y se colocó en tubos de centrifugación (Corning) de 15 ml y se centrifugó a 3,000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla celular obtenida se resuspendió en 2 ml de MEM. Se colocó un 1 ml

de la suspensión celular en cada tubo nuevo de cultivo y se añadieron 2 ml de MEM incubándose a 37 °C hasta observar confluencia.

65 muestras de suero humano infectadas con dengue fueron donadas por el Instituto Mexicano del Seguro Social de Veracruz, dichas muestras fueron almacenadas en congelación a -70°C hasta su uso. Cultivos confluentes fueron usados para incubar 1 ml de suero de paciente diagnosticado con dengue previamente diluido (1/5) con MEM para evitar que las proteínas del complemento contenidas en el suero dañaran al cultivo celular y se incubó a 37 °C por 1 h para que el virus se absorbiera. Pasado el tiempo, el sobrenadante se desechó y se añadieron 3 ml de MEM nuevo, incubándose hasta por 15 días durante los cuáles las células fueron observadas diariamente hasta que el efecto citopático fuera evidente sobre la monocapa celular (sincicios, placas líticas y/o células gigantes), esta etapa se consideró como el pase 1 de la infección. Las células fueron cosechadas golpeando el tubo de cultivo para desprender la monocapa, la suspensión celular se depositó en tubos para centrifugar de 15 ml y se centrifugó a 3,000 rpm durante 2 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 0.5 ml del mismo sobrenadante (considerada como semilla viral) y se almacenó a -70 °C. El sobrenadante restante se almacenó en alícuotas de 1 ml. Para el pase 2 de infección, cultivos de células C6/36 en botellas de 25 cm² se incubaron con 1 ml de sobrenadante del pase 1 durante 1 h a 37 °C siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la primera infección, excepto que ahora se agregaron 5 ml de MEM. Para obtener el tercer pase el procedimiento se repitió nuevamente.

8.2.3. Extracción de RNA.

El RNA se extrajo de la semilla viral o el sobrenadante por el método de TRIZOL LS (No. Cat. 10296-010, Invitrogen). Se incubaron 125 µl de semilla viral (o sobrenadante) con 375 µl de TRIZOL LS (volumen final de 500 µl) durante 15 min a temperatura ambiente. En seguida se añadieron 100 µl de cloroformo mezclando durante 15 s por inversión de los tubos y se incubó por 10 min a temperatura ambiente; se centrifugó a 11500 rpm durante 15 min, la

fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se le añadieron 250 µl de alcohol isopropílico incubando a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 11,500 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla resultante se lavó con 500 µl de etanol al 75 % mezclando con vórtex y se centrifugó esta vez a 9000 rpm 5 min. Se desechó el sobrenadante de etanol y la pastilla se dejó secando por 5-15 min a temperatura ambiente para eliminar completamente el etanol. Finalmente, la pastilla se disolvió en 25 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

8.2.4. Serotipificación.

Para determinar el serotipo de DENV de los aislados obtenidos se llevó a cabo la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa - Reverso Transcriptasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) en dos pasos para obtener primero el cDNA y a partir de este serotipificar cada una de las muestras mediante la amplificación de cada fragmento con el tamaño característico para cada uno de los serotipos como lo describió Seah *et al.* (1995). El cDNA de cada muestra, fue obtenido con el objetivo de que este fuera utilizado en análisis posteriores al de serotipificación. Se utilizó el kit ThermoScript RT-PCR System con la polimerasa Platinum Taq DNA High Fidelity (Invitrogen). Para la retrotranscripción del RNA viral a 9 µl de RNA viral se le agregaron 1 µl de hexámeros y 2 µl de dNTPs 10 mM y se precalentó la mezcla durante 5 min a 65 °C, terminado el tiempo, la mezcla se colocó rápidamente en hielo para desnaturalizar la cadena de RNA y permitir a los hexámeros unirse al RNA viral. Finalmente se añadieron 8 µl de una mezcla maestra que contenía 4 µl de buffer RT 5X, 1 µl de RNasaOUT, 1 µl de ThermoScript RT, 1 µl de 0.1 M de DTT y 1 µl de H₂O DEPC. Las condiciones para la RT fueron 25 °C 10 min, 50 °C 80 min, 85 °C 5 min y 4 °C a tiempo infinito.

Para serotipificar al virus mediante PCR, se tomaron 0.5 µl de cDNA a los cuales se les añadieron 12 µl de una mezcla maestra que contenía 1.25 µl de buffer 10X, 0.05 µl de enzima Platinum Taq High Fidelity (1 U/ µl), 0.25 µl de dNTPs, 8 µl de H₂O DEPC, 0.25 µl de oligonucleótido DV1 y 0.25 µl de alguno

de los cuatro oligonucleótidos específicos de serotipo presentados en el Tabla 2, de manera que se realizaron cuatro reacciones diferentes para serotipificar. Asimismo, cada reacción individual se realizó por triplicado para validar el resultado obtenido.

El PCR se programó de acuerdo con Seah *et al.* (1995): Activación de la enzima a 95 °C por 5 min; seguido de 10 ciclos con 94 °C por 30 s de desnaturalización, 50 °C por 1 min de alineamiento y 72 °C por 1 min de extensión; 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s con un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron observados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % con buffer TAE, donde el tamaño de cada banda determinó el serotipo de cada aislado como se observa en el Tabla 3.

TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA SEROTIPIFICACIÓN DE LOS SUEROS INFECTADOS CON DENV.

Primer	Secuencia	Posición	Tamaño Esperado
DV1	GGRACKTCAGGWTCTCC		
DSP1	AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG	5067-5045	169
DSP2	CCGGTGTGCTCRGCTGAT	5279-5960	362
DSP3	TTAGAGRYCTTAAGCGTCTCTT	5174-5052	265
DSP4	CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG	5342-5320	426

8.3. Identificación de los factores climáticos presentes en el año 2009.

Se realizó una investigación bibliográfica en la página del Servicio Meteorológico Nacional, la cual cuenta con los registros de todos los años de los Estados del país de datos climatológicos como las temperaturas, cantidad de lluvia y la presencia de fenómenos naturales de importancia como los huracanes.

8.4. Análisis filogenético de la región C-prM.

8.4.1. Amplificación de la región C-prM.

Para amplificar la región C-prM se tomaron 2 µl del cDNA previamente obtenido y se le añadieron 48 µl de una mezcla maestra conteniendo 5 µl de buffer 10X, 0.25 µl de enzima Platinum Taq High Fidelity (1 U/ µl), 1 µl de dNTPs, 40 µl de H₂O DEPC, 1 µl de oligonucleótido C139(+) y 1 µl del oligo prM767(-) (Tabla 4).

TABLA 4. OLIGONUCLEÓTIDOS QUE SE EMPLEARON PARA AMPLIFICAR Y SECUENCIAR LA REGIÓN C-PRM.

Primer	Secuencia	Posición
C139(+)	CAATATGCTGAAACGCGHG	139
prM789(-)	CCTTCNGMNGACATCC	789

8.4.2. Secuenciación de la región C-prM.

Para la secuenciación del fragmento C-prM se utilizaron los mismos primers empleados en la PCR para los serotipos 2 y 4, mientras que para los serotipos 1 y 3 se utilizaron los primers de Seah et al. (1995), y para la reacción de secuenciación se utilizó el kit BigDye.

8.5. Análisis filogenético

Una vez obtenidas las secuenciaciones del fragmento C-prM de las muestras de DENV2 y DENV4, así como del fragmento de Seah de los serotipos 1 y 3, se realizaron los alineamientos con el programa Bioedit y los árboles filogenéticos fueron elaborados con MEGA7 y a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) (Domínguez-de-la-Cruz *et al.*, 2020).

IX. RESULTADOS

9.1. Análisis epidemiológico del DENV en México y Veracruz en el periodo 1990-2022.

De acuerdo con los datos colectados y analizados a partir de la Dirección General de Epidemiología (2022), un total de cinco brotes epidémicos han superado la barrera de los 50,000 casos totales de dengue, siendo estos los años 1997, 2007, 2009, 2012 y 2013. Para Veracruz, el 2009 fue el brote más fuerte de dengue en toda su historia, sin embargo, es el tercer año con más casos de dengue severo solo detrás de los años 2012 y 2013. Asimismo, la proporción de casos de dengue severo fue mayor comparado con los casos de dengue no severo en los brotes del 2012 y 2013 (Fig. 28 y Tabla 5). Como se observa en la Fig. 28, en México, incluyendo el Estado de Veracruz, los casos de dengue presentan fluctuaciones, donde se observa el incremento del número de casos que origina un pico de la enfermedad cada 3-5 años, después de lo cual la cantidad de casos disminuye.

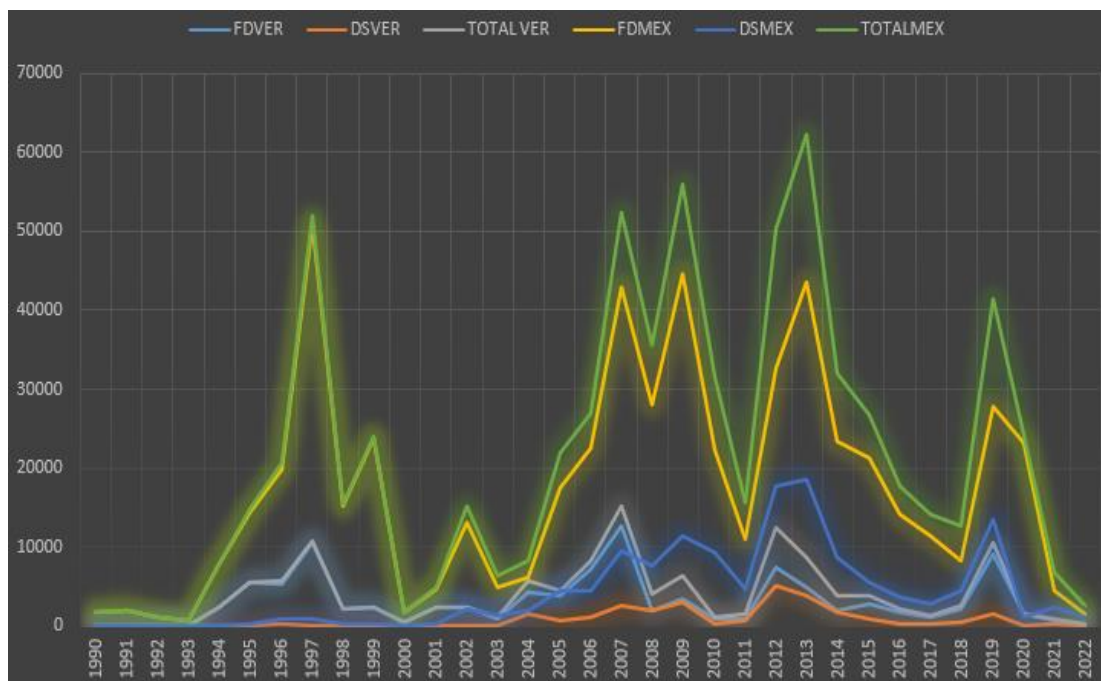


FIGURA 28. CASOS DE DENGUE EN MÉXICO Y EL ESTADO DE VERACRUZ.

CINCO BROTES EPIDÉMICOS HAN SUPERADO LOS 50000 CASOS TOTALES DE DENGUE, SIENDO ESTOS LOS DE 1997, 2007, 2009, 2012 Y 2013; COMO SE PUEDE OBSERVAR, EL AÑO 2009 SIGNIFICÓ EL SEGUNDO BROTE CON MÁS CASOS TOTALES DE DENGUE PARA MÉXICO Y EL SÉPTIMO PARA EL ESTADO DE VERACRUZ, AUNQUE FUE EL TERCERO EN CASOS DE DENGUE SEVERO, SOLO SUPERADOS POR LOS DE 2012 Y 2013. FD: CASOS DE FIEBRE DE DENGUE, DS: CASOS DE DENGUE SEVERO, TOTAL: CASOS TOTALES DE DENGUE, VER: VERACRUZ, MEX, MÉXICO.

Tabla 5. Casos de fiebre de dengue (FD), dengue severo (DS) y totales para México y el Estado de Veracruz en el periodo de 1990-2022. FD: casos de fiebre de dengue, DS: casos de dengue severo, TOTAL: casos totales de dengue.

AÑO	Veracruz			México		
	FD	DS	TOTAL	FD	DS	TOTAL
1990	160	0	160	1663	6	1669
1991	143	0	143	1931	1	1932
1992	32	0	32	1102	0	1102
1993	166	0	166	791	0	791
1994	2462	0	2462	7868	0	7868
1995	5503	79	5582	14396	355	14751
1996	5297	358	5655	19835	884	20719
1997	10563	155	10718	51021	954	51975
1998	2147	28	2175	15181	225	15406
1999	2331	10	2341	23725	220	23945
2000	568	7	575	1706	50	1756
2001	2344	14	2358	4643	312	4955
2002	2357	98	2455	13131	2159	15290
2003	988	95	1083	5018	1419	6437
2004	4250	1570	5820	6243	1959	8202
2005	3901	636	4537	17487	4418	21905
2006	7265	1066	8331	22566	4426	26992
2007	12608	2645	15253	42936	9433	52369
2008	2066	2051	4117	27964	7560	35524
2009	3412	2978	6390	44565	11396	55961
2010	867	302	1169	22352	9336	31688
2011	996	651	1647	10970	4608	15578
2012	7531	5041	12572	32662	17706	50368
2013	4941	3858	8799	43663	18667	62330
2014	2060	1866	3926	23374	8647	32021
2015	2884	876	3760	21201	5464	26665
2016	1833	391	2224	14112	3683	17795
2017	1031	324	1355	11334	2794	14128
2018	2239	467	2706	8229	4477	12706
2019	9195	1453	10648	27884	13621	41505
2020	1485	40	1525	23255	1058	24313
2021	992	34	1026	6446	300	6746
2022	1075	25	1100	7399	240	7639

A partir de los datos obtenidos de la DGE, se estimó la incidencia de dengue por cada 100,000 habitantes para México y el Estado de Veracruz. En la Tabla 6 y la Fig. 29 se puede observar que la incidencia de casos totales de dengue, fiebre de dengue y dengue severo, es mayor en el Estado de Veracruz comparada con la incidencia para México. En el periodo comprendido entre 1990 y 2019, solamente en los años 1990, 1991, 1992 y 2010 la incidencia fue mayor para el país, mientras que en el resto de los años analizados fue mayor para el Estado de Veracruz, llegando a ser hasta 4 veces más alta como en los años 2007 y 2012. Con respecto al año 2009, la incidencia fue de 1.5 veces mayor para Veracruz con respecto a la de México.

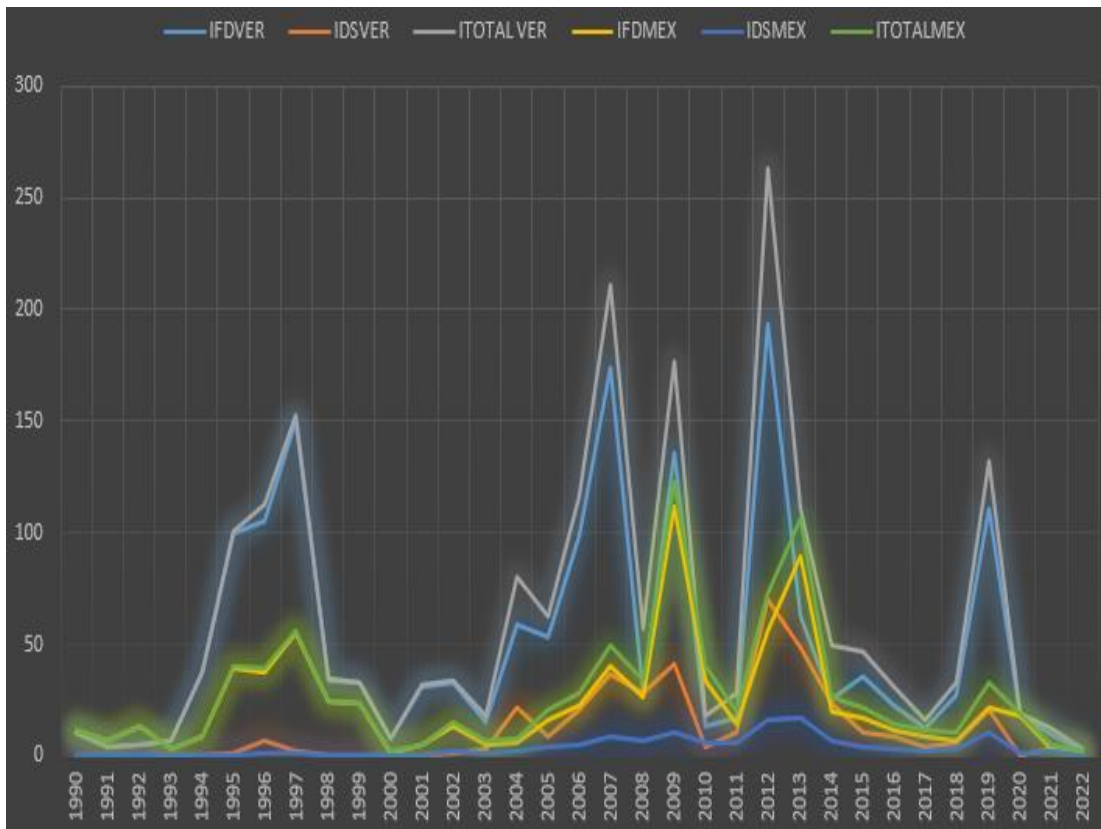


FIGURA 29. INCIDENCIA DE DENGUE Y DENGUE SEVERO EN EL ESTADO DE VERACRUZ Y MÉXICO. SE PUEDE OBSERVAR CLARAMENTE QUE LA INCIDENCIA DE DENGUE Y DENGUE SEVERO EN VERACRUZ ES MAYOR QUE LA DE MÉXICO EN CASI TODOS LOS AÑOS EXCEPTO EN 1990, 1991, 1992, 2010 Y 2020.

Tabla 6. Incidencia de casos totales de dengue, fiebre de dengue y dengue severo para México y el Estado de Veracruz en el periodo 1990-2022. IFD: incidencia de fiebre de dengue, IDS: incidencia de dengue severo, ITOTAL: incidencia total de dengue.

AÑO	Veracruz			México		
	IFD	IDS	ITOTAL	IFD	IDS	ITOTAL
1990	10.71	0	10.71	11.09	0	11.09
1991	4.43	0	4.43	6.72	0	6.72
1992	4.86	0	4.86	13.74	0	13.74
1993	6.87	0	6.87	3.28	0	3.28
1994	37.44	0.07	37.51	8.95	0.03	8.98
1995	99.68	1.14	100.82	39.33	0.59	39.92
1996	105.22	7.27	112.49	37.62	1.56	39.18
1997	150.2	2.2	152.4	55.48	1.03	56.51
1998	33.66	0.6	34.26	24.17	0.39	24.56
1999	32.7	0.2	32.9	23.4	0.2	23.6
2000	8.02	0.11	8.13	1.72	0.07	1.79
2001	31.35	0.2	31.55	4.6	0.31	4.91
2002	32.71	1.36	34.07	12.95	2.11	15.06
2003	14.95	3.05	18	5.01	1.7	6.71
2004	58.42	21.58	80	5.93	1.86	7.79
2005	53.47	8.72	62.19	16.43	4.15	20.58
2006	98.57	21.13	116.7	22.94	4.81	27.75
2007	174.09	36.52	210.61	40.59	8.92	49.51
2008	28.49	28.37	56.86	26.26	7.11	33.37
2009	136.08	40.91	176.99	112.18	10.6	122.78
2010	13.76	4.4	18.16	33.89	6.18	40.07
2011	17.2	11.04	28.24	14.12	5.88	20
2012	193.15	69.82	262.97	56.37	16.01	72.38
2013	62.47	48.78	111.25	89.51	16.74	106.25
2014	25.8	23.37	49.17	19.51	7.22	26.73
2015	35.84	10.89	46.73	17.52	4.52	22.04
2016	22.61	8.64	31.25	11.54	3.1	14.64
2017	12.63	3.96	16.59	9.18	2.26	11.44
2018	27.24	5.69	32.93	6.6	3.59	10.19
2019	111.12	20.63	131.75	22.14	10.82	32.96
2020	17.95	0.56	18.86	18.46	0.84	19.31
2021	9.25	3	12.25	3.47	1.79	5.26
2022	2	1.15	3.15	1.26	0.82	2.08

Se determinó el porcentaje de variación en tándem de fiebre de dengue y dengue severo para México y Veracruz. El porcentaje de variación es una medida que muestra la proporción en la cual la cantidad de casos aumenta o disminuye entre un año de interés en particular y el año que le precede, en el presente estudio se estimó el porcentaje de variación en tándem para la fiebre de dengue y para el dengue severo. Como se observa en la figura 30, el mayor incremento en cuanto a dengue severo se registró en 2001-2002, 2003-2004, 2008-2009, 2011-2012 y 2018-2019 para el Estado de Veracruz; mientras que para México fue en 2000-2001, 2001-2002 y 2011-2012.

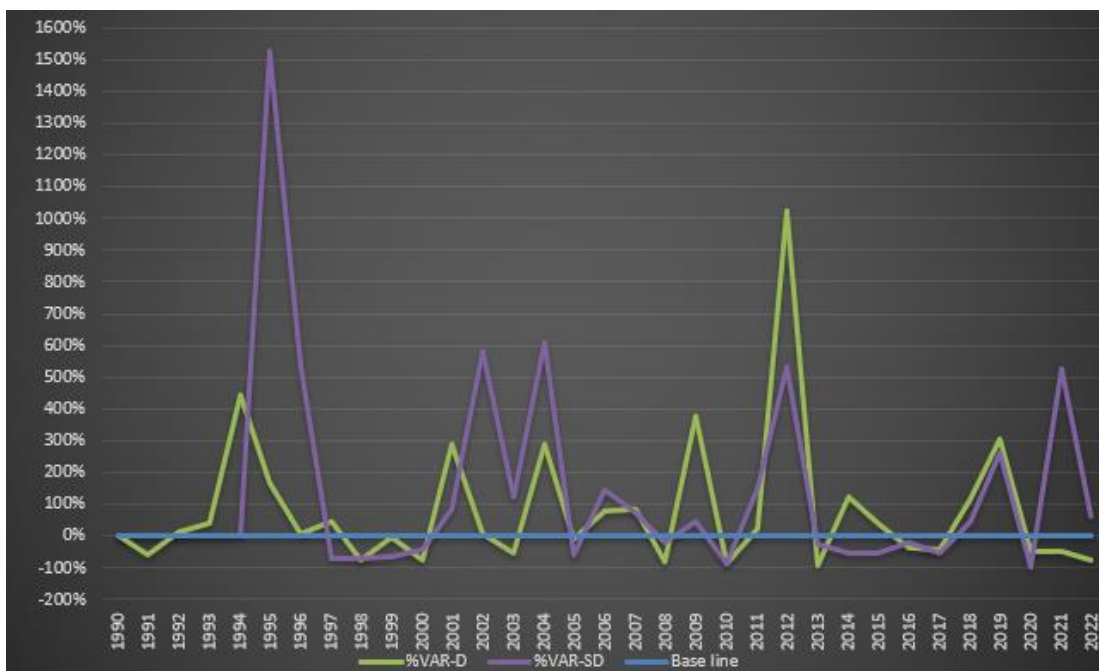


FIGURA 30. PORCENTAJE DE VARIACIÓN EN TÁNDEM DE LA FIEBRE DE DENGUE (D) Y EL DENGUE SEVERO (SD).

SE OBSERVA UN GRAN INCREMENTO EN EL DENGUE SEVERO EN VERACRUZ ENTRE LOS AÑOS 2001-2002, 2003-2004, 2008-2009, 2011-2012 Y 2018-2019.

Posteriormente se estimó la diferencia porcentual absoluta, que es una medida que compara un valor de interés contra otro, en este caso, se compararon los valores de dengue severo contra los de fiebre de dengue de cada año en el periodo de 1990-2019. Dada la fórmula, un valor de 200 significa que en ese año solamente se detectaron casos de fiebre de dengue, mientras que si se

obtiene un valor de 0 significaría que los casos de dengue severo serían iguales a la cantidad de casos de fiebre de dengue.

La gráfica de la Fig. 31 muestra que la diferencia de porcentaje se mantiene muy similar de 1990 al 2000 tanto para México como Veracruz, predominando los casos de fiebre de dengue. En el 2000-2001 inició un incremento significativo de dengue severo en México, que para Veracruz fue en 2003-2004. A partir de estos años la diferencia absoluta de porcentaje muestra que el dengue severo aumentó con respecto a la fiebre de dengue hasta el 2012 para México y 2014 para Veracruz. En los años 2008, 2009 y 2014 hubo una proporción de casi 1:1 entre el dengue severo y la fiebre de dengue en Veracruz, lo cual contrastó fuertemente con lo observado para México. En 2004-2007, 2011-2012 y 2015-2017, la diferencia de porcentaje de fiebre de dengue con respecto al dengue severo fue muy similar entre Veracruz y México.

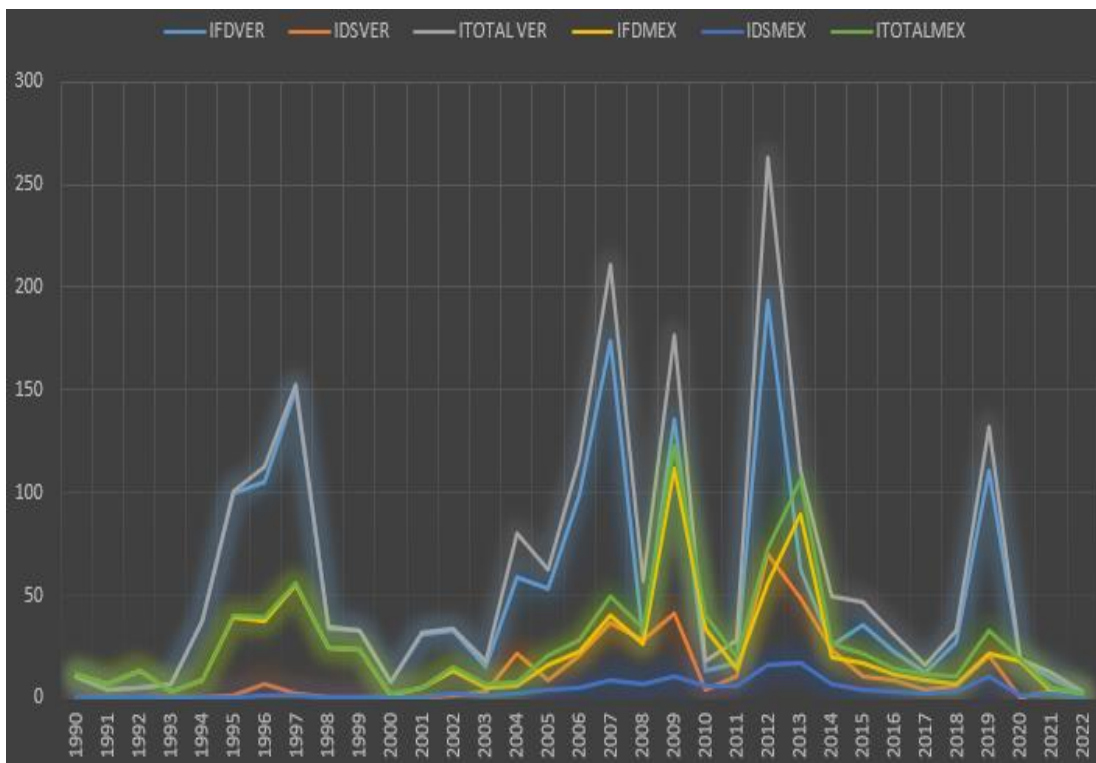


FIGURA 31. GRÁFICA DE LA DIFERENCIA ABSOLUTA DE PORCENTAJES. VALOR IGUAL O CERCANO A 200 IMPLICA QUE SOLO HUBO CASOS DE FIEBRE DE DENGUE O MUY POCOS DE DENGUE SEVERO, MIENTRAS QUE VALORES CERCANOS A 0 SIGNIFICAN QUE HAY UNA GRAN PROPORCIÓN DE DENGUE SEVERO. SE OBSERVA QUE, EN LOS AÑOS 2008, 2009 Y 2014 LA PROPORCIÓN DE DENGUE SEVERO CON RESPECTO A FIEBRE DE DENGUE EN VERACRUZ FUE DE CASI 1:1.

9.2. Frecuencia de serotipos

Un total de 65 muestras provenientes del Instituto Mexicano del Seguro Social del Estado de Veracruz fueron analizadas. EL RNA extraído fue utilizado primero para serotipificar las muestras por el método de Seah et al. (1995). Del total de muestras, 31 fueron de dengue severo; en cuanto a los serotipos, el 67.7 % (44) de las muestras correspondió al DENV-2, 7.7 % (5) al DENV-3, 7.7 % (5) al DENV-4 y 4.6 (3) % al DENV-1, mientras que el porcentaje de dobles infecciones fue de 12.3 % (8), siendo estas coinfecciones con DENV-2 en combinación con DENV-1, DENV-3 y DENV-4 (Figs. 32 y 33).

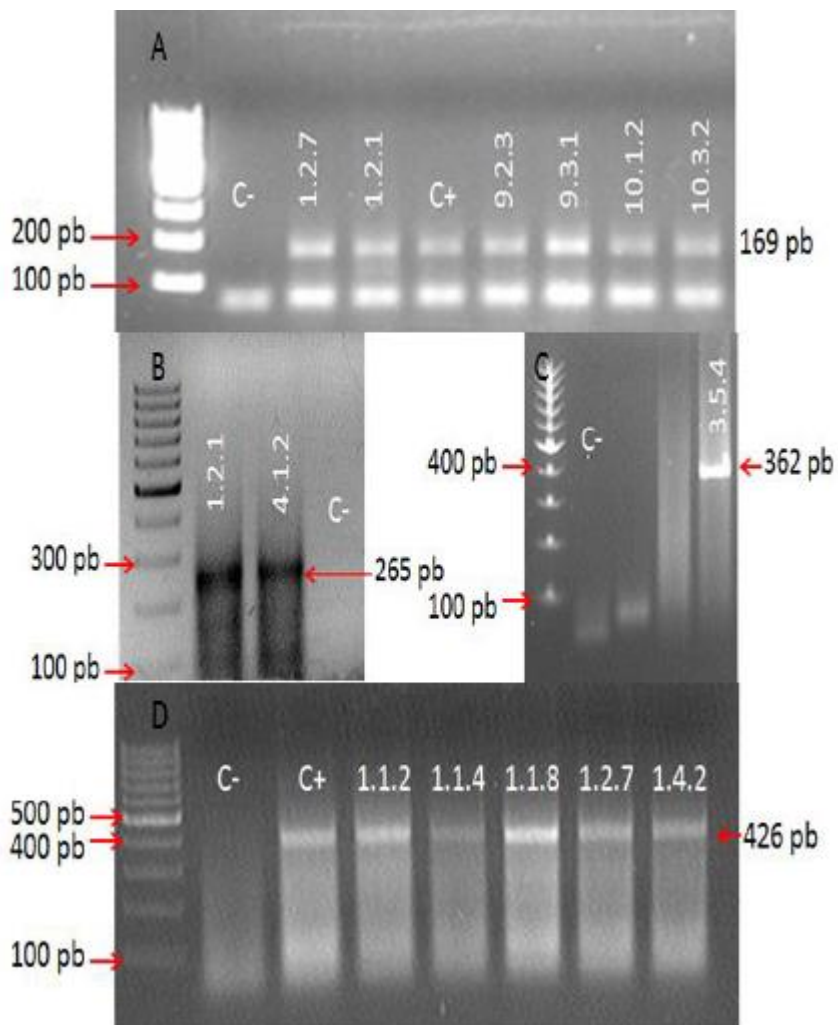


FIGURA 32. SEROTIFICACIÓN DE SUEROS INFECTADOS CON EL VIRUS DEL DENGUE. A) MUESTRAS CON SEROTIPO 1, B) MUESTRAS CON SEROTIPO 3, C) MUESTRA CON SEROTIPO 2 Y D) MUESTRAS CON SEROTIPO 4.

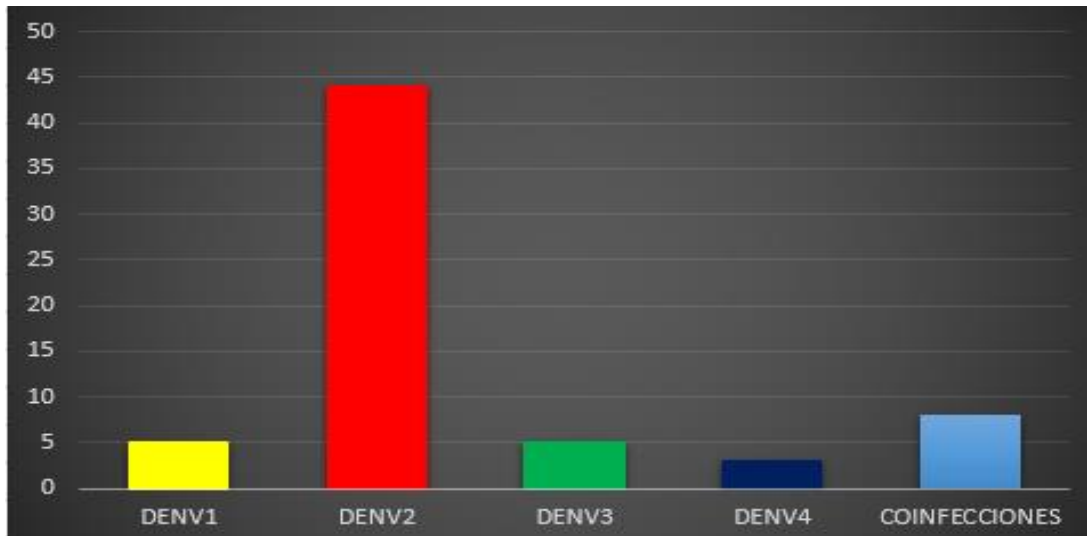


FIGURA 33. FRECUENCIA DE LOS SEROTIPOS OBTENIDOS POR PCR DE PUNTO FINAL CON LOS PRIMERS DE SEAH ET AL. (1995).

LA MAYOR FRECUENCIA OBSERVADA FUE DE DENV2, SEGUIDA POR DENV1, DENV3 Y DENV4. ASIMISMO, UN TOTAL DE 8 COINFECCIONES FUERON OBSERVADAS, EN LAS CUALES EL DENV2 SE PRESENTÓ EN TODAS ELLAS EN COMBINACIÓN CON DENV1, DENV3 Y DENV4.

9.3. Análisis filogenético

Un total de 16 secuencias del fragmento C-prM (14 de DENV2 y dos de DENV4) y siete secuencias de una porción de la región NS3 (cinco de DENV1 y dos de DENV3) fueron analizadas. Los árboles se construyeron utilizando alineamientos de secuencias de Muñoz et al. (2020), con el programa MEGA7 y el modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura Nei de 1993 (TN93) y 1000 repeticiones (bootstrap). Los árboles fueron corroborados mediante análisis bayesianos reportados por Domínguez de la Cruz *et al.* (2020).

Un total de 14 secuencias de DENV2 de 384 pb fueron obtenidas. Tres secuencias correspondieron al genotipo Asiático Americano, las cuales se encuentran cercanamente relacionadas con secuencias de Oaxaca de 2005 y de Veracruz del 2006. Asimismo, se encuentran cercanamente relacionadas con secuencias caribeñas de Cuba, Martinica y República Dominicana. Un total de 11 secuencias de DENV2 se agruparon dentro del clado del genotipo Asiático II, siendo las secuencias de Colombia, Tailandia y China las más cercanas filogenéticamente a las de Veracruz del presente estudio (Fig. 34). Las tres secuencias del genotipo Asiático Americano correspondieron a sueros

de pacientes con fiebre de dengue; de las 11 secuencias agrupadas en el genotipo Asiático II, siete correspondieron a dengue severo y cuatro a fiebre de dengue.

En el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) se encontraron secuencias mexicanas del genotipo Asiático II de DENV2 reportadas para Guerrero. Estas secuencias corresponden al fragmento C-prM, sin embargo, tienen un tamaño de 134 pb, se elaboró un árbol filogenético donde se incluyeron estas secuencias. El resultado corroboró que algunas de las secuencias de Veracruz del 2009 son genotipo Asiático II y están relacionadas con las secuencias de China, Colombia y Tailandia, sin embargo, en este clado también se ubicaron las secuencias de Guerrero (Fig. 35).

La figura 36 muestra el árbol filogenético de las dos muestras de DENV4 donde se usaron secuencias de 567 pb. Ambas secuencias se agruparon con las de Filipinas de 1956 y China de 1990 y 2000 que pertenecen al genotipo I del DENV4, hasta el momento no se han reportado secuencias de DENV4 con este genotipo en el NCBI para México, lo que nos indica la introducción de este genotipo a nuestro país. El DENV4 genotipo I se ha reportado únicamente en Brasil. Dos secuencias de Amazonas, Brasil de 365 pb reportadas como genotipo I de DENV4 en el NCBI se incluyeron en un segundo árbol filogenético de DENV4 con las secuencias utilizadas en el primer árbol recortadas al tamaño de las secuencias brasileñas. Como se puede observar en la figura 37, las secuencias de Veracruz del 2009 siguieron agrupando con las secuencias de Filipinas de 1956, pero las secuencias de Brasil del 2005 también se relacionaron con las de Veracruz y Filipinas.

El árbol filogenético para DENV1 se muestra en la figura 38, todas las secuencias se agruparon dentro del genotipo V junto con otras secuencias de países americanos y asiáticos, pero están más cercanamente relacionadas con aquellas de Puerto Rico y Brasil. Las dos secuencias de DENV3 obtenidas pertenecen al genotipo III (Fig. 39) agrupándose con secuencias asiáticas y americanas, con las secuencias de Oaxaca del brote epidémico del 2005.

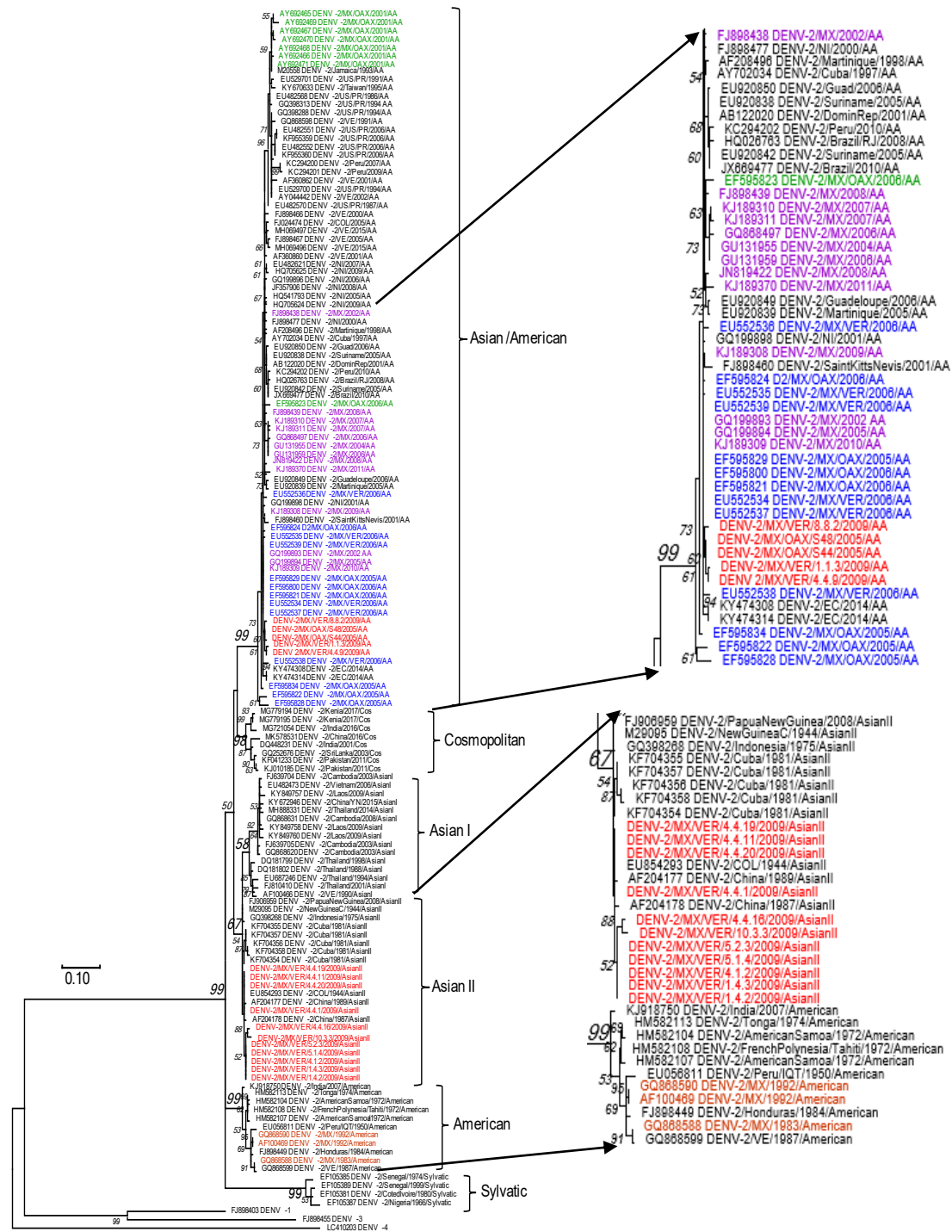


FIGURA 34. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE DENV2 DE 384 PB.
EN VERDE, AZUL Y MORADO SE PRESENTAN MUESTRAS DE MÉXICO DE OTROS ESTUDIOS, EN ROJO LAS MUESTRAS DEL PRESENTE ESTUDIO. TRES SECUENCIAS AGRUPARON DENTRO DEL GENOTIPO ASIÁTICO AMERICANO, MIENTRAS QUE 11 CORRESPONDEN AL GENOTIPO ASIÁTICO II, CERCANAMENTE RELACIONADAS A SECUENCIAS DE CHINA Y COLOMBIA.

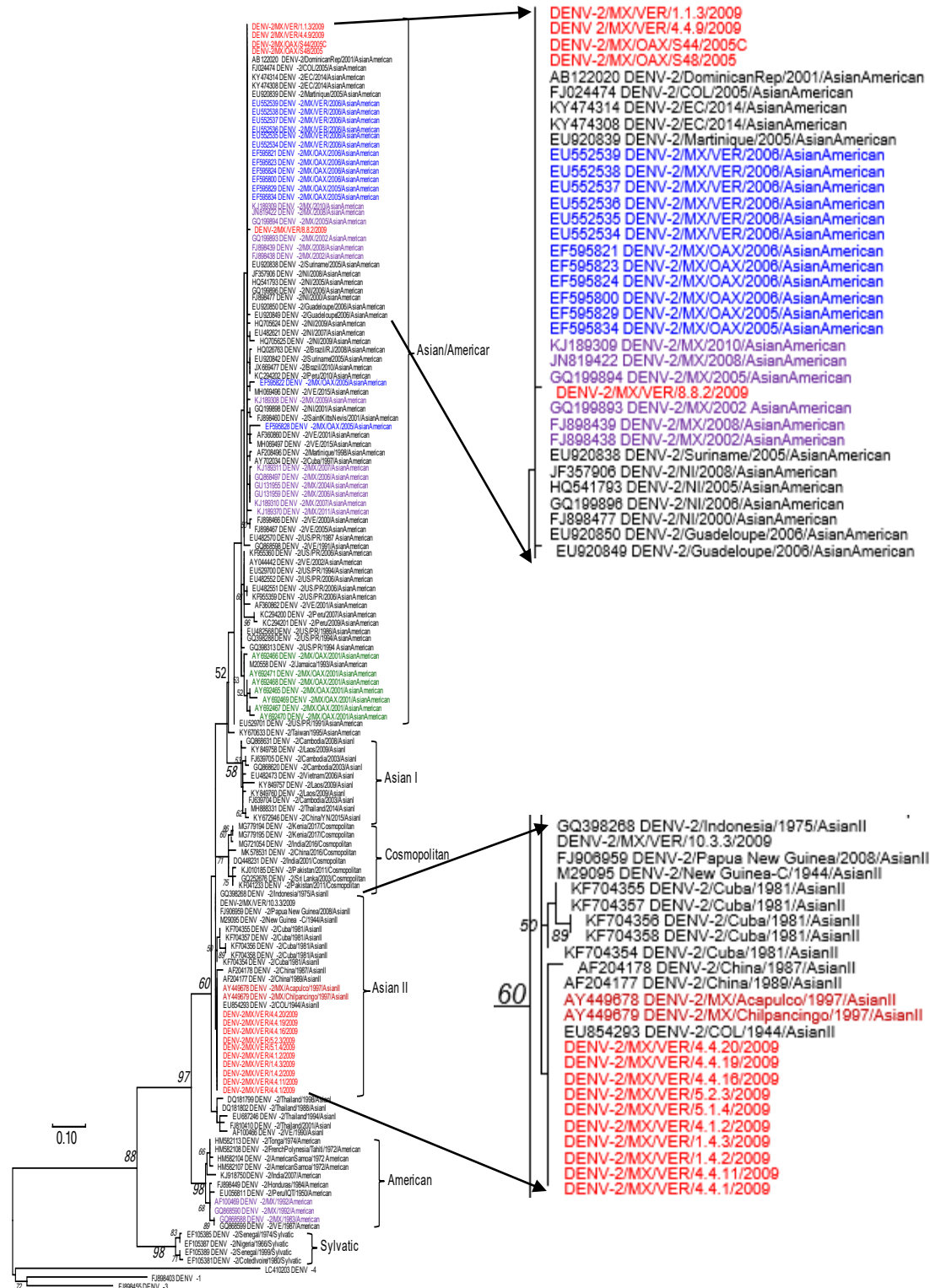


FIGURA 35. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE DENV2 CON SECUENCIAS RECORADAS A 142 PB. LAS SECUENCIAS DE DENV2 FUERON ALIENADAS Y RECORADAS CON LAS SECUENCIAS DE GUERRERO DE 142 PB DE 1997. NUEVAMENTE 11 SECUENCIAS AGRUPARON DENTRO DEL GENOTIPO ASIÁTICO II Y SE RELACIONARON CON SECUENCIAS DE CHINA Y COLOMBIA, LAS SECUENCIAS DE GUERRERO TAMBIÉN AGRUPARON DENTRO DEL MISMO CLADO.

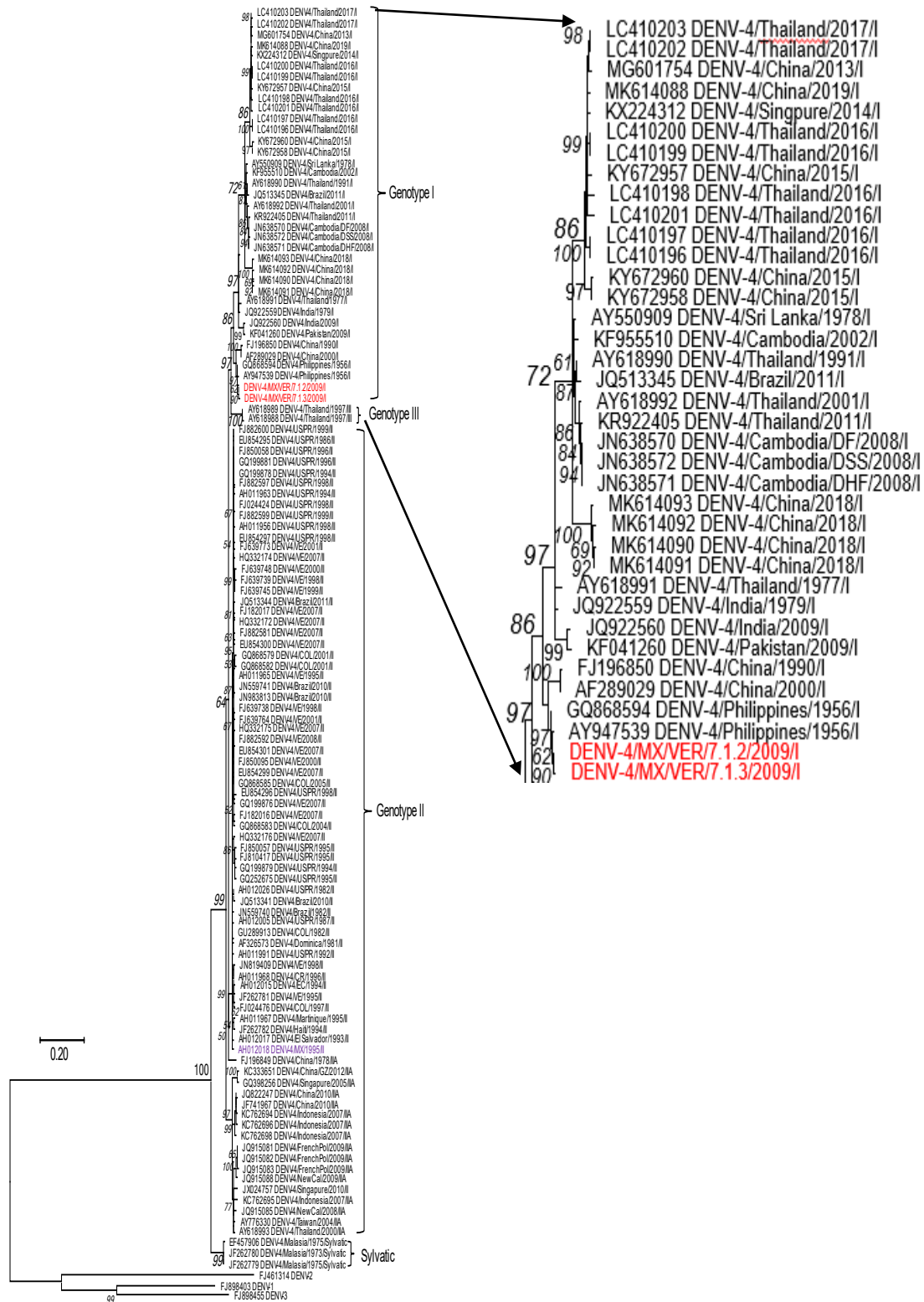


FIGURA 36. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE DENV4 DE 567 PB. LAS DOS SECUENCIAS DE DENV4 AGRUPARON EN EL GENOTIPO I EN LA MISMA RAMA QUE LAS SECUENCIAS DE FILIPINAS DE 1956 Y CHINA DE 1990 Y 2000.

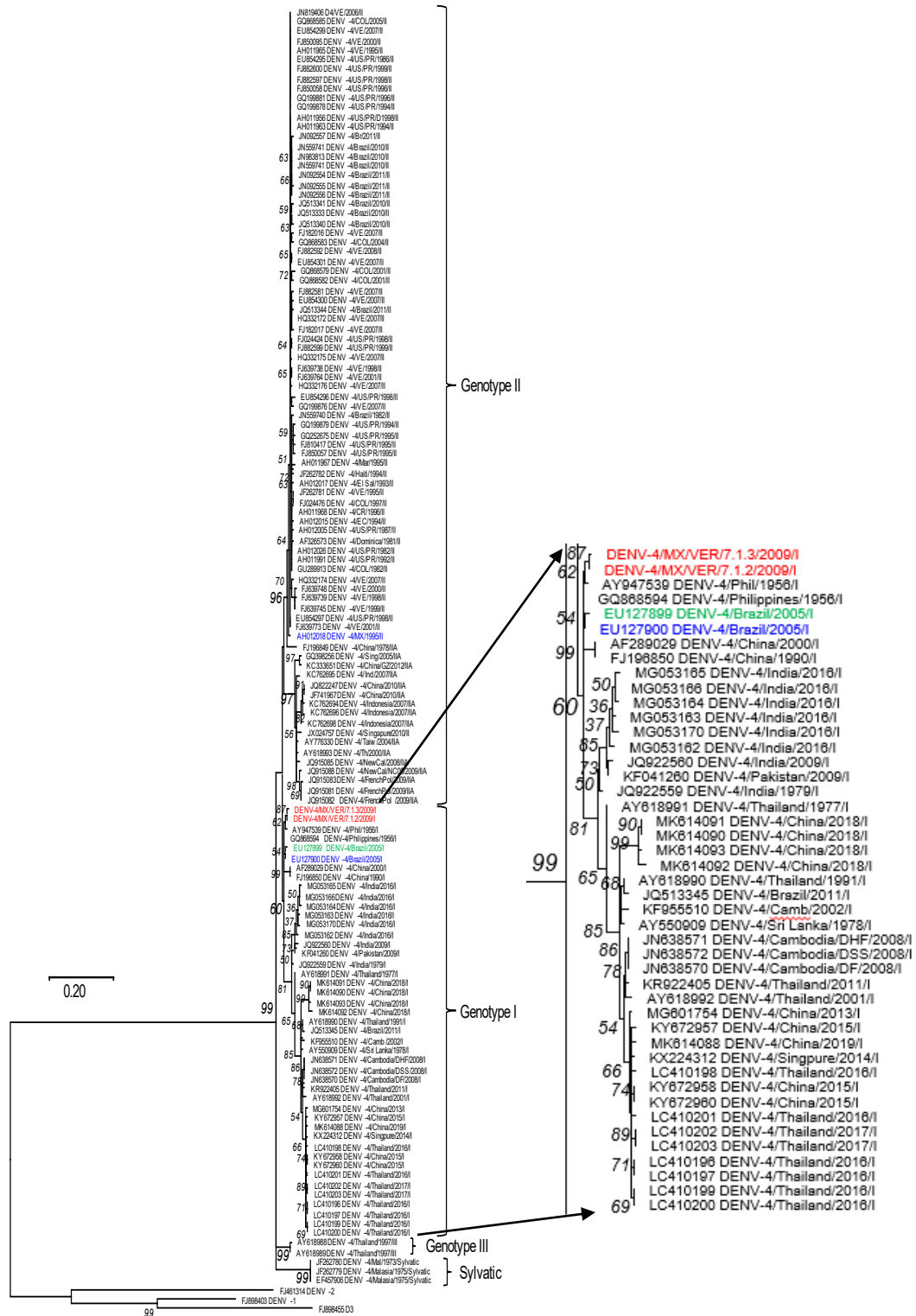


FIGURA 37. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE DENV4 DE 365 PB. LAS SECUENCIAS DE DENV4 NUEVAMENTE AGRUPARON DENTRO DEL GENOTIPO I SIENDO FILOGENÉTICAMENTE CERCANAS A LAS SECUENCIAS DE FILIPINAS DE 1956 Y DE CHINA DE 1990 Y 2000, SE OBSERVA ADEMÁS QUE LAS SECUENCIAS DE BRASIL DEL 2005 TAMBIÉN ESTÁN RELACIONADAS CON LAS DE VERACRUZ.

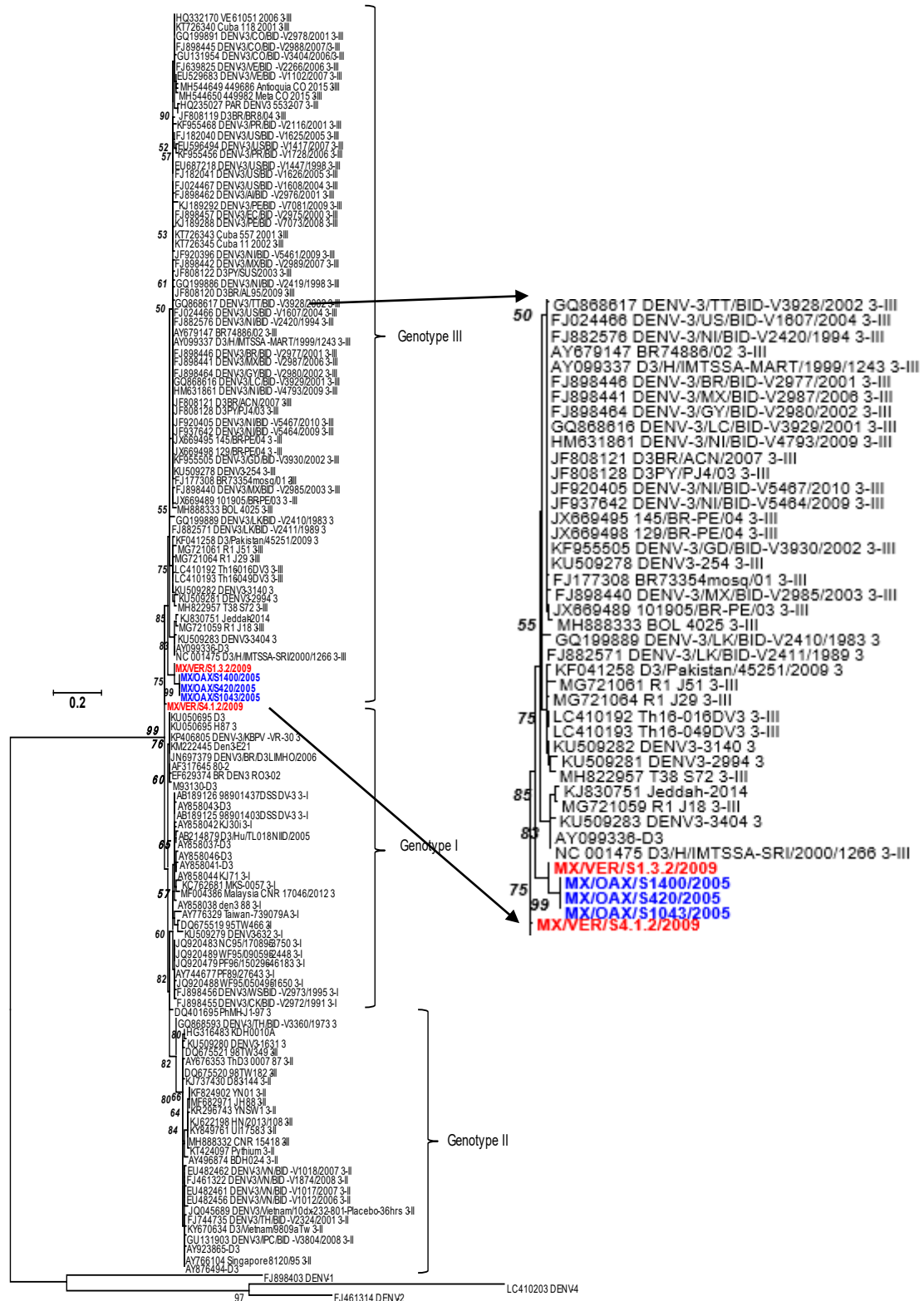


FIGURA 39. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE DENV3. LAS DOS SECUENCIAS AGRUPARON DENTRO DEL GENOTIPO III FORMANDO UN CLADO CON LAS SECUENCIAS DE OAXACA DEL 2005.

X. DISCUSIÓN

México es un país donde el dengue es endémico, ya que los cuatro serotipos se encuentran circulando en su territorio. Veracruz se ha caracterizado por ser uno de los estados con mayor cantidad de casos anuales de dengue, de acuerdo con los datos de la DGE (2020), siempre se encuentra entre los primeros cinco lugares cada año.

Se ha observado que los brotes de dengue presentan periodos de fluctuaciones en los cuales se llega a un pico de cantidad de casos de infección y luego esa cantidad disminuye por otro periodo de tiempo para después volver a subir hasta otro pico de casos. Lo anterior ha sido estudiado y observado en varios países alrededor del mundo. O'Driscoll et al. (2020) estudiaron la variabilidad espacio temporal del dengue en Jakarta, Indonesia; en su estudio, que abarcó el periodo del 2008-2017, se observó que aproximadamente cada tres años se dan picos en los casos de dengue, que luego bajan drásticamente y para luego volver a subir. En Brasil, el país con mayor cantidad de casos anuales de dengue en el continente americano, Andrioli et al. (2020) también realizaron un estudio espacio temporal en el cual se observan altibajos en la cantidad de casos de dengue. De acuerdo con la gráfica de la Fig. 23, estas fluctuaciones se presentan en México cada 3-5 años.

Como ya se mencionó, el 2009 ha sido uno de los años con mayor cantidad de casos de dengue, para el caso del Estado de Veracruz, se presentó la particularidad de que los casos de dengue y dengue severo se presentaron en un radio de casi 1:1. Las fluctuaciones en los casos de dengue y su severidad dependen de factores tales como la virulencia del DENV, factores genéticos del hospedero y los factores ambientales. En el 2009 hubo una gran cantidad de huracanes con lluvias que dieron origen a inundaciones creando ambientes ideales para la oviposición de los mosquitos; de acuerdo con datos del Servicio Meteorológico Nacional (Hernandez-Unzón, 2009), México fue azotado por un total de 7 ciclones tropicales, 49 frentes fríos, 38 ondas tropicales y 3 tormentas invernales.

El DENV2 ha sido el serotipo dominante en México y desde luego en Veracruz, después de haber dominado el genotipo americano, actualmente el genotipo dominante en México es el Asiático Americano. El genotipo asiático II de DENV2 solo había sido reportado en México para el Estado de Guerrero en 1997 por Loroño-Pino et al. (2004). Después de llevar a cabo el análisis filogenético, se observó que el 84 % de las secuencias de Veracruz del 2009 corresponden al genotipo asiático II mientras que solo el 16 % al genotipo Asiático Americano. Asimismo, las secuencias del genotipo asiático II se encuentran filogenéticamente cercanas a las reportadas para Guerrero, pero también con las de Cuba de 1981 (Rodríguez-Roche et al., 2014), por lo cual el origen de la introducción del genotipo asiático II a Veracruz pudo haber sido de Guerrero o de las islas del caribe.

Con respecto al DENV4, en todo el continente americano el único genotipo reportado había sido el II, sin embargo, De Melo et al. (2009) reportaron la introducción del genotipo I en Manaus, Brasil, siendo este el primer reporte en todo el continente del surgimiento de este genotipo en América. La filogenia de DENV4 reveló que las secuencias del presente estudio también se agruparon con secuencias del genotipo I estando cercanamente relacionadas con las de Filipinas de 1956 y de Brasil del 2007. Lo anterior sugiere una posible introducción del genotipo I de DENV4 directamente de Asia o más probablemente de Brasil, por la temporalidad de las secuencias. Este es el primer reporte del surgimiento del genotipo I de DENV4 en Veracruz y en todo México.

Por otro lado, Lazo (2020) habla acerca del potencial de las infecciones de DENV4 por lo cual es importante el resultado obtenido en el presente estudio, ya que, además de que la introducción de genotipos nuevos puede producir el incremento de casos de dengue en general, también potencializa el incremento de casos de dengue severo. Además, Aryati et al. (2020) reportaron que, en su estudio llevado a cabo entre 2019 y 2020 en la ciudad de Jember (Indonesia), el DENV4 fue detectado en mayor proporción y fue considerado como el causante del brote de dengue de aquella ciudad en el

periodo del 2019-2020, por lo cual, el hallazgo del presente trabajo es importante debido a la aparición del nuevo genotipo que podría causar brotes de dengue en otros años.

Con respecto al DENV1 y DENV3, el análisis filogenético mostró que los genotipos presentes fueron el V para DENV1 y genotipo III para DENV3, dichos genotipos han sido reportados en América desde su introducción en la década de 1980 (De Bruycker-Nogueira et al., 2016). En este caso se confirmó la presencia de ambos genotipos en Veracruz tal y como ya se había hecho en estudios previos como los de Cisneros-Solano et al. (2004), Cisneros-Solano et al. (2006) y Gardella-Garcia (2008). Sin embargo, como se puede observar en las Figs. 28 y 29, estos genotipos del 2009 se agrupan en clados diferentes, lo cual evidencia los procesos evolutivos que ha sufrido el DENV. Con los resultados obtenidos, es posible establecer que las pandemias que van surgiendo en el tiempo en regiones donde el dengue es endémico es de suma importancia realizar el diagnóstico correspondiente para diferenciar entre ellas cuando los síntomas son muy similares. Esto fue recientemente establecido por Bicudo et al. (2020) por la llegada de la nueva pandemia de causada por el virus SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad del coronavirus del 2019 (COVID-19, por sus siglas en inglés) ya que ésta está presente en zonas donde el dengue es endémico, por lo cual el uso de técnicas como la PCR facilitan el diagnóstico diferencial de estas enfermedades, considerando que, las sintomatologías son muy similares, lo que dificulta diagnosticar estas enfermedades en los países donde ambos virus están co-circulando.

Finalmente, es importante resaltar que aquí se reporta la introducción de dos nuevos genotipos en el Estado de Veracruz, el genotipo asiático II de DENV2 el cual solo se había reportado en Guerrero en 1997 y el genotipo I de DENV4, el cual es nuevo no solo en Veracruz sino en todo México. Lo anterior es importante si consideramos que dentro de las causas que generan brotes de dengue severo está la introducción de genotipos en lugares que no estaban presentes como también lo mostró el estudio de Susuki *et al.* (2019), en el cual

se observó en Bangladesh un reemplazamiento del genotipo II por el genotipo I de DENV3 así como un reemplazamiento de clados del genotipo Cosmopolita; Phadungsombat et al. (2018) en Tailandia, también reportó un reemplazamiento del genotipo II por el genotipo III de DENV3, así como la co-circulación del genotipo Asiático I con el Cosmopolita, siendo el primero de estos el genotipo dominante hasta antes de ese estudio.

XI. CONCLUSIONES

1. El DENV es endémico en México debido a la presencia de los cuatro serotipos existentes a nivel mundial, aquí se reporta la presencia de los cuatro serotipos para el Estado de Veracruz en el brote epidémico del 2009. Además, se observan picos de la enfermedad aproximadamente cada 3-5 años de acuerdo con lo observado en la gráfica.
2. Los genotipos V de DENV1 y III de DENV3 fueron identificados y corrobora la presencia de estos en México como ha sido desde su introducción en la década de 1980.
3. Para el caso del DENV2, el genotipo dominante en los últimos años había sido el Asiático Americano, el cual se ha asociado a la mayor frecuencia de casos de dengue severo. En este estudio se observó el genotipo Asiático Americano para DENV2, sin embargo, la mayor frecuencia fue del genotipo asiático II, el cual solo había sido reportado para el Estado de Guerrero en 1997, lo que significa que es el primer reporte del genotipo asiático II para el Estado de Veracruz. Debido a la cercanía filogenética con las secuencias de Guerrero y Cuba, el origen de la introducción de este nuevo genotipo pudo ser de cualquiera de esas dos regiones.
4. El único genotipo de DENV4 presente en América hasta el año 2007 era el II, año en que fueron obtenidas muestras cuya secuencia pertenecía al genotipo I en Manaus, Brasil. Hasta la fecha, el genotipo I no se había reportado en ningún otro país del continente americano lo cual incluye a México. En el presente estudio se reporta la introducción del genotipo I de DENV4 en las muestras del brote epidémico de Veracruz del 2009, significando el primer reporte en México. El análisis filogenético mostró que las secuencias obtenidas se encuentran muy relacionadas a las de Filipinas de 1956 y las de Brasil del 2007, por lo que el genotipo I de DENV4 pudo provenir directamente de Asia o de Brasil debido a la globalización de los países.

5. La introducción de los genotipos asiático II de DENV2 y I de DENV4, así como la fuerte intensidad de lluvias que ocurrieron en México en el año 2009, es probable que hayan tenido una fuerte influencia en la gran cantidad de casos de dengue en general y dengue severo para el Estado de Veracruz.
6. Del presente trabajo se publicaron dos trabajos en revistas internacionales indexadas con factor de impacto (ANEXO II).

XII. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2017). Collateral damage during dengue virus infection: Making sense of DNA by Cgas. *Journal of Virology*. 91 (14): e01081-16.

Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Patel, J., Lamothe, F., Fredericks, A. C., Tripathi, S., Zhu, T., Pintado-Silva, J., Webb, L. G., Bernal-Rubio, D., Solovyov, A., Greenbaum, B., Simon, V., Basler, C. F., Mulder, L. C. F., García-Sastre, A., & Fernández-Sesma, A. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nature Microbiology*. 2: 17037.

Ahmad, Z., & Poh, C. L. (2019). The conserved molecular determinants of virulence in dengue virus. *International Journal of Medical Sciences*. 16 (3): 355-365.

Alves-dos Santos, E., & Fink, K. (2018). Animal models for dengue and zika vaccine development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 215-239.

Anasir, M. I., Ramanathan, B., & Poh, C. L. (2020). Structure-based design of antivirals against envelope glycoprotein of dengue virus. *Viruses*. 12: 367.

Andrioli, D. C., Busato, M. A., & Lutinski, J. A. (2020). Spatial and temporal distribution of dengue in Brazil, 1990-2017. *PLoS ONE*. 15 (2): e0228346.

Aryati, A., Wrahatnala, J., Yohan, B., Fanny, M., Hakim, F. K. N., Sunari, E. P., Zuroidah, N., Wardhani, P., Santoso, M. S., Husada, D., Rohman, A., Tarmizi, S. N., Sievers, J. T. O., & Sasmono, R. T. (2020). Dengue virus serotype 4 is responsible for the outbreak of dengue in east Java City of Jember, Indonesia. *Viruses*. 12 (9): 913.

Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., Mal, S., & Ray, U. (2019). Insight into the tropism of dengue virus in humans. *Viruses*. 11: 1136.

Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2021). Current understanding of the pathogenesis of dengue virus infection. *Current Microbiology*. 78: 17-32.

Bicudo, N., Bicudo, E., Duarte-Costa, J., Leite-Porto Castro, J. A., & Barcelos-Barra, G. (2020). Co-infection of SARS-CoV-2 and dengue virus: a clinical challenge. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 24 (5): 452-454.

Bidet, K., & Garcia-Blanco, A. (2018). Flaviviral RNA structures and their role in replication and immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 45-62.

Brady, O. J., & Hay, S. I. (2019). The global expansion of dengue: How *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annual Review of Entomology*. 65: 9.1-9.18.

Bujalowski, P. J., Bujalowski, W., & Choi, K. Y. (2017). Interactions between the dengue virus polymerase NS5 and Stem-Loop A. *Journal of Virology*. 91: e00047-17.

Byk, L. A., & Garmanik, A. V. (2016). Properties and functions of the dengue virus capsid protein. *Annual Review of Virology*. 3 (1): 263-281.

Byk, L. A., Iglesias, N. G., De Maio, F. A., Gebhard, L. G., Rossi, M., & Gamarnik, A. V. (2016). Dengue virus genome uncoating requires ubiquitination. *mBio*. 7 (3): e00804-16.

Castillo, J. A., & Urcuqui-Inchima, S. (2018). Mechanisms of monocyte cell death triggered by dengue virus infection. *Apoptosis*. 23 (11-12): 576-586.

Castillo, J. A., Naranjo, J. S., Rojas, M., Castaño, D., & Velilla, P. A. (2017). Role of monocytes in the pathogenesis of dengue. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 67 (1): 27-40.

Castro, M. C., Wilson, M. E., & Bloom, D. E. (2017). Disease and economic burdens of dengue. *Lancet Infectious Diseases*. 17 (3): e70-e78.

CDC. (2022). El dengue en el mundo. In: <https://www.cdc.gov/dengue/es/areaswithrisk/around-the-world.html>

Cerikan, V., Goellner, S., Neufeldt, C. J., Haselmann, U., Mulder, K., Chatel-Chaix, L., Cortese, M., & Bartenschlager, R. (2020). A non-replicative role of the 3' terminal sequence of the dengue virus genome in membranous replication organelle formation. *Cell Reports*. 32 (1): 107859.

Chen, H. R., Chuang, Y. C., Lin, Y. S., Liu, H. S., Liu, C. C., Perng, G. C., & Yeh, T. M. (2016). Dengue virus nonstructural protein 1 induces vascular leakage through macrophage migration inhibitory factor and autophagy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10 (7): e0004828.

Chen, H. R., Lai, Y.C., & Yeh, T. M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*. 25: 58.

Chen, H. R., Chao, C. H., Liu, C. C., Ho, T. S., Tsai, H. P., Perng, G. C., Lin, Y. S., Wang, J. R., & Yeh, T. M. (2018). Macrophage migration inhibitory factor is critical for dengue NS1-induced endothelial glycocalyx degradation and hyperpermeability. *PLoS Pathogens*. 14 (4): e1007033.

Chen, H. J., Tang, H. J., Lu, C. L., & Chien, C. C. (2020). Warning signs and severe dengue in end stage renal disease dialysis patients. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. doi: 10.1016/j.jmii.2019.08.005.

Cisneros-Solano, A., Moreno-Altamirano, M.M.B., Martínez-Soriano, U., Jimenez-Rojas, F., Díaz-Badillo, A., Muñoz, M.L. (2004). Sero-epidemiological and Virological Investigation of Dengue Infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001. *Dengue Bulletin*.

Cisneros, A., Díaz-Badillo, Á., Cruz-Martínez, G., Tovar, R., Ramírez-Palacios, L.R., Jiménez-Rojas, F., Beaty, B., Black IV, W.C., De Lourdes Muñoz, M., (2006). Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico. *Archives of Virology*. 151, 113–125.

Dai, L., Wang, Q., Qi, J., Shi, Y., Yan, J., & Gao, G. F. (2016). Molecular basis of antibody-mediated neutralization and protection against flavivirus. *IUBMB Life*. 68 (10): 783-791.

De Bruycker-Nogueira, F., Mir, D., Barreto-dos Santos, F., & Bello, G. (2016). Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution*. 45: 454-460.

Dirección General de Epidemiología (2021). Histórico Boletín Epidemiológico. Secretaría de Salud. In: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

Domínguez-de la Cruz, E., Muñoz, M. de L., Hernández-García, E., Pérez-Ramírez, G., David, R. E., Navarrete-Espinoza, J., Díaz-Badillo, A., Moreno-Galeana, M., Brito-Carreón, C. A. (2020). Data set on epidemiology, and genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico. *Data in brief*. 32: 106077.

Dussart, P., Duong, V., Bleakley, K., Fortas, C., Try, P. L., Kim, K. S., Choeung, R., In, S., Andries, A. C., Cantaert, T., Flamand, M., Buchy, P., & Sakuntabhai, A. (2020). Comparison of dengue case classification schemes and evaluation of biological changes in different dengue clinical patterns in a longitudinal follow-up of hospitalized children in Cambodia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 14 (9): e0008603.

El Sahili, A., & Lescar, J. (2017). Dengue virus non-structural protein 5. *Viruses*. 9: 91.

Elong-Ngono, A., & Shresta, S. (2018). Immune response to dengue and zika. *Annual Reviews of Immunology*. 36: 279-308.

Fahimi, H., Mohammadipour, M., Kashani, H. H., Parvini, F., & Sadeghizadeh, M. (2018). Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102: 2977-2996.

Fajardo, T., Sanford, T. J., Mears, H. V., Jasper, A., Storrie, S., Mansur, D. S., & Sweeney, T. R. (2020). The flavivirus polymerase NS5 regulates translation of viral genomic RNA. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkaa242.

Faustino, A. F., Martins, A. S., Karguth, N., Artilheiro, V., Enguita, F. J., Ricardo, J. C., Santos, N. C., & Martins, I. C. (2019). Structural and functional properties of the capsid protein of dengue and related flavivirus. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 3870.

Gabriel, M., Costa-Navarro, G. S., de Borba, L., Rossi, A H., Gamarnik, A V., & Estrada, L. C. (2020). Dengue virus capsid protein dynamics reveals spatially heterogeneous motion in live-infected-cells. *10 (1): 8751*.

Gallichotte, E. N., Baric, R. S., & De Silva, A. M. (2018). The molecular specificity of the human antibody response to dengue virus infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 63-76.

Gallichotte, E. N., Baric, T. J., Nivarthi, U., Delacruz, M. J., Graham, R., Widman, D. G., Yount, B. L., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., de Silva, A. M., & Baric, R. S. (2018). Genetic variation between dengue virus type 4 strains impacts human antibody binding and neutralization. *Cell reports*. 25: 1214-1224.

Gan, E. S., Ting, D. H. R., & Chan, K. R. (2017). The mechanistic role of antibodies to dengue virus in protection and disease pathogenesis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 15 (2): 111-119.

Gardella-Garcia, C.E., Perez-Ramirez, G., Navarrete-Espinosa, J., Cisneros, A., Jimenez-Rojas, F., Ramírez-Palacios, L.R., Rosado-Leon, R., Camacho-Nuez, M., Munoz, M. D. L. (2008). Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. *BMC Microbiology*. 8: 117.

Gebhard, L. G., Iglesias, N. G., Byk, L. A., Filomatori, C. V., De Maio, F. A., & Gamarnik, A. V. (2016). A proline rich N-terminal region of the dengue virus

NS3 is crucial for infectious particle production. *Journal of Virology*. 90 (11): 5451-5461.

Glasner, D. R., Puerta-Guardado, H., Beatty, P. R., & Harris, E. (2018). The god, the bad, and the shocking: the multiple roles of dengue virus nonstructural protein 1 in protection and pathogenesis. *Annual Review of Virology*. 5 (1): 227-253.

Gopala-Reddy, S. B., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: minor proteins, mammoth roles. *Biochemical Pharmacologies*. 154: 54-63

Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews. Diseases Primers*. 2: 16055.

Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: a minireview. *Viruses*. 12: 829.

Halstead, S. B. (2016). Pathogenesis of dengue: Dawn of a new era. *F1000 Research*. doi: 10.12688/f1000research.7024.1.

Halstead, S. B. (2019). Recent advances in understanding dengue. *F1000 Research*. 8: 1279.

He, Z., Zhu, X., Wen, W., Yuan, W., Hu, Y., Chen, J., An, S., Dong, X., Lin, C., Yu, J., Wu, J., Yang, Y., Cai, J., Li, J., & Li, M. (2016). Dengue virus subverts host innate immunity by targeting adaptor protein MAVS. *Journal of Virology*. 90: 7219-7230.

Hernández-Unzón, A. (2009). Resumen de la temporada de ciclones tropicales 2009. Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del Agua. In: <https://smn.conagua.gob.mx/tools/DATA/Ciclones%20Tropicales/Resumenes/2009.pdf>

Hodge, K., Kamkaew, M., Pisitkun, T., & Chimnarok, S. (2019). Flavors of flaviviral RNA structure: towards an integrated view of RNA function from translation through encapsidation. *BioEssays*. 41: 1900003.

Holbrook, M. R. (2017). Historical perspectives on flavivirus research. *Viruses*. 9: 97.

Huang, Y. J. S., Higgs, S., Vanlandingham, D. L. (2019). Emergence and re-emergence of mosquito borne-arboviruses. *Current Opinion in Virology*. 34: 104-109.

Ishak, S. H., Yaacob, L. H., & Ishak, A. (2020). Severe dengue with hemophagocytosis syndrome. *Malaysian Family Physician*. 15 (1): 47-49.

Jans, D. A.; Martin, A. J. (2018). Nucleocytoplasmic trafficking of dengue non-structural protein 5 as a target for antivirals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 199-214.

Jones, R., Kulkarni, M. A., Davidson, T. M. V., & Talbot, B. (2020). Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and Chikungunya vectors. *PLoS ONE*. 15 (2): e0220753.

Kao, Y. T., Lai, M. M. C., & Yu, C. Y. (2018). How dengue virus circumvents innate immunity. *Frontiers in Immunology*. 9: 2860.

Katzelnick, L. C., Coloma, J., & Harris, E. (2017). Dengue: Knowledge gaps, unmet needs and research priorities. *Lancet Infectious Diseases*. (2017). 17 (3): e88-e100.

Khan, R. A., Afroz, S., Minhas, G., Battu, S., & Khan, N. (2019). Dengue virus envelope protein domain III induces pro-inflammatory signature and triggers activation of inflammasome. *Cytokine*. 123: 154780.

Khandia, R., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K., & Chaicumpa, W. (2018). Modulation of Dengue/Zika virus pathogenicity

by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika virus infection. *Frontiers in Immunology*. 9: 597.

Khetarpal, N., & Khanna, I. (2016). Dengue fever: Causes, complications, and vaccine strategies. *Journal of Immunology Research*. doi: 10.1155/2016/6803098.

King, C. A., Wegman, A. D., & Endy, T. P. (2020). Mobilization and activation of the innate immune response to dengue virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 547417.

Kramer, L. D. (2016). Complexity of virus-vector interactions. *Current Opinion in Virology*. 21: 81-86.

Kumar, A., Mayers, S., Welch, J., Taitt, J., Benskin, G. A., & Nielsen, A. L. (2020). The spectrum of disease severity, the burden of hospitalizations and associated risk factors in confirmed dengue among persons of all ages: findings from a population based longitudinal study from Barbados. *Infectious diseases*. doi: 10.1080/23744235.2020.1749723.

Lambrechts, L., & Lequime, S. (2016). Evolutionary dynamics of dengue virus populations within the mosquito vector. *Current Opinion in Virology*. 21: 47-53.

Laveau, A., Simon-Loriere, E., Hafirassou, M. L., Bonnet-Madin, L., Tessier, S., Zamborlini, A., Dupré, A., Seta, N., Schwarts, O., Chaix, M. L., Delaugerre, C., Amara, A., & Meertens, L. (2020). A genome-wide CRISPR-Cas screen identifies the dolichol phosphate mannanose synthase complex as a hot dependency factor for dengue virus infection. *Journal of virology*. 94: e01751-19.

Lazo, L., Valdes, I., Guillén, G., Hermida, L., & Gil, L. (2019). Aiming at the heart: the capsid protein of dengue virus as a vaccine candidate. *Expert Review of Vaccines*. doi: 10.1080/14760584.2019.1574575.

Lazo, L., Valdes, I., Guillén, G., Hermida, L., & Gil, Lázaro. (2019). Aiming at the heart: the capsid protein of dengue virus as a vaccine candidate. *Expert Review of Vaccines*. 18 (2): 161-173.

Lazo, L. (2020). Dengue virus 4: the “black sheep” of the family? *Expert Review of Vaccines*. 19 (9): 807-815.

Lescar, J., Soh, S., Lee, L. T., Vasudevan, S. G., Kang, C., & Lim, S. P. (2018). The dengue virus replication complex: from RNA replication to protein-protein interactions to evasion of innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 115-129.

Li, Q., & Kang, C. (2020). Insights into structures and dynamics of flavivirus proteases from NMR studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: 2527.

Li, Q., & Kang, C. (2022). Dengue virus NS4B protein as a target for developing antivirals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12: 959727

Lim, S. P., Noble, C. G., Nilar, S., Shi, P. Y., & Yokokawa, F. (2018). Discovery of potent non-nucleoside inhibitors of dengue viral RNA-dependent RNA polymerase from fragment screening and structure-guided design. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 187-198.

Lin, K. H., Nalivaika, E. A., Prachanronarong, K. L., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2016). Dengue protease substrate recognition: binding of the prime side. *ACS Infectious Diseases*. 2 (10): 734-743.

Lin, K. H., Ali, A., Rusere, L., Soumana, D. I., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2017). Dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors exploiting the prime side. *Journal of Virology*. 91 (10): e00045-17.

Loroño-Pino, M. A., Farfán-Ale, J. A., Zapata-Peraza, A. L., Rosado-Paredes, E. P., Flores-Flores, E. F., García-Rejón, J. E., Díaz, F. J., Blitvich, B. J., Andrade-Narváez, M., Jiménez-Ríos, E., Blair, C. D., Olson, K. E., Black IV,

Low, J. G., Gatsinga, R., Vasudevan, S. G., & Sampath, A. (2018). Dengue antiviral development: a continuing journey. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 319-332.

Low, G. K. K., Ogston, S. A., Yong, M. H., Gan, S. C., & Chee, H. Y. (2018). Global dengue death before and after the new World Health Organization 2009 case classification: A systematic review and meta-regression analysis. *Acta Tropica*. 182: 237-245.

Mahmud, M. A. F., Mutalip, M. H. A., Lodz, N. A., Muhammad, E. N., Yoep, N., Hashim, M. H., Pawai, F., Rajarethinam, J., Aik, J., & Muhammad N. A. (2019). Environmental management for dengue control: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 9 (5): e026101.

Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*. 151: 261-269.

Martín-Acebes, M. A., Vázquez-Calvo, A., & Saiz, J. C. (2016). Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Progress in Lipid Research*. 64: 123-137.

Mathew, A. (2018). Regulation and function of NK and T cells during dengue virus infection and vaccination. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 251-264.

McCracken, M. K., Gromowski, G. D., Garver, L. S., Goupil, B. A., Walker, K. D., Friberg H., Currier, J. R., Rutvisuttinuny, W., Hinton, K. L., Christofferson, R. C., Mores, C. N., Vanloubbeeck, Y., Lorin, C., Malice, M. P., Thomas, S. J., Jarman, R. G., Vaughn, D. W., Putnak, J. R., & Warter, L. (2020). Route of inoculation and mosquito vector exposure modulate dengue virus replication kinetics and immune responses in rhesus macaques. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 14 (4): e0008191.

Miller, J. L., Tyrrell, B. E., & Zitzmann, N. (2018). Mechanisms of antiviral activity of iminosugars against dengue virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 277-301.

Morra, M. E., Altibi, A. M. A., Iqtadar, S., Minh, L. H. N., Elawady, S. S., Hallab, A., Elshafay, A., Omer, O. A., Iraqi, A., Adhikari, P., Labib, J. H., Elhusseiny, K. M., Elgebaly, A., Yacoub, S., Huong, L. T. M., Hirayama, K., & Huy, N. T. (2018). Definitions for warnings signs and signs of severe dengue according to the WHO 2009 classification: systematic review of literature. *Reviews of Medical Virology*. 28 (4): e1979.

Morrone, S. R., & Lok, S. M. (2019). Structural perspectives of antibody-dependent enhancement of infection of dengue virus. *Current Opinion in Virology*. 36: 1-8.

Muñoz, M. de L., Domínguez-de la Cruz, E., Hernández-García, E., Pérez-Ramírez, G., David, R. E., Navarrete-Espinoza, J., Moreno-Galeana, M., Brito-Carreón, C. A. (2020). Sequences alignments of DENV-1, -2, -3 and -4 used to construct phylogenetic trees. *Mendeley data*. V2

Nealon, J., Bouckenooghe, A., Cortes, M., Coudeville, L., Frago, C., Macina, D., & Tam, C. C. (2020). Dengue Endemicity, force of infection, and variation in transmission intensity in 13 endemic countries. *The Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1093/infdis/jiaa132.

O'Driscoll, M., Imai, N., Ferguson, N. M., Hadinegoro, S. R., Satari, I., Tam, C. C., & Dorigati, I. (2020). Spatiotemporal variability in dengue transmission intensity in Jakarta, Indonesia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 14 (3): e0008102.

Oliveira, E. R. A., Mohana-Borges, R., de Alencastro, R. B., & Horta, B. A. C. (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Research*. 227: 115-123.

Pan, P., Zhang, Q., Liu, W., Wang, W., Lao, Z., Zhang, W., Shen, M., Wan, P., Xiao, F., Liu, F., Zhang, W., Tan, Q., Liu, X., Wu, K., Liu, Y., Li, G., & Wu, J. (2019). Dengue virus M protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce vascular leakage in mice. *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.00996-19.

Pang, T., Mak, T. K., & Gubler, D. J. (2017). Prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. *Lancet Infectious Diseases*. 17: e79-87.

Perez-Ramirez, G., Diaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., Cisneros, A., & Munoz, M. de L. (2009). Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. *BMC Microbiology*. 9: 260.

Phadungsombat, J., Lin, M. Y. C., Srimark, A. Y., Nakayama, E. E., Moolasart, V., Suttha, P., Shioda, T., & Uttayamakul, S. (2018). Emergence of genotype Cosmopolitan of dengue virus type 2 and genotype III of dengue virus type 3 in Thailand. *PLoS ONE*. 13 (11): e0207220.

Puerta-Guardado, H., Glasner, D. R., & Harris, E. (2016). Dengue virus NS1 disrupts the endothelial glycocalyx, leading to hyperpermeability. *PLoS Pathogens*. *PLoS Pathogens*. 12 (7): e1005738.

Puerta-Guardado, H., Glasner, D. R., Espinosa, D. A., Biering, S. B., Patana, M., Ratnasiri, K., Wang, C., Beatty, P. R., & Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 triggers tissue-specific vascular endothelial dysfunction reflecting disease tropism. *Cell Reports*. 26 (6): 1598-1613.

Ramos-Castañeda, J., Barreto-dos Santos, F., Martínez-Vega, R., Galvao-de Araujo, M., Joint, G., & Sarti, E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic review of molecular epidemiological trends. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11 (1): e0005224.

Rana, J., Campos, J. L. S., Poggianella, M., & Burrone, O. R. (2019). Dengue virus capsid anchor modulates the efficiency of polyprotein processing and assembly of viral particles. *Journal of General Virology*. 100: 1663-1673.

Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*. 13: 131.

Rathore, A. P. S., & St. John, A. L. (2018). Immune responses to dengue virus in the skin. *Open Biology*. 8: 180087.

Rivino, L. (2018). Understanding the human T cell response to dengue virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 214-250.

Rodpothong, P., Boonarkart, C. Ruangrung, K., Onsirisakul, N., Kanistanon, D., & Auewarakul, P. (2016). Relative contribution of dengue prM- and E-specific polyclonal antibodies to neutralization and enhancement. *Acta Virologica*. 60: 249-259.

Severson, D. W., & Behura, S. K. (2012). Mosquito genomics: Progress and challenges. *Annual Review of Entomology*. 57: 143-166.

Shrivastava, G., Visoso-Carvajal, G., Garcia-Cordero, J., Leon-Juarez, M., Chavez-Munguia, B., Lopez, T., Nava, P., Villegas-Sepulveda, N., & Cedillo-Barron, L. (2020). Dengue virus serotype 2 and its non-structural proteins 2 A and 2B activate NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Immunology*. 11: 352.

Shukla, R., Ramasamy, V., Shanmugam, R. H., Ahuja, R., & Khanna, R. (2020). Antibody-dependent enhancement: a challenge for developing a safe dengue vaccine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 572681.

Silva, N. M., Santos, N. C., & Martins, I. C. (2020). Dengue and Zika viruses: Epidemiological history, potential therapies, and promising vaccines. *Tropical Medicine and Infectious Diseases*. 5: 150.

Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & ICTV Report Consortium. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *The Journal of General Virology*. 98 (1): 2-3.

Song, Y., Mugavero, J., Stauff, C. B., & Wimmer, E. (2019). Dengue and Zika virus 5' untranslated regions harbor internal ribosomal entry site functions. *mBio*. 10: e00459-19.

Souza-Salles, T., da Encarnacao-Sá Guimaraes, T., Lima-de Alvarenga, E. S., Guimaraes-Ribeiro, V., do Amaral-Melo, A. C., Soares, M. R., Fernandez-Ferreira, D., & Ferreira-Moreira, M. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites & Vectors*. 11: 264.

Susuki, K., Phadungsombat, J., Nakayama, E. E., Saito, A., Egawa, A., Sato, T., Rahim, R., Hasan, A., Lin, M. Y. C., Takasaki, T., Rajman, M., & Shioda, T. (2019). Genotype replacement of dengue virus type 3 and clade replacement of dengue virus type 2 genotype Cosmopolitan in Dhaka, Bangladesh in 2017. *Infection, Genetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103977.

Tay, M. Y. F., & Vasudevan, S. G. (2018). The transactions of NS3 and Ns5 in flaviviral RNA replication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 147-164.

Teramoto, T., Balasubramanian, A., Choi, K. H., & Padmanabhan, R. (2017). Serotype-specific interactions among functional domains of dengue virus 2 nonstructural proteins (NS) 5 and 3 are crucial for viral RNA replication. *Journal of Biological Chemistry*. 292 (23): 9465-9479.

Thomas, A., Thiono, D. J., Kudlacek, S. T., Forsberg, J., Premkumar, S., Tian, S., Kuhlman, B., de Silva, A. M., & Metz, S. W. Dimerization of dengue virus E subunits impacts antibody function and domain focus. *Journal of Virology*. 94: e00745-20.

Troupin, A., Shirley, D., Londono-Renteria, B., Watson, A. M., McHale, C., Hall, A., Hartstone-Rose, A., Klimstra, W. B., Gomez, G., & Colpitts, T. M. (2016). A role for human skin mast cells in dengue virus infection and systemic spread. *The Journal of Immunology*. 197: 4382-4391.

Undurraga, E. A., Betancourt-Cravioto, M., Ramos-Castañeda, J., Martínez-Vega, R., Méndez-Galván, J., Gubler, D. J., Guzmán, M. G., Halstead, S. B., Harris, E., Kuri-Morales, P., Tapia-Conyer, R., Shepard, D. Economic and disease burden of dengue in Mexico. (2015). PLoS Neglected Tropical Diseases. 9 (3): e0003547.

Urakami, A., Tun, M. M. N., Moi, M. L., Sakurai, A., Ishikawa, M., Kuno, S., Ueno, R., Morita, K., & Akahata, W. (2017). An envelope-modified tetravalent dengue virus-like particle vaccine has implications for flavivirus vaccine design. *Journal of Virology*. 91: e01181-17.

Valderrama, A., Díaz, Y., & López-Vergès, S. (2017). Interaction of flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 492: 541-547.

Wang, C., Puerta-Guardo, H., Biering, S. B., Glasner, D. R., Tran, E. B., Patana, M., Gomberg, T. A., Malvar, C., Lo, N. T. N., Espinosa, D. A., & Harris, E. (2019). Endocytosis of flavivirus NS1 is required for NS1-mediated endothelial hyperpermeability and is abolished by a single N-glycosylation site mutation. *PLoS Pathogens*. 15 (7): e1007938.

Wang, W. H., Urbina, A. N., Chang, M. R., Assavalapsakul, W., Lu, P. L., Chen, Y. H., & Wang, S. F. (2020). Dengue hemorrhagic fever – A systematic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.007.

Watterson, D., Modhiran, N., Muller, D. A., Stacey, K. J., & Young, P. R. (2018). Plugging the leak in dengue shock. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 89-106.

Wirawan, M., Fibriansah, G., Marzinek, J. K., Lim, X. X., Ng, T. S., Sim, A. Y. L., Zhang, Q., Kostyuchenko, V. A., Shi, J., Smith, S. A., Verma, C. S., Anand,

G., Crowe Jr, J. E., Bond, P. J., & Lok, S. M. (2019). Mechanism of enhanced immature dengue virus attachment to endosomal membrane induced by prM antibody. *Structure*. 27 (2): 253-267.

Wu, R. H., Tsai, M. H., Tsai, K. N., Tian, J. N., Wu, J. S., Wu, S. Y., Chern, J. H., Chen. C. H., & Yueh, A. (2016). Mutagenesis of dengue virus protein NS2A revealed a novel domain responsible for virus-induced cytopathic effect and interactions between NS2A and NS2B transmembrane segments. *Journal of Virology*. 91: e01836-16.

Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A L., Kang, C., Popov, V. L., Chen, X., Wang, Q. Y., Dong, H., & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A protein orchestrates virus assembly. *Cell Host & Microbe*. 26: 1-17.

Yong, X. E., Palur, V. R., Anand, G. S., Wohland, T., & Sharma, K. K. (2021). Dengue virus 2 capsid protein chaperones the strand displacement of 5'-3' cyclization sequences. *Nucleic Acid Research*. 49 (10): 5832-5844.

Young, P. R. (2018). Arboviruses: a family on the move. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062: 1-11

Zevini, A., Ferrari, M., Olganier, D., & Hiscott, J. (2020). Dengue virus infection and Nrf2 regulation of oxidative stress. *Current Opinion in Virology*. 43: 35-40.

Zhang, H., Kai, E. L. J., & Lu, L. (2019). Investigating the stability of dengue virus envelope protein dimer using well-tempered metadynamics simulations. *Proteins*. 88: 643-653.

Zomosa-Signoret, V. C., Morales-González, K. R., Estrada-Rodríguez, A. E., Rivas-Estilla, A. M., Devéze-García, M. C., Galaviz-Aguilar, E., & Vidaltamayo, R. (2020). Alanine substitution inactive cross-reacting epitopes in dengue virus recombinant envelope proteins. *Viruses*. 12: 208.

XIII. ANEXO I.

NÚMEROS DE ACCESO DEL GENBANK DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL PRESENTE PROYECTO (Muñoz et al., 2020).

SEROTIPO	NÚMERO DE ACCESO
DENV3	MN711793
DENV3	MN711794
DENV2	MN711795
DENV2	MN711796
DENV2	MN711798
DENV2	MN711799
DENV2	MN711800
DENV2	MN711801
DENV2	MN711802
DENV2	MN711803
DENV2	MN711804
DENV2	MN711805
DENV2	MN711806
DENV2	MN711807
DENV4	MN711808
DENV4	MN711809
DENV2	MN711810
DENV1	MN711811
DENV1	MN711812
DENV1	MN711813
DENV1	MN711814
DENV1	MN711815

XIV. ANEXO II. PUBLICACIONES.

Infection, Genetics and Evolution 84 (2020) 104391



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Epidemiological implications of the genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico



Ericel Hernández-García^a, María de Lourdes Muñoz^{a,*}, Randy E. David^b, Gerardo Pérez-Ramírez^a, Joel Navarrete-Espinosa^c, Álvaro Díaz-Badillo^d, Eduardo Domínguez-de-la-Cruz^a, Miguel Moreno-Galeana^a, Cesar Armando Brito-Carreón^a

^a Department of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV—IPN), Mexico City, Mexico

^b Laboratories of Biological Anthropology, University of Kansas, Lawrence, KS, USA

^c Epidemiology Division, Coordination of Integrated Health Programs, Mexican Social Security Institute, Mexico City, Mexico

^d University of Texas, Rio Grande Valley, Department of Human Genetics and South Texas Diabetes and Obesity Institute, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Emergence of new genotypes
Geographic distribution of DENV serotypes
Phylogenetic analysis of dengue
Dengue epidemiology

ABSTRACT

Variation and clade shifts in dengue virus (DENV) genotypes are responsible for numerous dengue fever outbreaks throughout Latin America in the past decade. Molecular analyses of dengue serotypes have revealed extensive genetic diversification and the emergence of new genotypes in Brazil (DENV-4 genotype I) and elsewhere in tropical and subtropical America. The goal of the present study is to assess the extent to which the adventitious introduction of DENV genotypes and their increasing genetic diversity affects dengue epidemiology in Mexico. A nuanced sequence inspection and phylogenetic analysis of the C-prM nucleotide region of DENV was performed for specimens collected in 2009 from the Veracruz State, Mexico. Findings were contrasted with specimens collected in adjacent years and analysed based on the epidemiological patterns reported between 1990 and 2019. Additionally, the identification process of various DENV genotypes was assessed, including: (1) DENV-1, genotype V, (2) the DENV-2 Asian/American and Asian II genotypes (3) DENV-3, genotype III, and (4) DENV-4, genotype I. This resulted in the discovery of a distinct genetic cladistic pattern for serotype DENV-2. Lastly, study findings suggest that a correlation exists between the emergence of novel genotypes and genetic diversification, with the increasing incidence of DENV infections in Mexico in 2009.

1. Introduction

In tropical and subtropical America today, the co-circulation of dengue (DENV), zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) viruses is a major public health concern. The transmission of these diseases is dependent on mosquito vectors, specifically, the “bite” of infected *Aedes aegypti* or *Aedes albopictus* mosquitoes. Mass human population movement, climate change, and the introduction of novel technologies (related to agriculture, construction, damming, etc.) have contributed to the geographic redistribution and expansion of the range of mosquito vectors and the diseases that they transmit (Ryan et al., 2018).

Aedes aegypti is the principal dengue vector due to its enhanced viral replication capacity, therefore causing an increased likelihood of DENV transmission (Clyde et al., 2006). Since the vector was introduced from Africa in the 17th century, various DENV genotypes have been recorded (Moore et al., 2013; Gubler, 2004). Symptoms of these infections are

similarly, making accurate diagnoses difficult. Nonetheless, dengue transmission in the Americas has been carefully monitored for approximately 50 years. Notably, its incidence has increased dramatically over the last quarter-century.

Most dengue infections are asymptomatic, although mild to moderate symptoms may occur, including: fever, malaise, headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, nausea/vomiting, and rash (Murray et al., 2013). In cases of “severe dengue”, or dengue haemorrhagic fever (DHF)—the primary symptom are plasma leakage (vascular permeability) that may result in pleural effusion and dyspnoea, leading to dengue shock syndrome (DSS), possibly causing the death of the patient (Huy et al., 2013). More than 50 million dengue fever cases occur each year worldwide, resulting in ~24,000 deaths annually (Huy et al., 2013). In Mexico, ~548,000 cases of dengue fever and ~153,682 cases of severe dengue were reported between 1990 and 2019 (Dirección General de Epidemiología, 2020). Although dengue is the most

* Corresponding author.

E-mail addresses: lmunoz@cinvestav.mx (M.d.L. Muñoz), r528d912@ku.edu (R.E. David), gperezr@cinvestav.mx (G. Pérez-Ramírez), alvaro.diazbadillo@uth.tmc.edu (Á. Díaz-Badillo), edomiguez@cinvestav.mx (E. Domínguez-de-la-Cruz), cesarbrito@cinvestav.mx (C.A. Brito-Carreón).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104391>

Received 13 November 2019; Received in revised form 7 May 2020; Accepted 31 May 2020

Available online 03 June 2020

1567-1348/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

common vector-borne viral disease worldwide, few studies have investigated the underlying relationship between disease epidemiology and evolutionary virology, specifically the influx of genetic diversity and novel genotypes. This relationship becomes increasingly convoluted with the presence of concomitant chikungunya and zika virus infections (Mercado-Reyes et al., 2019).

Globally, DENV-2 was the predominant dengue serotype reported between 1990 and 2004. Between 2005 and 2009, coinfections among all four serotypes (DENV-1 – Denv-4) largely characterized outbreaks. After 2009, various serotypes predominated in different regions of the world. DENV-1 and DENV-2 were the most common serotypes in Africa and the Americas; DENV-1 was most prevalent in Europe; coinfection among all four serotypes predominated in the eastern Mediterranean (Levant); and DENV-1 was the most common serotype in the western Pacific (Oceania) (Cisneros-Solano et al., 2004; Guo et al., 2017). These results, although valuable as a global distribution overview, do not inform the geographic fine-mapping of dengue serotypes and genotypes which are etiologically dependent on climate and distinct viral evolution trajectories. Such microevolutionary patterns are more readily apparent in phylogeographic analyses (Cisneros et al., 2006; Gardella-García et al., 2008; Pinheiro and Corber, 1997; Rico-Hesse et al., 1997).

DENV serotypes emerged in the Americas beginning with DENV-1 in 1977. By 1981, DENV-2 and DENV-4 appeared, and in 1994, a novel DENV-3 genotype emerged. These developments resulted in a shift from nonendemicity or hypoendemicity, to hyperendemicity, and ultimately, the arrival of severe dengue, reported between 1981 and 1997 in 24 American countries (Gubler, 1998; Pinheiro and Corber, 1997). Severe dengue was first reported in Mexico among eight patients in 1985. By 1995–1996, 539 cases of severe dengue, including 30 deaths were reported. During this same period, Mexican dengue endemicity was established, and later confirmed in Oaxaca State in 2010 (Istúriz et al., 2000; Torres-Galicia et al., 2014). Significant epidemics of serotype DENV-1 occurred throughout numerous Mexican States between 1979 and 1983, including: Chiapas, Mexico State, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, and Yucatán. Serotype DENV-2 first appeared in Oaxaca and Tamaulipas in 1982. DENV-3 was introduced in Chiapas, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas and Veracruz in 1995. Lastly, cases of DEN-4, the least common dengue serotype in Mexico, was reported in Yucatán in 1984 (Loroño-Pino et al., 1993). By 1996, DEN-4 was reported in Oaxaca, Veracruz and other Mexican States (Cisneros-Solano et al., 2004; Cisneros et al., 2006; Dantés et al., 2014; Falcón-Lezama et al., 2009; Gardella-García et al., 2008). The variable geographic distribution of dengue serotypes corroborates the complex and dynamic nature of DENV introduction across Mexico.

In 2009, Hurricane Ida flooded the States of Veracruz, Tabasco, and Jalisco creating an ideal breeding ground for mosquito vectors, leaving many people susceptible to infection. During the subsequent dengue outbreak, the Mexican Epidemiological Surveillance Single Information System—SINAVE (DREF, 2009) reported 41,687 confirmed cases of dengue fever in Veracruz, representing a 30% increase from the previous year. A total of 7898 of these cases were classified as severe dengue. There were an additional 11,222 unconfirmed cases reported as well (DREF, 2009).

Studies have shown that DENV strains possess variable levels of virulence (Rodríguez-Roche and Gould, 2013). For example, the occurrence of particularly severe DHF in Cuba in 1981 was linked to the introduction of a Southeast Asian strain of DENV-2 (Rico-Hesse et al., 1997; Gardella-García et al., 2008). Subsequently, an extended outbreak of DHF/DSS arose in Venezuela, Mexico, Colombia, and Brazil, linked to the same Southeast Asian strain of DENV-2 (Rico-Hesse et al., 1997). In 1995, following a 5-year DENV-1 epidemic, a novel DENV-2 epidemic (American genotype) was reported in Peru (Kochel et al., 2002). This indicated that the American DENV-2 genotype strain lacked the properties necessary to cause the development of severe disease. This episode corroborates earlier findings that associate the DENV-2

American genotype with mild disease and the DENV-2 Southeast Asian genotype with the appearance of DHF in the Americas (Rico-Hesse et al., 1997). Viral virulence and immune response are hence considered two key determinants in the pathogenesis of DHF. In agreement with other researchers, we hypothesize that the displacement of one genotype by another more pernicious type will precipitate severe dengue. This system operates within the context of vector density, in turn influenced by climate and ecological factors. To investigate this hypothesis, it is vital to have continuous epidemiological surveillance systems in place to detect the transmission of distinctive dengue virus genotypes of each serotype.

The objective of this study is to analyse dengue epidemic trends between 1990 and 2019, and to assess DENV serotypes and genotypes from the 2009 Mexican epidemic, specifically. Results will contribute to the development of a future surveillance program, integral to controlling the most virulent forms of this disease.

2. Material and methods

2.1. Viruses

The serotypes of DENV used in this study were as follows: DENV-1 Hawaii, DENV-2 New Guinea C (NGC), DENV-3H-87, and DENV-4H-341. All control samples were supplied by the Division of Vector-borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, USA. Additionally, sixty-five isolates of DENV virus were obtained from acute-phase plasma collected from patients with dengue fever or severe dengue through the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) from Veracruz State in 2009. Samples were anonymized, with only information regarding disease symptomatology available. This study was approved by the Institutional Review Board of the IMSS (Commission of Scientific Research) and the Bioethical Commission for Research in Humans of the Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Comité de Bioética Para la Investigación en Seres Humanos, COBISH—CINVESTAV). All epidemiological data was obtained through the Mexican SINAVE (Dirección General de Epidemiología, 2020).

2.2. DENV infected cells and virus isolation

Aedes albopictus clone C6/36 cells were grown in minimal essential media (MEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and nonessential amino acids. Cells were maintained at 28 °C without carbon dioxide (CO₂). After 18 h of culture, cells (2 × 10⁶/100 mm plate) were infected with 0.2 ml DENV-2 inoculum with an input MOI of 600 PFU/cell, and were incubated at 28 °C for 10 days.

Viruses were isolated as described by Cisneros et al. (2006), with a few modifications. After 18 h of culture, C6/36 cells (2 × 10⁶/15 ml tube) were infected with 0.01 to 0.1 ml of serum specimen per tube, diluted to 1.0 ml with medium, and incubated for 2 h at 28 °C. After one wash, 3.0 ml of MEM was added, and cells were cultivated for approximately 15 days at 28 °C (passage number 1). Cells were observed daily and when a cytopathic effect was apparent from syncytium formation and cellular lysis, cells were harvested and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The pellet was then suspended in 0.6 ml of MEM and stored in aliquots of 0.15 ml at –70 °C. The supernatant (approximately 2.5 ml) was stored in 2 aliquots of 1.0 ml and one aliquot of 0.5 ml, at –70 °C. To obtain passage numbers two and three, C6/36 cells were incubated with 1.0 ml of the supernatant obtained from earlier passages, for 2 h at 28 °C, following the same procedure as above. Serotypes among all samples were determined based on the isolates obtained from the first, second, or third culture passages.

2.3. RNA extraction procedure

RNA was extracted from the cell culture supernatant using TRIzol™

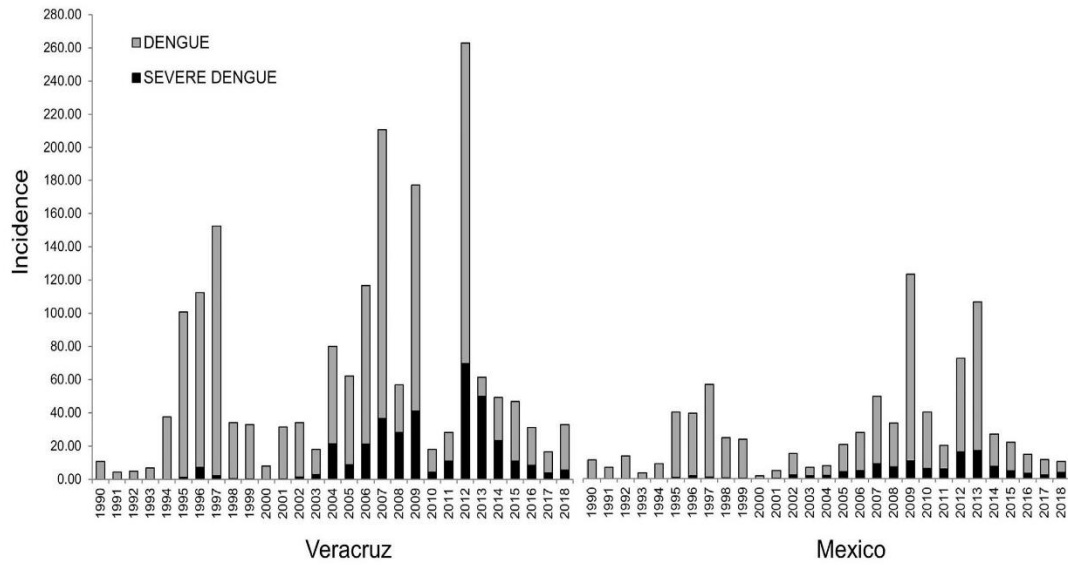


Fig. 1. Dengue virus incidence in Veracruz State and Mexico. Reported incidence (Annual new cases per 100,000 individuals) of dengue fever and the proportion of severe dengue cases across Veracruz State and Mexico between 1990 and 2019.

Table 1
Number of cases and incidence of dengue fever/severe dengue in Veracruz State and Mexico between 1990 and 2019.

Year	Number of cases						Incidence (per 100,000)					
	Veracruz state			Mexico			Veracruz state			Mexico		
	Dengue fever	Severe dengue	Total	Dengue fever	Severe dengue	Total	Dengue fever	Severe dengue	Total	Dengue fever	Severe dengue	Total
1990	160	0	160	1663	6	1669	10.71	0.00	10.71	11.09	0.00	11.09
1991	143	0	143	1931	1	1932	4.43	0.00	4.43	6.72	0.00	6.72
1992	32	0	32	1102	0	1102	4.86	0.00	4.86	13.74	0.00	13.74
1993	166	0	166	791	0	791	6.87	0.00	6.87	3.28	0.00	3.28
1994	2462	0	2462	7868	0	7868	37.44	0.07	37.51	8.95	0.03	8.98
1995	5503	79	5582	14,396	355	14,751	99.68	1.14	100.82	39.33	0.59	39.92
1996	5297	358	5655	19,835	884	20,719	105.22	7.27	112.49	37.62	1.56	39.18
1997	10,563	155	10,718	51,021	954	51,975	150.2	2.2	152.4	55.48	1.03	56.51
1998	2147	28	2175	15,181	225	15,406	33.66	0.6	34.26	24.17	0.39	24.56
1999	2331	10	2341	23,725	220	23,945	32.7	0.2	32.9	23.4	0.2	23.6
2000	568	7	575	1706	50	1756	8.02	0.11	8.13	1.72	0.07	1.79
2001	2344	14	2358	4643	312	4955	31.35	0.2	31.55	4.6	0.31	4.91
2002	2357	98	2455	13,131	2159	15,290	32.71	1.36	34.07	12.95	2.11	15.06
2003	988	95	1083	5018	1419	6437	14.95	3.05	18	5.01	1.7	6.71
2004	4250	1570	5820	6243	1959	8202	58.42	21.58	80	5.93	1.86	7.79
2005	3901	636	4537	17,487	4418	21,905	53.47	8.72	62.19	16.43	4.15	20.58
2006	7265	1066	8331	22,566	4426	26,992	95.57	21.13	116.7	22.94	4.81	27.75
2007	12,608	2645	15,253	42,936	9433	52,369	174.09	36.52	210.61	40.59	8.92	49.51
2008	2066	2051	4117	27,964	7560	35,524	28.49	28.37	56.86	26.26	7.11	33.37
2009	3412	2978	6390	44,565	11,396	55,961	136.08	40.91	176.99	112.18	10.6	122.78
2010	867	302	1169	22,352	9336	31,688	13.76	4.4	18.16	33.89	6.18	40.07
2011	996	651	1647	10,970	4608	15,578	17.2	11.04	28.24	14.12	5.88	20
2012	7531	5041	12,572	32,662	17,706	50,368	193.15	69.82	262.97	56.37	16.01	72.38
2013	4941	3858	8799	43,663	18,667	62,330	62.47	48.78	111.25	89.51	16.74	106.25
2014	2060	1866	3926	23,374	8647	32,021	25.8	23.37	49.17	19.51	7.22	26.73
2015	2884	876	3760	21,201	5464	26,665	35.84	10.89	46.73	17.52	4.52	22.04
2016	1833	391	2224	14,112	3683	17,795	22.61	8.64	31.25	11.54	3.1	14.64
2017	1031	324	1355	11,334	2794	14,128	12.63	3.96	16.59	9.18	2.26	11.44
2018	2239	467	2706	8229	4477	12,706	27.24	5.69	32.93	6.6	3.59	10.19
2019	9195	1707	10,902	27,884	13,621	41,505	111.12	20.63	131.75	22.14	10.82	32.96

The number of cases and incidence of dengue fever and severe dengue in Mexico and Veracruz State were collected from the official website of the Mexican SINAVE (Dirección General de Epidemiología) [2] during the period from 1990 to 2019. The incidence was calculated as the number of annual new cases per 100,000 individuals.

LS reagent (Gibco, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's recommendations. Isopropanol-precipitated RNA was recovered by centrifugation, and then air-dried. The resultant RNA pellet was

suspended in 50 µl of diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) treated water and used as a template for reverse transcription with polymerase chain reaction (RT-PCR).

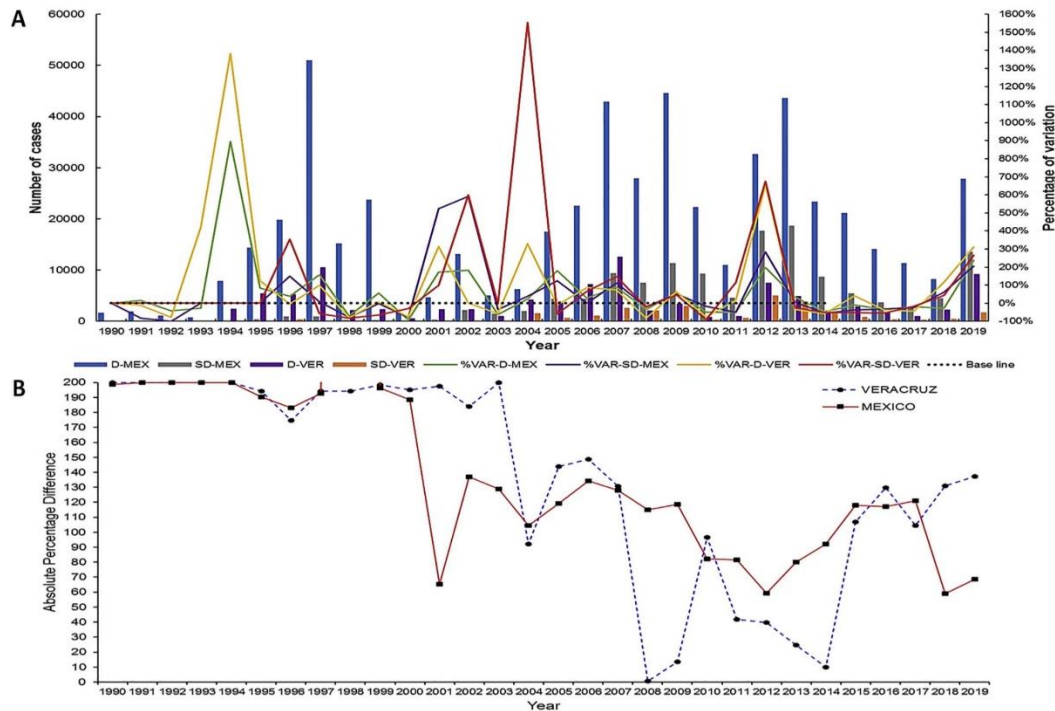


Fig. 2. (A) Number of cases and percentage of variation of dengue fever and severe dengue between 1990 and 2019, and (B) Absolute percentage differences between dengue fever and severe dengue cases between 1990 and 2019 in both Veracruz State and Mexico. (A) The total number of cases of dengue fever and severe dengue in Veracruz State and Mexico is displayed in bars and the percentage of variation in lines. D-MEX and D-VER represent dengue cases from Mexico and Veracruz, respectively. SD-MEX and SD-VER represent severe dengue cases from Mexico and Veracruz, respectively. (B) Displays the absolute percentage difference between the number of cases of dengue fever and severe dengue in both Veracruz State and Mexico between 1990 and 2019, according to the formula described in the Material and Methods section. Lower values represent a higher proportion of severe dengue. Table 1 displays all corresponding, graphed values.

2.4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The RT-PCR protocol described in Seah et al. (1995) was used to discern DENV serotypes. Synthetic oligonucleotide primer pairs were designed according to sequence data for the following DENV strains: 16681, New Guinea C, and Jamaica 1409 (Seah et al., 1995). The following genes were then amplified and sequenced: (1) protein C—nucleotide 139 (C-139) to prM-789 (prM-789) (Gardella-García et al., 2008), and (2) NS3 from nucleotides 4,899 (DV1) to 5,067 (DSP1), 4,899 (DV1) to 5,279 (DSP2), 4,899 (DV1) to 5,174 (DSP3) or 4,899 (DV1) to 5,342 (DSP4), for serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, respectively (Seah et al., 1995). All assays were performed using the SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). A mixture of 5 µl of total RNA (0.1–0.5 µg), and 1 pmol/µl of each primer at nucleotide positions C-139 (forward, 5'-CAATATGCTGAAACGCGHG-3') and prM-789 (reverse, 5'-CCTTCNG MNGACATCC-3') was incubated at 65 °C for 5 min. After adding 25 µl of 2 × Reaction Mix and 2 µl of SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq with DEPC-treated water (total volume: 50 µl), RT was carried out at 50 °C for 60 min. This step was followed by incubation at 94 °C for 2 min to inactivate the reverse transcriptase. Afterwards, Platinum™ Taq was activated by incubation at 94 °C for 2 min to amplify the 629 bp fragment of C-pM. This was followed by 35 cycles with the following conditions: 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 85 s, and a final extension of 72 °C for 10 min (storage at 4 °C). Strains of DENV-1, -2, -3 and -4 were used as positive controls for RT-PCR assays.

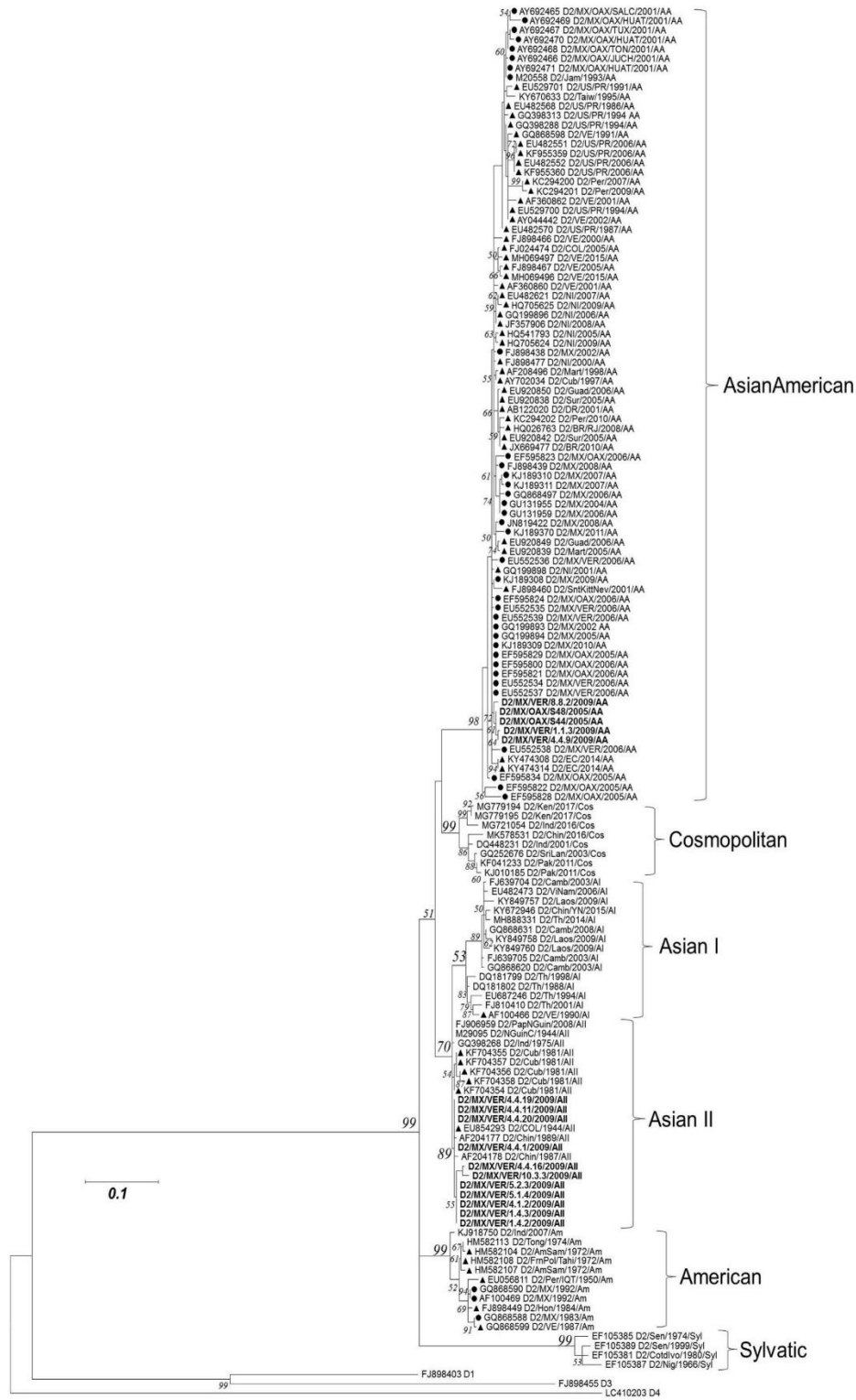
Serotyping was conducted according to the protocol of Seah et al. (1995): 10 cycles of 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min and 35 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension of 72 °C for 7 min (storage at 4 °C). In addition, the NS3 region—nucleotide positions 4,899 to 5,067 (NS3-169) for DENV-1, and 4,910 to 5,174 (NS3-265) for DENV-3, was obtained via an RT-PCR assay, as aforementioned, but with the following primers: (1) DV1 (forward, 5'-GGRACKTCAGGWTCC-3') and DSP1 (reverse, 5'-AGTTTCTTTTCCTAACACCTCG-3') for DENV-1, (2) DV1 and DSP3 (reverse, 5'-TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG-3') for DENV-3, and (3) DV1 and DSP4 (reverse, 5'-CCTGGTTGATGACAAA GTGTGG 3') for DENV-4.

2.5. Sequencing of PCR products

For automated sequencing, spin column-purified (Qiagen, Chatsworth, CA.) DNA fragments were sequenced using a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Sequencing was conducted using an Applied Biosystems Prism 3100, in a short capillary (47 cm × 50 µm inside diameter), and Performance Optimized Polymer 6 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, and Applied Biosystems).

2.6. Phylogenetic analyses

The phylogenetic trees for DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 were inferred using the maximum likelihood method of Tamura and Nei



(caption on next page)

Fig. 3. Maximum-likelihood phylogenetic tree of 150 DENV-2 C_{prM} gene sequences (380 nucleotides). The midpoint rooted phylogenetic tree includes 13 new sequences in Asian/American and Asian II genotypes, labelled in bold. All samples are from the State of Veracruz, Mexico. The phylogenetic tree was obtained using MEGA 7 as described in the section of Methods. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to branches. Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, from the Americas using a triangle, and novel sequences from Veracruz State in bold. Horizontal branch lengths are proportional to the bar representing number of nucleotide substitutions/sites. MX: Mexico; MZ/OAX: Mexico, Oaxaca; MX/VER: Mexico, Veracruz; US/PR: United States, Puerto Rico; VE: Venezuela; NI: Nicaragua; COL: Colombia; EC: Ecuador; BR: Brazil; Ph, Philippines; China, Chin. DENV strains are named as follows: GenBank accession number/strain/country/year/serotype/genotype (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020).

(1993). For this method the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to each branch (Felsenstein, 1981). Initial trees for the heuristic search were obtained by applying the neighbour-joining method to a matrix of pairwise distances estimated using maximum composite likelihood (MCL) (Tamura et al., 2004). A discrete gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites with 3 rate categories (+G, parameter = 0.2447). The final tree is drawn to scale, with branch lengths measured by number of substitutions per site. All above analyses were performed using MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0) software (Kumar et al., 2016).

Phylogenetic trees were then constructed using a Markov chain Monte Carlo integration (MCMC)-based Bayesian analysis with the minimum recommended parameters (uncorrelated log-normal relaxed clock, with a GTR substitution model with Gamma 4), implemented in BEAST v1.10.3 software (Suchard et al., 2018). MCL trees and Bayesian trees were compared to assess the extent of congruence between these methods.

2.7. Absolute percent difference between dengue fever and severe dengue cases in both Veracruz state and Mexico

The percentage of variation between tandem epidemiologic years was calculated as follows:

$$\left[\left(\frac{\text{final value}}{\text{initial value}} \right) - 1 \right] 100$$

Where *final value* is the number of cases (either dengue fever or severe dengue) in the year of interest, and *initial value* is the number of cases (either dengue fever or severe dengue) in the preceding year.

The absolute percent difference between dengue fever and severe dengue was calculated as follows:

$$\left(\frac{\text{first value} - \text{second value}}{(\text{first value} + \text{second value})/2} \right) 100$$

Where *first value* is the number of cases of dengue fever and *second value* is the number of cases of severe dengue.

3. Results

3.1. Epidemiology of dengue in Mexico and serotyping of virus isolates

Cases of dengue are widely underreported and moreover, circulating serotype distribution is not well established, creating a need for a broader and more nuanced understanding (Gómez-Dantés and Willoquet, 2009). Fig. 1 shows dengue and severe dengue incidence increase in Mexico between 1990 and 2019. The percentage of variation in number of dengue fever versus severe dengue cases in both Veracruz and Mexico was calculated to assess spatiotemporal dengue patterns. Although percentage of variation generally fluctuates between each epidemiological year, according to Fig. 2A, the rate of increase was greater from 2001 to 2002, 2003 to 2004 and 2011 to 2012 compared with other years. Fig. 2B depicts the absolute percentage difference of dengue fever to severe dengue cases between 1990 and 2019 in both Veracruz State and Mexico. The relative percentage of severe dengue cases has increased compared to dengue fever cases in

both Veracruz State and Mexico. The 2009 incidence of dengue fever was greatest in Veracruz compared to any other State in the country, evidence of the devastating effects of Hurricane Ida on mosquito-borne illness within a geographic area (DREF, 2009). If we compare the absolute percentage difference (proportion) in dengue fever versus severe dengue cases between Veracruz and Mexico (Fig. 2B), the percentage difference remained similar between 1990 and 2000, followed by an increase in the percentage difference (greater severe dengue) beginning in 2000–2001 in Mexico, and 2003–2004 in Veracruz. Between 2007 and 2008 there is a sharp increase in the proportion of severe dengue cases in Veracruz that continues until 2009. In 2008 and 2014 there was a conspicuous dissonance in the proportion of severe dengue to dengue fever cases in Veracruz compared to Mexico. Both years exhibited a noticeable increase in severe dengue in Veracruz, separated by a sizeable recovery in 2010. The proportion of dengue fever to severe dengue cases in Veracruz compared to Mexico was very similar in the years 2004–2007, 2011–2012, and 2015–2017.

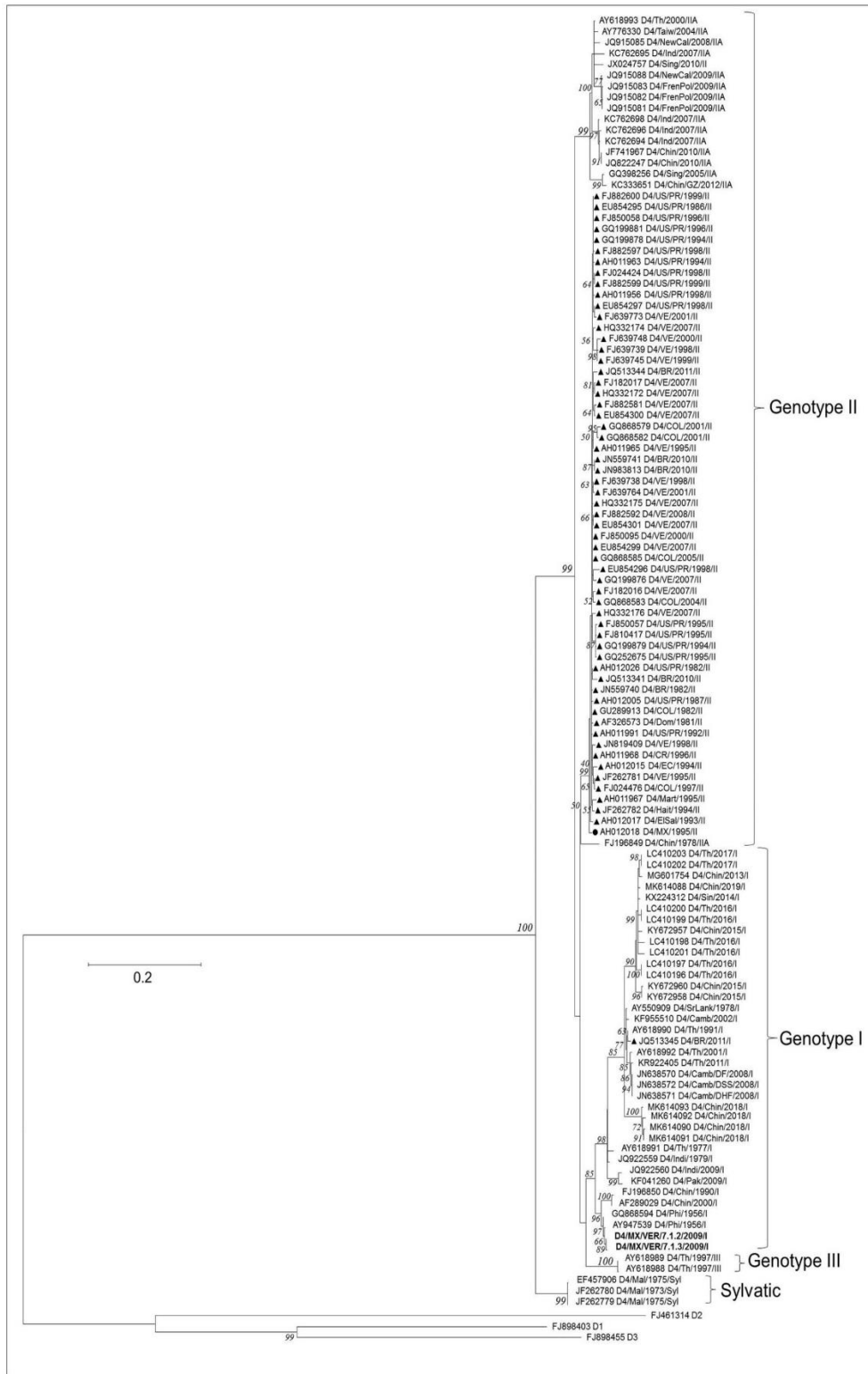
3.2. Isolation and serotyping of DENV

All samples were evaluated using the Mac-Elisa test, which is standard protocol of the Mexican Ministry of Health for diagnosing DENV infections (Cisneros-Solano et al., 2004). Patients whose clinical reports showed symptoms of severe dengue had laboratory results verified using an IgG-ELISA kit. Serotyping was performed via RT-PCR using the RNA obtained from isolates in C6/36 cells and repeated at least twice. Out of 215 isolates from Oaxaca, 31 were diagnosed with severe dengue—74.5% were DENV-2, 6.4% were DENV-3, 6.4% were DENV-4, 4.2% were DENV-1, and 8.5% presented dual infections (DENV-2 with either DENV-1, -3, or -4).

3.3. Phylogenetic analysis of Veracruz isolates

Portions of the C139-prM789 or NS3-484 gene were amplified and sequenced as described in the Methods section. Fifteen sequences were obtained from the Veracruz 2009 isolates for the C-prM fragment (eight with dengue fever and eight with severe dengue) and seven sequences for the NS3 gene (all with dengue fever). Five sequences from the 2005 outbreak in Oaxaca were added, two of the DENV-2 Asian/American genotype and 3 of DENV-3, genotype III. Phylogenetic analyses were performed on the aforementioned sequences and furthermore prototype sequences of characterized isolates for DENV-1, -2, -3, and -4 (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020). Eleven sequences presented as the DENV-2, Asian II genotype (seven with dengue fever and seven with severe dengue), three presented as the DENV-2 Asian/American genotype (all with dengue fever), and two presented as DENV-4, genotype I (one with dengue fever and one coinfecting with DENV-2 Asian II genotype with severe dengue). Genotypes I and II were assessed for DENV-1 and -3 using the NS3 gene (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020).

Phylogenetic analyses showed that C139-prM789 (Asian/American genotype) from Veracruz was most closely related to dengue strains from Oaxaca and Veracruz during the 2005 and 2006 outbreaks. Strains were closely related to those previously found in the Caribbean countries of Cuba, the Dominican Republic (DR), and Martinique (Mar) (France) (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020) (Fig. 3). Strains from these regions were all grouped on the same branch of the constructed phylogenetic tree (Fig. 3). DENV-2 isolates from Veracruz (Asian II



Genotype II

Genotype I

Genotype III

Sylvatic

(caption on next page)

Fig. 4. Maximum-likelihood phylogenetic tree of 150 DENV-4 CprM gene sequences (567 nucleotides). Details of phylogenetic tree analysis and graphical features are the same as those provided in the Fig. 3 legend. This phylogenetic tree includes two novel sequences of genotype I, labelled in bold. Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, from the Americas using a triangle, and novel sequences from Veracruz State in bold. MX: Mexico; MZ/OAX: Mexico, Oaxaca; MX/VER: Mexico, Veracruz; US/PR: United States, Puerto Rico; VE: Venezuela; NI: Nicaragua; COL: Colombia; EC: Ecuador; BR: Brazil.

genotype) were most closely related to strains from Colombia and Thailand (Fig. 3). DENV strains from Brazil, Venezuela and Jamaica formed an independent clade. Interestingly, analysis of C139-prM789 showed that isolates obtained in 2001 from Juchitán, Tonalá, Tuxtpec, Huatulco, and Salina Cruz, Oaxaca State shared the same clade as strains from Venezuela, Puerto Rico (USA), and Taiwan (Taiw) for the Asian/American genotype. A shorter fragment of the gene for the prM protein, including isolates from Guerrero State, Mexico (Asian II genotype) showed that isolates from Veracruz belonged to the same phylogenetic tree branch. This finding confirms the circulation of the DENV-2, Asian II genotype in Veracruz State (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020).

Phylogenetic analyses using C139-prM789 sequences revealed that both DENV-4 isolates from the 2009 dengue epidemic in Veracruz, Mexico present as genotype I, and are most closely related to strains from Philippines and China (Fig. 4). Moreover, both isolates share a close evolutionary lineage with strains from the Amazonas State, Brazil (Fig. 5). Notably, genotype I was not previously reported in Mexico. DENV-4 trees were constructed with sequences of 567 bp (Fig. 4) and 363 bp (Fig. 5) because Brazilian sequences were relatively shorter. DENV-4, genotype II, which has been previously reported in the Americas was not identified in this study (Bennett et al., 2003). Phylogenetic analyses using the NS3-484 gene showed that DENV-1 isolates presented as genotype V, and that they are most closely related to strains from Puerto Rico (USA) and Brazil. This particular genotype has been circulating in the Americas since approximately 2004 (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020). Phylogenetic analyses using the NS3-484 gene showed that DENV-3 isolates presented as genotype III, and that they share an affinity with strains from the 2005 dengue epidemic in Oaxaca. Such genotypes have been circulating in the Americas since approximately 2001 (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020).

MCL trees were compared with Bayesian trees to assess the extent of congruence between these methods. Our results found that the topology of resultant trees was very similar. Bayesian analyses confirm the presentation of the Asian II genotype of DENV-2 (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020) and genotype I of DENV-4, in Veracruz (Fig. 5).

4. Discussion

After broad campaigns between 1947 and 1970 by the Pan American Health Organization (PAHO) to eradicate *Ae. aegypti* in tropical and subtropical America, yellow fever and dengue were largely, though temporarily, eliminated (Brathwaite-Dick et al., 2012). Arbovirus surveillance eventually waned, leading to a rapid and widespread re-emergence of *Ae. aegypti* in environmentally suitable countries. An outbreak of DENV-1 infection occurred in Mexico in 1978. In 1984, eight DENV-4 severe dengue cases were reported, resulting in four deaths. By 1989, four more DENV-4 severe dengue cases were reported, resulting in 1 death, and in 1991, two more cases were reported. The emergence of DENV-2 in Mexico occurred in 1981 (30,000 cases) and was followed shortly thereafter by another outbreak in 1984 (23,000 cases). DENV-1, -2, and -4 were isolated in 1994, and DENV-3 was first reported in Mexico in 1995 (Brathwaite-Dick et al., 2012). By 1997, all four serotypes of DENV were circulating in Mexico (Gardella-García et al., 2008).

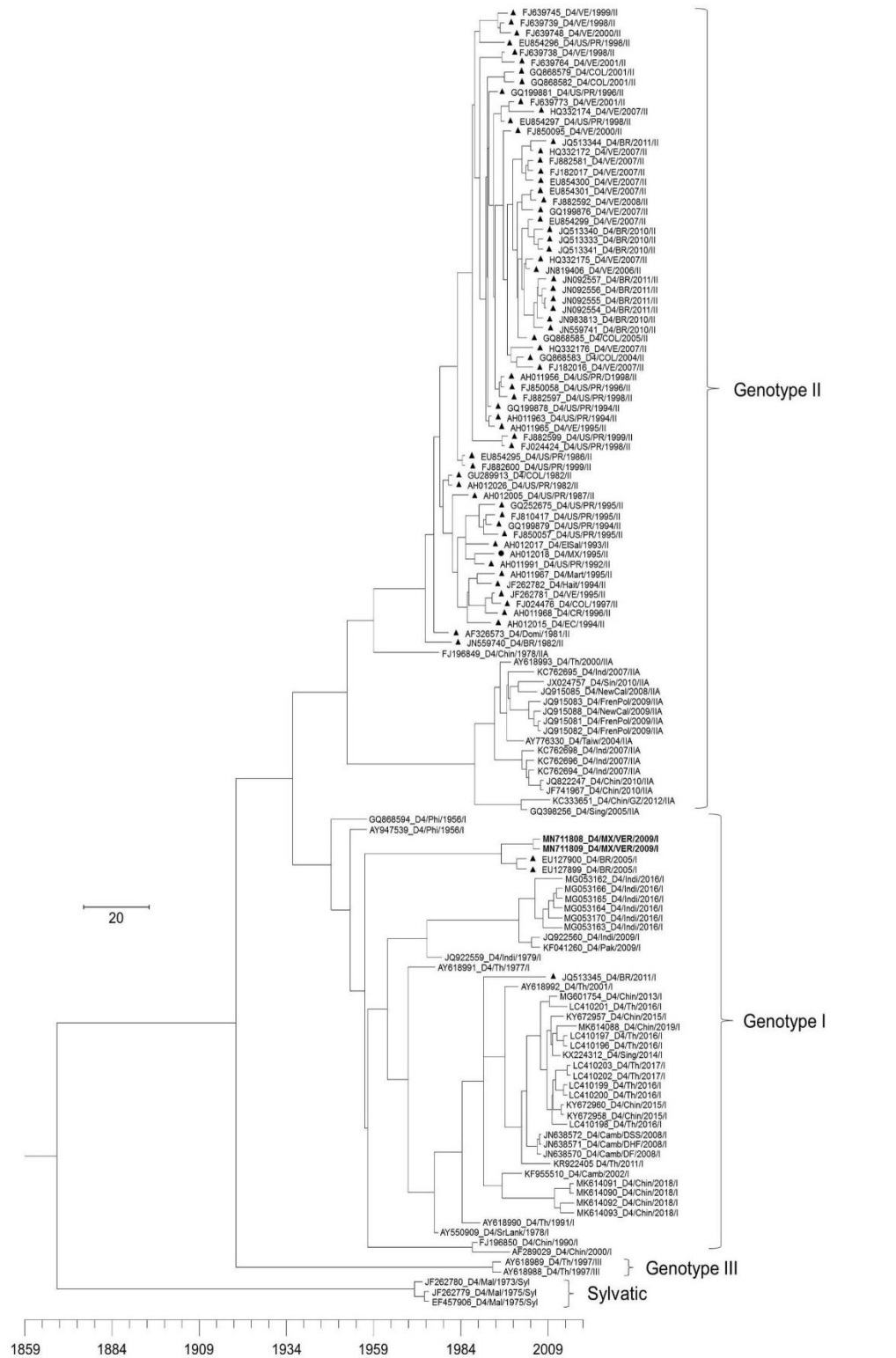
Phylogenetic analyses of DENV-1 and DENV-3 displayed the presentation of genotypes V and III, respectively, despite clustering with different clades. This is suggestive of viral evolution. The DENV-2 Asian/American genotype has slowly replaced the American genotype.

The geographic origin of the Asian/American genotype strain in Veracruz may have been introduced from nearby Caribbean islands. The DENV-2, Asian II genotype was identified in dengue fever (63.6%) and severe dengue (36.4%) cases. Strains isolated in the years 1983, 1984, 1992, 1994, and 1995 were identified as the American genotype. One 1996 isolate from Yucatán State was dubbed the “Cosmopolitan” genotype by Loroño-Pino et al. (2004). Mexican DENV-2 isolates from Yucatán and Oaxaca between 2000 and 2002, and Oaxaca and Veracruz between 2005 and 2006 have previously been reported to belong the Asian/American genotype (Díaz et al., 2006; Gardella-García et al., 2008).

This study provides evidence for the introduction of the Asian II genotype of DENV-2, in Mexico during the 2009 Veracruz dengue outbreak. The Asian II genotype was first reported in Mexico in two DENV-2 isolates from 1997 in Guerrero, Mexico (GenBank accession number: AY449678, AY449679). According to phylogenetic analyses, this strain is closely related with DENV-2 strains collected from Cuba in 1981 (Rodríguez-Roche and Gould, 2013) (GenBank accession number: EU854293), and later Colombia (GenBank Accession Number: EU854293) and Asia (GenBank Accession Number: AF204178 and AF204177) (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020). The geographic origin of the Mexican DENV-2, Asian II genotype may be Guerrero State and/or the Caribbean islands. This study has also described the introduction of DENV-4 genotype II, previously reported in Manaus, Brazil in 2008 (de Melo et al., 2009; de Figueiredo et al., 2008). Although DENV-4 is less prevalent than other dengue serotypes in Mexico, it has been shown to be involved in the development of severe dengue following secondary infections, and hence of significant epidemiological importance (Ahamed et al., 2019; Guo et al., 2017; Soo et al., 2016; Suppiah et al., 2018). This study identified two DENV-4, genotype II isolates, one from a patient coinfecting with DENV-3, genotype III, and diagnosed with severe dengue.

The increased frequency of severe dengue in Veracruz coincides with the permanence of the DENV-2 Asian/American genotype and the emergence of both the DENV-2, Asian II genotype, and DENV-4, genotype I. The DENV-2, Asian II genotype, and DENV-4, genotype I have been reported in Acapulco and Chilpancingo, Mexico, as well as Brazil (Kubiszewski et al., 2020; de Melo et al., 2009; de Figueiredo et al., 2008). The novel genotypic/lineage variations in DENV-2 and DENV-4 may have influenced the magnitude and severity of Veracruz dengue epidemics in 2009, since the severe dengue patients were infected by the novel DENV-2 Asian II genotype. This suggests that these particular genotypes cause more severe disease directly (Fig. 2B). Prior studies have shown the potential for novel genotypic/lineage variations to have epidemiological effects (Ahamed et al., 2019; De La Cruz-Hernández et al., 2013; Gardella-García et al., 2008; Zhang Jr et al., 2005). Relative increases in severe dengue cases in particular may be due to the circulation of specific genotypes during certain years that cause an increase in dengue infection severity and incidence. Once the infection caused by that specific genotype passes through the population, herd immunity is achieved, reducing the incidence of infection. If a different, novel genotype begins to circulate, however, it will re-infect the population, generating another spike in either incidence, disease severity, or both (OhAinle et al., 2011; Cologna et al., 2005; Hang et al., 2010).

Apart from direct host-, vector-, and virus-related determinants, ecological factors such as climatic variation (i.e. seasonality), and weather events (i.e. flooding, hurricanes, etc.) are integral to the fitness and ultimate distribution of both dengue vectors and novel DENV strains. Our results show that increases in dengue fever and severe dengue cases overlapped with the climatological and infrastructural



(caption on next page)

Fig. 5. Maximum clade credibility (MCC) tree of 132 DENV-4 CprM gene sequences (363 nucleotides). This phylogenetic tree includes two new sequences of genotype I, labelled in bold. Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, and from the Americas using a triangle. Horizontal branch lengths are proportional to the bar representing the probability of coalescence. DENV strains are named as follows (GenBank accession number/serotype/country/year/genotype). MX: Mexico; MZ/OAX: Mexico, Oaxaca; MX/VER: Mexico, Veracruz; US/PR: United States, Puerto Rico; VE: Venezuela; NI: Nicaragua; COL: Colombia; EC: Ecuador; BR: Brazil; Ph, Philippines; China, Chin.

fallout of Hurricane Ida in 2009. Hurricanes in Veracruz in 2007 (Hurricane Dean) and 2012 (Hurricane Ernesto) (CONAGUA, 2020), were also found to coincide with an uptick in severe dengue cases (Fig. 2). Although such observations are indeed in agreement with previous reports showing a causative association between severe hurricane years and arbovirus infection rates, further statistical analyses will have to be conducted before drawing any conclusions regarding the data from this study in particular (Messina et al., 2015; Morin et al., 2013). A future synthesis of demographic, sociocultural, ecological and infrastructural elements with evolutionary virology is paramount to further elucidating dengue epidemiology in the Americas.

5. Conclusions

In 2009, Veracruz State was affected by intense rains due to Hurricane Ida, causing flooding and infrastructural damage, leaving thousands without homes, and creating an ideal mosquito breeding (DREF, 2009). Approximately 42,000 cases of dengue infection were confirmed that year in Veracruz, representing a 30% increase from the previous year (2008). The emergence of novel genotypes is due to an overall increase in dengue cases, leading to a higher probability of genetic divergence. Findings show that the predominant DENV serotypes circulating during this outbreak were: (1) DENV-2, followed by (2) DENV-3, (3) DENV-1, and (4) DENV-4. Five cases of DENV-2, genotype I were coinfecting with serotypes -1, -3, or -4. The primary DENV genotypes found in Veracruz during the 2009 epidemic were:

- (A) The Asian II and Asian/American genotypes (DENV-2)
- (B) Genotype III (DENV-3)
- (C) Genotype V (DENV-1)
- (D) Genotype I (DENV-4).

Severe dengue cases were identified mainly in subjects infected with the DENV-2, Asian II genotype, and DENV-4, genotype I. Results suggest a possible association between the emergence of novel DENV genotypes with both an increase in DENV incidence and frequency of severe dengue. To corroborate this potential relationship, annual testing should be conducted in a large sample size every year following the introduction of novel genotypes to a particular geographic region. Routine serological and nucleic acid detection methodologies should be employed to this end.

Author disclosure statement

The authors have no potential conflicts of interest.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to thank Rosalinda Tovar-Gallegos for her invaluable technical assistance. We are also grateful to Duane J. Gubler and Blanca Ruiz for generously providing control samples. Lastly, we are obliged to all study participants and anonymous reviewers.

This study was completed thanks to the generous support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico: EHG (Registration Number: 111110038; CVU: 49406), and ED-de-la-C (CONACYT Registration

Number: 280838; CVU: 485179; and COMECYT Scholarship Number: 18BTD0020).

References

- Ahamed, S.F., Rosario, V., Brito, C., Dias, M., Nayak, K., Chande, A., Kaja, M.K., Shet, A., 2019. Emergence of new genotypes and lineages of dengue viruses during the 2012–15 epidemics in southern India. *Int. J. Infect. Dis.* 84, S34–S43. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.014>.
- Bennett, S.N., Holmes, E.C., Chirivella, M., Rodriguez, D.M., Beltran, M., Vorndam, V., Gubler, D.J., McMillan, W.O., 2003. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1650–1658. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg182>.
- Brathwaite-Dick, O., San-Martín, J.L., Montoya, R.H., del-Diego, J., Zambrano, B., Dayan, G.H., 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87 (4), 584–593. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>.
- Cisneros, A., Díaz-Badillo, Á., Cruz-Martínez, G., Tovar, R., Ramírez-Palacios, L.R., Jiménez-Rojas, F., Beaty, B., Black IV, W.C., De Lourdes Muñoz, M., 2006. Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico. *Arch. Virol.* 151, 113–125. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0595-9>.
- Cisneros-Solano, A., Moreno-Altamirano, M.M.B., Martínez-Soriano, U., Jiménez-Rojas, F., Díaz-Badillo, A., Muñoz, M.L., 2004. Sero-epidemiological and Virological investigation of dengue infection in Oaxaca, Mexico, during 2000–2001. *Dengue Bull.* 28, 28–34.
- Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E., 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 11418–11431. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>.
- Cologna, R., Armstrong, P.M., Rico-Hesse, R., 2005. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J. Virol.* 79, 853–859. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.2.853-859.2005>.
- CONAGUA, 2020. Pronóstico Meteorológico General. (Mexico City).
- Dantés, H.G., Farfán-Ale, J.A., Sarti, E., 2014. Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000–2011): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003158>.
- de Figueiredo, R.M.P., Naveca, F.G., Bastos, M. de S., Melo, M. do N., Viana, S. de S., Mourão, M.P.G., Costa, C.A., Farias, L.P., 2008. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 667–669. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071185>.
- De La Cruz-Hernández, S.I., Flores-Aguilar, H., González-Mateos, S., López-Martínez, I., Alpuche-Aranda, C., Ludert, J.E., Del Angel, R.M., 2013. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 446–454. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0023>.
- de Melo, F.L., Romano, C.M., Zanotto, P.M. de A., 2009. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e390. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000390>.
- Díaz, F.J., Black IV, W.C., Farfán-Ale, J.A., Loroño-Pino, M.A., Olson, K.E., Beaty, B.J., 2006. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch. Med. Res.* 37, 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.armed.2006.02.004>.
- Dirección General de Epidemiología, 2020. Histórico Boletín Epidemiológico | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx [WWW Document]. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico> (accessed 4.12.20).
- Domínguez-de-la-Cruz, E., de Muñoz, M.L., Hernández-García, E., Pérez-Ramírez, G., David, R.E., Navarrete-Espinosa, J., Díaz-Badillo, A., Moreno-Galeana, M., Brito-Carreón, C.A., 2020. Data set on epidemiology, and genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico. Data Brief (In revision).
- DREF, 2009. Mexico: Dengue Outbreak DREF Operation No. MDRMX004 - Mexico | ReliefWeb [WWW Document]. <https://reliefweb.int/report/mexico/mexico-dengue-outbreak-dref-operation-no-mdrmx004> (accessed 9.12.19).
- Falcón-Lezama, J., Sánchez-Burgos, G.G., Ramos-Castañeda, J., 2009. Population genetics of dengue virus and transmission of dengue fever. *Salud Pública Mex.* 51 (Suppl. 3), S403–S409.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>.
- Gardella-García, C.E., Pérez-Ramírez, G., Navarrete-Espinosa, J., Cisneros, A., Jiménez-Rojas, F., Ramírez-Palacios, L.R., Rosado-Leon, R., Camacho-Nuez, M., Muñoz, M.D.L., 2008. Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. *BMC Microbiol.* 8, 117. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-117>.
- Gómez-Dantés, H., Willoquet, J.R., 2009. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad Saude Publica.* 25 (Suppl. 1), S19–S31. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2009001300003>.
- Gubler, D., 1998. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann. Acad. Med. Singap.* 27, 227–234.
- Gubler, D.J., 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.013>.
- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D., Ou, M., Han, Y., Huang, S., Liu, D.,

- Ye, X., Zou, X., Wu, J., Wang, H., Zeng, E.Y., Jing, C., Yang, G., 2017. Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: a systematic review and meta-analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 317. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>.
- Hang, V.T.T., Holmes, E.C., Veasna, D., Quy, N.T., Hien, T.T., Quail, M., Churcher, C., Parkhill, J., Cardoso, J., Farrar, J., Wills, B., Lennon, N.J., Birren, B.W., Buchy, P., Henn, M.R., Simmons, C.P., 2010. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet Nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000757>.
- Huy, N.T., Van Giang, T., Thuy, D.H.D., Kikuchi, M., Hien, T.T., Zamora, J., Hirayama, K., 2013. Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2412. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002412>.
- Istúriz, R.E., Gubler, D.J., Brea del Castillo, J., 2000. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 14, 121–140 (ix).
- Kochel, T.J., Watts, D.M., Halstead, S.B., Hayes, C.G., Espinoza, A., Felices, V., Caceda, R., Bautista, C.T., Montoya, Y., Douglas, S., Russell, K.L., 2002. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue hemorrhagic fever. *Lancet* 360, 310–312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09522-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09522-3).
- Kubiszewski, J.R., Vieira, Carla Julia da Silva Pessoa, Thies, Sirlei Franck, da Silva, David José Ferreira, Barreto, Eriana Serpa, Mondini, Adriano, Bronzoni, Roberta Viera de Moraes, 2020. Detection of the Asian II genotype of dengue virus serotype 2 in humans and mosquitoes in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53 Uberaba2020.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Loroño-Pino, M.A., Farfán Ale, J.A., Rosado Paredes, E.P., Kuno, G., Gubler, D.J., 1993. Epidemic dengue 4 in the Yucatán, México, 1984. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 35, 449–455. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651993000500011>.
- Loroño-Pino, M.A., Farfán-Ale, J.A., Zapata-Peraza, A.L., Rosado-Paredes, E.P., Flores-Flores, L.F., García-Rejón, J.E., Díaz, F.J., Blitvich, B.J., Andrade-Narváez, M., Jiménez-Ríos, E., Blair, C.D., Olson, K.E., Black IV, W., Beaty, B.J., 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatán state of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 485–492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.485>.
- Mercado-Reyes, M., Acosta-Reyes, J., Navarro-Lechuga, E., Corchuelo, S., Rico, A., Parra, E., Tolosa, N., Pardo, L., González, M., Martín-Rodríguez-Hernández, J., Karime-Osorio, L., Ospina-Martínez, M., Rodríguez-Perea, H., Del Río-Pertuz, G., Viasus, D., 2019. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. *Epidemiol. Infect.* 147, e77. <https://doi.org/10.1017/S095026881800359X>.
- Messina, J.P., Brady, O.J., Pigott, D.M., Golding, N., Kraemer, M.U.G., Scott, T.W., Wint, G.R.W., Smith, D.L., Hay, S.I., 2015. The many projected futures of dengue. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro3430>.
- Moore, M., Sylla, M., Goss, L., Burugu, M.W., Sang, R., Kamau, L.W., Kenya, E.U., Bosio, C., Munoz, M. de L., Sharakova, M., Black, W.C., 2013. Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2175. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002175>.
- Morin, C.W., Comrie, A.C., Ernst, K., 2013. Climate and dengue transmission: evidence and implications. *Environ. Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/ehp.1306556>.
- Murray, N.E.A., Quam, M.B., Wilder-Smith, A., 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin. Epidemiol.* 5, 299–309. <https://doi.org/10.2147/CEEP.S34440>.
- OhAinle, M., Balmaseda, A., Macalalad, A.R., Tellez, Y., Zody, M.C., Saborío, S., Nuñez, A., Lennon, N.J., Birren, B.W., Gordon, A., Henn, M.R., Harris, E., 2011. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci. Transl. Med.* 3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003084>.
- Pinheiro, F.P., Corber, S.J., 1997. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Heal. Stat. Q.* 50 (3/4), 161–169 1997.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L.M., Salas, R.A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M.T., Nogueira, R.M., da Rosa, A.T., 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230, 244–251. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8504>.
- Rodríguez-Roche, R., Gould, E.A., 2013. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed. Res. Int.* 2013, 20. <https://doi.org/10.1155/2013/690835>.
- Ryan, S.J., Carlson, C.J., Mordecai, E.A., Johnson, L.R., 2018. Global expansion and redistribution of *Aedes*-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007213. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007213>.
- Seah, C.L.K., Chow, V.T.K., Tan, H.C., Chan, Y.C., 1995. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J. Virol. Methods* 51, 193–200. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00104-0](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00104-0).
- Soo, K.M., Khalid, B., Ching, S.M., Chee, H.Y., 2016. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. *PLoS One* 11, e0154760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154760>.
- Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., Rambaut, A., 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.*, vol. 4. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
- Suppliah, J., Ching, S.M., Amin-Nordin, S., Mat-Nor, L.A., Ahmad-Najimudin, N.A., Low, G.K.K., Abdul-Wahid, M.Z., Thayan, R., Chee, H.Y., 2018. Clinical manifestations of dengue in relation to dengue serotype and genotype in Malaysia: a retrospective observational study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006817. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006817>.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (30), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., Becker, I., 2014. Dengue in Mexico: increase in the juvenile population during the last decade. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 71, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2014.08.003>.
- Zhang Jr., C., Mammen, P.M., Klungthong, C., Monkongdee, P., Nimmannitya, S., Kalayanaroj, S., Holmes, E.C., Mammen, M.P., Chinnawirotpisan, P., Rodpradit, P., 2005. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence †. *J. Virol.* 79, 15123–15130. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15123>.

ANEXO II. CONTINÚA PUBLICACIONES:

Data in Brief 32 (2020) 106077



Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Dataset on the epidemiology and genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico



Eduardo Domínguez-de-la-Cruz^a, María de Lourdes Muñoz^{a,*},
Ericel Hernández-García^a, Gerardo Pérez-Ramírez^a,
Randy E. David^b, Joel Navarrete-Espinosa^c, Álvaro Díaz-Badillo^d,
Miguel Moreno-Galeana^a, Cesar Armando Brito-Carreón^a

^aDepartment of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

^bLaboratories of Biological Anthropology, University of Kansas, Lawrence, KS, USA

^cEpidemiology Division, Coordination of Integrated Health Programs, Mexican Social Security Institute, Mexico City, Mexico

^dUniversity of Texas Rio Grande Valley, Department of Human Genetics and South Texas Diabetes and Obesity Institute, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2020

Revised 18 July 2020

Accepted 20 July 2020

Available online 29 July 2020

Keywords:

Dengue fever

DENV genotypes

DENV serotypes

Epidemiology

Evolutionary virology

Introduction of novel genotypes

Phylogeny

Severe dengue

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) evolution has had a significant impact on disease pathogenesis, virulence, and epidemiology in Mexico. Novel genotypic variation in DENV serotypes and genotypes may influence the magnitude and severity of dengue epidemics, as evidenced by 2009 data from Veracruz State. The data presented herein is related to the publication entitled "Epidemiological Implications of the Genetic Diversification of Dengue Virus (DENV) Serotypes and Genotypes in Mexico" [1]. Raw data and trees provide epidemiological data on DENV prevalence and a comprehensive phylogeny of both representative sequences collected from an NCBI repository, and 28 additional isolates from acute-phase plasma samples diagnosed with dengue fever or severe dengue (Raw sequencing data is hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhbf6x.2>). Phylogenetic

DOI of original article: [10.1016/j.dib.2020.104391](https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.104391)

* Corresponding author.

E-mail address: lmunoz@cinvestav.mx (M.d.L. Muñoz).

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106077>

2352-3409/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

trees for each DENV serotype (DENV-1, -2, -3 and -4) were constructed using these sequences by a maximum likelihood methodology as well as a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) integration approach. Phylogenetic trees exhibited: (1) DENV-1, genotype V, (2) the DENV-2 Asian/American and Asian II genotypes, (3) DENV-3, genotype III, and (4) DENV-4, genotype I. This data can be beneficial for future analyses on DENV serotype and genotype structure and the introduction of novel DENV genotype sequences in the Americas, for the further elucidation of dengue etiology.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY license.

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Specifications table

Subject	Virology
Specific subject area	Dengue virus and the introduction of novel DENV genotypes in Veracruz State, Mexico.
Type of data	Data are in raw format and have been analyzed. An Excel spreadsheet and figures have been uploaded. Raw sequencing data hosted in the public repository Mendeley Data (http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2) [2].
How data was acquired	Raw sequencing data is hosted in the public repository Mendeley Data (http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2) [2]. This data was used to construct phylogenetic trees using divergence time (tMRCA) and rate of nucleotide substitution, built using a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) integration approach, as implemented in BEAST 1.10.3 software [3]. A database of DENV representative sequences were collected freely from the NCBI repository: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ Raw DENV isolate data compiled freely from the GenBank database from both Veracruz State, and Mexico, as well as other countries, in addition to Mexican DENV epidemiological data from the Mexican SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología/Epidemiological Surveillance Single Information System) (Table 1) were acquired [4]. One Excel spreadsheet with pertinent raw data has been uploaded freely (Supplementary Table 1).
Data format	Raw sequencing data is hosted in the public repository Mendeley Data (http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2) [2]. Data are in raw format and have been analyzed. Two tables have been uploaded, Table 1 and Supplementary Table 1 (Excel spreadsheet).
Parameters for data collection	RNA obtained from the isolates of DENV-1, -2, -3, and -4, were amplified and sequenced [1]. Raw sequencing data hosted in the public repository Mendeley Data (http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2) [2] were used to construct phylogenetic trees for all DENV serotypes using the maximum likelihood method [5] and Bayesian MCMC approach [6]. Dengue incidence was calculated by the equation: Number of dengue cases in one epidemiological year / 100,000 individuals.
Description of data collection	Epidemiological data of DENV (Table 1) collected freely from the Mexican SINAVE [4] displays the number of cases, incidence, and percentage of variation in dengue and severe dengue for both Mexico and Veracruz State between 1990 and 2019. The database of DENV sequences hosted in the public repository Mendeley Data (http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2) [2] includes 513 sequences collected from an NCBI repository and 28 sequences obtained from the isolates from Veracruz, Mexico. Database details (Supplementary Table 1) includes: GenBank accession number, URL: GenBank, strain or isolate, year collected, serotype, genotype, country, ID in phylogenetic analyses, and reference(s).
Data source location	Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico. Latitude and longitude for collected sample/data 19° 30' 33"N, 99° 07' 46"W

(continued on next page)

Data accessibility	Access options located with article. Raw sequencing data and alignment information data is hosted in the public repository Mendeley Data (http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhtf6x.2) [2]; a description of each DENV sequence is displayed in Supplementary Table 1, and epidemiological raw data is displayed in Table 1.
Related research article	Author's names: Hernández-García, María de Lourdes Muñoz, Randy E. David, Gerardo Pérez-Ramírez, Joel Navarrete-Espinosa, Álvaro Díaz-Badillo, Eduardo Domínguez-de-la-Cruz, Miguel Moreno-Galeana, Cesar Armando Brito-Carreón Title: Epidemiological Implications of the Genetic Diversification of Dengue Virus (DENV) Serotypes and Genotypes in Mexico Journal: INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION Volume 84, October 2020, 104391. [https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104391]

Value of the data

- This data will serve as a reference for future analyses on the incidence, epidemiology, and introduction of novel DENV genotypes/serotypes in Mexico—fostering a greater understanding of the emergence of variable dengue strains in the Americas.
- All institutions involved in public health, disaster relief, and arbovirus control programs can benefit from this data through a more nuanced understanding of the association between specific genotypes (within serotypes) and presentation of disease.
- Novel DENV sequence data from Mexico can aid the future phylogenetic classification of dengue serotypes and genotypes circulating in the Americas, useful to understanding virus evolution and the association between genotype/serotype and disease pathogenesis.
- DNA sequencing and serotype identification of DENV samples in Veracruz State and elsewhere in Mexico can provide crucial supporting data for future control programs, re-emergence research, source/sink studies, transnational transmission pattern analysis, and herd immunity research.
- The epidemiological analysis of dengue virus in Veracruz State in 2009 can provide a foundation for further insight into the interrelationship between climatological factors, viral evolution, and disease distribution.

1. Data description

Table 1 displays epidemiological data of DENV in both Mexico and Veracruz State specifically, between 1990 and 2019. Characteristics of the DENV sequences used to construct phylogenetic trees from Mexico and Veracruz State (GenBank accession number: EF589666 – EF589668 and MN711791 – MN711815) and additional representative sequences from the NCBI repository are presented in Supplementary Table 1, which also includes: GenBank accession number, URL: GenBank, strain or isolate, year collected, serotype, genotype, country, and ID in phylogenetic analyses. Alignment and sequences for DENV-1, -2, -3, and -4 are hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhtf6x.2>) [2]. Database details (Supplementary Table 1) includes: GenBank accession number, URL: GenBank, strain or isolate, year collected, serotype, genotype, country, ID in phylogenetic analyses, and references associated with each sequence. The phylogenetic trees for DENV-1, -2, -3, and -4 were constructed using the sequences of either the C-prM or NS3 gene regions. Fig. 1 displays the phylogeny of NS3 gene sequences for DENV-1. Sequences from Veracruz State were grouped within genotype V (labelled in bold), similar to other isolates from Latin America. The phylogeny of NS3 gene sequences for DENV-3 from both Veracruz and Oaxaca States (2009 and 2005 epidemics, respectively) presented as genotype III (labelled in bold; Fig. 2). The phylogenetic tree for DENV-2 illustrates isolates of the DENV-2 Asian/American genotype related to strains from Oaxaca (Fig. 3). The DENV-2, Asian II genotype was shown to share a genetic affinity with dengue strains from Chilpancingo, and Acapulco, Mexico, as well as Colombia, Cuba, and China, both according to a maximum composite likelihood (MCL) methodology (Fig. 3) and a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach (Fig. 4) [3]. The Bayesian trend moreover held true for Fig. 5, where 384

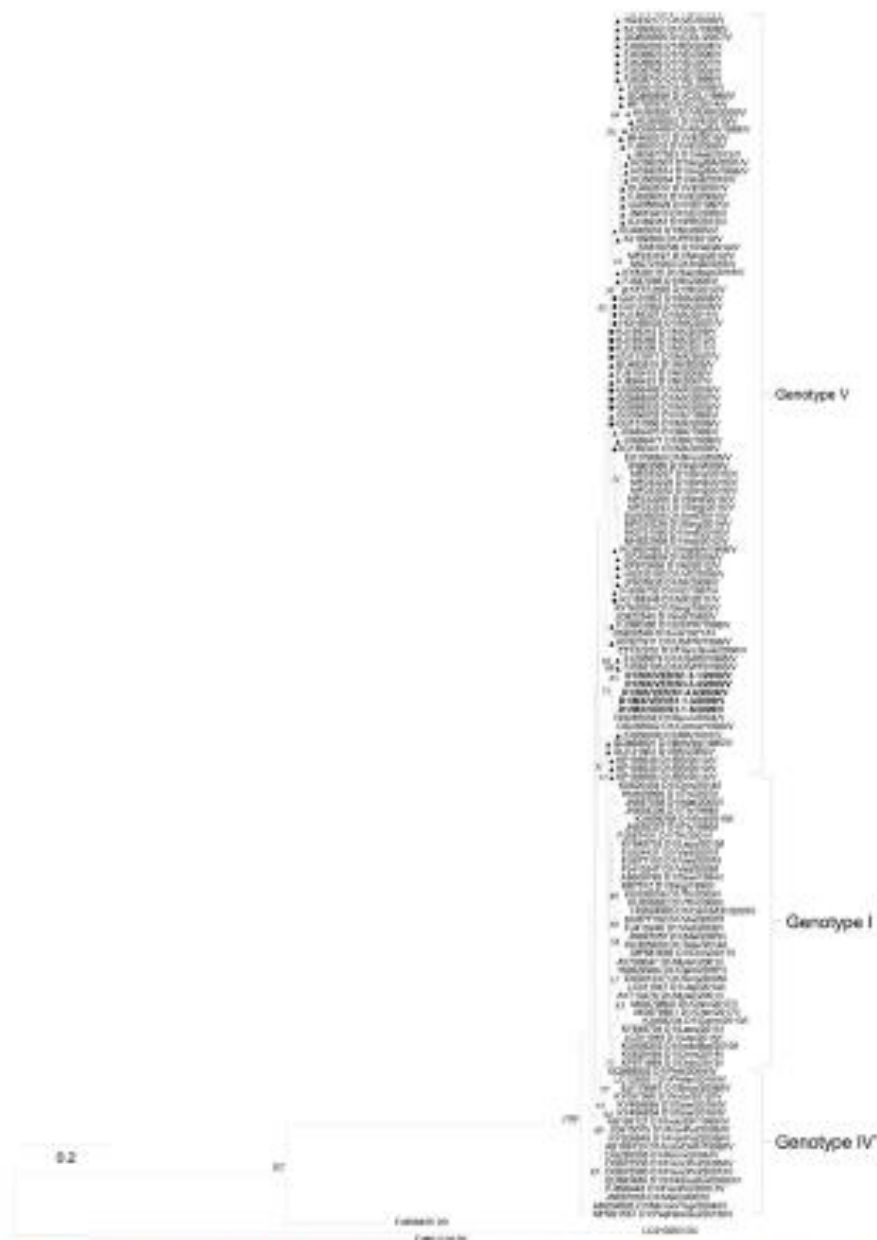


Fig. 1. Maximum-likelihood phylogenetic tree of 146 DENV-1 NS3 (141 bp) gene sequences constructed using raw data hosted in the public repository Mendelley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2>) [2]. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to branches. This phylogenetic tree includes five novel sequences clustered within genotype V, labelled in bold. Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, and those from the Americas using a triangle. Horizontal branch lengths are proportional to the bar representing number of nucleotide substitutions/sites. DENV strains are named as follows: GenBank accession number|strain|country|year|serotype/genotype.

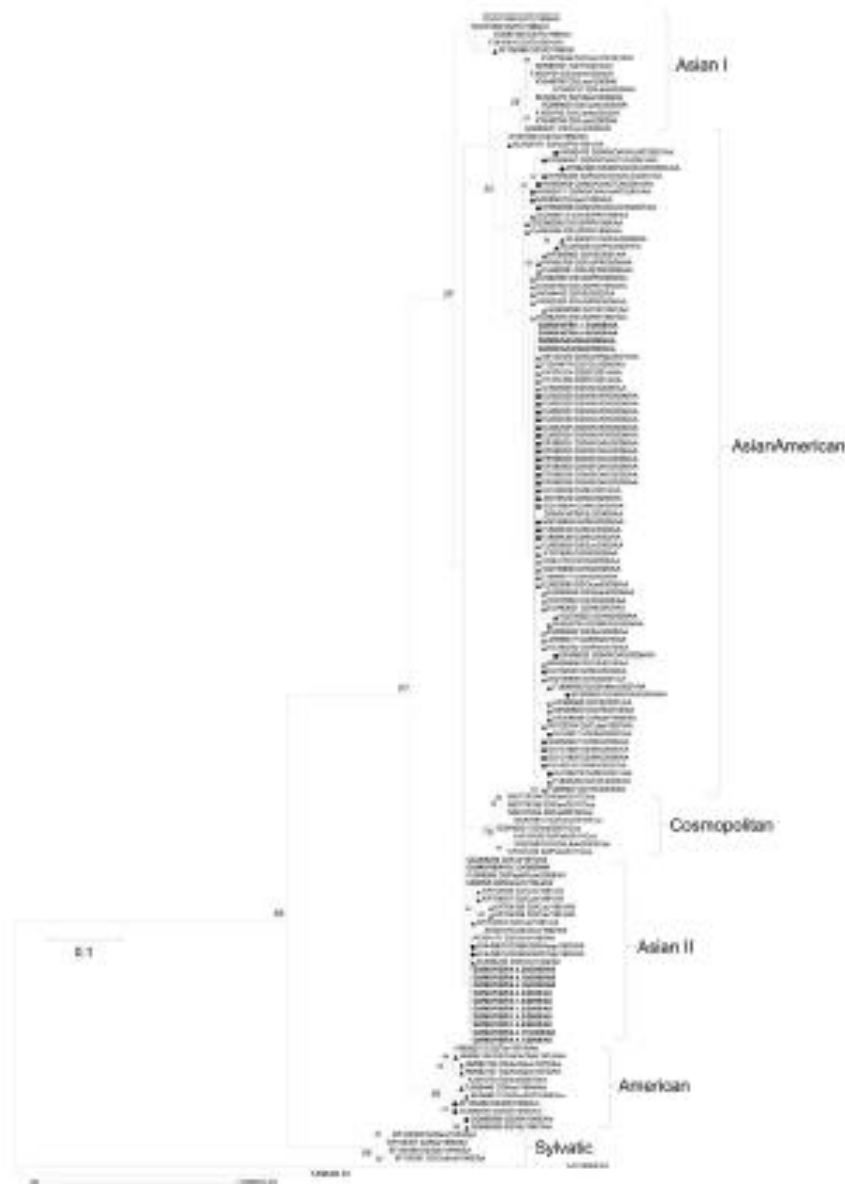


Fig. 3. Maximum-likelihood phylogenetic tree of 146 DENV-2 C-prM (134 bp) sequences constructed using raw data hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdfhh9x.2>) [2]. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to branches. This phylogenetic tree includes four novel sequences clustered within the Asian/American genotype, and ten novel sequences clustered within the Asian II genotype (labelled in bold). Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, and those from the Americas using a triangle. Horizontal branch lengths are proportional to the bar representing number of nucleotide substitution sites. DENV strains are named as follows: GenBank accession number/strain/country/year/serotype/genotype. MX: Mexico; MQ/OAX: Mexico, Oaxaca; MX/VER: Mexico, Veracruz; US/PR: United States, Puerto Rico; VE: Venezuela; NI: Nicaragua; COL: Colombia; EC: Ecuador; BR: Brazil.



Fig. 4. Maximum clade credibility (MCC) of 146 DENV-2 C-prM (134 bp) sequences constructed using raw data hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.7763/2017/632/bf2kdhf6x.2>) [2]. This phylogenetic tree includes 96 novel sequences clustered within the Asian/American genotype, and eleven novel sequences clustered within the Asian II genotype (labelled in bold). Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, and those from the Americas using a triangle. Horizontal branch lengths are proportional to the bar representing the probability of coalescence. DENV strains are named as follows: GenBank accession number|serotype|country/year|genotype.

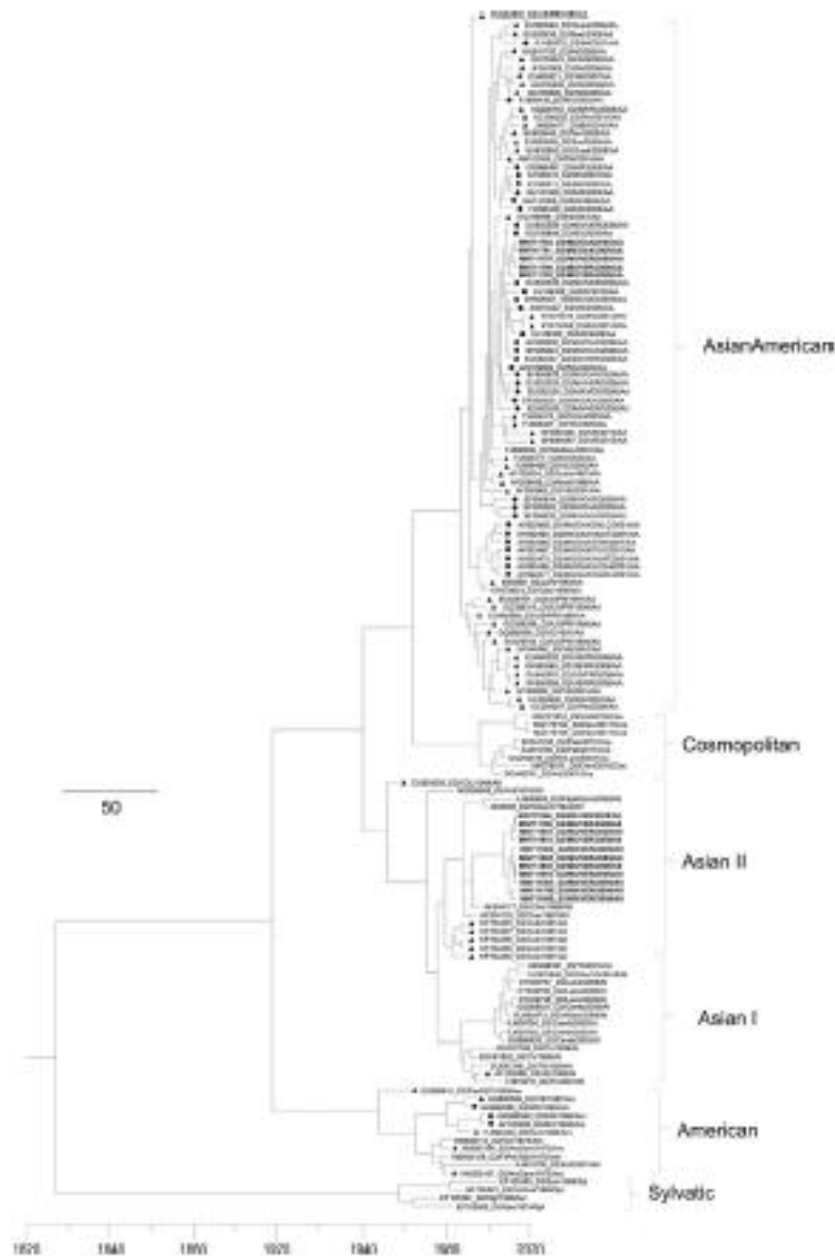


Fig. 5. Maximum clade credibility (MCC) tree of 144 DENV-2 C-prM (384 bp) gene sequences constructed using raw data hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.7554/1.2020.106077>) [2]. Details of phylogenetic tree analysis and graphical features are the same as those provided in the Fig. 4 caption. This phylogenetic tree includes five novel sequences clustered within the Asian/American genotype, and eleven novel sequences clustered within the Asian II genotype (labelled in bold). Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, and those from the Americas using a triangle. MX: Mexico; MX/OAX: Mexico, Oaxaca; MX/VER: Mexico, Veracruz; US/PR: United States, Puerto Rico; VE: Venezuela; NI: Nicaragua; COL: Colombia; EC: Ecuador; BR: Brazil.

Table 1

Raw data of the epidemiology of DENV in Mexico and Veracruz State. Number of cases and percentage of variation of dengue and severe dengue in both Mexico and Veracruz State between 1990 and 2019 are displayed.

YEAR	Number of cases				Percentage of variation ^a			
	D-MEX	SD-MEX	D-VER	SD-VER	D-MEX	SD-MEX	D-VER	SD-VER
1990	1663	6	160	0	0%	0%	0%	0%
1991	1931	1	143	0	16%	-83%	-11%	0%
1992	1102	0	32	0	-43%	-100%	-78%	0%
1993	791	0	166	0	-28%	0%	419%	0%
1994	7868	0	2462	0	895%	0%	1383%	0%
1995	14396	355	5503	79	83%	0%	124%	0%
1996	19835	884	5297	358	38%	149%	-4%	353%
1997	51021	954	10563	155	157%	8%	99%	-57%
1998	15381	225	2147	28	-70%	-76%	-80%	-82%
1999	23725	220	2331	10	56%	-2%	9%	-64%
2000	1706	50	568	7	-93%	-77%	-76%	-30%
2001	4643	312	2344	14	172%	524%	313%	100%
2002	13131	2159	2357	98	183%	592%	1%	600%
2003	5018	1419	988	95	-62%	-34%	-58%	-3%
2004	6243	1959	4250	1570	24%	38%	330%	1553%
2005	17487	4418	3901	636	180%	126%	-8%	-59%
2006	22566	4426	7265	1066	29%	0%	86%	68%
2007	42936	9433	12608	2645	90%	113%	74%	148%
2008	27964	7560	2066	2051	-35%	-20%	-84%	-22%
2009	44565	11396	3412	2978	59%	51%	65%	45%
2010	22352	9336	867	302	-50%	-18%	-75%	-90%
2011	10970	4608	996	651	-51%	-51%	15%	116%
2012	32662	17706	7531	5041	198%	284%	656%	674%
2013	43663	18667	4941	3858	34%	5%	-34%	-23%
2014	23374	8647	2060	1866	-46%	-54%	-58%	-52%
2015	21201	5464	2884	876	-9%	-37%	40%	-53%
2016	14112	3683	1833	391	-33%	-33%	-36%	-55%
2017	11334	2794	1031	324	-20%	-24%	-44%	-17%
2018	8229	4477	2239	467	-27%	60%	117%	44%
2019	27884	13621	9195	1707	239%	204%	311%	266%

D-MEX: dengue in Mexico; SD-MEX: severe dengue in Mexico; D-VER: Dengue in Veracruz; SD-VER: severe dengue in Veracruz; %: indicates the percentage of variation in the present year compared with the previous year.

instead of 134 nucleotides were used, omitting sequences of Guerrero State samples due to their relatively shorter length. DENV-4 isolates clustered with genotype I, sharing a recent common ancestor with strains from the Philippines and Brazil (Fig. 6). Lastly, DENV-4 isolates, according to a Bayesian model, were found to cluster with isolates from China after omitting Brazilian sequences due to their inherently shorter length (Fig. 7).

2. Experimental design, materials and methods

2.1. Epidemiology of dengue in Mexico

The data source of DEN incidence and number of cases in Mexico between 1990 and 2019 was the Mexican SINAVE [4].

2.2. Sample collection

Sixty-five isolates of DENV viruses were obtained from acute-phase plasma collected from patients with dengue fever or severe dengue through the "Instituto Mexicano del Seguro Social"

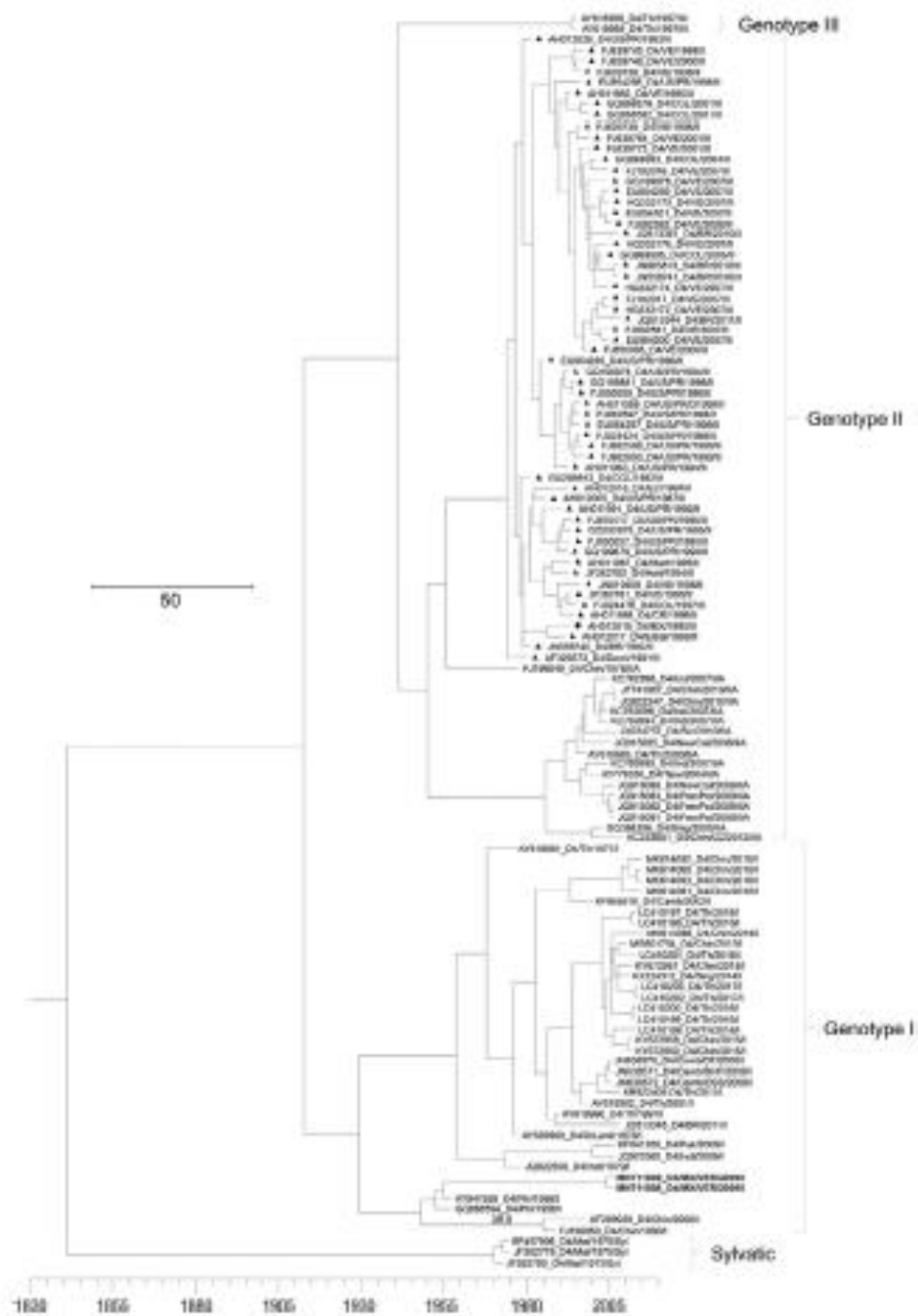


Fig. 7. Maximum clade credibility (MCC) phylogenetic tree of 118 DENV-4 C-prM (567 bp gene sequences) constructed using raw data hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/8f2kdhf6x.2>) [2]. This phylogenetic tree includes two novel sequences clustered within genotype I, labelled in bold. Positions of sequences from Mexico are indicated using a dot, and those from the Americas using a triangle. Horizontal branch lengths are proportional to the bar representing the probability of coalescence. DENV strains are named as follows: GenBank accession number/serotype/country/year/genotype.

(IMSS) from Veracruz State in 2009. Samples were anonymous, with only information regarding disease symptomology provided. Excess samples that remained after diagnostic testing were stored at -70°C . The project was reviewed and approved by the Institutional Review Board of the IMSS (Commission of Scientific Research) and the Bioethical Commission for Research in Humans of Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Comité de Bioética Para la Investigación en Seres Humanos, COBISH-CINVESTAV).

2.3. Dengue virus isolation

Aedes albopictus clone C6/36 cells were grown in minimal essential media (MEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and nonessential amino acids. Cells were maintained at 28°C without carbon dioxide (CO_2). After 18 h of culture, cells (2×10^5 /100 mm plate) were infected with 0.2 ml DENV-2 inoculum with an input MOI of 600 PFU/cell and were incubated at 28°C for 10 days.

Viruses were isolated as previously described [7] with a few modifications. After 18 hours of culture, C6/36 cells (2×10^5 /15 ml tube) were infected with 0.01 to 0.1 ml of serum specimen per tube, diluted to 1.0 ml with medium, and incubated for 2 h at 28°C . After one wash, 3.0 ml of MEM was added, and cells were cultivated for approximately 15 days at 28°C (passage number 1). Cells were observed daily and when a cytopathic effect was apparent from syncytium formation and cellular lysis, the cells were harvested and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The pellet was then suspended in 0.6 ml of MEM and stored in aliquots of 0.15 ml at -70°C . The supernatant (approximately 2.5 ml) was stored in 2 aliquots of 1.0 ml and one aliquot of 0.5 ml, at -70°C . To obtain passage numbers two and three, C6/36 cells were incubated with 1.0 ml of the supernatant obtained from earlier passages, for 2 h at 28°C following the same procedure as above. Serotypes in all samples were determined based on the isolates obtained from the first, second, or third culture passages.

2.4. RNA extraction

RNA was extracted from the cell culture supernatant using TRIzolTM LS reagent, Cat. No. 10296028 (Gibco, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's recommendations. Isopropanol-precipitated RNA was recovered by centrifugation, then air-dried. The resultant RNA pellet was suspended in 50 μl of diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water, Cat. No. 46-2224 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and used as a template for reverse transcription with polymerase chain reaction (RT-PCR).

2.5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The RT-PCR protocol previously described [8] was used to discern DENV serotypes. The following genes were then amplified and sequenced: protein C–nucleotide 139 (C-139) to prM-789 (prM-789) [4]; and NS3 from nucleotides 4,899 (DV1) to 5,067 (DSP1), 4,899 (DV1) to 5,279 (DSP2), 4,899 (DV1) to 5,174 (DSP3) or 4,899 (DV1) to 5,342 (DSP4), for serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, respectively [8]. All assays were performed using the SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with PlatinumTM Taq DNA Polymerase, Cat. No. 12574026 (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). A mixture of 5 μl of total RNA (0.1–0.5 μg), and 1 pmol/ μl of each primer at nucleotide positions C-139 (forward, 5'-CAATATGCTGAAACCGGHG-3') and prM-789 (reverse, 5'-CCTTCNGMNGACATCC-3') was incubated at 65°C for 5 min. After adding 25 μl of 2X Reaction Mix, and 2 μl of SuperScriptTM III RT/PlatinumTM Taq with DEPC-treated water (total volume: 50 μl), RT was carried out at 50°C for 60 min. This step was followed by incubation at 94°C for 2 min to inactivate the reverse

transcriptase. Afterwards, Platinum™ Taq was activated by incubation at 94 °C for 2 min, to amplify the 629 bp fragment of the C-pM gene. This was followed by 35 cycles with the following conditions: 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 85 s, and a final extension of 72 °C for 10 min (storage at 4 °C).

Serotyping was carried out following the protocol of Seah et al. [8]: 10 cycles of 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min and 35 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension of 72 °C for 7 min (storage at 4 °C). In addition, the NS3 region – nucleotides 4,899 to 5,067 (NS3-169) for DENV-1, 4,899 to 5,279 (NS3-362) for DENV-2, 4,899 to 5,174 (NS3-265) for DENV-3, and 4,899 to 5,342 (NS3-426) for DENV-4 was obtained via RT-PCR assay as aforementioned, but with the following primers:

DV1 (forward, 5'-GGRACKTCAGGWTCTCC-3') and DSP1 (reverse, 5'-AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG-3') for DENV-1; DV1 and DSP2 (reverse, 5'-CCGCTGTGCTCRGCYCTGAT-3') for DENV-2; and DV1 and DSP3 (reverse, 5'-TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG-3') for DENV-3; and DV1 and DSP4 (reverse, 5'-CCTGTTGATGACAAAAGTGTG-3') for DENV-4.

2.6. Sequencing of PCR products

For automated sequencing, spin column-purified QIAquick PCR Purification Kit, Cat. No. 28106 (Qiagen, Chatsworth, CA.) DNA fragments were sequenced using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Cat. No. 4337458 (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientifics, Waltham, MA). Sequencing was conducted using an Applied Biosystems Prism 3100 in a short capillary (47 cm x 50 µm inside diameter), and Performance Optimized Polymer 6, Cat. No. 4352757 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, and Applied Biosystems).

2.7. Phylogenetic tree construction using raw data

Phylogenetic trees for DENV-1, -2, -3, and -4 were performed using the maximum likelihood method of Tamura and Nei [5]. For this method, the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to each branch [9]. Initial trees for the heuristic search were obtained by applying the neighbor-joining method to a matrix of pairwise distances estimated using maximum composite likelihood (MCL). A discrete gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites with 3 rate categories (+G, parameter = 0.2447). The final tree is drawn to scale, with branch lengths measured by number of substitutions per site. All aforementioned analyses were performed using MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0) software [10].

The estimation of phylogeny, divergence time (tMRCA) and rate of nucleotide substitution of 2009 DENV-1, -2, -3, and -4 samples from Veracruz State was performed. The different genotypes were assessed according to a Bayesian MCMC approach. The MCMC chain length was run for 30 million generations along with the 95% highest posterior density (HPD) intervals. A GTR + G substitution model (general time-reversible model with four gamma-distributed rate categories) was used for the four sets of different sequences. The uncorrelated log-normal relaxed clock was employed [6] using a constant population size demographic model. The convergence of the chain was evaluated using Tracer 1.7.1 software [11]. Effective sample size (ESS) values of > 200 indicated a sufficient level of sampling. The maximum clade credibility tree was generated using the Tree Annotator program (available in BEAST). Fig Tree 1.4.3 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) was utilized for the visualization of the annotated tree.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships which have, or could be perceived to have, influenced the work reported in this article.

Ethics statement

This research project was reviewed and approved by the Institutional Review Board of the IMSS (Commission of Scientific Research) and the Bioethical Commission for Research in Humans of Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Comité de Bioética Para la Investigación en Seres Humanos, COBISH-CINVESTAV). Written informed consent was obtained from all patient.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to the anonymous reviewers for their invaluable comments and suggestions. This important data was collected thanks to the generous support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico: EHG (Registration Number: 111110038; CVU: 49406) and ED-de-la-C (CONACYT Registration Number: 280838; CVU: 485179; and COMECYT Scholarship Number: 18BTD0020).

Credit author statement

María de Lourdes Muñoz: responsible for ensuring that the descriptions are accurate and agreed by all authors; Ericel Hernández-García: methodology, Investigation, Data Curation; María de Lourdes Muñoz: Conceptualization, Resources, Supervision, Writing - Original Draft; Randy E. David: Writing - Review & Editing; Gerardo Pérez-Ramírez: Data Curation, Visualization; Formal analysis; Joel Navarrete-Espinosa: Investigation; Álvaro Díaz-Badillo: Investigation, Software; Eduardo Domínguez-de-la-Cruz: Formal analysis, Validation, Visualization; Miguel Moreno-Galeana: Validation; Cesar Armando Brito-Carreón: Validation.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.dib.2020.106077.

References

- [1] E. Hernández-García, M. Muñoz, L. de, R.E. David, G. Pérez-Ramírez, J. Navarrete-Espinosa, A. Díaz-Badillo, E. Domínguez-de-la-Cruz, M.A. Moreno-Galeana, C.A. Brito-Carreón, Epidemiological implications of the genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico, *Infect. Genet. Evol.* 84 (2020) 104391, doi:10.1016/j.meegid.2020.104391.
- [2] M.d.L. Muñoz, E. Domínguez-de-la-Cruz, E. Hernández-García, G. Pérez-Ramírez, R.E. David, J. Navarrete-Espinosa, M. Moreno-Galeana, C.A. Brito-Carreón, Sequence alignments of DENV-1, -2, -3, and -4 used to construct phylogenetic tree, 2020. <http://dx.doi.org/10.17632/8f2kdhhtf6x.2>.
- [3] M.A. Suchard, P. Lemey, G. Baele, D.L. Ayres, A.J. Drummond, A. Rambaut, Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10, *Virus Evol.* 4 (2018) vey016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29942856>.
- [4] Dirección General de Epidemiología. Histórico Boletín Epidemiológico, 2020. Secretaría de Salud Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2020 Apr 12]. Available from: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>.
- [5] K. Tamura, M. Nei, Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Mol Biol Evol* 10 (1993) 512–526 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8336541>.
- [6] W. Lok, S. Li, A.J. Drummond, Model averaging and Bayes factor calculation of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics, *Mol. Biol. Evol.* 29 (2012) 751–761, doi:10.1093/molbev/mst232.
- [7] A. Cisneros, Á. Díaz-Badillo, G. Cruz-Martínez, R. Tovar, L.R. Ramírez-Palacios, F. Jiménez-Rojas, et al., Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico, *Arch Virol* 151 (2006) 113–125 <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0595-9>.
- [8] C.L.K. Seah, V.T.K. Chow, H.C. Tan, Y.C. Chan, Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers, *J. Virol. Methods* 51 (1995) 193–200 [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00104-0](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00104-0).
- [9] J. Felsenstein, Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach, *J. Mol. Evol.* 17 (1981) 368–376, doi:10.1007/BF01734359.

- [10] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>.
- [11] A. Rambaut, A.J. Drummond, D. Xie, G. Baele, M.A. Suchard, in: Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7, *Syst. Biol.*, 67, Oxford University Press, 2018, pp. 901–904, doi:10.1093/sysbio/syy032.