

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

ESTUDIOS MOLECULARES Y DE
RECOMBINACIÓN EN AISLADOS DE
VIRUS DE DENGUE

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
M. EN C. GERARDO PÉREZ RAMÍREZ

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO
DRA. MINERVA CAMACHO NÚEZ

MÉXICO D.F.

OCTUBRE 2010

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, a cargo de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y parte del mismo en el Laboratorio 1 del postgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México a cargo de la Dra. Minerva Camacho Nuez. Este trabajo fue apoyado por los donativos de CONACYT CB-2005-01-50603 y Fondo Mixto VER-2007-C01-68123.

Este trabajo contó con la asesoría del Dr. Alejandro Cisneros de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca y del Dr. José Luis Sánchez de la Universidad de las Américas Puebla.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

A la **Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno**, por lo mucho que me enseñó no solo en el terreno experimental, también deductivo y filosófico, por la paciencia y apoyo mostrado hacia mí y por el interés que a mi trabajo siempre prestó. Profesores como usted, con principios científicos bien fundamentados y con tan alto interés en preparar estudiantes faltan en este País.

A mi co-directora, la **Dra. Minerva Camacho Nuez** le quiero sinceramente agradecer la asesoría que me dio en el desarrollo del proyecto. Su participación muy valiosa fue en las clonaciones de la proteína E y en la revisión de la tesis.

Mis Asesores el **Dr. José Luis Sánchez** y al **Dr. Alejandro Cisneros** y al **Dr. Juan Kuri**, por sus observaciones y consejos para mejorar mi trabajo.

A las lectoras de la Tesis la **Dra. Elizabeth Álvarez** y **Dra. Elisa Azuara**, por sus oportunas observaciones y correcciones al escrito de esta tesis.

A los Doctores **Víctor Altúzar** y **Claudia Oliva Mendoza Barrera** por su confianza y el apoyo que me brindaron en la etapa final del proyecto.

Al Dr. Álvaro Díaz Badillo por todas las sugerencias hechas a mi trabajo de investigación y el apoyo desinteresado que me brindó durante el desarrollo de mi trabajo.

A los Auxiliares del Lab. 1: **Rosalinda Tovar** y **Miguel Moreno** siempre atentos conmigo en el trabajo, y siempre con la confianza de tener una mano amiga.

A los compañeros y amigos del Laboratorio 1: **Ricardo Curiel, Gustavo Limón, Mauro López, Manuel Castillo, Enrique Villamar, Alma y Conny, Francisco, Katia, Lautaro, Israel** con ustedes la vida en el laboratorio es más agradable.

Agradecimientos especiales a **Evelyn Gardella y Diana Bustos**, con las que he trabajado y me ha enriquecido tanto en el pensamiento como aumentado mis perspectivas de vida de manera positiva.

A mi gran amigo **Miguel Palomino**, ya que iniciamos juntos esta aventura del Doctorado y siempre he contado con su apoyo en todos los sentidos.

A **Guadalupe Aguilar** la operadora de la unidad Ácidos Nucleicos del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN y a **Eduardo Carrillo** encargado de la unidad del secuenciación del Postgrado en Ciencias Genómicas de la UACM por su gran ayuda en la obtención de las secuencias.

Al técnico del Lab. 1 **Hebert Cadena**.

A las secretaria de Genética y Biología Molecular: **Antonia Salazar**, y a **Catalina Sánchez y Lourdes** del postgrado en Ciencias Genómicas siempre colaboradoras con el papeleo y trámites.

AGRADECIMIENTOS:

Muy en especial a mi esposa (**Francisca Castañeda**) e hijos (**Santiago, Héctor y Noemi**) que son los que soportaron no sólo mi ausencia, también mis enojos y necesidades.

A mis padres, hermanos, que aunque no entienden bien lo que hago siempre he obtenido su apoyo y comprensión.

DEDICATORIAS.

Este trabajo se lo dedico principalmente a **Héctor Román Pérez Castañeda**, **Santiago Leonardo Pérez Castañeda** y **Noemí Vanesa Pérez Castañeda**, espero que este logró les impacte de manera positiva en sus vidas, mis tres peques a los que amo por sobre todo.

A mi Esposa **Biol. Francisca Castañeda Hernández**, que se ha propuesto aguantarme, comprenderme y tener siempre la disposición de soportar toda una vida conmigo.

Le dedico esta tesis a mi Mamá, **Emma Ramírez Sánchez**, eres el principio mi vida, de mis objetivos y de mis ambiciones, este paso no lo hubiera logrado sin tu cariño.

Finalmente le dedico esta tesis a toda mi familia.

A la Memoria.....

De mi Padre que falleció en diciembre de 2007 y no pudo ver el final de esta etapa de mi vida.

Gracias.....

“En el pasado el intervalo entre cambios era mucho mayor que la vida humana... hoy es al contrario, y por tanto nuestra formación debe prepararnos para una continua novedad de condiciones de vida.”

Alfred North Whitehead

“A una persona naturalmente confiada le lleva bastante tiempo reconciliarse con la idea de que, después de todo, dios no lo ayudará.”

Henry Louis Mencken

“Cuando los hombres ya no creen en Dios, no es que no crean en nada, es que se lo creen todo.”

Gilbert Keith Chesterton

“Dios no manda cosas imposibles, sino que, al mandar lo que manda, te invita a hacer lo que puedas y pedir lo que no puedas y te ayuda para que puedas”

San Agustín De Hipona

“La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos”

Albert Einstein

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”

Louis Pasteur

“La ciencia que sirve para hacernos orgullosos y que degenera en pedantería no vale mas que para deshonrarnos”

San Francisco de Sales

“Los conceptos y principios fundamentales de la ciencia son invenciones libres del espíritu humano”

Albert Einstein de nuestro universo.

“Al aparecer como hombres, hombres, pues, fueron. Hablaron y razonaron, vieron y oyeron, anduvieron y palparon. Hombres perfectos y hermosos y cuya figura era una figura humana. Fue y existió (en ellos) el pensamiento. Vieron y al instante se elevó su mirada. Su vista abrazó todo. Conocieron el mundo entero, y cuando lo contemplaban, su mirada se dirigía, en un momento, de la bóveda del cielo a la superficie de la tierra. Veían las cosas más ocultas a su voluntad, sin tener necesidad de moverse antes. Y cuando luego volvían la vista a este mundo, veían igualmente todo lo que él contiene. Hombres verdaderamente dignos de admiración (así eran) Balam-Quitzé, Balam-Agab, Mabucutab e Iqi-Balam.

Entonces fueron interrogados por El Edificador y El Formador. -¿Qué es lo que pensáis de vuestro ser? No veis nada. No oís nada. ¿No son buenos vuestro lenguaje y vuestra manera de andar? -Mirad, pues, y ved bajo el cielo si aparecen las montañas y los valles. Procurad verlos ahora -les fue dicho. Después vieron el conjunto de todo lo que hay bajo el cielo. Luego dieron gracias a El Creador y a El Formador (diciendo): -En verdad os damos las gracias. Hemos recibido la existencia; hemos recibido una boca, un rostro. Hablamos, oímos, pensamos, andamos, sentimos y conocemos igualmente bien lo que está lejos y lo que está cerca.

-Vemos también todas las cosas grandes y las cosas pequeñas en el cielo y en la tierra. ¡Gracias, pues, a vos, hemos sido creados, oh, Edificador, oh, Formador! ¡Existimos ya, oh, abuela nuestra, oh, nuestro abuelo! -dijeron al darles las gracias por su creación y por su existencia. Y acabaron de contemplar y de ver todo lo que existe en los cuatro rincones y en los cuatro ángulos en el cielo y sobre la tierra.

Pero El Edificador y El Formador no oyeron tales cosas con gusto. -No está bien lo que dicen nuestras criaturas. Ellas saben de todas las cosas grandes y de las pequeñas -dijeron ellos. Por ello se tomó de nuevo el parecer de El que Engendra, de El que da el Ser. -Limitemos un poco (nuestra obra), a fin de que les falte (algo). No está bien lo que vemos. ¿Querrán por ventura igualarse a nosotros, que los hemos hecho; a nosotros, cuya sabiduría se extiende tan lejos y conoce todo? Eso dijeron El Corazón del Cielo, Hurakán, El Surco del Relámpago, El Rayo que Golpea, Tepeu y Gucumatz, El que Engendra, El que da el Ser, Xpiyacoc, El Edificador y El Formador. Así hablaron y enseguida cambiaron la naturaleza de sus criaturas y de su obra.

Entonces El Corazón del Cielo les pasó una nube sobre las pupilas de los ojos, que se empañaron como la luna de un espejo que se cubre de vapor. El globo de sus ojos fue así oscureciendo. No vieron sino lo que estaba cerca y sólo eso era claro para ellos.”

POPOL VUH

INDICE

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 5 |
| RESUMEN | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| Epidemiología del DEN | 11 |
| Ciclo de infección | 15 |
| Cuadro clínico del DEN | 16 |
| Factores que influyen para desarrollar DHF | 17 |
| ANTECEDENTES | 21 |
| El DENV | 21 |
| Biología Molecular del DENV | 22 |
| ESTADO DEL ARTE | 26 |
| Evolución del DENV | 26 |
| Recombinación en Dengue | 27 |
| IMPORTANCIA DEL CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA | 33 |
| OBJETIVOS | 34 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 35 |
| MATERIAL Y METODOS | 36 |
| Virus | 36 |
| Infección de cultivos celulares y aislamiento de DENV | 36 |
| Extracción de ARN viral | 37 |
| Trascricpción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) | 37 |
| Clonación | 38 |
| Secuenciación de los productos de RT-PCR | 38 |

| | |
|---|----|
| Análisis de Secuencias, de filogenia y recombinación | 39 |
| RESULTADOS | 41 |
| Aislamiento viral y serotipificación | 41 |
| Los cambios de aminoácidos de los aislados de Oaxaca y Veracruz | 45 |
| Análisis filogenéticos | 49 |
| Análisis de Recombinación | 55 |
| DISCUSIÓN | 63 |
| CONCLUSIONES | 74 |
| LITERATURA CITADA | 75 |
| PUBLICACIONES | 93 |

INDICE DE FIGURAS.

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1 | Distribución de <i>Ae. aegypti</i> y de casos de DEN en el mundo. | 9 |
| FIGURA 2 | Reinfestación de <i>Ae. aegypti</i> en las Américas. | 13 |
| FIGURA 3 | Casos de DF en la republica Mexicana de 1990-2008. | 14 |
| FIGURA 4 | Los diferentes grados de DHF según la Organización Mundial de la Salud. | 17 |
| FIGURA 5 | Respuesta inmune aumentada dependiente de anticuerpos | 19 |
| FIGURA 6 | Estructura del DENV. Proteínas | 21 |
| FIGURA 7 | El genoma del DENV y sitios del procesamiento de la poliproteína | 22 |
| FIGURA 8 | Relación filogenética de los cuatro serotipos de DENV | 28 |
| FIGURA 9 | Tipos de recombinación de ARN | 29 |
| FIGURA 10 | Modelo de "elección de copia" para la recombinación del ARN viral. | 30 |
| FIGURA 11 | Conflictos filogenéticos por recombinación. | 31 |
| FIGURA 12 | Epidemiología del DEN en México (2001–2006) | 41 |
| FIGURA 13 | Serotipificación de los aislados por RT-TPCR. | 42 |
| FIGURA 14 | Porcentaje de casos por serotipo de DENV | 43 |
| FIGURA 15 | Resumen de todos los casos de DENV analizados en este estudio | 44 |
| FIGURA 16 | Amplificación del gen <i>E</i> y del fragmento C(91)-prM-M-E-NS1 | 45 |
| FIGURA 17 | Árboles máxima verosimilitud construidos por el método de mínima evolución. | 51 |
| FIGURA 18 | Árbol de Máxima Verosimilitud del gen de envoltura. | 52 |
| FIGURA 19 | Árbol de Máxima Verosimilitud del genotipo Asiático/Americano. | 53 |
| FIGURA 20 | Dispersión del DENV-2, genotipo Asiático/Americano en el continente Americano. | 54 |
| FIGURA 21 | Determinación de los puntos de entrecruzamiento para las secuencias MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05. | 55 |
| FIGURA 22 | Determinación de los puntos de entrecruzamiento para las secuencias MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05. | 57 |
| FIGURA 23 | Análisis de recombinación por filogenia de las secuencias de MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05. | 58 |
| FIGURA 24 | Alineamiento de la región recombinante de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05 con las secuencias parentales. | 59 |
| FIGURA 25 | Puntos de entrecruzamiento del gen <i>E</i> de la clona MEX_OAX_1656_05_C07. | 60 |
| FIGURA 26 | Análisis de recombinación por filogenia de la secuencia MEX_OAX_1656_05_C07. | 61 |
| FIGURA 27 | Alineamiento de la secuencia recombinante MEX_OAX_1656_05_C07 con las secuencias parentales. | 62 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|---------|---|----|
| TABLA 1 | Primers para amplificar la región de los genes estructurales y el gen <i>E</i> . | 38 |
| TABLA 2 | Primers utilizados para secuenciar la región de los genes estructurales y el gen <i>E</i> . | 39 |
| TABLA 3 | Determinación del serotipo de los aislados. | 43 |
| TABLA 4 | Resumen de los cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas C, PrM y M de cinco genotipos de DENV-2. | 47 |

ABSTRACT

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) are caused by one of four closely related virus serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). They are a serious cause of mortality and morbidity in the world including Mexico, where the infection is endemic. Dengue (DEN) is an infectious disease caused by DEN virus (DENV), which belongs to the Flavivirus genus in the family *Flaviviridae* that is mainly transmitted to humans by the vector mosquito *Aedes aegypti*. This virus has a positive-sense ARN that evolves rapidly increasing its variability due to the absence of a repair mechanism that leads to approximately one mutational event per genome replication; which results in enhancement of viral adaptation, including the escape from host immune responses. Additionally, recombination may play a role in driving the evolution of DENV, which may potentially affect virulence and cause host tropism changes. Epidemiological and evolutionary studies have indicated that host and viral factors are involved in determining disease outcome and have proved the importance of viral genotype in causing severe epidemics. Host immune status and mosquito vectorial capacity are also important influences on the severity of infection. Therefore, an understanding of the relationship between virus variants with altered amino acids and high pathogenicity will provide more information on the molecular epidemiology of DEN. Accordingly, knowledge of DENV serotypes and genotypes circulating in the latest DEN outbreaks in Mexico, in addition to recombination, will contribute to the understanding of DEN infections. Furthermore, recombination in DENV has not been described in Mexican strains, neither has been described the relevance in virus evolution in endemic states such as Oaxaca and Veracruz where the four serotypes of DENV are circulating. In summary, we obtained 88 isolates of DENV, 27 from Oaxaca and 61 from Veracruz; from these 88 isolates, 16 were serotype 1; 62 serotype 2; 7 serotype 3; 2 serotype 4 and one isolate had 2 serotypes (DENV-2 and -1); Partial nucleotide sequences of the genes encoding C-prM (14 sequences), the NS3 helicase domain (7 sequences) were obtained. Phylogenetic analysis showed that DENV-2 isolates belonged to the Asian/American genotype. In addition, the Asian/American genotype was divided into two clusters, one containing the isolates from 2001 and the other the isolates from 2005-2006 with high bootstrap support of 94%. To study whether there are isolates from Oaxaca having recombination, we obtained the sequence of 6 different isolates of DENV-2 Asian/American genotype from the outbreaks 2005-06, one clone of the C₍₉₁₎-prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ structural genes, and 10 clones of the *E* gene from the isolate MEX_OAX_1656_05. Evidence of recombination was found by using different methods along with two softwares: RDP3 and GARD. The Oaxaca MEX_OAX_1656_05 and MEX_OAX_1038_05 isolates sequenced in this study were recombinant viruses that incorporate the genome sequence from the Cosmopolitan genotype. Furthermore, the clone of the *E* gene namely MEX_OAX_165607_05 from this study was also recombinant, incorporating genome sequence from the

American genotype. In conclusion we observed that DENV-2 was the predominant serotype in the DF and DHF outbreaks from 2005 to 2006 in Oaxaca State as well as in the 2006 and 2008 outbreak in Veracruz State, with the Asian/American genotype prevalent in both states. Interestingly, DENV-1 and DENV-2 were the only serotypes related to DHF cases. In contrast, DENV-3 and DENV-4 were poorly represented according to epidemiological data reported in Mexico. We also found that isoleucine was replaced by valine at residue 106 of protein C in the isolates from these 2005-2006 outbreaks and in those from the 1997, 1998 and 2001 outbreaks in the Caribbean islands. We suggested that this amino acid change may be used as a signature for isolates arising in the Caribbean islands and pertaining to the Asian/American genotype. Other amino acid changes are specific for the Asian/American, Asian and American strains. Besides, these aas may be used as markers of genotypes and geographic origins. Interestingly, our results are showing for the first time recombination in DENV-2 in Mexico. Given such a recombinant activity new genomic combinations were produced, this could play a significant role in the DENV evolution and must be considered as a potentially important mechanism generating genetic variation in this virus with serious implications for the vaccines and drugs formulation as occurs for other viruses like poliovirus, influenza and HIV. This results are very important since, will let diagnose the serotype, genotype and recombination in any patient presenting DF or DHF.

RESUMEN

La fiebre de dengue (DF) y la fiebre hemorrágica de dengue (DHF) son causadas por uno de los cuatro serotipos de virus que están estrechamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). La fiebre por dengue es una causa grave de morbilidad y mortalidad en el mundo, incluyendo México, donde la infección es endémica. El dengue (DEN) es una enfermedad infecciosa causada por el virus del dengue (DENV), el cual pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, se transmite principalmente a los humanos por el mosquito vector *Aedes aegypti*. Este virus tiene una cadena de ARN de sentido positivo, evoluciona rápidamente, aumentando su variabilidad debido a la ausencia de un mecanismo de reparación, que genera aproximadamente una mutación por cada replicación del genoma, lo cual resulta en un aumento en la adaptación viral, incluyendo una mejor vía de escape de la respuesta inmune del hospedero. Además, la recombinación puede desempeñar un papel en la evolución de las DENV, que potencialmente puede afectar su virulencia y causar cambios de tropismo en el hospedero. Los estudios evolutivos y epidemiológicos indican que factores del hospedero y virales están implicados en la determinación del tipo de enfermedad que se desarrollará y han demostrado la importancia del genotipo viral en la generación de epidemias severas. El estado inmune del hospedero y la capacidad vectorial de mosquitos también influyen de forma importante en la gravedad de la infección. Por lo tanto, la comprensión de la relación entre las variantes virales con alteraciones en su secuencia de aminoácidos y la alta patogenicidad proporcionará más información sobre la epidemiología molecular de DEN. En consecuencia, el conocimiento de los serotipos de DENV y genotipos circulantes en los brotes más recientes de DEN en México, además de la recombinación, contribuirá a la comprensión de las infecciones por DENV. Por otra parte, la recombinación en DENV no se ha descrito en cepas mexicanas, ni se ha descrito su importancia en la evolución del virus en lugares endémicos como Oaxaca y Veracruz, donde los cuatro serotipos de DENV están circulando. En síntesis, se obtuvieron 88 aislados de DENV, 27 de Oaxaca y 61 de Veracruz, de los 88 aislados, 16 fueron del serotipo 1, 62 serotipo 2, 7 serotipo 3, 2 serotipo 4 y un aislado tenía dos serotipos (DEN-2 y -1). Se obtuvieron secuencias parciales de nucleótidos de los genes que codifican para C-prM (14 secuencias) y el dominio helicasa NS3 (7 secuencias). El análisis filogenético demostró que los aislados de DENV-2 pertenecían al genotipo Asiático/Americano. El genotipo Asiático/Americano se dividió en dos grupos, uno con los aislados obtenidos en 2001 y el otro con los aislados de 2005-06 con un bootstrap del 94%. Para estudiar la recombinación en los aislados de Oaxaca, se obtuvo la secuencia de 6 diferentes cepas de DENV-2, genotipo Asiático/Americano del brote de 2005-06, una clona de la región de los genes estructurales C₍₉₁₎-prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎, y 10 clonas del gen E del aislado MEX_OAX_1656_05. La evidencia de recombinación se encontró mediante el uso de diferentes métodos, incluidos en dos programas: RDP3 y GARD. Las secuencias de los aislados de Oaxaca MEX_OAX_1656_05 y MEX_OAX_1038_05 en este estudio

fueron de virus recombinantes que incluyeron a su genoma, fragmentos de secuencia del genotipo Cosmopolitan. Por otra parte, la clona del gen *E*, MEX_OAX_1656_05_C07 fue también recombinante, incorporando a su genoma fragmentos de secuencia del genotipo Americano. En conclusión, se observó que DENV-2 fue el serotipo predominante en el brote de DF y DHF de 2005 y 2006 en el estado de Oaxaca, así como en el brote de 2006 y 2008 en el estado de Veracruz, con el genotipo Asiático/Americano como el más frecuente en ambos estados. Interesantemente, DENV-1 y DENV-2 fueron los serotipos relacionados con casos de DHF. En contraste, DENV-3 y DENV-4 estuvieron pobremente representados, lo que concuerda con los reportes epidemiológicos en México. También se demostró que en el residuo 106 de la proteína C, la Isoleucina fue reemplazada por una Valina en los aislados de los brotes de 2005-2006 y en las secuencias reportadas en los brotes de 1997, 1998 y 2001, en las islas del Caribe. Sugerimos que este cambio de aminoácidos puede ser utilizado como un marcador para los aislados provenientes de las islas del Caribe, que pertenecen al genotipo Asiático/Americano. Otros cambios de aminoácidos son específicos para los genotipos Asiático/Americano, Asiático I y Americano. Estos aminoácidos pueden ser utilizados como marcadores de genotipo o de origen geográfico. Nuestros resultados muestran por primera vez la recombinación en DENV-2 en México. Debido a la actividad recombinante, nuevas combinaciones genéticas fueron producidas, esto podría jugar un papel significativo en la evolución de DENV y debe ser considerada como un mecanismo potencialmente importante en la generación de variación genética de este virus con graves consecuencias para la formulación de vacunas y medicamentos, como ocurre para otros virus como el poliovirus, el virus de la influenza y el VIH. Estos resultados son muy importantes ya que permitirá diagnosticar el serotipo, el genotipo y la recombinación en cualquier paciente que presente DF o DHF.

INTRODUCCIÓN

El dengue (DEN) es una enfermedad febril transmitida por mosquitos del género *Aedes*. Esta enfermedad se distribuye principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Fig. 1) siendo la más importante de las transmitidas por vectores, generando de 50 a 100 millones de nuevos casos por año (Gluber, 1998). Debido a su amplia distribución, alto número de casos y su alto impacto económico es comparable a las principales enfermedades infecciosas re-emergentes como la malaria, la tuberculosis, la hepatitis y la meningitis (Torres y Castro 2007).

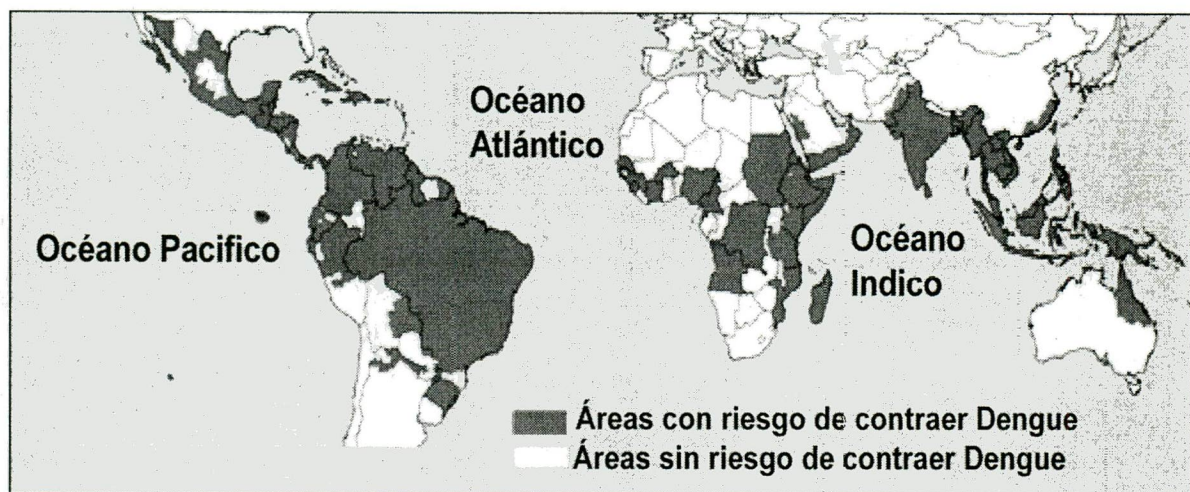


FIGURA 1. **Distribución de *Ae. aegypti* y de casos de DEN en el mundo.** Reportado por los Centers of Disease Control and Prevention (CDC) en 2008.

Las personas enfermas de fiebre de dengue clásico (DF por las siglas en inglés de *Dengue Fever*) presentan una fiebre aguda y debilidad, que generalmente no pone en peligro la vida del paciente; sin embargo, algunos pacientes desarrollan las formas graves de la enfermedad como el dengue hemorrágico (DHF por sus siglas en inglés *Dengue Hemorrhagic Fever*) que se caracteriza por presentar periodos de fiebre acompañado de hemorragias internas, hepatomegalia,

trombocitopenia y finalmente se puede desarrollar el síndrome de choque por Dengue (DSS por sus siglas en inglés *Dengue Shock Syndrome*) el cual se caracteriza por generar choque hipovolémico, coma y finalmente la muerte (Gibbons y Vaughn 2002).

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus del dengue (DENV por sus siglas en inglés) perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*, es un virus de ARN de una sola cadena con polaridad positiva, de una longitud aproximada de 11Kb y un solo marco de lectura abierto que codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales, flanqueado por dos regiones no codificantes (You *et al.*, 2001). Existen cuatro serotipos de DENV (DENV1-4) inmunogénica y genéticamente diferentes y que circulan al mismo tiempo en muchas regiones del mundo, cada serotipo se subdivide en varios genotipos dependiendo de su relación filogenética (Holmes y Twiddy 2003).

Se han descrito 6 genotipos para el DENV-2, cinco de los cuales son epidémicos para humanos (Asiático I y Asiático II restringidos al sudeste de Asia; genotipo Americano; genotipo Cosmopolita; genotipo Asiático/Americano) y uno selvático. DENV-1 está dividido en cinco genotipos epidémicos (I-V) y uno selvático. El DENV-3 se subdivide en 4 genotipos (I-IV) y aún no se encuentra el genotipo selvático. DENV-4 esta subdividido en 3 genotipos (I-III) y uno selvático (Holmes y Twiddy 2003; Holmes y Twiddy 2003; Zang *et al.*, 2006; Rico-Hesse 1990; Lanciotti *et al.*, 1994; Lanciotti *et al.*, 1997).

La re-emergencia del DEN es debida a múltiples factores que no han sido descritos completamente, sin embargo se han identificado: 1) La re-infestación de los vectores (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*) en los países tropicales y la falta de estrategias de control; 2) La urbanización mal planeada, mal manejo de desechos y un drenaje inadecuado; 3) El aumento en las vías de comunicación lo que ha

permitido una mayor distribución de los vectores, aumentando así el rango de distribución de las diferentes cepas de DENV (Black *et al.*, 2002).

Epidemiología del DEN.

La enfermedad de DEN es conocida en la literatura médica desde hace 200 años aproximadamente (Guzman 2005), pero fue caracterizada como epidemia hasta los años de 1950, cuando ocurrió un brote en la ciudad de Manila y la posterior diseminación de la enfermedad hacia el sureste asiático, apareciendo múltiples casos de DHF (Gubler 1998).

Aedes aegypti es el vector transmisor más importante del DENV en el ciclo mosquito-humano. Este es una especie del subgénero *Stegomyia* que se originó en el cinturón tropical de África. Este vector en la actualidad es endémico en varias regiones tropicales y subtropicales de diferentes partes del mundo, encontrándose predominantemente en áreas urbanas y suburbanas ocasionando que DEN se encuentre presente en más de 100 ciudades en África, el Mediterráneo Europeo, el Sudeste de Asia y América (Fig.1). Cincuenta millones de personas son infectadas cada año y cerca 500 000 son hospitalizadas de las cuales entre el 25,000 y 75,000 personas (entre el 5% y 15%) mueren (Gubler y Meltzer 1999).

En los años de 1960 se desarrollaron en el continente Americano intensas campañas para controlar a los vectores transmisores de DEN, logrando erradicarlo de la mayoría de los países Americanos, pero a principios de la década de 1970 estos programas fueron discontinuados y como resultado a finales de esta década el mosquito obtuvo una distribución más amplia de la que tenía antes de los años de 1960 (<http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue.htm>) y se ha mantenido hasta la actualidad (Fig. 2).

La primera epidemia de DF documentada en laboratorios para las Américas estuvo relacionada con el serotipo DENV-3 y afectó a la Cuenca del Caribe y a

Venezuela entre los años de 1963-1964. Con anterioridad, solo se había aislado el DENV-2 en Trinidad, durante 1953-1954, en una situación no epidémica. En 1968-1969, otra epidemia afectó a varias islas del Caribe y en su transcurso se aislaron los serotipos DENV-2 y DENV-3. (<http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/vbd/arias-dengue.htm>).

El primer brote que reportó casos de DHF ocurrió en Cuba en 1981 y se relacionó con la presencia de cepas del sudeste asiático de DENV-2 en la isla (Guzman *et al.*, 1984; Guzman *et al.*, 1990), posteriormente Perú, Ecuador, Brasil y Bolivia, sufrieron brotes explosivos de DF y DHF y DSS. Desde entonces se considera al DEN como una enfermedad re-emergente, diez años más tarde 11 países del continente habían sufrido brotes con casos de DHF y se habían reportado cepas de los 4 serotipos de DENV en el continente (Monath 1994) para el año 2008 casi todos los países de las Américas han reportado casos de DHF incluyendo Argentina, Paraguay y Chile (Aviles *et al.*, 1999; Aviles *et al.*, 2001; Perret *et al.*, 2003).

En México el primer brote de DF ocurrió en 1979 y estuvo relacionado con DENV-1 en el estado de Yucatán, en 1984 se reportó el primer brote con casos de DHF en el estado de San Luis Potosí, reportándose la presencia de DENV-2 y DENV-4, a partir de 1990 el reporte de casos se disparó en prácticamente todo el país. Hasta el año de 1994 se reportó la presencia de DENV-3, la co-circulación de los cuatro serotipos de DENV en el país esta relacionada con el aumento en el número de casos de DHF (Fig. 3) en todo el país (www.cenave.gob.mx/dengue.htm).

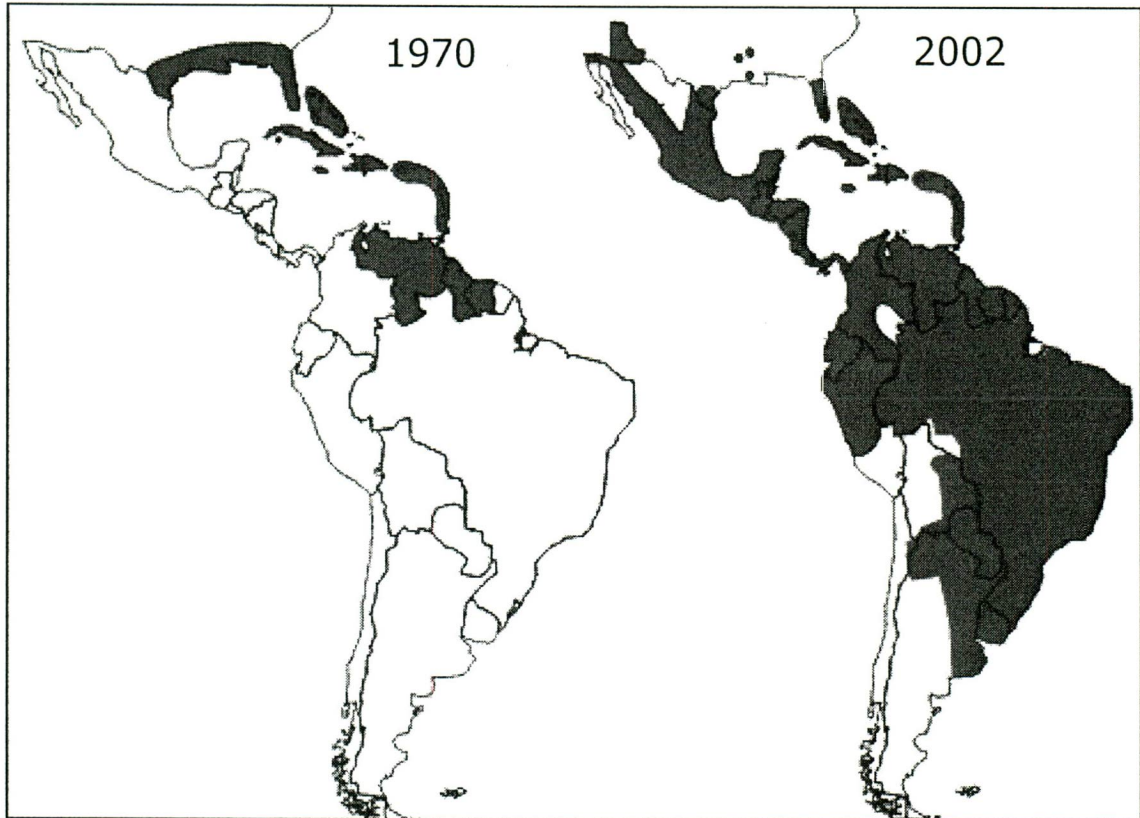


FIGURA 2. **Reinfestación de *Ae. aegypti* en las Américas.** Distribución del *Ae. aegypti* en las Américas en 1970, al final de la campaña de erradicación en el 2002. Reportado por el "Centers of Disease Control and Prevention" (CDC).

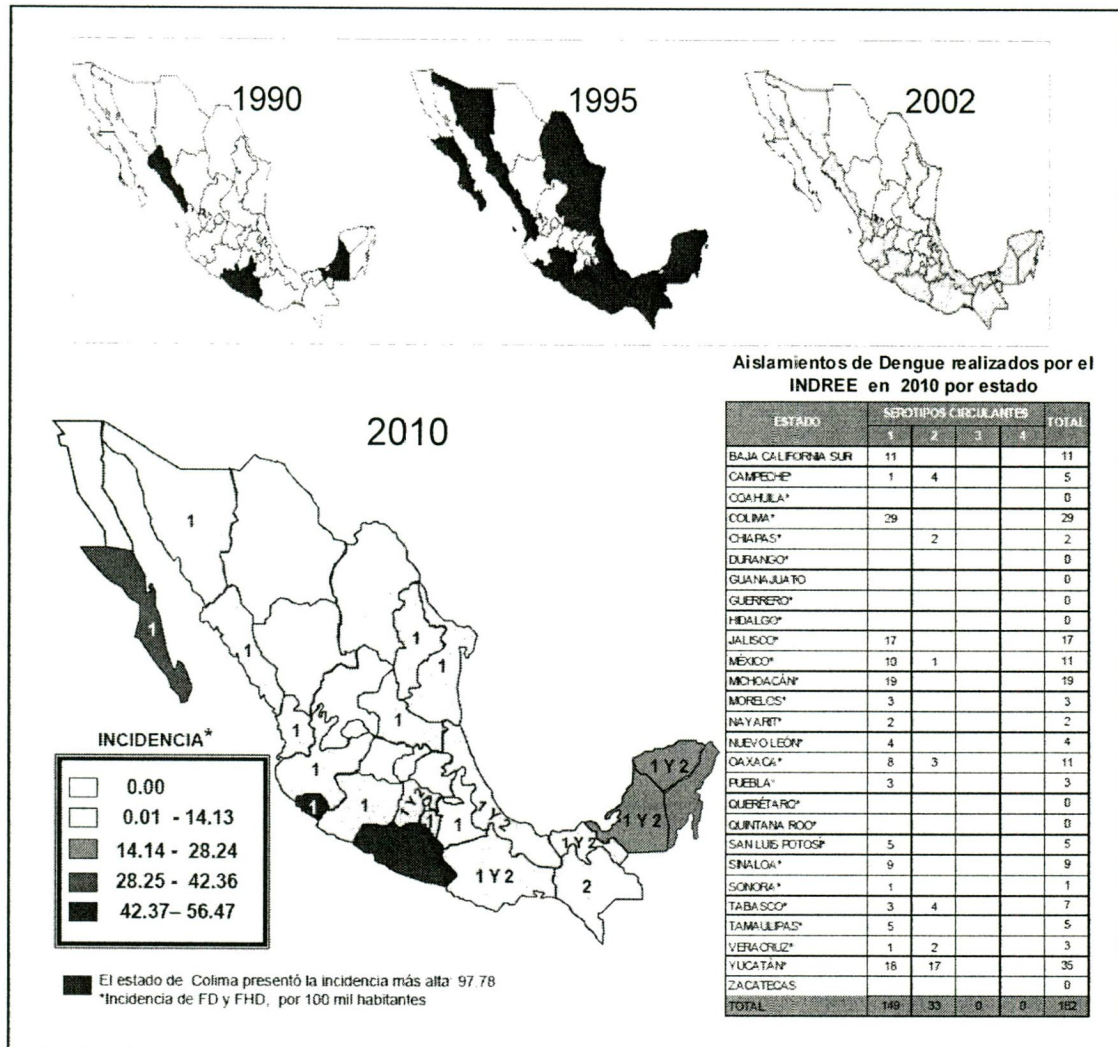


FIGURA 3. **Casos de DF en la republica Mexicana de 1990-2010.** Para el año 2010 se reportan el número de casos y los Serotipos de dengue por entidad federativa. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE).

Ciclo de infección.

La transmisión del DENV ocurre en dos ciclos: El primero es un ciclo endémico entre humanos y mosquitos, que por un lado permite mantener reservorios del virus y por otro permite la circulación de estos reservorios entre mosquitos peridomésticos (mosquitos que circulan en ambientes domésticos) y otras especies de *Aedes* que actúan como vectores secundarios. El ciclo endémico, es completamente diferente tanto evolutiva, como ecológicamente del ciclo selvático del que surgió y es dependiente principalmente de la ecología y el comportamiento de *Ae. aegypti*. Este mosquito pone sus huevos en recipientes próximos a las viviendas donde se almacena agua, entra fácilmente a las casas, y tiene múltiples periodos de alimentación durante cada ciclo de producción de los huevos. Este comportamiento lo provee de una mejor capacidad para transmitir al DENV a más de un humano hospedero (Harrington *et al.*, 2001).

El segundo es el ciclo silvestre, este ocurre entre los primates no humanos y varias especies de mosquitos de *Aedes* de diferentes zonas de África Occidental y Malasia (Gubler 1988; Gubler 1994). En Malasia existen los 4 serotipos de DENV, los cuales se han mantenido seguramente gracias a su circulación entre *Ae. niveus* y varios primates no humanos (Rudnick 1965). Los serotipos, DENV-1, -2 y -4 se han aislado de monos centinelas y se ha observado seroconversión contra DENV-1, -2 y -4.

En África occidental, el DENV-2 selvático ha sido aislado de mosquitos arborícolas de las especies *Ae. africanus*, *Ae. leuteocephalus*, *Ae. opok*, *Ae. taylori* y *Ae. furcifer* (Cordellier *et al.*, 1983; Roche *et al.*, 1983) además estos virus se han encontrado infectando humanos en el este de Senegal (Monlun *et al.*, 1992; Saluzzo *et al.*, 1986). Cabe mencionar que los virus selváticos son genéticamente distintos a los virus endémicos, (Gubler, 1994; Rico-Hesse, 1990; Wang *et al.*, 2000).

Cuadro clínico del DEN.

Los síntomas de DF en una persona infectada aparecen después de tres o cuatro días de ser picado por un mosquito infectado. En niños menores de 15 años el DF puede ser asintomático o poco sintomático y a veces las molestias duran solo un día, los casos sintomáticos ocurren generalmente en adolescentes y adultos y aparecen abruptamente con temperatura alta acompañada de mialgias, artralgias, náuseas, vómito y erupciones cutáneas. (Carrington *et al.*, 2005). En ocasiones se acompaña de equimosis, e incluso hemorragias menores por un periodo aproximado de tres a siete días (Malavige *et al.*, 2004).

El DHF se caracteriza por un aumento en la permeabilidad capilar y defectos en la coagulación. Cuando se intensifican los síntomas aparecen hemorragias espontáneas, como epistaxis, gingivorragia, sangrado urogenital e incluso sangrado masivo del tubo digestivo. El dato cardinal para el diagnóstico de DHF es la presencia de trombocitopenia y hemoconcentración (Oliveira *et al.*, 2004). Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) existen cuatro etapas entre el DHF y el DSS (Fig. 4) que no necesariamente son consecutivas. El DSS se caracteriza por hipovolemia secundaria por extravasación del plasma al espacio extravascular, hipotensión y pulso filiforme (Moncayo *et al.*, 2004). No existe un medicamento que por el momento contrarreste los síntomas; sin embargo, recientemente han surgido medicamentos que presentan buenos resultados en el control de los síntomas, sin embargo todavía están en fase experimental (Talarico *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

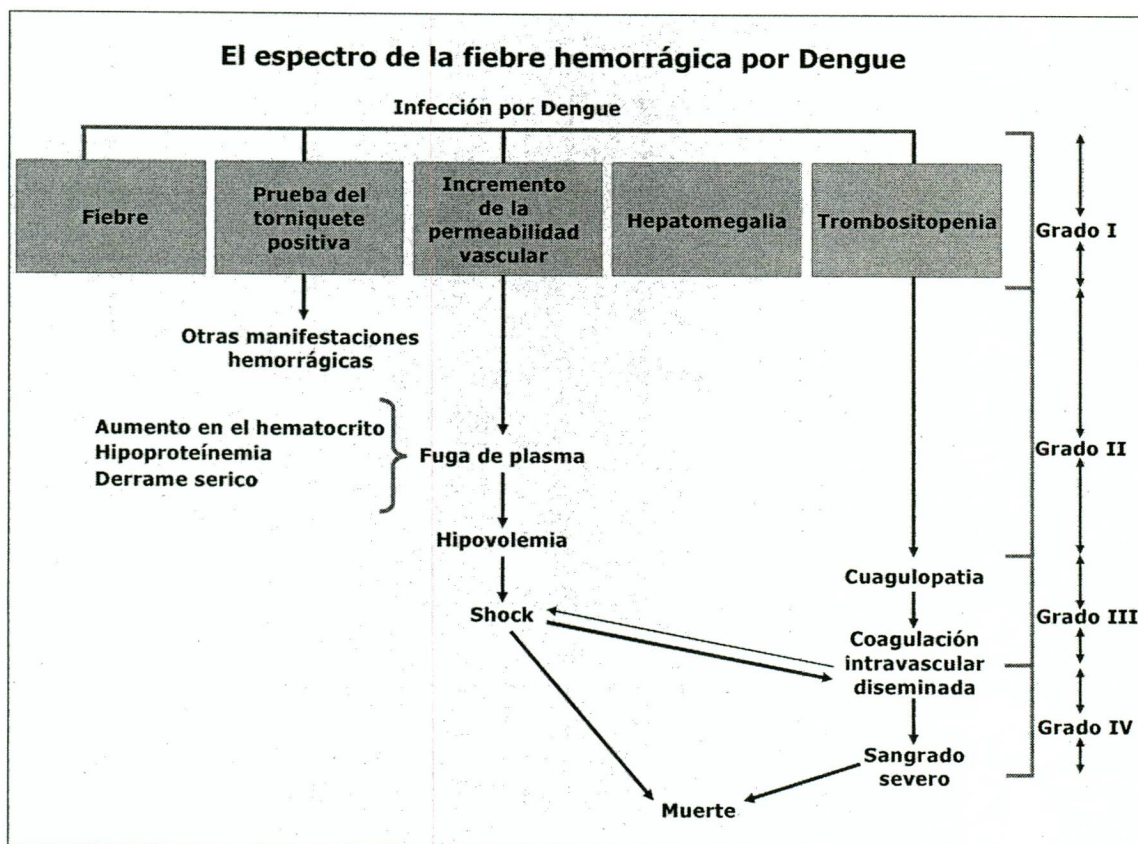


FIGURA 4. Los diferentes grados de DHF conforme a la Organización Mundial de la Salud. Publicado en la página de la Organización Pan-Americana de la Salud (PAOH) <http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/vbd/arias-dengue.htm..>

Factores que influyen para desarrollar DHF.

El incremento en el número de casos de DHF y DSS en el mundo aún no es completamente entendida, pero sabemos que influyen factores ambientales [latitud, altitud, temperatura, humedad], factores sociales [densidad poblacional, estado socioeconómico, ubicación de las viviendas, aprovisionamiento y almacenaje de agua, hábitos de limpieza], factores del huésped [edad, condiciones de salud, estado de su sistema inmunológico, nutrición] (Kalayanarooj y Nimmannitya 2005), factores del vector [capacidad y competencia vectorial] (Moncayo *et al.*, 2004) y factores del DENV [virulencia de los diferentes serotipos y genotipos] (Messer *et al.*, 2003; Cologna y Rico-Hesse 2003; Cologna *et al.*, 2005; Vasilakis *et al.*, 2007).

En el mundo, los nuevos estilos de vida han permitido aumentar la densidad poblacional del mosquito *Ae. aegypti* proporcionando más lugares de cría de larvas y sus hábitos domésticos lo han convertido en el vector con mayor capacidad vectorial para transmitir el DENV, a pesar de que existen especies con mejor competencia vectorial [factores genéticos que influyen en la habilidad del vector para transmitir un patógeno] (Moncayo *et al.*, 2004). Del mismo modo, el aumento en el número de viajes aéreos y terrestres se ha traducido en la circulación de cepas de DENV entre diferentes focos de transmisión, proporcionando una mayor oportunidad para la infección secuencial de las poblaciones humanas por 2 o más serotipos de DENV, generando un aumento en la incidencia de DHF (Weaver y Vasilakis 2009).

La gran limitación para conocer la patología de DENV es la falta de modelos animales o procedimientos *in vitro* que repliquen la viremia y los síntomas de la enfermedad que ocurre en el humano, por lo que es difícil conocer los mecanismos de patogenicidad exactos, y los factores que determinan la virulencia y el grado de virulencia del DENV (Blaney *et al.*, 2005; Hanley *et al.*, 2004; Men *et al.*, 1996).

Anteriormente se pensaba que los monocitos y macrófagos, eran los primeros blancos de DENV; sin embargo, ahora sabemos que las células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) como las células de Langerhans son el primer tipo celular que es infectado por el DENV (Cologna y Rico-Hesse, 2003). Actualmente se sabe que en etapas tempranas de la infección el virus, también infecta células endoteliales (Avirutnan *et al.*, 1998), epiteliales (Bosch *et al.*, 2002), fibroblastos (Diamond *et al.*, 2000), y hepatocitos (Hilgard y Stockert 2000).

La infección causada por alguno de los cuatro serotipos de DENV confiere inmunidad específica permanente contra el este serotipo involucrado, pero no protege contra un serotipo diferente. En una infección secundaria con un serotipo diferente de DENV, los anticuerpos son no neutralizantes contra éste nuevo

serotipo, permitiendo el acceso del DENV a células que presentan receptores a la fracción cristalizante de los anticuerpos (FcγR por sus siglas en inglés), infectándolos y por lo tanto, incrementa el espectro de blancos celulares. Esto ocasiona el incremento del título viral en el torrente sanguíneo (Fig. 5), y provoca una activación extensiva de la vía del complemento, así como un incremento de la apoptosis celular y la activación del sistema inmune, desencadenando hemorragias; a este fenómeno se le conoce como respuesta inmune aumentada dependiente de anticuerpos [ADE por sus siglas en inglés] (Halstead 1988; Halstead 2003).

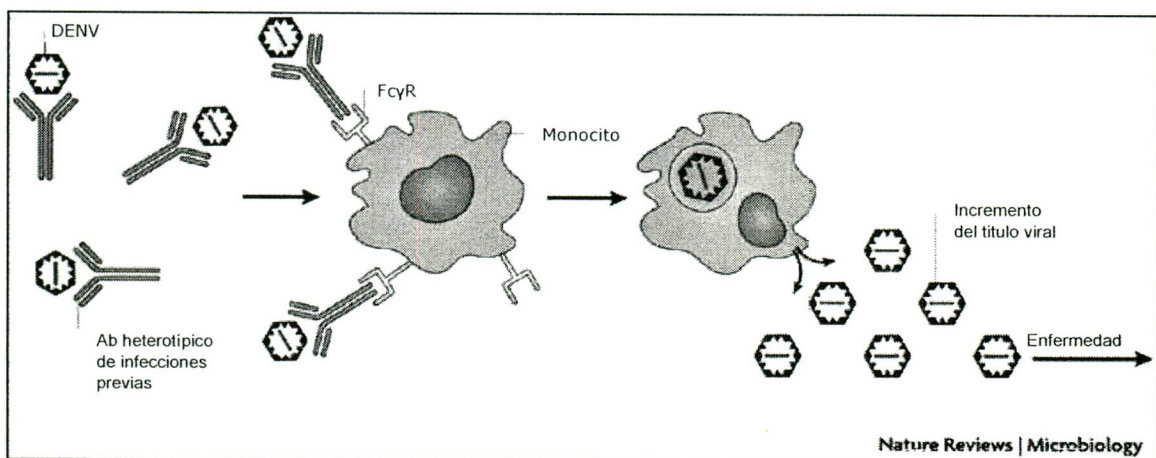


FIGURA 5. **Respuesta inmune aumentada dependiente de anticuerpos.** Anticuerpos no neutralizantes permiten la entrada de DENV a células con FcγR aumentando el título viral en el plasma y provocando una respuesta inmune exagerada en pacientes con DHF y DSS. Diagrama tomado de Whitehead *et al.*, (2007).

Sin embargo, reportes epidemiológicos sugieren que existen factores del DENV que pueden afectar su virulencia (como el serotipo, el genotipo, la estructura del genoma viral, etc.) ya que se han reportado casos de DHF en pacientes con infecciones primarias de DENV. Las cepas de DENV-2 de genotipos originados en Asia son más virulentas que las cepas del genotipo Americano (Harris *et al.*, 2000; Leitmeyer *et al.*, 1999; Rico-Hesse *et al.*, 1997). El análisis de las secuencias del genoma permite predecir las estructuras del ARN en las regiones no codificantes (NCR por sus siglas en inglés) muy diferentes entre los genotipos de origen Asiático y Americano del DENV (Leitmeyer *et al.*, 1999). Esto podría ser la causa de que las cepas del genotipo Americano se repliquen con menor eficiencia comparado con las

cepas de genotipo Asiático (Pryor *et al.*, 2001; Cologna y Rico-Hesse, 2003; Vasilakis *et al.*, 2007).

Otro factor que se ha considerado importante para la virulencia del virus es el aminoácido 390 localizado en la proteína E, ya que en este residuo se encuentra el motivo de unión a glicosaminoglicanos, el cual es responsable de la unión de DENV a las células blanco, en los genotipos de origen asiático y selvático. Este residuo es una Asparagina (N) mientras que en la mayoría de las cepas del genotipo Cosmopolita es una Serina (S) y en las cepas del genotipo Americano es ácido Aspártico (D) (Twiddy *et al.*, 2002); se ha observado que las cepas que tienen ácido Aspártico disminuyen su virulencia en ratones (Sanchez y Ruiz 1996). Lo que nos sugeriría que los cambios en el genoma viral afectan directamente la virulencia del DENV y que estos cambios al estar conservados en los genomas de cada genotipo podrían considerarse como indicadores de virulencia.

ANTECEDENTES

El DENV.

El DENV es un virus animal transmitido entre huéspedes susceptibles, por artrópodos hematófagos (arbovirus), se incluye en la familia *Flaviviridae* que agrupa a virus de ARN de cadena positiva y al género *Flavivirus* (Lindenbach y Rice 2003).

Los viriones son partículas envueltas, esféricas y lisas (Fig. 6) de 40-50nm de diámetro, el exterior está formado por homodímeros antiparalelos de la proteína de envoltura (E), intercalados, hay monómeros de la proteína de membrana (M) que en su estado inmaduro tiene un péptido (prM) que es procesado antes de que el virus salga de la célula huésped. En el interior de la envoltura se encuentra la nucleocápside, formada por un icosaedro de proteína de cápside (C) que contiene el genoma en forma de ácido ribonucleico (ARN) (Kuhn *et al.*, 2002).

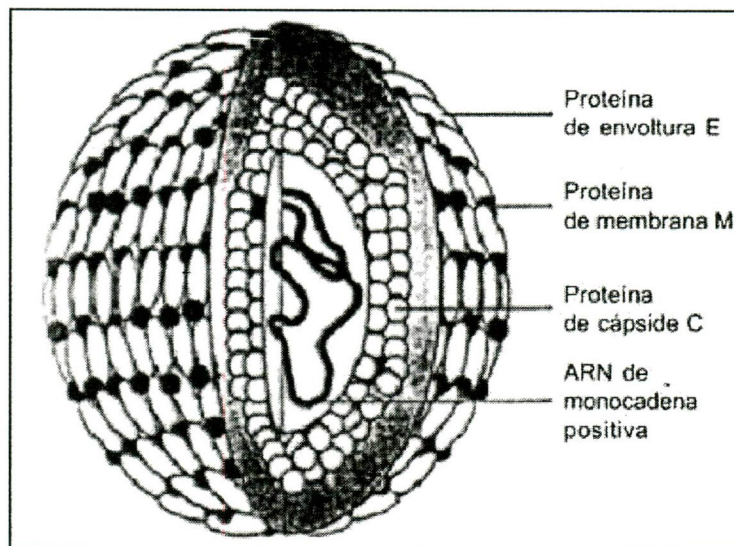


FIGURA 6. **Estructura del DENV. Proteínas.** Tomado de www.encolombia.com/medicina/academedia/.

El genoma de ARN consiste en una hebra sencilla con polaridad positiva que presenta un solo marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) y que codifica para tres proteínas estructurales (C, prM-M y E) y para siete proteínas no estructurales (NS1-5). El ORF se traduce en una sola poliproteína que es procesada en las diez proteínas virales por la proteasa viral formada por el dímero NS2B-NS3 y proteasas del huésped (Fig. 7). El ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR por sus siglas en inglés) 5' y 3' los cuales son relevantes para el inicio y regulación de la replicación en el virus (Rothman, 2003).

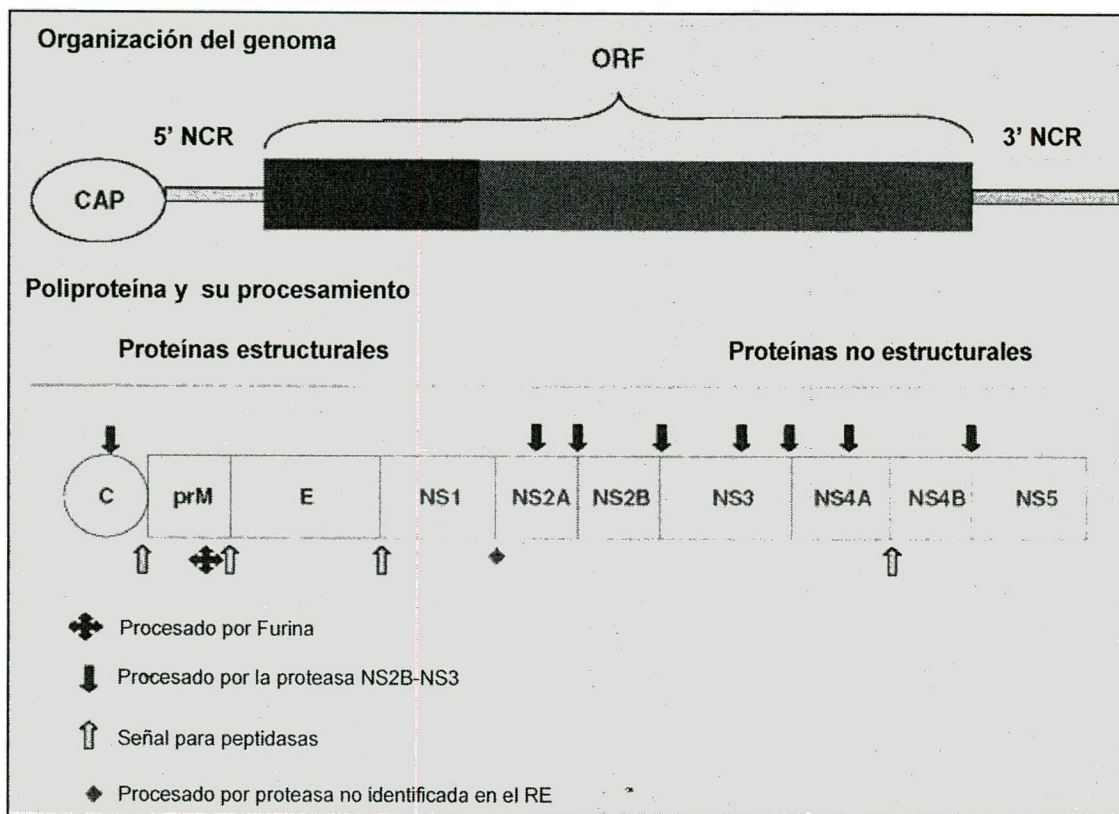


FIGURA 7. El genoma del DENV y sitios del procesamiento de la poliproteína. Tomado de Melino y Paci 2007.

Biología Molecular del DENV.

En el proceso de infección el virus se une a un receptor de superficie celular por medio de la proteína E (Zhang *et al.*, 2005). La proteína E es una proteína tipo I,

cada monómero está plegado en tres dominios distintos llamados: Dominio I (DI), que es el dominio central y está en el N-terminal; Dominio II (DII) que tiene la función de formar dímeros con otro DII; Dominio III (DIII) que tiene la estructura de tipo globulina, formado por los residuos 303 al 395 del C-terminal y es el encargado del reconocimiento al receptor y unión a las células blanco.

En cuanto a los receptores de las células de mosquito y de las células de mamífero, Cruz (1996) identificó por medio de ensayos de *overlay* varias proteínas que se unen al DENV, dentro de éstas la más prometedora fue un péptido de 65 KDa que fue identificado en células C6/36 y en el intestino medio de *Ae. aegypti*. Posteriormente Salas-Benito y Del Ángel (1997) reportaron dos proteínas de células C6/36 de 40 y 45 KDa que se unen de manera específica al DENV-4. Muñoz *et al.*, (1998) identificaron 4 péptidos de 80, 79, 67 y 19 KDa además del de 65 KDa, que se unen al virus del DENV-2 y por medio de ensayos de inmunofluorescencia demostraron que anticuerpos contra estas proteínas bloqueaban la unión del virus a células en cultivos.

Mercado-Curiel *et al.*, (2006) evidenciaron que los cuatro serotipos del DENV reconocen los mismos péptidos de membrana de células C6/36, estas son proteínas con pesos moleculares aparentes de 67 y 80KDa. Estos autores localizaron proteínas con el mismo peso molecular en células epiteliales del intestino medio de los mosquitos *Ae. aegypti*. En cuanto a receptores celulares de mamífero Chee y AbuBakar (2004) detectaron una proteína de 48 kDa que se une al virus y usando espectrometría de masas determinaron la homología de esta proteína con cadenas de tubulina (alfa y beta).

También se han propuesto como receptores a las lectinas tipo C presentes en células dendríticas. Las lectinas son moléculas de carbohidratos del tipo de alta manosa que están presentes en los viriones producidos en células de insectos (Tassaneeritthep *et al.*, 2003).

En macrófagos y monocitos, el DENV entra por medio de los receptores Fc γ (Halstead, 2003). Para las células que carecen de receptores Fc, se han propuesto una gran variedad de receptores celulares los cuales varían en su estructura química, y generalmente son de naturaleza proteica (Muñoz *et al.*, 1998; Moreno-Altamirano *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Reyes del Valle *et al.*, 2005), glicoproteínas (Marianneau *et al.*, 1996), heparán sulfato (Chen *et al.*, 1997) y proteínas asociadas a LPS/CD14 (Chen *et al.*, 1999).

Después de la fusión y entrada del DENV, el primer evento es la traducción del ARN genómico en una poliproteína. El complejo de ARN-ribosomas-proteína naciente se ancla en el retículo endoplásmico (RE), el procesamiento de la poliproteína viral continúa en asociación con el RE. El corte en NS1-NS2A ocurre después de la síntesis por una proteasa desconocida del huésped, mientras que los cortes en C-prM, prM-E, E-NS1 y NS4A-NS4B son realizados por peptidasas del huésped residentes en el ER, los cortes en NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A y NS4B-NS5 son realizados por la serin-proteasa NS2B-NS3 (Falgout *et al.*, 1991).

La proteína prM tiene un papel esencial en la maduración del virus y en el plegamiento correcto de la proteína E (Stiasny y Heinz 2006). La proteína NS1 (42-50kDa) es una proteína de anclaje a membrana que forma dímeros glicosil-fosfatidilinositol N-glicosilados y que participa en el complejo de replicación del ARN viral. NS2A es una proteína de 22 KDa relacionada con la replicación y empaquetamiento del ARN viral (Khromykh *et al.*, 2001); NS2B es una proteína de 14KDa asociada a membrana y que junto con la NS3 forma y activa la serin-proteasa que ayuda a la maduración de la poliproteína viral.

La proteína NS3 es una proteína multifuncional que además de contar con el dominio de proteasa (NS3pro) en el extremo N-terminal, tiene un dominio de ARN helicasa activo en el complejo de replicación, un dominio de ARN-trifosfatasa y un

dominio de ARN NTPasa en la región C-terminal. Los dominios de la proteasa y la NTPasa comparten una región entre los residuos 160 y 180. La ARN trifosfatasa forma parte del *capping* del ARN viral (Gorbalenya *et al.*, 1989).

Las proteínas NS4A y NS4B que son proteínas hidrofóbicas pequeñas de 16 y 27 KDa respectivamente, las han encontrado asociadas a las membranas celulares, sin embargo, sus funciones aun no están bien definidas (Mackenzie *et al.*, 1996).

La proteína NS5 se caracteriza por un dominio de metiltransferasa en el extremo N-terminal y por una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP por sus siglas en inglés) localizada en su dominio C-terminal (Koonin 1993; Tan *et al.*, 1996) y es la que se encarga de formar nuevas cadenas de ARN viral. La NS5 se asocia a la unión NTR5'-NTR3' para formar el complejo de replicación (Chiu *et al.*, 2005).

La proteína C se asocia al ARN genómico del virus para formar una nucleocápside icosaédrica, que posteriormente adquiere una bicapa lipídica que junto con la proteína E y M forman la envoltura del virus. Las partículas inmaduras son transportadas a través de la vía secretoria a la superficie celular para su liberación (Zybert *et al.*, 2008).

ESTADO DEL ARTE

Evolución del DENV.

Los análisis filogenéticos de muchos Flavivirus ha revelado períodos de tiempo relativamente largos entre cada linaje y su diversificación, lo que indica que durante su evolución existió un momento de "auge" y uno de "caída" es decir existe un periodo de tiempo de intensa diversificación seguido de un periodo de extinción y pérdida de linajes (Zanotto *et al.*, 1996). Ejemplo de este modelo son los cuatro serotipos de DENV, que parecen estar en un período de intensa radiación biológica (adaptándose rápidamente a los ambientes nuevos y generando variedades de virus que son posteriormente dispersados por el vector hacia nuevos nichos), desde su aparición después de la Segunda Guerra Mundial (Holmes y Twiddy 2003).

El aumento en el número de secuencias de DENV ha permitido la obtención de análisis filogenéticos más robustos. Los primeros estudios de los 4 serotipos DENV mostraron múltiples linajes, a menudo relacionados en su localización geográfica, y en ocasiones relacionados con la gravedad de la enfermedad (Holmes y Twiddy 2003).

El análisis filogenético de los genotipos observados en las epidemias y de los genotipos selváticos de los diferentes serotipos de DENV, refuerzan la teoría de que el ciclo selvático es el ciclo ancestral y que por zoonosis se originaron los ciclos epidémicos de cada uno de los cuatro serotipos de DENV (Fig. 8). Con diferentes estudios filogenéticos se ha calculado que DENV-2 surgió hace aproximadamente 1000 años, DENV-4 hace 600 años y DENV-1 hace 200 años (Weaver y Vasilakis 2009). Otro punto que apoya la teoría del origen selvático es el hecho de que *Ae. aegypti* es el vector adaptado para la transmisión del DENV en humanos desde hace apenas 300 o 400 años.

Por otro lado los estudios filogenéticos de cada uno de los serotipos de DENV muestran que éstos forman grupos separados unos de otros por una divergencia de entre el 8-6%, a cada grupo se le ha dado el nombre de subtipo o genotipo (Rico-Hesse, 1990; Lewis *et al.*, 1993; Lanciotti *et al.*, 1994; Lanciotti *et al.*, 1997).

De los 6 genotipos de DENV-2 descritos, cinco son específicos para humanos y uno es selvático, los genotipos epidémicos tienen correlación con la situación geográfica de los brotes que originan. Los genotipos Asiático I y Asiático II se han reportado en brotes ocurridos en el sudeste de Asia (Holmes y Twiddy, 2003).

El genotipo Americano fue el más común en los brotes ocurridos en todo el continente Americano hasta antes de la década del año 2000; el genotipo Cosmopolita ha sido reportado en distintos brotes alrededor del mundo (Holmes y Twiddy, 2003; Zang *et al.*, 2006); el genotipo Asiático/Americano, es el más reciente y ha sido reportado desde 1980 en diferentes brotes ocurridos en el continente Americano. Por análisis filogenia ubican su origen en el continente asiático (Rico-Hesse, 1990).

DENV-1 está dividido en cinco genotipos epidémicos (I-V) y uno selvático. Las secuencias de DENV-3 se subdividen en 4 genotipos (I-IV) y aun no se encuentra el genotipo selvático. DENV-4 esta subdividido en 3 genotipos (I-III) más uno selvático (Lanciotti *et al.*, 1994; Lanciotti *et al.*, 1997).

Recombinación en Dengue.

El ensamblaje discontinuo de moléculas de ARN es una propiedad de la mayoría de los virus de ARN, éste se encuentra bajo el control de procesos de recombinación que son totalmente diferentes a los procesos que ocurren en las células y generalmente ocurren durante la replicación viral, siendo la replicasa viral la que tiene funciones de recombinasa (Lai, 1992). En grupos taxonómicos virales como

los virus de la familia *Togaviridae* y los *Coronaviridae*, existen miembros que tienen genes homólogos en diferente orden dentro de su genoma, indicando que la recombinación ha sido importante durante su evolución (Worobey y Holmes, 1999).

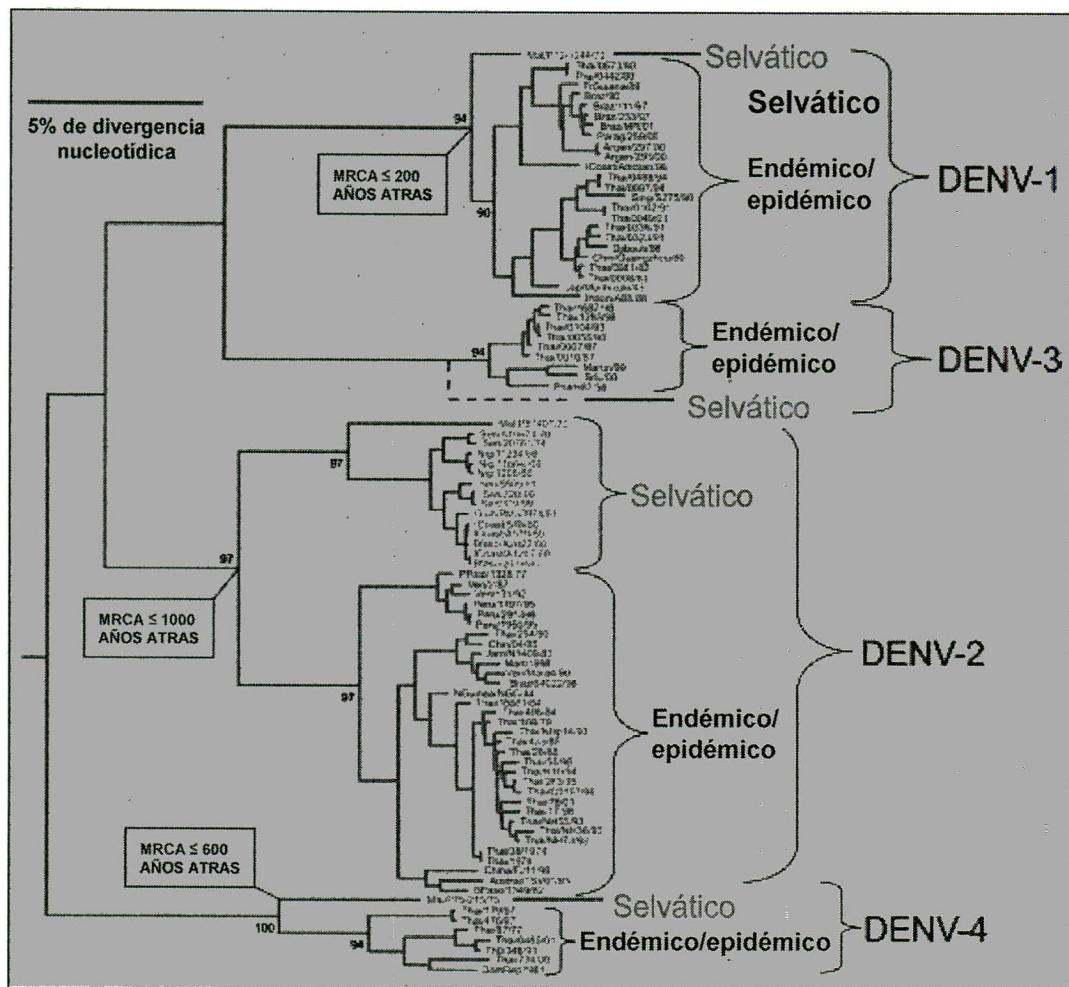


FIGURA 8. Relación filogenética de los cuatro serotipos de DENV. El árbol fue obtenido con los marcos de lectura abierto completos obtenidos del GenBank. La filogenia fue inferida usando análisis Bayesiano con un millón de repeticiones. Obtenido de Weaver y Vasilakis, 2009.

En la naturaleza existen tres tipos diferentes de recombinación: la recombinación homóloga o de tipo I, cuando se recombinan dos cadenas de ARN viral que tienen el mismo origen y la recombinación es de región por región (Fig. 9);

recombinación aberrante o de tipo II, cuando dos secuencias homólogas recombinan y en el proceso se adquieren o pierden genes; y finalmente la recombinación no homóloga o de tipo III, cuando se recombinan dos cadenas de ARN que tienen un origen o secuencias diferentes independientemente de que el intercambio sea región por región o no (Lai, 1992).

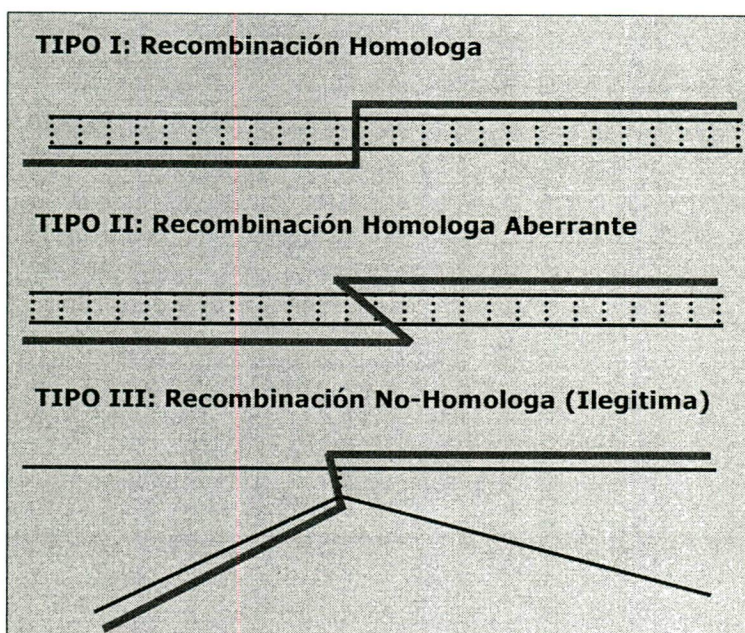


FIGURA 9. **Tipos de recombinación de ARN.** Las líneas oscuras representan las moléculas recombinantes de ARN. Las líneas verticales representan los nucleótidos homólogos. Esquema tomado de Lai, (1992).

Para explicar como ocurre la recombinación en los virus de ARN, el modelo más aceptado, es conocido como "elección de copia" (*copy choice*) y supone que durante la replicación viral existen secuencias de material genético viral en diferentes estados de desnaturalización, unos con estructuras secundarias y terciarias estables y otros totalmente lineales, cuando los genomas no desnaturalizados se empiezan replicar, las regiones con estructuras detienen la polimerización de la nueva cadena y ocasionan que el complejo de replicación se

suelte de la secuencia templete, liberando al complejo de replicación unido a la hebra de ARN naciente, los cuales se unen a otro genoma que esta totalmente desnaturalizado, y continua la replicación hasta completarla (Fig. 10A), generando así una secuencia recombinante (Chi-Ping *et al.*, 2005).

Por otra parte también supone que la formación de dúplex o heterodúplex entre dos cadenas de ARN desnaturalizado, durante la replicación puede generar secuencias recombinantes (Fig. 10B) ya que en este caso el complejo de replicación cambia de una secuencia a otra sin romper el dúplex (Figlerowicz 2000; Balakrishnan *et al.*, 2003; Wiercholawki, 2003).

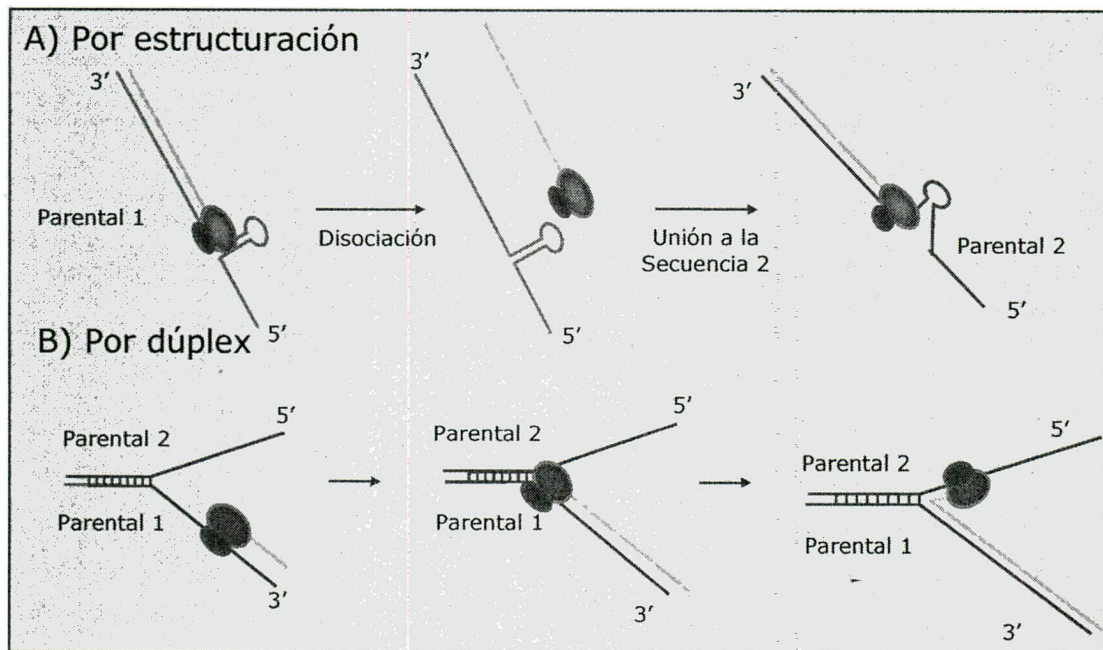


FIGURA 10. **Modelo de "elección de copia" para la recombinação del ARN viral.** El proceso puede ocurrir por la estructuración del ARN (A) o por la formación de dúplex. Esquema basado en los datos de Brunier *et al.*, (1988); Cheng *et al.*, (2005).

Los análisis de secuencias por métodos filogenéticos han proporcionado nuevas herramientas estadísticas muy eficientes para evidenciar y caracterizar eventos de recombinação en virus de ARN, que con los métodos tradicionales tanto *in vivo* como *in vitro* serian muy difíciles de observar (Smith y Smith, 1998; Worobey y Holmes, 1999) ya que al agrupar las secuencias, las recombinantes

generan conflictos porque no se ubican en grupos definidos de forma clara y al analizar la distancia genética, estas secuencias presentan cambios bruscos de identidad de un tipo de secuencias hacia otra (Fig. 11).

En general era aceptado que en la familia *Flaviviridae* la principal causa que generaba diversidad genética en los virus eran los errores que la RdRp cometía en cada ciclo de replicación (Steinhauer *et al.*, 1992). Ahora sabemos que el DENV puede cambiar en determinadas regiones gracias a periodos selectivos rápidos (*periodic selective sweeps*) (Bennett *et al.*, 2003), y también por recombinación homóloga intra-serotipo (Holmes *et al.*, 1999; Tolou *et al.*, 2001; Worobey *et al.*, 2001; AbuBakar *et al.*, 2002; Domingo *et al.*, 2006)

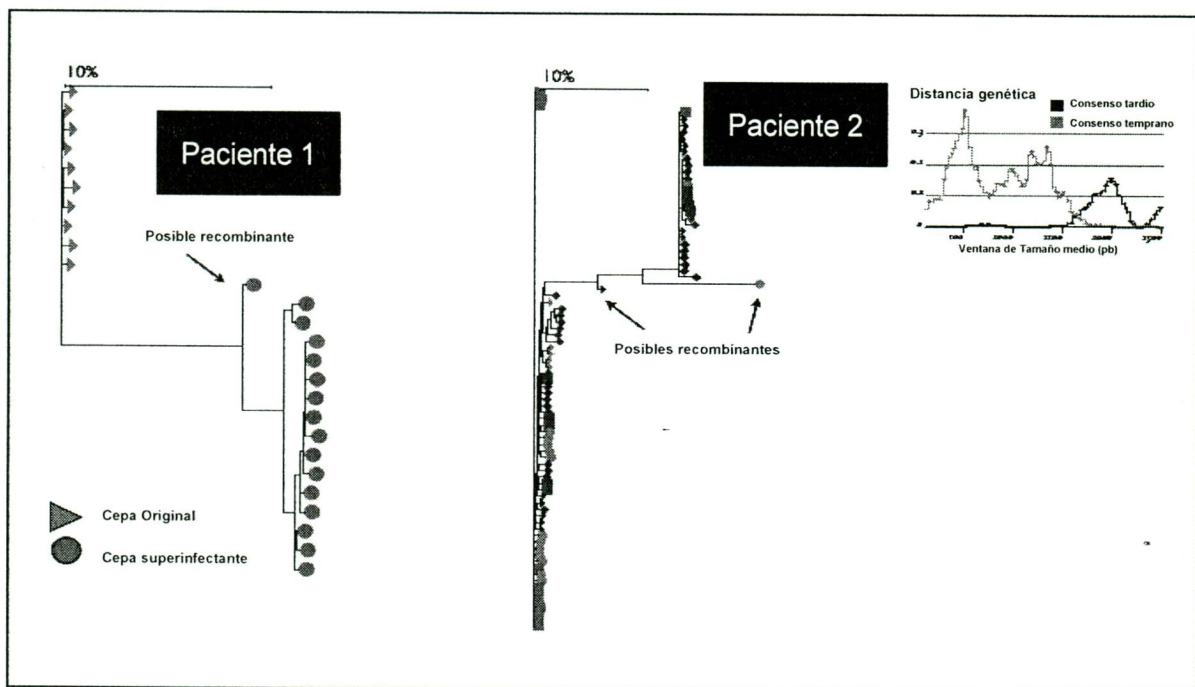


FIGURA 11. **Conflictos filogenéticos por recombinación.** Las secuencias recombinantes no se ubican de forma consistente entre los grupos que arroja una reconstrucción filogenética y al analizar la distancia genética de estas secuencias observamos que estas secuencias realmente son un mosaico de los dos grupos de secuencia. Tomado de Kosakovsky-Pond *et al.*, (2005).

La recombinación en DENV ha sido ampliamente debatida porque no existen evidencias claras de como ocurre, sin embargo los reportes de recombinación, sobretodo entre genotipos de DENV-1 (Toluo *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2008) así como en otros miembros de la familia *Flaviviridae* han aumentado considerablemente en los últimos años (Bernardin *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; Legrand-Abravanel *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2006). La recombinación en DENV fue reportada principalmente en los genes estructurales particularmente en el gen de la proteína *E*, y recientemente también se ha reportado en los genes no estructurales (Worebey *et al.*, 1999). Hasta el momento la recombinación en dengue no parece tener patrones comunes que permitan la determinación de puntos calientes de recombinación (Worobey *et al.*, 1999).

Para que la recombinación exista, es necesario que una célula sea infectada con más de una cepa viral y que la recombinación genere cepas capaces de replicarse y transmitirse. La co-circulación de múltiples poblaciones de DENV en un mismo sitio y la capacidad del vector de picar a más de una persona, incrementa la oportunidad para que el mosquito vector ingiera diferentes cepas de DENV, o que un hospedero sea picado por diferentes mosquitos infectados con distintas variedades de DENV [Gluber *et al.*, 1985; Twiddy *et al.*, 2002; Wang, 2003]. Estas condiciones existen en México, el Caribe y el sudeste de Asia, sin embargo en México no existen estudios que nos permitan saber si existen cepas recombinantes y como están afectando la epidemiología de la enfermedad.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

México es uno de los países que cada año presenta brotes de DEN y en el cual se han reportado circulando a los cuatro serotipos de DENV; sin embargo, no existen estudios suficientes que analicen la circulación de los diferentes serotipos, los cambios moleculares en la secuencia de aminoácidos ocasionados por mutaciones ni por los procesos de recombinación los cuales pueden afectar la evolución de estos virus, lo que permitirá conocer mejor la biología y epidemiología del DENV y saber si estos factores están influyendo en el aumento del número de casos de DHF y DSS en el país. Los datos epidemiológicos del DEN en México nos indican que Oaxaca y Veracruz son dos de las entidades mas importantes con casos de DEN, tanto por el número de casos reportados como por la co-circulación de los cuatro serotipos de por lo que se decidió analizar sueros de pacientes diagnosticados con DEN en estas dos entidades para realizar los análisis de la epidemiología molecular y la determinación de la recombinación junto con su análisis filogenético.

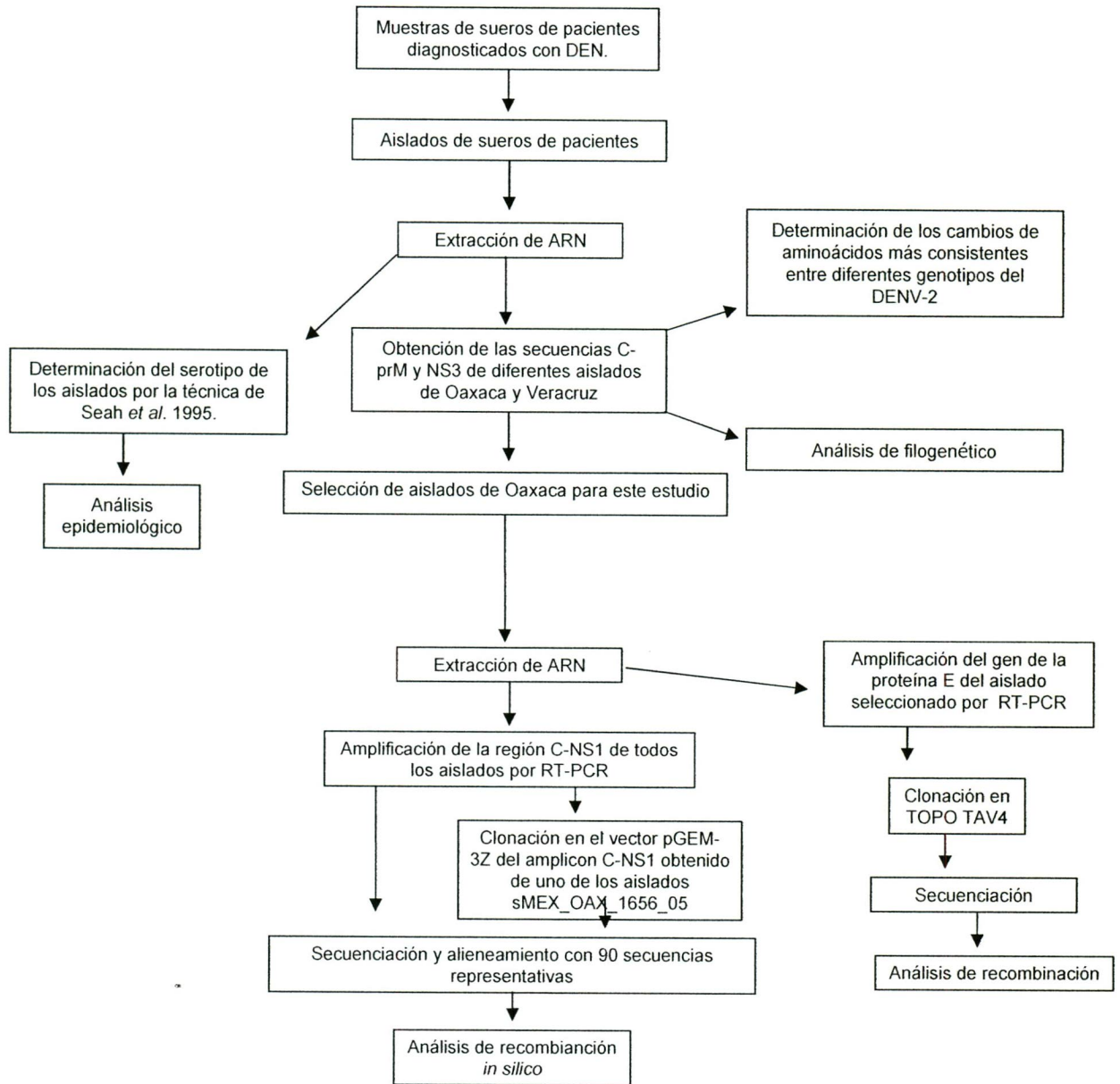
OBJETIVO GENERAL.

Determinar el serotipo y genotipo de los aislados de DENV provenientes de sueros de pacientes de Oaxaca y Veracruz mediante técnicas de biología molecular; realizar el análisis filogenético; e identificar las secuencias recombinantes del virus Dengue 2 mediante los programas RDP y GARD.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Serotipificar los aislados de DENV provenientes de los pacientes de Oaxaca y Veracruz.
2. Genotipificar los aislados del DENV mediante el análisis filogenético del genoma de las proteínas C-PrM-E y NS3 de los aislados de Oaxaca y Veracruz.
3. Determinar los marcadores de genotipo del virus dengue 2 mediante el análisis de las secuencias de las proteínas C-PrM y NS3 de los aislados de Oaxaca y Veracruz.
4. Identificar las secuencias recombinantes del virus DENV-2 en aislados de Oaxaca mediante su análisis filogenético por los programas RDP2 y GARD.
5. Identificar las secuencias recombinantes del gen de la proteína E del aislado MEX_OAX_1656_05 clonado en el vector pGEM-3Z.
6. Determinar la relación que existe entre la recombinación y la epidemiología del DENV-2 en Oaxaca.
7. Determinar las probables implicaciones entre la recombinación y la evolución del DENV-2.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y METODOS

Virus.

Las cepas de DENV usadas como control son: DENV-1 Hawaii; DENV-2 New Guinea C (NGC); DENV-3 H-87; y DENV-4 H-341. Estas cepas fueron proporcionadas por el Dr. J. Gubler (Division of Vector-borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Fort Collins, CO, USA) y por la Dr. Blanca Ruiz (Biomédicas UNAM). Veintisiete sueros fueron colectados de pacientes con DF o DHF en la fase aguda de la enfermedad y otorgados por la Secretaria de Salud de Oaxaca durante los brotes de 2005-2006 y 65 por el instituto mexicano del Seguro Social (IMSS) del estado de Veracruz del brote de 2006. Las muestras fueron anónimas y solo la información clínica asociada fue proveída.

Infección de cultivos celulares y aislamiento de DENV.

Células C6/36 de *Ae. albopictus* fueron cultivadas a 28°C durante 18h, hasta obtener una confluencia del 80% para ser infectadas con 0.2ml de solución de DENV-1, -2, -3,-4 control, en un MOI de 0.1 e incubados a 28°C por 10 días. Los virus fueron aislados como se describe previamente (Cisneros *et al.*, 2006) con algunas modificaciones. Después de 18h de cultivo, las células C6/36 fueron infectadas con 0.01 a 0.1 ml de suero por tubo previamente diluido en 1ml de medio de cultivo e incubadas por 2 h a 28°C. Terminado el tiempo de inoculación se lavó tres veces con medio mínimo esencial de cultivo (MEM), se agregaron 3ml de medio de cultivo y se incubaron hasta por 15 días a 28°C (este periodo de activación viral se consideró como el pase No. 1). Las células fueron observadas diariamente y se registró el efecto citopático (CPE) ocasionado por la infección viral, finalmente se colectaron las células y se centrifugaron a 1,000xg por 5 min. La pastilla fue suspendida en 0.6ml de medio de cultivo, y alícuotada en 0.15 ml para su almacenamiento a -70°C. El sobrenadante (aproximadamente 2.5 ml) fue

alícuotado en fracciones de 1 ml y 0.5 ml y guardado a -70°C . Para obtener los pases dos y tres cultivos semiconfluentes de C6/36 fueron incubados con 1ml de sobrenadante obtenido del pase uno o dos por 2h a 28°C siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Extracción de ARN viral.

El ARN total fue extraído de las pastillas de los cultivos celulares infectados, por la técnica de Trizol® LS (Gibco BRL., Gaithersburg, Md.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN se suspendió en 50 μl de agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich) y usado como templado para la transcripción inversa.

Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Todos los ensayos fueron hechos con el kit "ThermoScript™ RT-PCR System" con "Platinum Taq Hi-Fi" (Invitrogen, Life Technologies). Una mezcla de 5 μl de ARN total (0.1-0.5 μg), 50 ng de hexámeros, y agua tratada con DEPC (12 μl de volumen final) se incubó a 65°C por 5 min y rápidamente enfriado en hielo para desnaturalizar el ARN, finalmente se agregaron 8 μl de mezcla maestra de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La primera extensión fue realizada a 25°C por 10 min y posteriormente un ciclo a 50°C por 90 min. Las mezclas de PCR fueron hechas con una concentración de 20 μM de primer sentido y antisentido, 2 μl de reacción de síntesis de cDNA y sulfato de magnesio 2.4 mM. Para determinar el serotipo de los aislados se utilizó el protocolo de Seah *et al.*, (1995). Para amplificar la región *c-ns1* del genoma de DENV-2 que va del nucleótido 91 (C_{91}) al nucleótido 2400 ($\text{NS}_{1_{2400}}$) y el gen *E* se sintetizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1).

TABLA 1. Oligonucleótidos para amplificar la región de los genes estructurales y el gen *E*.

| Oligonucleótidos | Secuencia 3'-5' |
|-------------------------|---------------------------|
| C(+) | CAA TAT GCT GAA ACG CGH G |
| NS1(-) | GTT CTG TCC ANG TRT GNA C |
| EPP-F | GAA TGA CAA TGC GTT GC |
| EPP-R | TCA GCT CAC AAC GCA ACC |

Clonación.

Los productos de RT-PCR de la región de las proteínas estructurales (*C₉₁-prM-E-NS1₂₄₀₀*) fueron digeridos con *Kpn1* y ligados en el vector pGEM®-3Z (Promega) como ha sido descrito previamente (Sambrook *et al.*, 1989).

Para clonar el gen de la proteína *E* los productos de RT-PCR fueron ligados en el vector pCR®4-TOPO incluido en el kit "TOPO® TA Cloning for Sequencing" (Invitrogen, Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de los productos de RT-PCR.

Para secuenciar los amplicones de los genes que codifican para los genes estructurales y del gen *E* se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 2). La secuenciación automatizada de los fragmentos de DNA purificados por columnas Quiaquick (Quiagen, Chatsworth, Calif.) fue hecha por el método de Sanger *et al.*, (1977) usando el kit "The Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" y el secuenciador ABIPRISM 100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 2. **Oligonucleótidos utilizados para secuenciar la región de los genes estructurales y el gen de la proteína E.**

| Oligonucleótido | Secuencia 3'-5' |
|-----------------|-----------------------|
| PrM(+) | GGATGTCNKCNGAAGG |
| PrM(-) | CCTTCNGMNGACATCC |
| E1(+) | GACAGAGGNTGGGGMAATGG |
| E1(-) | CCATTKCCCCANCCTCTGTC; |
| E2(-) | CNCAAGARGGMGCCAGCC |
| E2(+) | GGCTGGCKCCYTCTTGNG |

Análisis de Secuencias para los estudios de filogenia y recombinación.

Las secuencias parciales de C₉₁-prM-E-NS₁₂₄₀₀ de DENV-2 se alinearon con 90 secuencias de DENV-2 obtenidas del GenBank, por otra parte las secuencias del gen de la proteína E se alinearon con 180 secuencias obtenidas del GenBank por medio del programa Clustal W (Thomson *et al.*, 1994) y se tradujeron automáticamente usando el programa BioEdit.

El alineamiento se ingresó a la herramienta "*Model Selection*" de la página en línea [//www.datamonkey.org/](http://www.datamonkey.org/) para determinar cual es el mejor modelo de sustitución nucleotídica para los análisis de filogenia y recombinación (Kosakovsky-Pond y Frost, 2005; Kosakovsky-Pond y Frost, 2005b).

Para los análisis filogenéticos se usaron los métodos de Neighbor-joining, Máxima Parsimonia y Mínima evolución con corrección gamma y un bootstrap de 10000 repeticiones y el método de sustitución nucleotídica determinada por el "*Model Selection*" utilizando el programa MEGA V4 (Tamura *et al.*, 2007). En los casos necesarios se utilizaron secuencias de DENV-2, DENV-1, DENV-3 y DENV-4 como grupos externos.

Para los análisis de recombinación se utilizaron 17 y 16 secuencias del GenBank para el fragmento C₉₁-prM-E-NS₁₂₄₀₀ y para el gen *E* respectivamente para obtener las gráficas y los árboles de filogenia. Las secuencias y su número de acceso son: VEN_2_87 (AF100465), MEX_131-92(AF100469), THNH_P36_93 (AF022441), TH_CO390_99 (AF100462), BANGKOK_74 (AJ487271), NGC_44 (D00346), CHINA_43_89 (AF204178), CHINA_FJ_10_00 (AF276619), INDI_GWL102_01 (DQ448233), INDO_BA05i_05 (AY858035), INDO_98900666_04 (AB189124), BR_64022_02 (AF489932), JAM_N1409_83 (M20558), CHINA_04_85 (AF119661), DR_23_01 (AB122020), MART_703_98 (AF208496), CUBA_13_97 (AY702034), MEX_95 (DQ364562). Los alineamientos fueron analizados por el paquete "Recombinant Detection Program version 3" (RDP3) (Martin *et al.*, 2005) usando los parámetros pre-establecidos (ventana de 200nt, pasos de 20nt, modelo de sustitución Jin y Nei (1990) y 1000 replicaciones) y también fueron analizadas por el algoritmo genético para la detección de la recombinación (GARD por sus siglas en inglés) ([//www.datamonkey.org/](http://www.datamonkey.org/)) usando el criterio informativo Akaike para determinar los puntos de entrecruzamiento (Sigiura, 1978). Los árboles de filogenia de máxima verosimilitud se hicieron con el paquete HYPHY (Kosakovsky-Pond *et al.*, 2005).

RESULTADOS.

Aislamiento viral y serotipificación.

El número de casos de DEN en México está en aumento desde principios de la década del 2000, conocer cuales son los serotipos circulantes es relevante ya que existe un aumento mas pronunciado en el número casos de DHF (Figura 12), causado probablemente por la circulación de los cuatro serotipos del virus, lo cual aumenta la probabilidad de infecciones secuéciales de diferentes tipos de DENV a personas que viven en zonas de riesgo, (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>). Oaxaca y Veracruz son dos entidades que presentaron un número significativo de casos de DEN durante los brotes de los años 2005 y 2006 con un alto porcentaje de casos de DHF (Fig. 12).

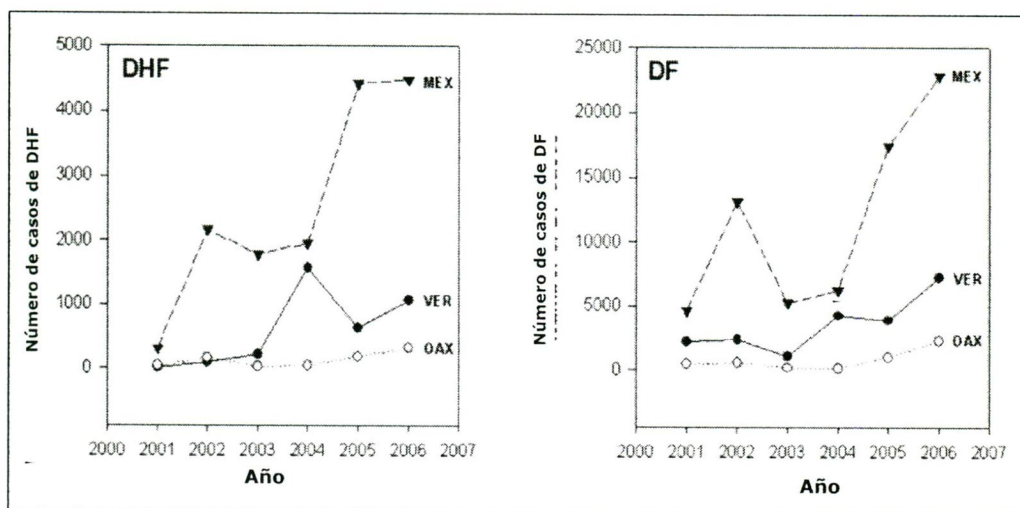


FIGURA 12. **Epidemiología del DEN en México (2001–2006).** El número total de los casos de DF y DHF en Oaxaca y Veracruz son comparados con el número total de casos en México (DGEPI; <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>).

De estas dos entidades se obtuvieron 128 muestras de suero de pacientes diagnosticados con DEN de las cuales 29 son del estado del Oaxaca y 99 del estado de Veracruz, de éstos se obtuvieron 27 y 61 aislados respectivamente en cultivos de células C6/36, los cuales fueron serotipificados después del pase 3, obteniendo el ARN total y aplicando el método de RT-PCR descrito por Seah *et al.*, en 1995 (Fig. 13). Cada prueba se realizó por triplicado.

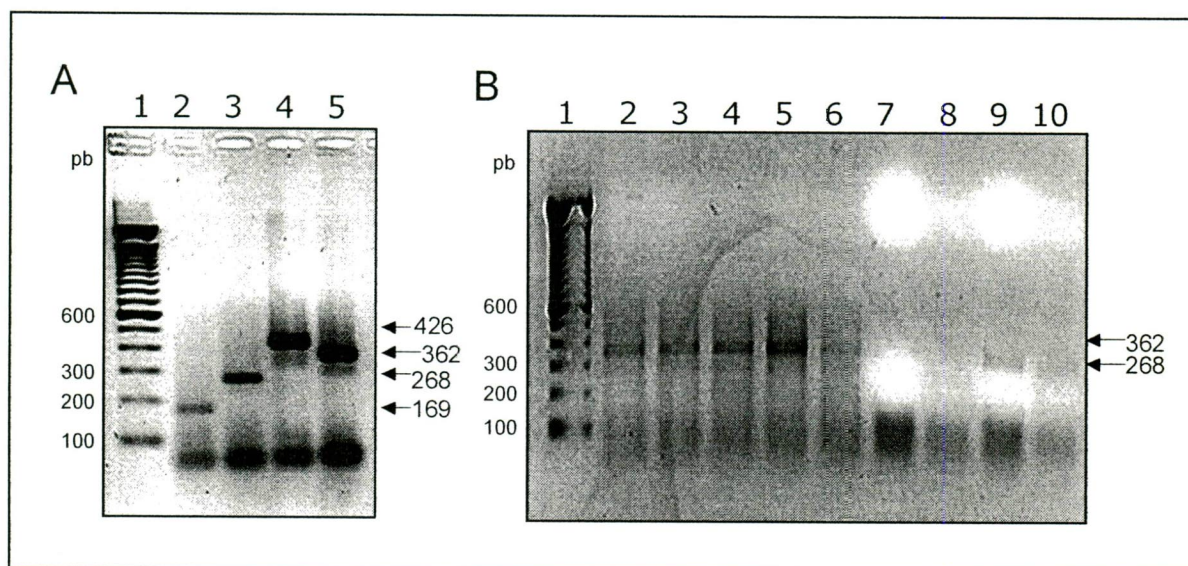


FIGURA 13. Serotipificación de los aislados por RT-TPCR. A. Validación del método de serotipificación usando las cepas de referencia; Carril 1) Marcador de 100 pares de bases (pb); carriles del 2) al 5) DENV-1, -3, -4 y -2 respectivamente. B. Serotipificación de los aislados de Oaxaca y Veracruz 2005 y 2006. Carril 1) marcador de 100pb, carriles: 2-4) Aislados de DENV-2 del estado de Oaxaca; 5-7) Aislado de DENV-2 del estado de Veracruz; Carril 8) control negativo; Carriles 9 y 10) Aislados de DENV-3 del estado de Oaxaca.

De los 27 aislados de Oaxaca 18 fueron diagnosticados como DHF, de éstos 12 fueron DENV-2 y seis DENV-1. De los 61 aislados obtenidos de sueros de Veracruz, 18 fueron diagnosticados como DHF; de los cuales 15 fueron DENV-2; dos DENV-1 y un aislado presentó dos serotipos, DENV-1,-2 (Tabla 3).

De un total de 43 muestras de pacientes diagnosticados como DF, 29 fueron DENV-2: cuatro DENV-3, ocho DENV-1 y dos DENV-4 (Tabla 3). La Figura 14 muestra el porcentaje de casos que corresponde a cada serotipo de DENV y se

observa que DENV-2 es el serotipo que generó un mayor número de casos en ambos estados durante los brotes de 2005-06, también observamos que DENV-1 y DENV-3 están circulando en ambos estados, mientras que el DENV-4 solo lo detectamos en Veracruz.

TABLA 3. **Determinación del serotipo de los aislados.** Se muestra el número de casos por cada serotipo del estado de Oaxaca (2005-2006) y Veracruz (2006) y su diagnóstico.

| SEROTIPO | DIAGNOSIS | OAXACA | VERACRUZ |
|----------|-----------|--------|----------|
| 1 | DHF | 6 | 2 |
| | DF | 0 | 8 |
| 2 | DHF | 12 | 15 |
| | DF | 6 | 29 |
| 3 | DF | 3 | 4 |
| 4 | DF | 0 | 2 |
| 1,2 | DHF | 0 | 1 |

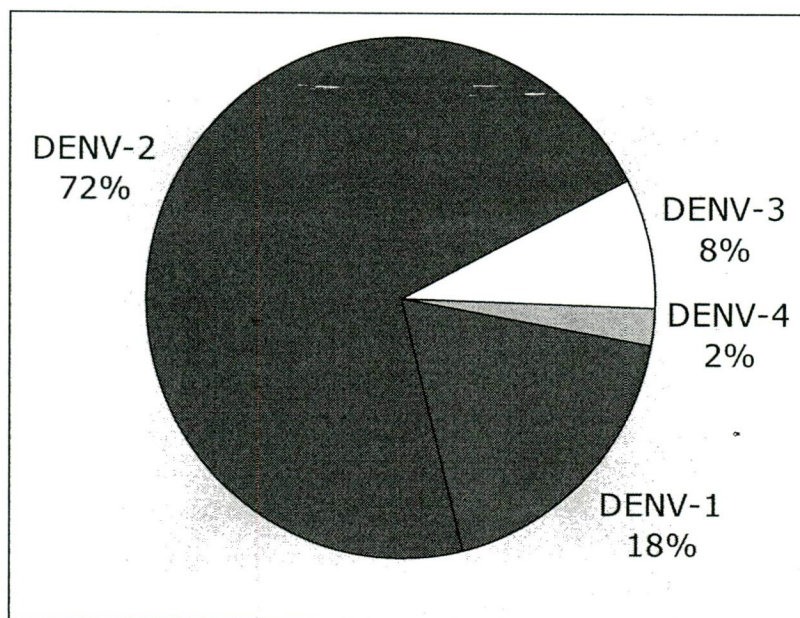


FIGURA 14. **Porcentaje de casos por serotipo de DENV para Oaxaca y Veracruz.** La mayoría de casos de DEN fueron determinados como DENV-2 mientras que el que tuvo menor presencia fue el DENV-4.

Si tomamos en cuenta solo el porcentaje de casos de DEN generados por cada serotipo observamos que la presencia de cada serotipo es muy similar en los dos estados, el DENV-3 no se relaciona con casos de DHF, mientras que el DENV-1 sí (Fig. 15).

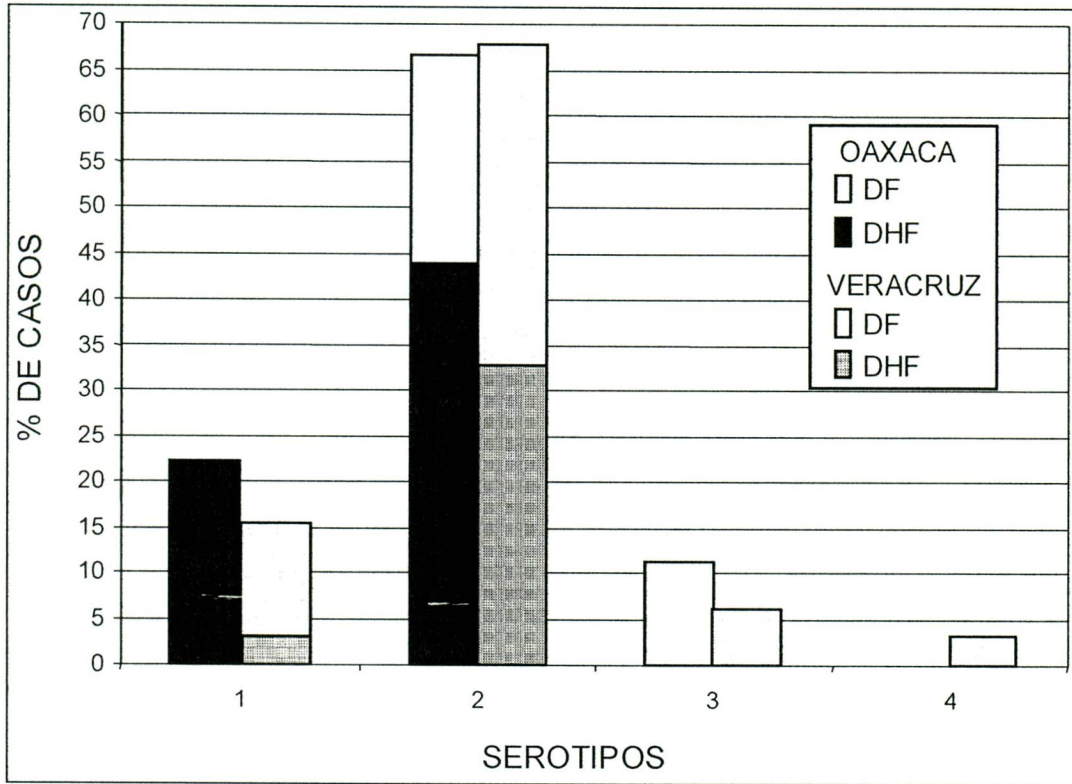


FIGURA 15. Resumen de todos los casos de DENV analizados en este estudio. Los porcentajes de casos de DENV-1, -2, -3 y -4 en Oaxaca y Veracruz durante los brotes de 2005-06. El porcentaje de casos relativos de cada serotipo no difiere en ambos estados. A pesar de que número de muestras analizadas es diferente en los dos estados.

Los cambios de aminoácidos de los aislados de Oaxaca y Veracruz.

Hasta el momento no existe una correlación directa entre los cambios existentes en las secuencias de los diferentes genotipos de DENV con su virulencia. Sin embargo, al relacionar los datos epidemiológicos con los genotipos causantes de brotes se ha logrado detectar que los genotipos de origen asiáticos tienen mayor probabilidad de generar casos de DHF. Y por otro lado si existe una relación directa entre los cambios observados en las secuencias, con los diferentes genotipos, por lo tanto estos cambios pueden indirectamente decir si estas cepas tienen mayor o menor probabilidad de generar casos de DHF, por lo que es importante conocer cuales son los cambios de amino ácidos más constantes entre los diferentes genotipos.

En este caso nos enfocamos a analizar las secuencias la región de la intersección C-prM y el interdominio de gen NS3 de DENV-2 (Fig. 16) debido a que durante los brotes de 2005-06 fue el serotipo que más se detectó en las muestras.

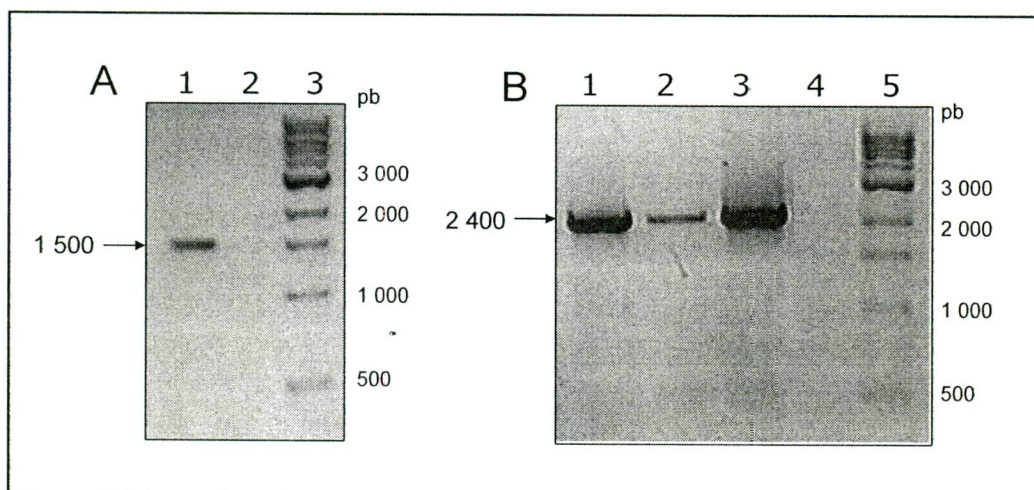


FIGURA 16. **Amplificación del gen *E* y del fragmento C₍₉₁₎-prM-M-E-NS1.** A) Amplificación del gen *E* para clonación; carril 1) Amplificación del gen *E* del aislado MEX_OAX_1656_05; carril 2, control negativo; carril 3, marcador de 1Kb. B) Amplificación del fragmento C-prM-M-E-NS1 de diferentes aislados; carriles 2-3) Amplicón de MEX_OAX_1656_05, MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1733_06 respectivamente; carril 4, control negativo; carril 5, marcador de 1Kb.

Después de obtener la secuencia de amino ácidos a partir de la secuencia de nucleótidos observamos que los aminoácidos que tienen una frecuencia de 1 o cercana a 1 entre secuencias del mismo genotipo son: Treonina en la posición 31 de la proteína prM para el genotipo Americano; para el genotipo Asiático I es Serina en la posición 101 de la proteína C e Isoleucina en la posición 15 de la proteína prM-M, con una frecuencia 0.73 (Tabla 4).

En el genotipo Cosmopolita encontramos que presentan una Valina, una Metionina y una Alanina en las posiciones 104, 108 y 112 de la proteína C con una frecuencia de 0.67, 0.44 y 0.61 respectivamente; también encontramos que presentan Asparagina en la posición 29 de la proteína prM, con una frecuencia de 0.44 (Tabla 4).

En el genotipo Asiático/Americano, observamos que tienen una Valina y una Alanina, en las posiciones 104 y 112 de la proteína C con una frecuencia de 1; también presentan Glicina, Glutámico, Valina e Isoleucina en las posiciones 14, 28, 31 y 39 de la proteína prM-M (Tabla 4). La Isoleucina (prM-M 39) tiene una frecuencia de 0,95 y la Lisina (prM-M 28) tiene una frecuencia de 0.75, estos cambios se han asociado a cuadros de DHF (Leitmeyer *et al.*, 1999).

Tabla 4. Continuación

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|----------|-----|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bangkok/74 | AJ487271 | NA | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M | R | R | A |
| USA 16681/97 | U87411 | NA | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | V | V | M | R | R | A |
| USA PDK53/97 | U87412 | NA | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | V | V | M | R | R | A |
| USA16681/97 | U87411 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-p11/93 | AF022437 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-p12/93 | AF022438 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-p14/93 | AF022439 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-7/93 | AF022434 | DSS | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-28/93 | AF022435 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-52/93 | AF022436 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-p16/93 | AF022440 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH-p36/93 | AF022441 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH29/93 | AF169678 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH36/93 | AF169679 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH45/93 | AF169680 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH55/93 | AF169681 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH54/93 | AF169682 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH62/93 | AF169683 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH63/93 | AF169684 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH69/93 | AF169685 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH73/93 | AF169686 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH76/93 | AF169687 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| ThNH81/93 | AF169688 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| VEN Mara4/90 ^a | AF100466 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| TH K0008/99 | AF100459 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| TH K0010/99 | AF100460 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| TH C0371/99 | AF100461 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| TH C0166/99 | AF100463 | DF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| TH C0167/99 | AF100464 | DHF | ASIATICO 1 | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M | R | R | A |
| NGC/44 | D00346 | DHF | ASIATICO 2 | T | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M | R | R | A |
| CHINA 43/89 | AF204178 | DF | ASIATICO 2 | T | M | I | L | V | S | R | G | D | V | M | R | R | A |
| CHINA 44/87 | AF204177 | DF | ASIATICO 2 | T | M | I | L | V | S | R | G | D | V | M | R | R | A |
| INDO BA05i/05 | AY858035 | DF | COSMOPOLITA | T | I | I | M | V | S | R | E | N | V | M | K | R | A |
| AUS TSV01/93 | AY037116 | NA | COSMOPOLITA | T | I | I | M | V | S | R | E | N | V | M | K | R | A |
| INDO 98900666/04 | AB189124 | DSS | COSMOPOLITA | T | V | I | M | V | S | R | E | N | V | M | K | R | A |
| CHINA ZS01/01 | EF051521 | NA | COSMOPOLITA | T | V | I | M | V | S | R | E | N | V | M | K | R | A |
| INDI GWL18/01 | DQ448231 | NA | COSMOPOLITA | T | V | I | L | A | S | R | E | D | V | M | K | R | A |
| INDI GWL39/01 | DQ448232 | NA | COSMOPOLITA | T | V | I | L | A | S | R | E | D | V | M | K | R | A |

^a La secuencia de aminoácidos es enumerada a partir del inicio del gen *C* o *prM*

*Secuencias de este estudio.

En las secuencias del interdominio de NS3 los cambios observados son: el genotipo Asiático/Americano y Cosmopolita presentan Arginina en la posición 187 con una frecuencia de 1. Las secuencias de Oaxaca y Veracruz tienen Lisina y Treonina en las posiciones 249 y 250 con una frecuencia de 0.33 y 0.38, siendo la Lisina 249 exclusivo en las secuencias de aislados de Oaxaca y Veracruz

Análisis filogenéticos.

Para la elaboración de los análisis filogenéticos se utilizaron las secuencias de diferentes los fragmentos: la intersección de los genes *C-prM*, el interdominio del gen *NS3* y la del gen *E* ya que son de los más informativos para realizar este tipo de análisis, además, debemos considerar que el número de secuencias es diferente para cada uno de los genes (Singh y Seth, 2001; Twiddy *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2005). Se obtuvieron trece secuencias de la intersección *C-prM* y del interdominio *NS3* (7 de aislados de Oaxaca y 6 de aislados de Veracruz), para el caso del gen *E* se analizaron 6 secuencias de aislados de Oaxaca y 11 secuencias de clonas derivadas del aislados MEX_OAX_1656.

El árbol obtenido con las secuencias *C-prM* muestra que las secuencias de DENV-2 del brote 2005-06 están relacionadas a las cepas de las islas del caribe Cuba, República Dominicana y Martinica de los años 1997 en adelante, mientras que las secuencias del brote de 2001 del mismo estado están relacionados con la cepa de Jamaica obtenida del brote de 1983 (Cisneros *et al.*, 2006), la que forma un grupo diferente con secuencias obtenidas en el sur del continente (Brasil y Venezuela) mostrando un 4% de divergencia entre los dos grupos, con un alto valor de bootstrap del 94% (Fig. 17A).

Lo mismo ocurre con las secuencias del interdominio del gen *NS3* a pesar de que este fragmento del genoma presenta más del 95% de identidad. Los pocos cambios permiten obtener árboles con grupos bien definidos y observamos que las

secuencias de los aislados de DENV-2 del brote de 2005-6 tienen el mismo comportamiento que la secuencia *C-prM* ubicando su origen en las islas del caribe y formando un grupo diferente al de las secuencias del sur de América (Figura 17B).

La secuencia del gen *E* es la más utilizada para análisis de filogenia ya que existe un mayor número de secuencias disponibles y nos ofrece una imagen más completa de la dispersión del virus. El árbol obtenido con secuencias de los 6 genotipos de DENV-2 muestra que las secuencias de los aislados de Oaxaca 2005-06, se agrupan dentro del genotipo Asiático/Americano con secuencias de Yucatán, Centroamérica y el Caribe (Fig. 18).

Interesantemente el árbol nos revela la existencia de tres grupos de DENV Asiático/Americano que generan brotes en la actualidad y que presentan relación con su ubicación geográfica, uno es el grupo formado por secuencias de Asia, el segundo tiene secuencias de Puerto Rico y Sudamérica y el tercero tiene secuencias del Caribe, Centroamérica y México (Fig. 19, Fig. 20). Las secuencias de DENV-2 del brote de 2005-06 en Oaxaca y del brote 2001-02 en Yucatán presentan una mayor identidad entre sí y con las reportadas en Centroamérica de los años 1999 y 2000.

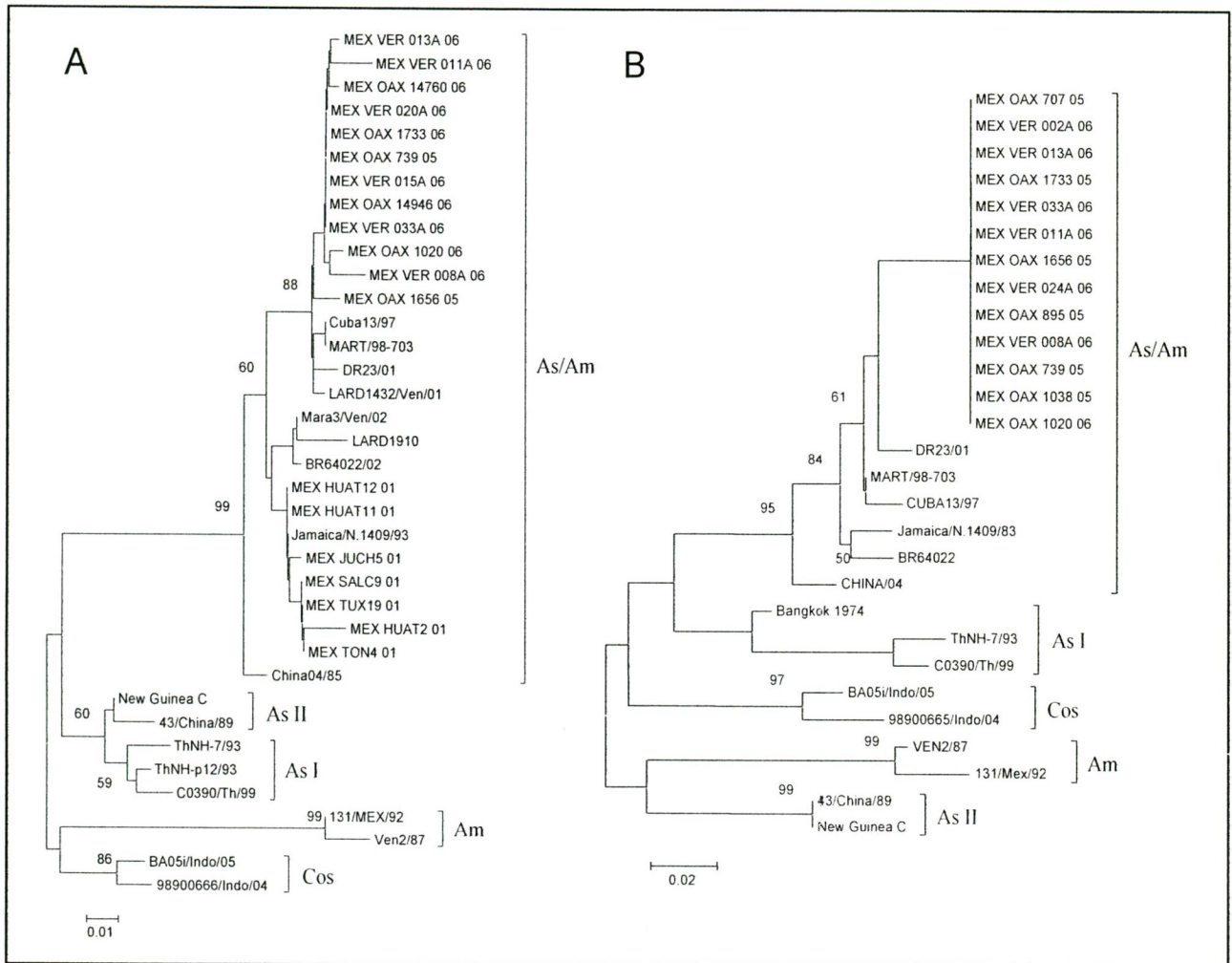


FIGURA 17. **Árboles máxima verosimilitud de DENV-2.** A. El árbol se elaboro con la secuencia de la intersección de los genes *C-PRM*. Las secuencias de los brotes de los años 2001-2, tienen un origen diferente a los de los brotes del 2005-6 de Oaxaca y Veracruz; B. Árbol construido con la secuencia del interdominio del gen *NS3*.

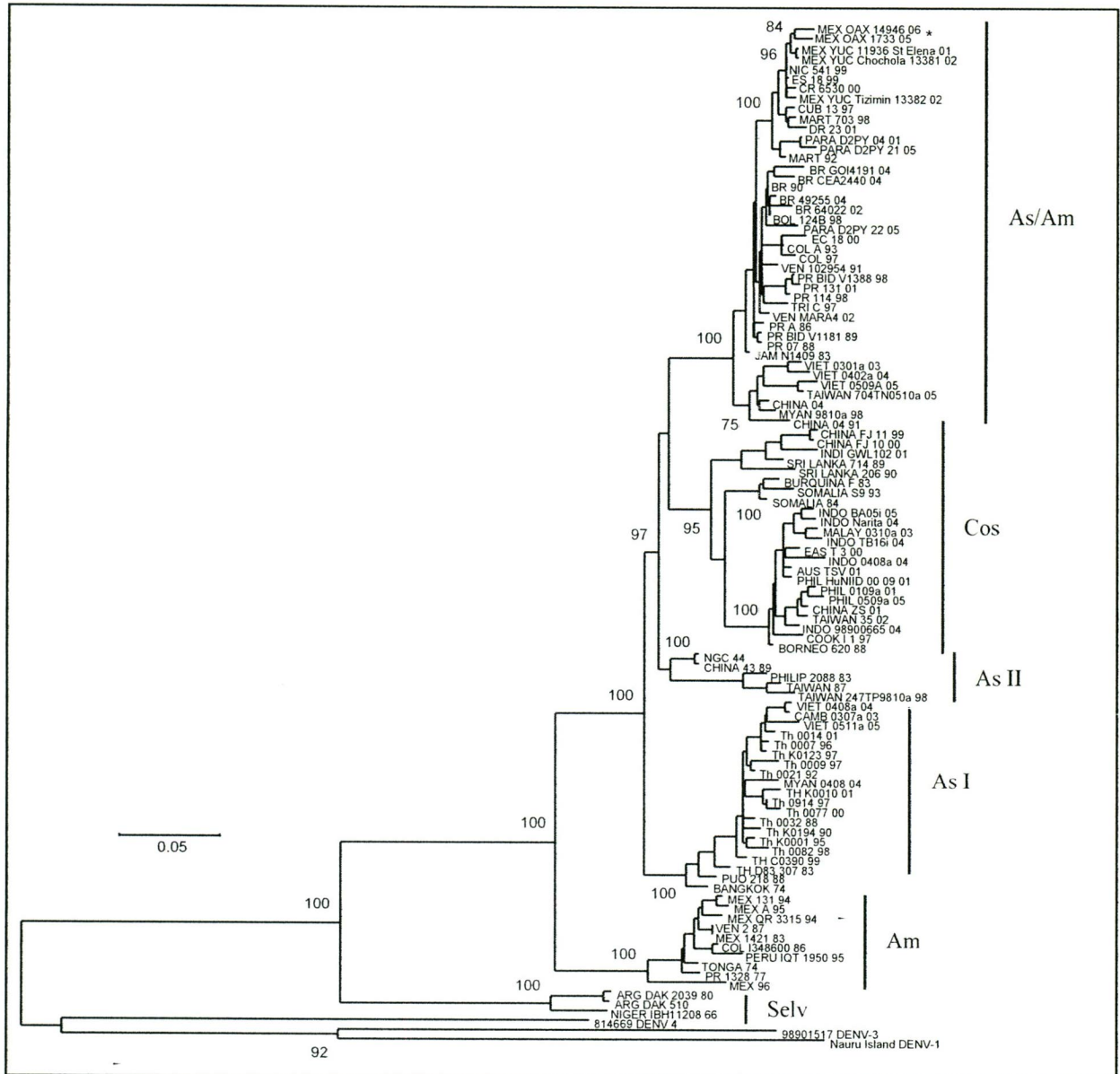


FIGURA 18. **Árbol de Máxima Verosimilitud para DENV-2 usando el gen E.** Nuestras secuencias se agrupan en el genotipo Asiático/Americano. El árbol fue construido por el método de Mínima Evolución.

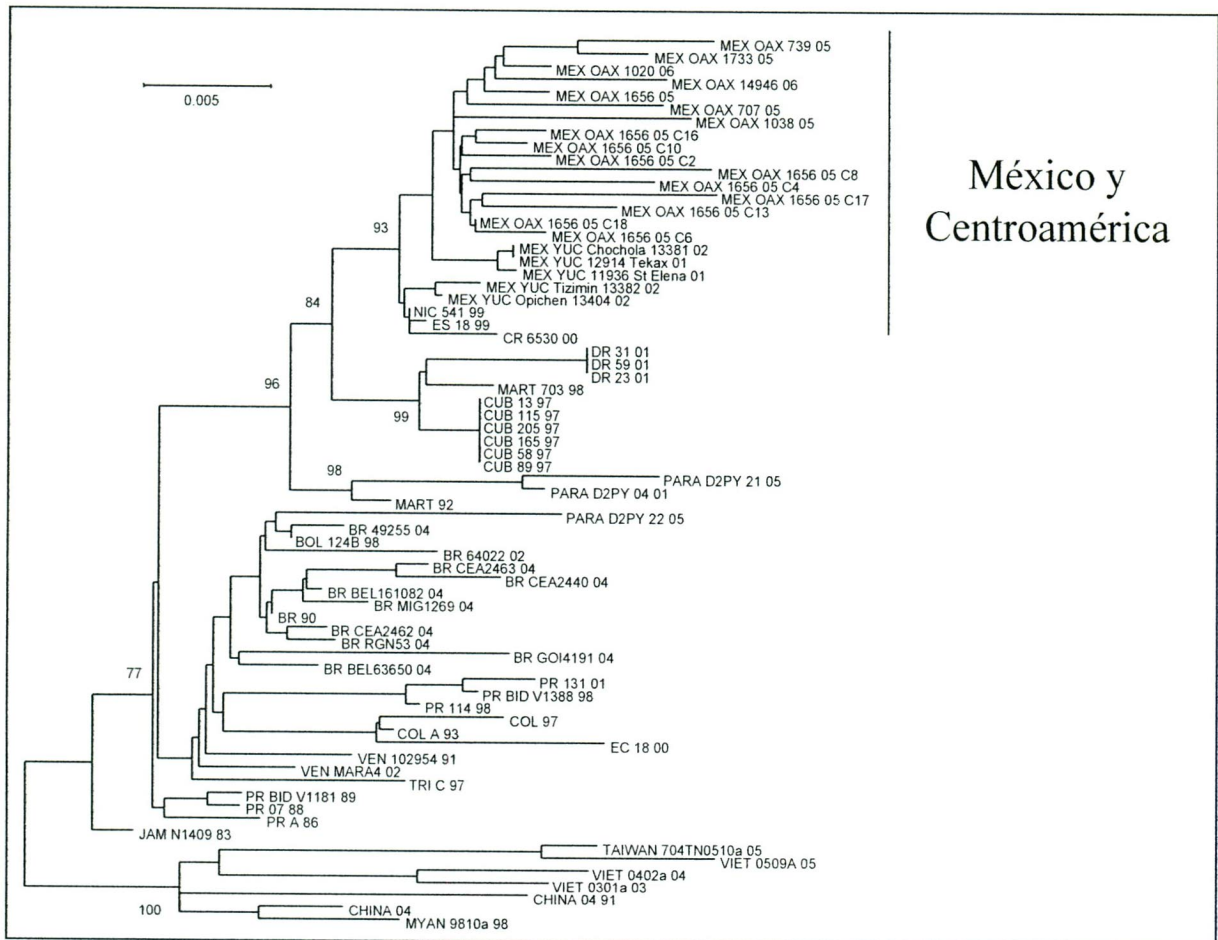


FIGURA 19. Árbol de Máxima Verosimilitud del genotipo Asiático/Americano utilizando el gen *E* Se observa que las secuencias de los brotes 2005-06 se agrupan con secuencias de Centroamérica. El árbol fue construido por el método de Mínima Evolución.

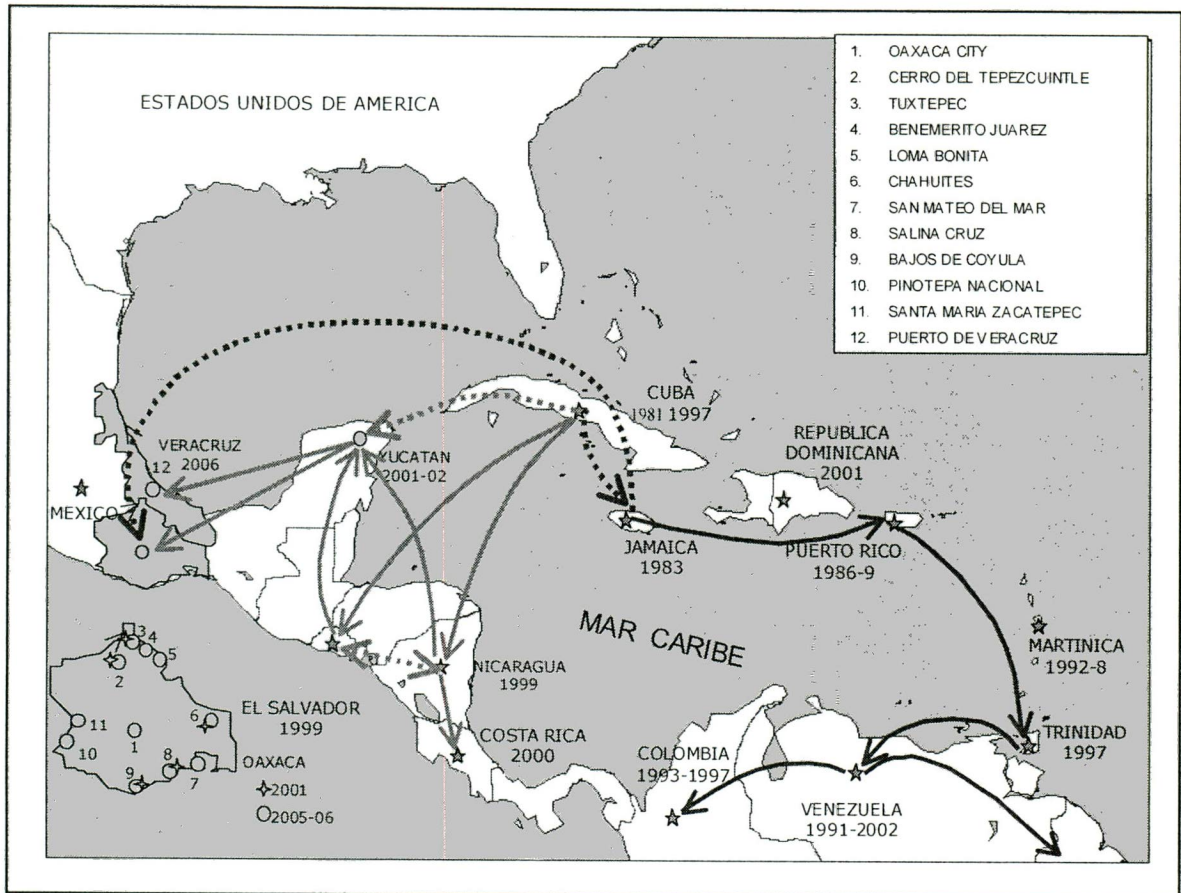


FIGURA 20. **Dispersión del DENV-2, genotipo Asiático/Americano en el continente Americano.** La llegada de las cepas Asiático/Americano a México pudo haber sido Centroamérica.

Las tres secuencias del interdominio NS3 de DENV-3 obtenidos de los aislados MEX_OAX_1043_05, MEX_OAX_1400_05 y MEX_OAX_420_05 provenientes de Oaxaca, muestran que son genotipo III el cual ha estado circulando en el continente desde principio de la década del 2000 y ha generado brotes de DHF en Brasil (Fig. 21). (Twiddy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

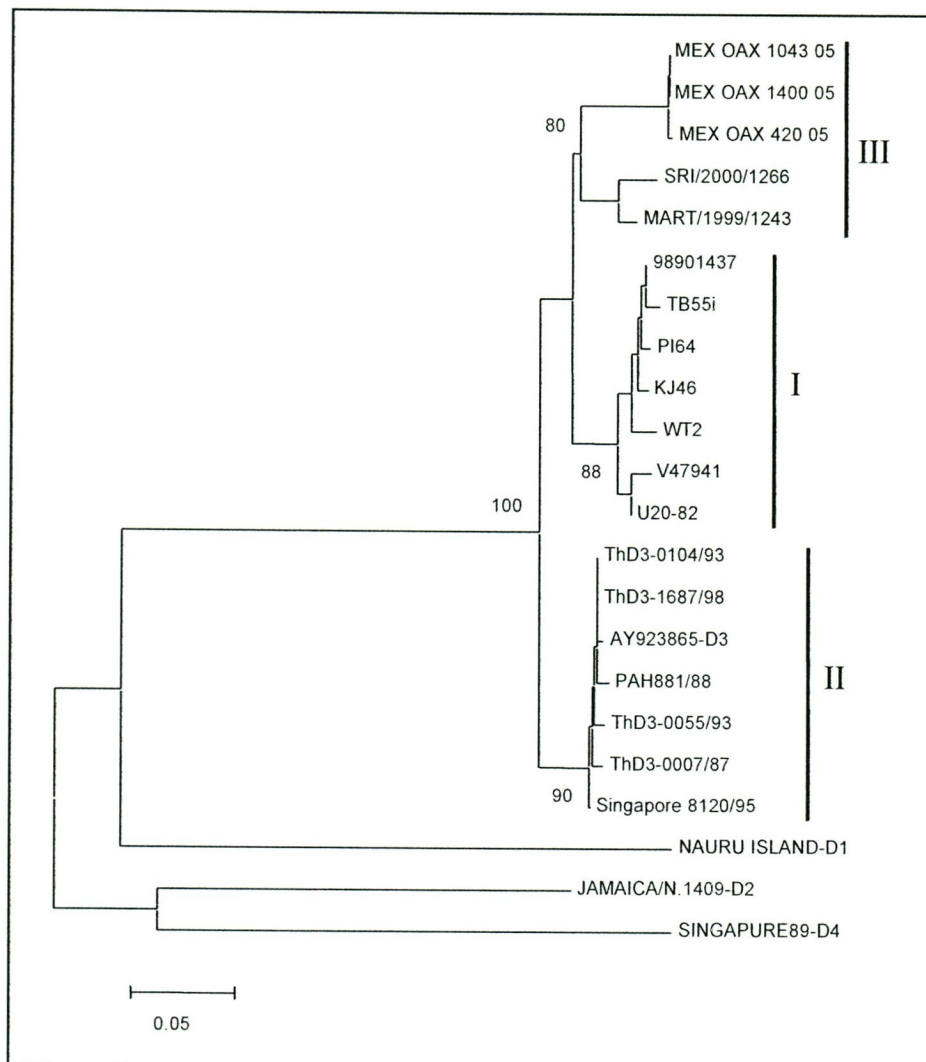


FIGURA. 21. **Árbol de Máxima Verosimilitud usando las secuencias del interdomio del gen NS3 de DENV-3.** Los aislados de DENV-3 se agruparon en el genotipo III.

Análisis de la Recombinación.

Para determinar la recombinación en las secuencias de DENV-2, las secuencias del fragmento $C_{(91)}-prM-E-NS1_{(2400)}$ de seis aislados más la secuencia de una clona (MEX_OAX_1656241_05) y 90 secuencias representativas de los diferentes genotipos de DENV-2 fueron alineados y analizados con los programas RDP3 y GARD. Además, la secuencia del gen *E* de los seis aislados, más la secuencia de 11 clonas (provenientes del aislado MEX_OAX_1656_05) fueron alineados con 180

secuencias obtenidas de GenBank de los diferentes genotipos y analizadas con los mismos programas.

El análisis del fragmento $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ con el programa RDP3 demostró que las secuencias de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05 presentan evidencias de recombinación por los métodos de GENECOV (P-Val= 2.467×10^{-2}), BOOTSCAN (P-Val= 4.289×10^{-5}), MAXCHI (P-Val= 1.438×10^{-5}), CHIMERA (P-Val= 3.790×10^{-3}), SISCAN (P-Val= 1.108×10^{-9}), y 3SEQ (P-Val= 4.478×10^{-4}), con tres puntos de entrecruzamiento.

El primer punto de entrecruzamiento para los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05 está localizado en los nucleótidos 499 y 512 respectivamente, el segundo punto se encuentra entre los nucleótidos 868 y 826 respectivamente, y el tercer punto de entrecruzamiento fue localizado en el nucleótido 2239 en ambas secuencias, de forma consistente. (Fig. 22 A-B). El análisis con GARD, localizó los puntos de entrecruzamiento en los nucleótidos 498, 828 y 2226 en ambas secuencias (Fig. 22C).

Las regiones recombinantes se localizaron en las intersecciones de los genes de las proteínas prM-M y la intersección de los genes *M-E* y la segunda región recombinante inicia en la intersección de los genes *E-NS1* (Fig. 22D). Interesantemente, observamos que las cepas parentales fueron las secuencias de la clona MEX_OAX_1656_05_C241 y la cepa INDI_GWL_102_01 del genotipo Cosmopolita, (número de acceso al GenBank DQ448235). (Fig. 22).

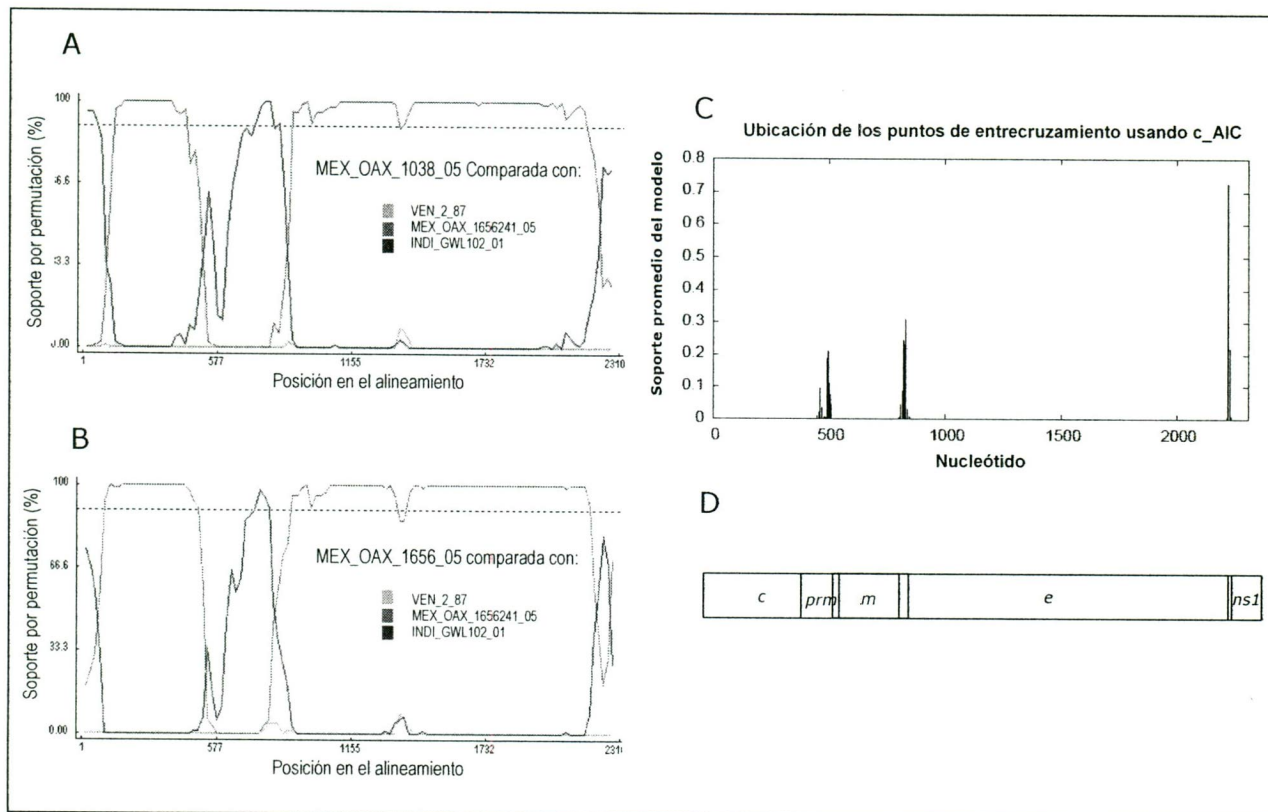


FIGURA 22. **Determinación de los puntos de entrecruzamiento para las secuencias MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05.** A. Gráfico de similitud obtenido con el método de BOOTSCAN para la secuencia MEX_OAX_1038_05; B. Gráfico de similitud para la secuencia MEX_OAX_1056_05; C. Puntos de entrecruzamiento determinados por c-AIC para las dos secuencias recombinantes; D. Ubicación de las regiones recombinantes en el genoma de DENV. La secuencia MEX_OAX_1656_05_C241 e INDI_GWL102_01 fungieron como secuencias parentales. El número de cada nucleótido es determinado por su posición en nuestra secuencia, la cual empieza en el nucleótido 91 del gen C.

Los árboles de filogenia construidos por GARD con los diferentes fragmentos muestran que las secuencias de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05, de los nucleótidos del 1 al 497 se agrupan en el genotipo Asiático/Americano (Fig. 23A) y del 498 al 828 se agrupan en el genotipo cosmopolita (Fig.23B), y de los nucleótido 829 al 2222 de nuevo se agrupa con el genotipo Asiático/Americano(Fig. 23C), finalmente en el segmento del nucleótido 2223 al 2310 la secuencias vuelven a agruparse con el genotipo Cosmopolita (Fig.23D).

Los nucleótidos de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05 relacionados con la combinación se alinearon con las secuencias parentales MEX_OAX_1656_05_C241 y INDI_GWL_102_01, y se pueden observar claramente los cambio de identidad de la secuencia recombinante (Fig. 24).

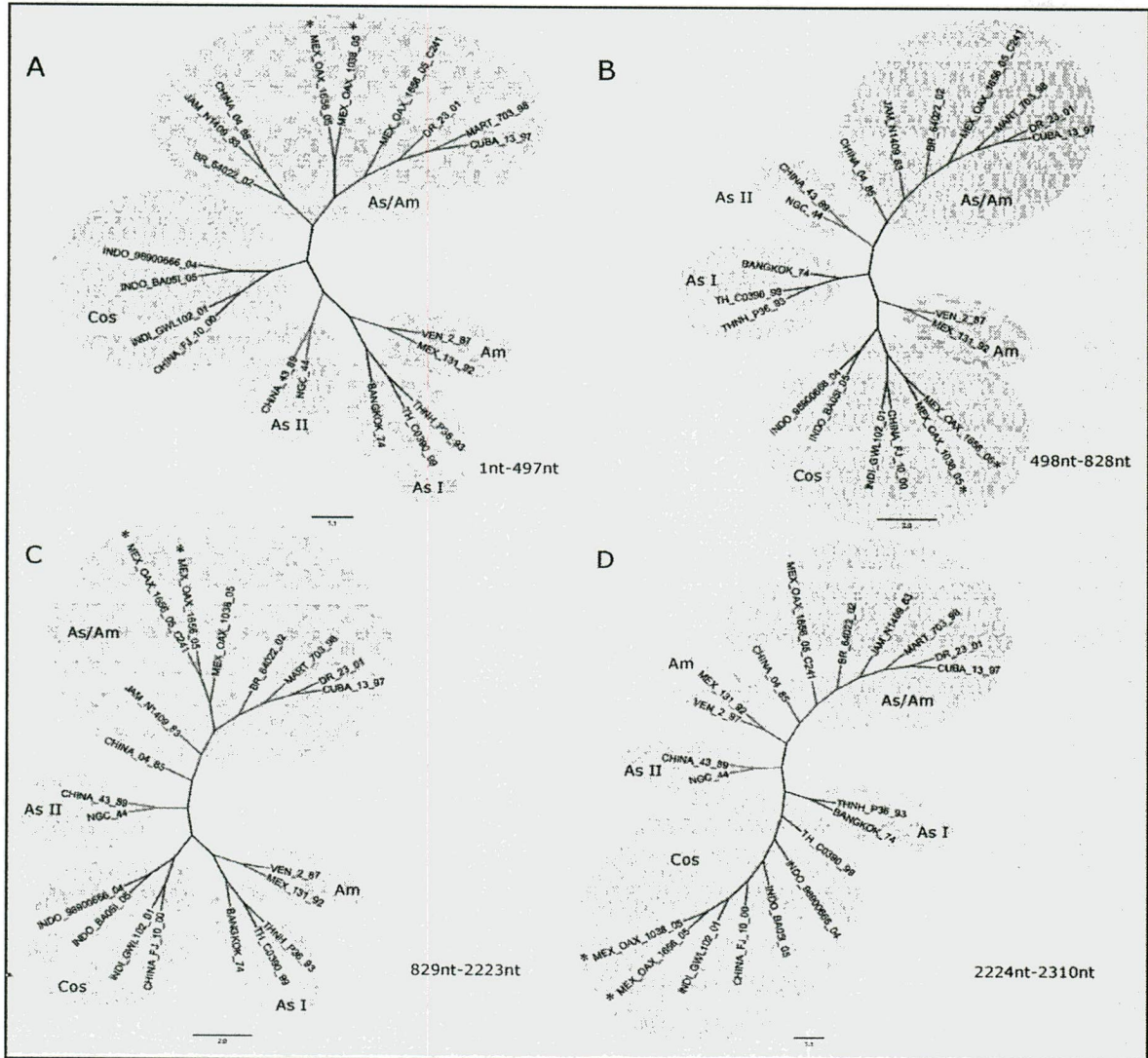


FIGURA 23. Análisis de recombinación mediante el análisis filogenético de las secuencias de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05. Los árboles de Máxima Verosimilitud se elaboraron con las secuencias de las regiones no-recombinantes y recombinantes provenientes de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05 (*).

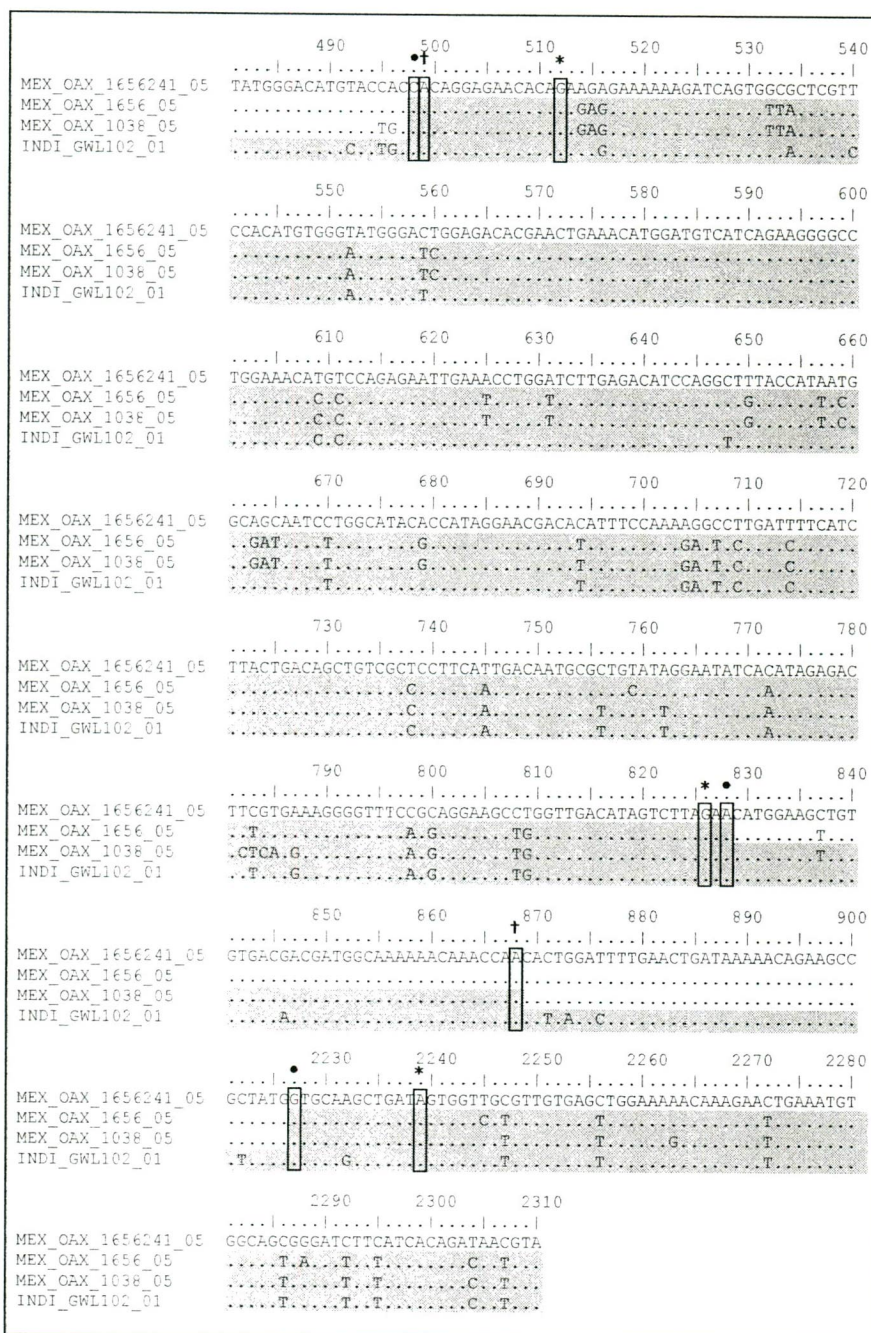


FIGURA 24. Alineamiento de la región recombinante de los aislados MEX_OAX_1038_05 y MEX_OAX_1656_05 con las secuencias parentales. (†) Puntos de entrecruzamiento de la secuencia MEX_OAX_1038_05 determinada por BOOTSCAN; (*) Puntos de entrecruzamiento para la secuencia MEX_OAX_1656_05 determinados con el mismo programa; (●) Puntos de entrecruzamiento determinados por GARD para ambas secuencias.

Las 10 clonas del gen *E* obtenidas del aislado MEX_OAX_1656_05 más las secuencias de los aislados fueron analizadas usando el programa RDP3 y GARD. La secuencia de la clona MEX_OAX_1656_05_C07 presentó evidencias de recombinación por los métodos GENECOV (P-Val= 7.356×10^{-7}), BOOTSCAN (P-Val= 1.378×10^{-5}), MAXCHI (P-Val= 1.764×10^{-3}), CHIMERA (P-Val= 1.392×10^{-4}) y 3SEQ (P-Val= 4.478×10^{-4}).

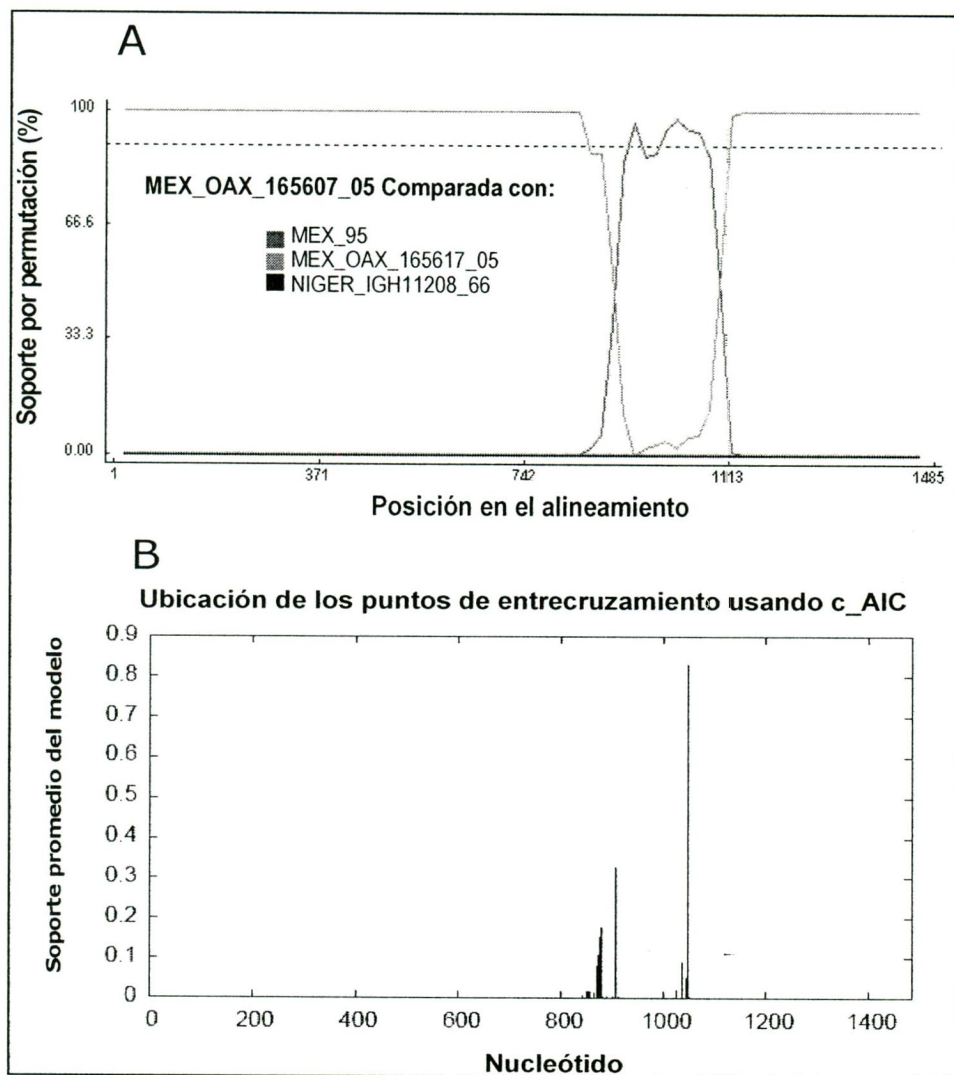


FIGURA 25. **Puntos de entrecruzamiento del gen *E* de la clona MEX_OAX_1656_05_C07.** A) Gráfico de similitud obtenido por el método de BOOTSCAN; B) Puntos de entrecruzamiento obtenidos usando c-AIC. Las secuencias de las clonas MEX_OAX_1656_05_C17, y MEX_95 son las secuencias parentales.

Los análisis mostraron dos puntos de entrecruzamiento. El primer punto de entrecruzamiento obtenido por RDP3 fue localizado en el nucleótido 906 de la región codificante, el segundo punto de entrecruzamiento fue localizado en el nucleótido 1038 (Fig. 25A). El programa GARD confirmó la presencia de dos puntos de entrecruzamiento y localizó al primer punto en el nucleótido 906 y al segundo en el nucleótido 1047 (Fig. 25B).

Los árboles de Máxima Verosimilitud construidos con los fragmentos recombinantes y no recombinantes de la clona MEX_OAX_1656_05_C07, muestran que de los nucleótidos 1 al 905 se agrupa en el genotipo Asiático/Americano, pero de los nucleótidos 906 al 1047 cambia al genotipo Americano y finalmente de los nucleótidos 1048 al 1485 la secuencia se agrupa nuevamente con las secuencias del genotipo Asiático/Americano (Fig. 26).

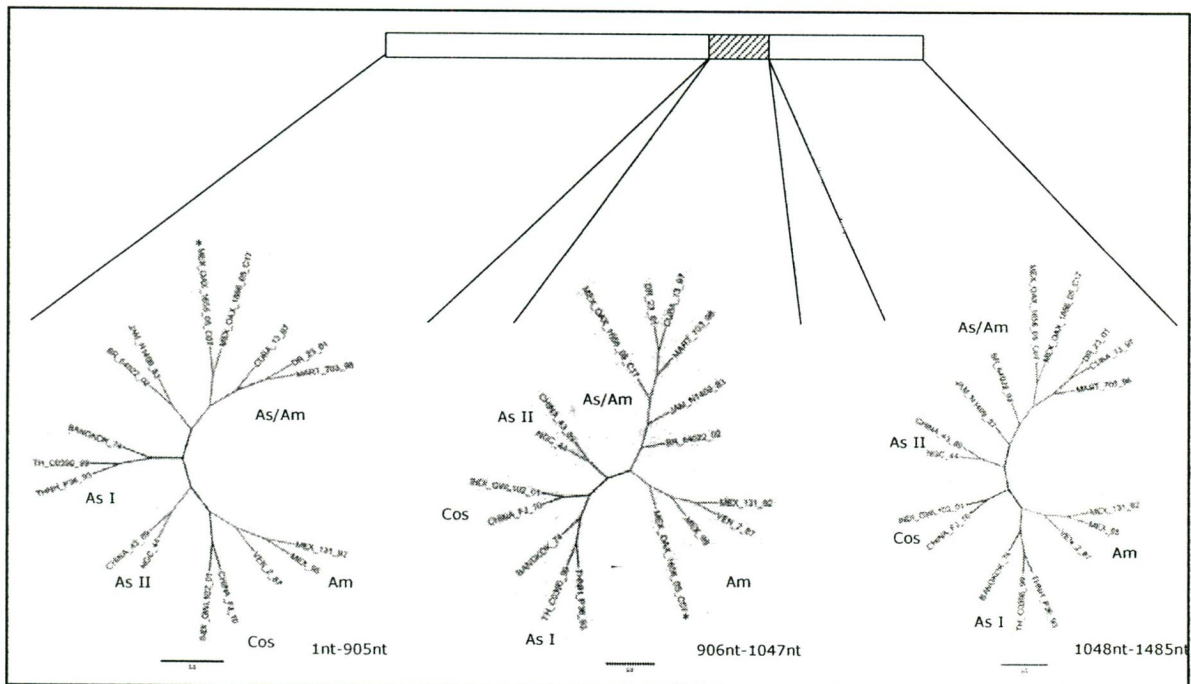


FIGURA 26. **Análisis de recombinación por filogenia de la secuencia MEX_OAX_1656_05_C07.** Árboles de máxima verosimilitud donde se observa el cambio de la secuencia MEX_OAX_1656_05_C07(+) del genotipo Asiático/Americano al genotipo Americano en la región recombinante.

DISCUSIÓN

El DEN es una enfermedad endémica en México razón por la cual es de suma importancia su estudio desde el punto de vista epidemiológico y molecular, incluyendo todos aquellos factores que pueden contribuir a la virulencia del virus.

En el caso del DEN no solo se tiene la contribución del virus sino además las del vector y las del hospedero humano.

Si pudieramos romper el ciclo de este virus mediante la erradicación del mosquito, definitivamente eliminaríamos las epidemias producidas por este virus. Hace algunos años la Organización Panamericana de la Salud (OPS), condujo una campaña de erradicación del mosquito *Ae. aegypti* con el objetivo de eliminar los casos de fiebre amarilla en América. Sin embargo, el mosquito no fue eliminado en su totalidad ni del sur de los EUA ni del Caribe, razón por la cual el mosquito nuevamente se dispersó y en la actualidad tenemos el problema de las epidemias por dengue en el Sur de EUA, en México, Centroamérica y Sudamérica. El mosquito *Ae. aegypti* sin embargo se eliminó en la mayor parte de América entre los años de 1947 hasta 1970. Consecuentemente y debido a que en el sur de los Estados Unidos no fue erradicado y a que las campañas de erradicación en el país se relajaron progresivamente, el mosquito *Ae. aegypti* reapareció en todas las costas del México y a la mayoría de los países tropicales y subtropicales del continente Americano.

El primer brote de DEN que hubo en México ocurrió en 1978 causado por DENV-1 y la epidemia se propagó por todo el país. Posteriormente los primeros informes de brotes por el DENV-2 fueron en 1981 y 1984, con 30.000 y 23.000 casos, respectivamente. En 1984 hubo 8 casos de DHF y 4 muertes asociadas con DENV-4. En 1989 se reportaron cuatro casos de DHF y una muerte; en 1991 se reportaron dos muertes. DENV-1, -2 y -4 fueron aislados en diferentes sitios en 1994, mientras que DENV-3 fue reportado hasta 1995. Los cuatro serotipos DENV-1, -2, -3 y -4 fueron aislados en 1997 (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>).

Los datos muestran que, incluso cuando los cuatro serotipos DENV estuvieron co-circulando en México durante estos brotes, los casos de DHF fueron poco frecuentes, lo que sugiere que la circulación simultánea de varios serotipos (hiperendemicidad) no es suficiente para causar epidemias con un gran número de casos de DHF (Watts *et al.*, 1999). Interesantemente, a partir de la introducción en México del DENV-2 genotipo Asiático/Americano a principios de la década del 2000 se ha observado un aumento en los casos de DHF con respecto a los casos de DF (Fig. 12) y pone a México como un país en riesgo de sufrir brotes graves (Cuddehe 2009), sin embargo, para entender este aumento de mejor forma, hay que tomar en cuenta también los factores demográficos, ambientales, (Escobar-Mesa *et al.*, 2003) culturales (Caballero-Hoyos *et al.*, 2006) y políticos (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>).

El comportamiento de este aumento en México es muy semejante a lo que ocurre en Tailandia, donde tres genotipos de DENV-2 han circulado, pero sólo los virus de genotipo Asiático I han sido muestreados en casos de DHF en la población desde 1991 (A-Nuegoonpipat *et al.*, 2004).

En México la detección de DENV se ha implementado por Secretaría de Salud mediante la prueba comercial Mac-ELISA (Cisneros *et al.*, 2004; Navarrete *et al.*, 2005; Ramirez-Zepeda *et al.*, 2009), mientras que los pacientes que presentan cuadros clínicos de DHF son evaluados exclusivamente por IgG-ELISA. Estos métodos no son 100% seguros, por lo que generan una sub-evaluación de los casos, además de que con estos métodos no se determinan los serotipos ni los genotipos circulantes en México, lo que es muy importante para predecir los cuadros clínicos de los pacientes con la enfermedad. Asimismo, le permite al médico decidir cual será el seguimiento del paciente ya que se ha descrito en la literatura que existe una relación entre el serotipo y el genotipo con la gravedad de la enfermedad. Estos datos también son importantes para determinar la distribución, dispersión, distribución geográfica y su evolución.

Un diagnóstico oportuno del serotipo y genotipo puede ayudar al seguimiento riguroso de los pacientes afectados y posiblemente ayudaría a evitar el desarrollo de cuadros graves de dengue y la muerte.

La técnica de RT-PCR es el método recomendable para diagnosticar el serotipo de cada muestra de DENV (Fig. 13). Nuestros resultados muestran que DHF se asoció a DENV-1 y -2 y en uno de los casos encontramos ambos serotipos (Tabla 1). Curiosamente, no observamos ningún caso de DHF asociado con DENV-3, como en otros estudios epidemiológicos en México (<http://salud.tamaulipas.gob.mx/epidemiologia/pdfs/MANUAL-DENGUE%202006.pdf>).

Recientemente, DENV-3 ha sido aislado en Brasil, pero su asociación con DHF no ha sido claramente establecido (Pires *et al.*, 2003). En cambio, DENV-3 se asoció con un brote de DHF en Cuba (Alvarez *et al.*, 2006).

De las muestras analizadas el 72% fueron de pacientes con DENV-2, el 18% fueron DENV-1, el 8% fueron DENV-3 y el 2% fueron DENV-4 (Fig. 14). La frecuencia de los diferentes serotipos en estos brotes para ambas entidades es similar, siendo el DENV-2 el serotipo más representado en las muestras seguido del DENV-1 y el DENV-3, finalmente del DENV-4 solo se registró en Oaxaca (Fig. 14) lo cuál presenta evidencias de que el brote es muy similar en todo el País.

Algunas de las muestras con DENV-2 se secuenciaron para determinar su genotipo, el cual resultó ser exclusivamente Asiático/Americano (Fig. 18) lo que nos hace pensar que este genotipo ha sustituido al genotipo Americano predominante en México hasta antes del 2001 (Diaz *et al.*, 2006).

De las muestras de DENV-3 que se secuenciaron, todas resultaron ser genotipo III (Fig. 22) el cual ha sido reportado con mayor frecuencia en el continente Americano (Messer *et al.*, 2003).

Después de determinar los serotipo y genotipos en los aislados de Oaxaca y Veracruz, consideramos de suma importancia determinar si existían marcadores genéticos específicos de genotipo y de sitio geográfico. Se observó claramente que hay cambios específicos de genotipo y de la región geográfica. Estos cambios observados en las secuencias de los DENV pueden ser debido a la adaptación tanto a los mosquitos como a los hospederos vertebrados de cada área geográfica. Esto podría estar favoreciendo la habilidad del virus para infectar tanto a *Ae. aegypti* (Armstrong y Rico-Hesse, 2003), como a su hospedero humano cuando interacciona con los receptores celulares de los hospederos (Muñoz *et al.*, 1998; Mercado-Curiel *et al.*, 2006) provocando un intenso proceso de selección o competencia entre los diferentes serotipos de DENV (Pepin *et al.*, 2008).

Con relación a esto, se sugiere que los genotipos de origen Asiático son más eficientes que el genotipo Americano porque infectan mejor a los mosquitos vectores (Armstrong y Rico-Hesse, 2003) ocasionando que su dispersión sea más rápida hacia nuevos nichos, y por otro lado, están relacionadas con un mayor número de casos de DHF, mientras que las cepas del genotipo Americano tienen una menor capacidad de infectar mosquitos (Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse, 2003), además están relacionados solo con casos de DF (Watts *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006).

A pesar de estas evidencias, los cambios que presentan en la secuencia de aminoácidos no parecen tener relación directa con la virulencia del DENV, aunque sí con la adaptación del virus con sus hospederos mosquito y humano. Por otro lado los cambios específicos de aa pueden usarse como marcadores de genotipo el cual sí tiene relación con el número de casos de DHF presente en cada brote y con el área geográfica en la que se localiza el virus. La detección del genotipo puede ayudar a determinar si el DENV que se detecta tiene mayor o menor potencial para generar DHF.

Resumiendo estos cambios específicos en las secuencias de aminoácidos de la región del interdominio C-prM y el interdominio de NS3 (Fig. 16) observamos en el genotipo Americano a la Lisina y Treonina en las posiciones 28 y 31 de la proteína prM que sustituyen a los aminoácidos ácido Glutámico y Valina presentes en otros genotipos y que se ha intentado relacionar con su baja virulencia (Leitmeyer *et al.*, 1999).

En la tabla 4 observamos que la Valina en la posición 106 de la proteína C el cual sustituye a una Isoleucina, solo se encuentra en secuencias del genotipo Asiático/Americano, reportadas desde 1997 en el Caribe, Centroamérica y México (Bennett *et al.*, 2006). En un árbol de filogenia las secuencias con este cambio se agrupan entre sí, la Valina 106 puede ser usado como marcador de subgenotipo.

La NS3 es una proteína multifuncional que posee dos dominios catalíticos, (un dominio de Serinproteasa y uno de Helicasa) y una región de interdominio que funciona como una unión (linker) entre los dos dominios. Las secuencias del gen NS3 obtenidas de las muestras incluyen al linker y parte del dominio de helicasa, el cual forma los bucles del sitio de unión a ATP necesario para que el complejo de replicación inicie la polimerización de un nuevo genoma viral (Lou *et al.*, 2008). Además esta zona está implicada en la flexibilidad entre los ambos dominios de NS3 (Rosales-Leon *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008).

No se sabe la importancia del cambio en la posición 250 de la proteína NS3, cambia de Alanina que es un aminoácido apolar por una Treonina que es un aminoácido polar, en la conformación del dominio de helicasa, cambio que también se encontró en la secuencia de la cepa de China04/85, por lo que se necesitan hacer más estudios para conocer si este cambio afecta a la virulencia del DENV.

Todas las diferencias en las secuencias de aminoácidos por supuesto se reflejan también en las secuencias de los ácidos nucleicos, lo cual puede ser evaluado a través de los análisis filogenéticos, los cuales nos agruparán las secuencias de los

aislados conforme a su genotipo. Para estos análisis se tomaron en cuenta diferentes fragmentos de las secuencias obtenidas de los aislados de DENV-2, analizando de forma independiente la intersección entre los genes *C-prM*; el interdominio de *NS3* y el gen *E*. Las secuencias de los aislados de Oaxaca y Veracruz siempre se agruparon dentro del genotipo Asiático/Americano (Fig. 17-19). Sabemos que este genotipo está relacionado con brotes de DHF (Rodríguez-Roche *et al.*, 2005; Thein *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 2003). En el continente Americano se observa con toda claridad que existen dos subgrupos dentro del genotipo Asiático/Americano, uno en Sudamérica y el Caribe y otro en centro y Norteamérica (Fig. 19).

El primer reporte donde se detectó al DENV-2 genotipo Asiático/Americano para el estado de Oaxaca (Cisneros *et al.*, 2006; Cisneros *et al.*, 2004) fue en aislados provenientes del brote ocurrido en 2001, los análisis filogenéticos ubican a estos aislados agrupados con la cepa de Jamaica de 1983, la cual es muy similar a las cepas que originaron los primeros brotes en Cuba y el Caribe de 1981 (Fig.17A), sin embargo, las secuencias obtenidas de los aislados de Oaxaca y Veracruz de los brotes del año 2005, se agrupan con secuencias de cepas que generaron brotes en el Caribe y centroamérica en los años de 1997 en adelante (Fig.17A).

Al analizar la secuencia del gen *E* observamos que las secuencias de los brotes 2005-06, están relacionadas con las cepas de Yucatán de 2002 y con cepas reportadas en Centroamérica entre los años 1999-2002, que con las cepas de Oaxaca de 2001 (Fig. 18,19) y aunque en apariencia las cepas de DENV-2 de los brotes 2005-06 se introdujeron por Centroamérica, la falta de datos no permite una afirmación contundente, dejando la posibilidad de que se hayan introducido de Cuba a Yucatán directamente. En la Fig. 20 podemos observar hipotéticamente y con los datos que se generaron de este estudio la dispersión del Dengue 30 años.

La presencia de diferentes cepas de DENV-2 genotipo Asiático/Americano en un periodo de 5 años pone de manifiesto que en el país continuamente se están

sustituyendo las cepas de DENV. Este fenómeno de continua sustitución de las cepas de DENV es común en los lugares en donde la enfermedad es endémica, pero sólo el análisis longitudinal de las muestras a través del tiempo evidencia como los linajes de DENV persisten por un período de tiempo y luego desaparecen (Wittke *et al.*, 2002; Salda *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), de tal manera que es muy difícil encontrar las mismas cepas durante un periodo de tiempo relativamente largo, aproximadamente cada 6 años surge una cepa que sustituirá a las existentes, con un alto potencial de generar brotes epidémicos (Vasilakis y Weaver, 2008). La gravedad de las manifestaciones clínicas depende de la dispersión viral y puede tener una participación significativa en el número de casos graves por la introducción de nuevas cepas que afectan a las poblaciones en riesgo (Bennett *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005).

Los análisis de filogenia demuestran que el Caribe es una región donde el DENV-2 genotipo Asiático/Americano presenta una mayor variabilidad (Uzcategi *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2006) que se manifiesta en un mayor número de cambios de aminoácidos (Tabla 4).

El genotipo III de DENV-3 detectado en este estudio es común en América y está asociado a brotes de DHF en Asia, el Caribe y Sudamérica (Messer *et al.*, 2003; Thu *et al.*, 2004; Gittens-ST y Clarke-Greenidge, 2008; Tomashek *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2009), sin embargo, en las muestras analizadas ninguno de los aislados se asocio a DHF.

Finalmente para completar nuestro análisis nos enfocamos ahora a el estudio de las recombinantes en el DENV. Dentro de los estudios previos reportados en la literatura ya existe evidencia de recombinación en poblaciones naturales, incorporando este fenómeno a los mecanismos virales para generar variabilidad genética (Holmes *et al.*, 1999; Worobey *et al.*, 1999; Tolou *et al.*, 2001; Twiddy *et al.*, 2002; Schreiber *et al.*, 2009). Este fenómeno se ha reportado en diferentes *Flavivirus* entre los que se encuentra el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la

diarrea bovina (DBV), el virus de la encefalitis Japonesa (JEV), y el virus de la encefalitis de San Louis (SLEV) (Worobey *et al.*, 1999; Twiddy *et al.*, 2002; Legrand *et al.*, 2007).

La mayoría de los reportes de recombinación están relacionados con DENV-1 (Tolou *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2003; Askov *et al.*, 2007) y solamente uno para DENV-2 (Worobey *et al.*, 1999; Twiddy *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2003). La recombinación se detecta con mayor frecuencia en el gen *E*, además de ser la proteína más estudiada. Algunos autores sugieren que esta proteína está más sujeta a presión por selección natural y presenta una mayor variabilidad, la cual ayuda a detectar la recombinación entre secuencias homólogas.

Por otra parte, la recombinación también ha sido detectada en otros puntos del genoma del DENV (Tolou *et al.*, 2001; Askov *et al.*, 2007), es por esto que se analizaron las secuencias obtenidas del fragmento $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ de 6 aislados, más una clona de esta región del aislado MEX_OAX1656_05, y de forma independiente, se analizaron las secuencias del gen *E* de estos 6 aislados, más diez clonas de éste gen, obtenidas del aislado MEX_OAX1656_05.

Es común que cada método de análisis arroje un número diferente de puntos de entrecruzamiento ó que la ubicación de éstos a lo largo de la secuencia analizada sea muy diferente (Martin *et al.*, 2005), es por eso que los puntos de entrecruzamiento más consistentes entre los diferentes métodos sean los reportados.

Los análisis de recombinación de las secuencias $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ de los aislados MEX_OAX1038_05 y MEX_OAX1656_05 presentaron evidencias de recombinación con tres puntos de entrecruzamiento de forma muy similar entre las dos cepas, (Fig. 23A-C) a pesar de que cada aislado proviene de una ciudad diferente de Oaxaca (Fig. 21). La identificación de estas cepas recombinantes, nos hace pensar que tienen un origen común y ponen en evidencia que la recombinación

en el DENV, es capaz de generar progenie capaz de ser seleccionada, mantenerse y dispersarse, formando parte de las variantes en las poblaciones de DENV (Worobey *et al.*, 1999; Twiddy *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2003).

Las secuencias de los aislados MEX_OAX1038_05 y MEX_OAX1656_05 son secuencias Asiático/Americanas que tienen insertados fragmentos de una secuencia de genotipo cosmopolita, similar a la secuencia INDI_GWL_102_01 (secuencia donadora) reportada en la India. Los análisis de filogenia para las secuencias de los aislados MEX_OAX1038_05 y MEX_OAX1656_05 muestran cómo estas secuencias se agrupan en el genotipo Asiático/Americano o Cosmopolita, dependiendo de los fragmentos limitados por los puntos de entrecruzamiento (Fig. 24A-D).

Por otro lado, al realizar el análisis de recombinación a las secuencias del gen *E* de las 10 clonas obtenidas del aislado MEX_OAX_1656_05 observamos que la clona MEX_OAX_1656_05_C07 presentaba evidencias de recombinación (Fig. 26). Interesantemente la cepa donadora en esta ocasión era del genotipo Americano (MEX_95), el cual es el genotipo que presenta mayor divergencia entre los diferentes genotipos del DENV-2. Es la primera vez que se detecta secuencias recombinantes que tienen inserciones de este genotipo (Figure 25A-B).

La inserción de la secuencia MEX_95 en la secuencia recombinante genera dos puntos de entrecruzamiento localizados en los nucleótidos 906 y 1038 determinado por RDP2 (Fig. 26A, 26B) la mayor similitud de los resultados entre los diferentes métodos dan una mayor solidez a nuestros análisis. Es importante hacer notar que al ser más divergentes las cepas parentales los cambios de identidad se pueden observar mejor (Fig. 27, 28).

Al igual que en reportes anteriores los datos obtenidos en estos análisis no muestran la existencia de un punto caliente de recombinación (Holmes *et al.*, 1999; Amanda *et al.*, 2000; Tolou *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2003; Aaskov *et al.*, 2007) y

no permiten deducir el mecanismo por el cual ocurre la recombinación en el DENV como ha sido descrito para otros virus (Kalinina *et al.*, 2004; Galli *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos no permiten inferir si la recombinación observada influye sobre la virulencia del DENV o como este fenómeno podría afectar el desarrollo de vacunas contra el DENV. Porque para conocer si una cepa recombinante de DENV modifica su virulencia, es necesario desarrollar modelos animales que permitan medirla, los cuales hasta ahora no existen.

Podemos especular, con muchas reservas, sobre como este fenómeno puede aumentar o disminuir la virulencia del DENV basándonos en lo que ocurre en otros virus de ARN como los poliovirus (Georgescu *et al.*, 1994; Rakoto-Andrianarivelo *et al.*, 2008), los virus de la influenza (Ghedini *et al.*, 2009) o el HIV (Carobene *et al.*, 2009). Un ejemplo dramático es lo ocurrido con la vacuna contra el poliovirus, la cual perdió el fenotipo atenuado por recombinación con cepas silvestres circulantes, resultando en la generación de un nuevo fenotipo que produce una parálisis aguda en niños (Rakoto *et al.*, 2008).

Uno de los factores que ha influido para que ocurra recombinación en DENV es la co-circulación de diferentes serotipos y genotipos en una misma zona geográfica (Judo *et al.*, 1998; Shafikhani, 2002; Gardella-García *et al.*, 2008), lo que aumenta la probabilidad de co-infección de diferentes serotipos o genotipos ya sea en el mosquito o en los humanos (Craig *et al.*, 2003; Gardella-García *et al.*, 2008; Aaskov *et al.*, 2007). Con estos estudios evidenciamos de forma indirecta la circulación de cepas del genotipo Americano (Bennett *et al.*, 2006), Asiático/Americano (Gardella-García *et al.*, 2008) y Cosmopolita (Loroño-Pino *et al.*, 2004) en México durante los brotes del 2005-2006 en Oaxaca.

La epidemiología molecular es un tema que está evidenciado su utilidad, en caso de DEN ha permitido saber que cepas virales son las causantes de brotes de diferentes brotes, cuales son los cambios que probablemente les permiten causar un

brote y hace extrapolaciones, pues ahora sabemos que cada 6 años surge una cepa con potencial para generar epidemias importantes alrededor del mundo. También nos permite conocer que tan frecuente están ocurriendo fenómenos como la recombinación y que tan importante es éste fenómeno para la evolución del virus y del brote.

Nuestro estudio pone en evidencia que en México es necesario implementar medidas de control del vector de manera local y de manera particular tener un mejor sistema de detección de plagas e insecto en los puertos de entrada al país ya que los vectores utilizan los medios de transporte para dispersarse.

CONCLUSIONES

- Durante los brotes de DEN en Oaxaca en 2005-06 se encontraban circulando DENV-1, -2 y -3. En Veracruz durante el brote de 2006 circularon DENV-1, -2, -3 y -4.
- DENV-1 y DENV-2 estuvieron presentes en casos de DHF, además, un de caso de DHF presento la infección con los dos serotipo.
- La cepa DENV-2 es genotipo Asiático/Americano y las secuencias de los aislados de Oaxaca y Veracruz comparten cambios con secuencias reportadas para el Caribe, Centroamérica y México que pueden usarse como marcadores de genotipo.
- Los análisis de filogenia demuestran que probablemente la cepa DENV-2 genotipo Asiático/Americano del brote de 2005-06 se introdujo a México ya sea por Centroamérica o por Cuba.
- Se detectó la recombinación de dos secuencias de los aislados obtenidos de diferentes individuos de DENV-2 genotipo Asiático/Americano y también en secuencias obtenidas a partir de un solo individuo.
- Al encontrar aislados recombinantes en diferentes ciudades de Oaxaca, con recombinación muy similar evidencian que estas cepas se mantienen y dispersar en el País.
- Los datos obtenidos en este trabajo permiten relacionar la presencia del genotipo Asiático/Americano y la recombinación con un incremento en la proporción de casos de DHF comparado con los casos de DF. Aunque seran necesarios otros estudios con un numero mayor de casos para poder hacer una relacion estadística entre el incremento de los casos de DHF y la presencia de los diferentes genotipos o de la recombinacion.

LITERATURA CITADA.

- A-Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai LQ, Ninh TU, Pyke A, Reid M. **Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains.** *Virology* **2004.** 329:505-512.
- Aaskov J, Buzacott K, Field E, Lowry K, Berlioz-Arthaud A, Holmes EC. **Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient.** *J Gen Virol* **2007.** 88(Pt 12):3334-40.
- AbuBakar S, Wong PF, Chan YF. **Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia.** *J Gen Virol.* **2002.** 83:2437-2442.
- Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzman MG. **Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002.** *Am J Trop Med Hyg* **2006.** 75(6):1113-1117.
- Amanda E, Hong Yu J, Klarmann GJ, RonY, Preston ID, Dougherty JP. **High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome.** *J Virol* **2000.** 74:(3) 1234-1240.
- Armstrong PM, Rico-Hesse R. **Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*.** *Am J Trop Med Hyg* **2003.** 68(5):539-544.
- Avilés G, Rangeón G, Vorndam V, Briones A, Baroni P, Enria D, Sabattini MS. **Dengue reemergence in Argentina.** *Emerg Infect Dis.* **1999.** Jul-Aug;5(4):575-8.
- Avilés G, Rowe J, Meissner J, Manzur Caffarena JC, Enria D, St Jeor S. **Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay.** *Arch Virol.* **2002.** Nov;147(11):2075-87.
- Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. **Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production,**

- complement activation, and apoptosis.** *J Immunol.* **1998** Dec 1;161(11):6338-46
- Balacrshnan M, BP Roques, PJ fay y RA Bambar. **Templete dimerization promotes an acceptor invasión-induced transfer mechanism during human immunodeficiency virus type 1 minus-strands síntesis.** *J Virol.* **2003.** 77:4701-4721.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. **Selection-driven evolution of emergent dengue virus.** *Mol Biol Evol.* **2003.** 20:1650-1658.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. **Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction.** *J Gen Virol* **2006.** 87(Pt 4):885-93.
- Bernardin F, Herring B, Page-Shafer K, Kuiken C, Delwart E. **Absence of HCV viral recombination following superinfection.** *J Viral Hepat.* **2006.** 13:532-537.
- Black WC 4th, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, de Lourdes Muñoz M, Farfán-Alé JA, Olson KE, Beaty BJ. **Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*.** *Arch Med Res.* **2002.** Jul-Aug;33(4):379-88.
- Blaney JE Jr, Matro JM, Murphy BR, Whitehead SS. **Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys.** *J Virol.* **2005** May;79(9):5516-28.
- Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, Fournier MV, Ennis FA, Rothman AL. **Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge.** *J Virol.* **2002.** Jun;76(11):5588-97.
- Brunier D, Michel B, Ehrlich SD. **Copy choice illegitimate DNA recombination.** *Cell.* **1988** Mar 25;52(6):883-92.

- Caballero Hoyos R, Torres López T, Chong Villarreal F, Pineda Lucatero A, Altuzar González M, López Coutiño B. **Cultural conceptions on dengue in urban contexts in Mexico.** *Rev Saude Publica.* **2006.**40(1):126-33.
- Carobene MG, Rodríguez CR, De Candia CA, Turk G, Salomón H. **In vitro dynamics of HIV-1 BF intersubtype recombinants genomic regions involved in the regulation of gene expression.** *Virology.* **2009.** 6:107.
- Carrington CV, Foster JE, Pybus OG, Bennett SN, Holmes EC. **Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas.** *J Virol.* **2005** Dec;79(23):14680-7.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC) [<http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue.htm>].
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (CENAVECE). Situación de Dengue en México [www.cenavece.gob.mx/dengue.htm].
- Chee Hui-Yee, AbuBakar Sazaly. **Identification of a 48 kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry.** *Biochem and Biophys. Research Communications.* **2004.** 320 : 11-17
- Chen SP, Yu M, Jiang T, Deng YQ, Qin CF, Han JF, Qin ED. **Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China.** *Arch Virol.* **2008.** 153(6):1175-9.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate.** *Nat Med.* **1997,** 3(8):866-71.
- Chen YC, Wang SY, King CC. **Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism.** *J Virol.* **1999.** 73(4):2650-7.
- Chen WJ, Wu HR, Chiou SS. **E/NS1 modifications of dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells.** *Intervirology* **2003.** 46(5):289-295.

- Chi-Ping Ch, T Panavas, G Luo y PD Nagy. **Heterologous RNA replication enhancer stimulates in vitro RNA synthesis and template-switching by the carmovirus, but not by the tombusvirus, RNA-dependent RNA polymerize: Implication for modular evolution of RNA viruses.** *Virology*. **2005**. 1-15
- Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. **Control of translation by the 5'-and 3'-terminal regions of the dengue virus genome.** *J Virol*. **2005**. Jul;79(13):8303-15.
- Chua SK, Selvanesan S, Sivalingam B, Chem YK, Norizah I, Zuridah H, Kumarasamy V, Chua KB: **Isolation of monoclonal antibodies-escape variant of dengue virus serotype 1.** *Singapore Med J* **2006**. 140(1-2):75-79.
- Cisneros-Solano A, Moreno-Altamirano MM, Martínez-Soriano U, Jimenez-Rojas F, Díaz-Badillo A, Muñoz ML. **Sero-epidemiological and virological investigation of dengue infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001.** *Dengue Bulletin* **2004**. 28:28-34.
- Cisneros A, Diaz-Badillo A, Cruz-Martinez G, Tovar R, Ramirez-Palacios LR, Jimenez-Rojas F, Beaty B, Black WC 4th, Munoz LM. **Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico.** *Arch Virol* **2006**. 151(1):113-125.
- Cologna R, Rico-Hesse R. **American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells.** *J Virol*. **2003**. Apr;77(7):3929-38.
- Clinical diagnosis.** In *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd edition. Edited by World Health Organization. Geneva; 1997:12-23.
[<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>]
- Cordellier R, Bouchite B, Roche JC, Monteny N, Diaco B, Akoliba P. **Circulation selvatique du virus Dengue 2, en 1980, dans les savanes subsoudaniennes de Cote d'Ivoire.** *Cah. ORSTOM. ser Ent. Med. et Parasitol*. **1983**. 21:165-179.

- Craig S, Thu HM, Lowry K, Wang XF, Holmes EC, Aaskov JG. **Diverse dengue type 2 virus populations contain recombinant and both parental viruses in a single mosquito host.** *J Virol* **2003**. 77:4463–4467.
- Cruz-Vera J. **Identificación y caracterización parcial del receptor del virus del dengue en células de mosquito.** *Tesis de Maestría, Depto. Genética y Biología Molecular. Cinvestav-IPN.* **1996**. México DF.
- Cuddehe M. **Mexico fights rise in dengue fever.** *Lancet* **2009**. 374(9690):602.
- Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. **Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains.** *J Virol.* **2000** Sep;74(17):7814-23.
- Diaz FJ, Black WCIV, Farfan-Ale JA, Lorono-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. **Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective.** *Arch Med Res* **2006**. 37(6):760-773.
- DGEPI (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud) 2001–2006 Boletín Epidemiología [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>].
- Domingo C, Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, Gascon J, Cabrerizo M, Lipkin WI, Tenorio A. **Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India.** *J Clin Microbiol* **2006**. 44:1519–1529.
- Escobar-Mesa J, Gómez-Dantés H. **Determinants of dengue transmission in Veracruz: an ecological approach to its control.** *Salud Publica Mex* **2003**. 45(1):43-53.
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. **Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins.** *J Virol.* **1991**. 65, 2467–2475.
- Galli A, Lai A, Corvasce S, Saladini F, Riva C, Dehò L, Caramma I, Franzetti M, Romano L, Galli M, Zazzi M, Balotta C. **Recombination analysis and structure prediction show correlation between breakpoint clusters and RNA hairpins in the pol gene of human immunodeficiency virus type 1 unique recombinant forms.** *J Gen Virol* **2008**. 89(Pt 12):3119-25.

BIBLIOTECA UACM

- Gao F, Nainan OV, Khudyakov Y, Li J, Hong Y, Gonzales AC, Spelbring J, Margolis HS. **Recombinant hepatitis C virus in experimentally infected chimpanzees.** *J Gen Virol.* **2007.** 88:143-147.
- Gardella-Garcia CE, Perez-Ramirez G, Navarrete-Espinosa J, Cisneros A, Jimenez-Rojas F, Ramírez-Palacios LR, Rosado-Leon R, Camacho-Nuez M, Munoz Mde L. **Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico.** *BMC Microbiol* **2008.** 8:117.
- Georgescu MM, Delpeyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combiescu M, Combiescu AA, Guillot S, Crainic R. **High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis.** *J Virol* **1994.** 68(12):8089-101.
- Ghedin E, Fitch A, Boyne A, Griesemer S, DePasse J, Bera J, Zhang X, Halpin RA, Smit M, Jennings L, St George K, Holmes EC, Spiro DJ. **Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity.** *J Virol* **2009,** 83(17):8832-41. Epub 2009 Jun 24.
- Gibbons RV, Vaughn DW. **Dengue: an escalating problem.** *BMJ.* **2002.** Jun 29;324(7353):1563-6.
- Gittens-St Hilaire M, Clarke-Greenidge N. **An analysis of the subtypes of dengue fever infections in Barbados 2003-2007 by reverse transcriptase polymerase chain reaction.** *Virol J* **2008.** 5:152.
- Gubler DJ. **Perspectives on the prevention and control of dengue hemorrhagic fever.** *Gaoxiang Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* **1994.** Dec;10 Suppl:S15-8.
- Gubler DJ. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Clin Microbiol Rev.* **1998.** Jul;11(3):480-96.
- Gubler DJ, Meltzer M. **Impact of dengue/dengue haemorrhagic fever on the developing world.** *Adv Virus Res* **1999.** 53:35-70.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Waterman SH. **A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses.** *Am J Trop Med Hyg.* **1985.** 34:170-173.

- Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV & Blinov VM. **N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases.** *Nucleic Acids Res.* **1989.** 17:3889–3897.
- Guzmán MG, Kourí GP, Bravo J, Soler M, Vázquez S, Morier L. **Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study.** *Am J Trop Med Hyg.* **1990.** 42:179-184.
- Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Calunga M, Soler M, Vazquez S, Venereo C. **Dengue Haemorrhagic Fever in Cuba. I. Serological confirmation of clinical diagnosis.** *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* **1984.** 78:235-238
- Guzman MG. **Global voices of science: Deciphering Dengue: The Cuban Experience.** *Science.* 2 September **2005.**
- Halstead SB. **Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.** *Science-* **1988-** 239, 476–481.
- Halstead SB. **Neutralization and antibodydependent enhancement of dengue viruses.** *Adv. Virus Res.* **2003.** 60, 421–467.
- Harrington LC, Edman JD, Scott TW. **Why do female Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?.** *J Med Entomol.* **2001.** May;38(3):411-22.
- Harris E, Videa E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, Gonzalez A, Amador JJ, Balmaseda A. **Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua.** *Am J Trop Med Hyg.* **2000** Jul-Aug;63(1-2):5-11.
- Hanley KA, Manlucu LR, Manipon GG, Hanson CT, Whitehead S, Murphy BR, Blaney JE Jr. **Introduction of mutations into the nonstructural genes or 3' untranslated region of an attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate further decreases replication in rhesus monkeys while retaining protective immunity.** *Vaccine.* **2004.** Sep 3;22(25-26):3440-8.

- Hilgard P, Stockert R. **Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes.** *Hepatology*. **2000**. Nov;32(5):1069-77.
- Holmes EC, Twiddy SS. **The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus.** *Infect Genet Evol*. **2003**, 3(1):19-28.
- Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. **Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus.** *Mol Biol Evol* **1999**. 16:405-409.
- Judo MS, Wedel AB, Wilson C. **Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination.** *Nucleic Acids Res* **1998**, 26(7):1819-25.
- Jin L, Nei M. **Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis.** *Mol Biol Evol* **1990**. 7:82-102.
- Kalayanarooj S, Nimmannitya S. **Is dengue severity related to nutritional status?.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. **2005**. Mar;36(2):378-84.
- Kalinina O, Norder H, Magnus LO. **Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation.** *J. Gen. Virol* **2004**. 85(Pt 7):1853-7.
- Koonin EV. **Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus.** *J Gen Virol*. **1993**. 74, 733-740.
- Kosakovsky-Pond SL, Frost SDW. **Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments.** *Bioinformatics* **2005b**. 21:2531-2533.
- Kosakovsky-Pond SL, Frost SDW. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol*. 2005, 22:1208-1222.
- Kosakovsky-Pond SL, Frost SDW, Muse SV. **HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies.** *Bioinformatics* **2005**. 21: 676-679.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. **Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion.** *Cell*. **2002**. Mar 8;108(5):717-25.

- Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. **Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus.** *J Virol.* **2001** May; 75(10):4633-40.
- Lai MM. **RNA recombination in animal and plant viruses.** *Microbiol Rev.* **1992** Mar. 56(1):61-79.
- Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. **Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses.** *J Gen Virol* **1994.** 75(Pt 1):65-75.
- Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. **Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses.** *J Gen Virol* **1997.** 78(Pt 9):2279-2284.
- Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J. **New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus.** *J Virol.* **2007.** 81:4357-4362.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. **Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis.** *J Virol.* **1999** Jun. 73(6):4738-47.
- Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW: **Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses.** *Virology* **1993.** 197(1):216-224.
- Lindenbach BD, Rice CM. **Molecular biology of flaviviruses.** *Adv Virus Res* **2003.** 59:23-61.
- Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, García-Rejón JE, Díaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narváez M, Jiménez-Ríos E, Blair CD, Olson KE, Black W 4th, Beaty BJ. **Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico.** *Am J Trop Med Hyg* **2004.** 71(4):485-92.
- Luo D, Xu T, Hunke C, Grüber G, Vasudevan SG, Lescar J. **Crystal structure of the NS3 protease-helicase from Dengue virus.** *J Virol* **2008.** 82(1):173-183.
- Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. **Dengue viral infections.** *Postgrad Med J.* **2004** Oct. 80(948):588-601.

- Mackenzie JM, Jones MK & Young PR. **Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication.** *Virology* **1996.** 220, 232–240.
- Marianneau P, Mégret F, Olivier R, Morens DM, Deubel V. **Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs.** *J Gen Virol.* **1996.** 77 (Pt 10):2547-54.
- Martin DP, Williamson C, Posada D. **RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments.** *Bioinformatics* **2005.** 21:260–262.
- Melino S, Paci M. **Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach.** *FEBS J.* **2007** Jun. 274(12):2986-3002. Epub 2007 May 17
- Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ. **Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 30 noncoding region of the RNA genome: Analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys.** *J. Virol.* **1996.** 70(6):3930–3937.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. **Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus.** *Emerg Infect* **2003.** 800–809.
- Mercado-Curiel RF, Esquinca-Avilés HA, Tovar R, Díaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Muñoz Mde L. **The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells.** *BMC Microbiol.* **2006** Oct. 2;6:85.
- Monath TP. **Dengue: the risk to developed and developing countries.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994** Mar. 29;91(7):2395-400.
- Moncayo AC, Fernandez Z, Ortiz D, Diallo M, Sall A, Hartman S, Davis CT, Coffey L, Mathiot CC, Tesh RB, Weaver SC. **Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes.** *Emerg Infect Dis* **2004** Oct. 10(10):1790-6.
- Monlun E, Zeller H, Traore-Lamizana M, Hervy JP, Adam F, Mondo M, Digoutte JP. **Caracteres cliniques et épidémiologiques de la dengue 2 au Sénégal.** *Med. Mal. Infect.* **1992.** 22:718–721.

- Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Pradeep Das, Tovar Rosalinda, Ortega Arturo. **Putative dengue virus receptors from mosquito cells.** *FEMS Microbiol Letts* **1998.** 168:251-258.
- Moreno-Altamirano MM, Sánchez-García FJ, Muñoz ML. **Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2.** *J Gen Virol.* **2002.** 83(Pt 5):1123-30.
- Moreno MP, Casane D, Lopez L, Cristina J. **Evidence of recombination in quasispecies populations of a hepatitis C virus patient undergoing anti-viral therapy.** *Virology.* **2006.** 3:87.
- Navarrete-Espinosa J, Gómez-Dantés H, Celis-Quintal JG, Vázquez-Martínez J. **Clinical profile of dengue hemorrhagic fever cases in Mexico.** *Salud Publica Mex* **2005** 47:193-200.
- Pan American Health Organization. (PAHO)
<http://www.paho.org/spanish/hcp/hct/vbd/arias-dengue.htm>.
- Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA. **Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus.** *BMC Microbio* **2008.** 8:28.
- Perret C, Abarca K, Ovalle J, Ferrer P, Godoy P, Olea A, Aguilera X, Ferrés M. **Dengue-1 virus isolation during first dengue fever outbreak on Easter Island, Chile.** *Emerg Infect Dis* **2003** Nov. 9(11):1465-7.
- Pires-Neto RJ, Lima DM, de Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BAL: **Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001.** *Braz J Med Biol Res* **2005.** 38(06):843-852.
- Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. **Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein.** *Am J Trop Med Hyg* **2001** Nov. 65(5):427-34.
- Rakoto-Andrianarivelo M, Gumede N, Jegouic S, Balanant J, Andriamamonjy SN, Rabemanantsoa S, Birmingham M, Randriamanalina B, Nkolomoni L, Venter M, Schoub BD, Delpeyroux F, Reynes JM. **Reemergence of recombinant**

- vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar.** *J Infect Dis.* **2008.** 197(10):1427-35.
- Ramírez-Zepeda MG, Velasco-Mondragón HE, Ramos C, Peñuelas JE, Maradiaga-Ceceña MA, Murillo-Llanes J, Rivas-Llamas R, Chaín-Castro R. **Clinical and epidemiologic characteristics of dengue cases: the experience of a general hospital in Culiacan, Sinaloa, Mexico.** *Rev Panam Salud Publica* **2009.** 25(1):16-23.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. **Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells.** *J Virol.* **2005.** 79(8):4557-67.
- Rico-Hesse R. **Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature.** *Virology* **1990.** 174(2):479-493.
- Rico-Hesse, R. **Microevolution and virulence of dengue viruses.** *Adv Virus Res* **2003.** 59:315-341.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. **Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas.** *Virology* **1997.** 230(2):244-51.
- Roche JC, Cordellier R, Hervy JP, Digoutte JP, Monteny N. **Isolement de 96 souches de virus Dengue 2 a partir de moustiques captures en Cote d'Ivoire et en Haute Volta.** *Ann. Virol. (Institut Pasteur)* **1983.** 134E:233-244.
- Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG. **Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997.** *Virology* **2005.** 334(2):154-159.
- Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG. **Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic.** *Arch Virol* **2005.** 150(3):415-425.

- Rosales-León L, Ortega-Lule G, Ruiz-Ordaz B. **Analysis of the domain interactions between the protease and helicase of NS3 in dengue and hepatitis C virus.** *J Mol Graph Model* **2007**. 25(5):585-594.
- Rothman AL. **Immunology and immunopathogenesis of dengue disease.** *Adv Virus Res* **2003**. 60:397-419.
- Rudnick, A. **Studies of the ecology of dengue in Malaysia: A preliminary report.** *J. Med. Entomol* 1965. 2(2):203–208.
- Salas-Benito J, Del Angel RM. **Identification of two Surface proteins from C6/36 cells that bind Dengue Type 4 virus.** *J. Virol* **1997**. 71(10)7246-7252
- Salda LTD, Parquet MDC, Matias RR, Natividad FF, Kobayashi N, Morita K. **Molecular epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* **2005**, 73(4):796–802.
- Saluzzo JF, Cornet M, Castagnet P, Rey C, Digoutte JP. **Isolation of dengue 2 and dengue 4 viruses from patients in Senegal.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* **1986**. 80(1):5.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Strategies for cloning in plasmid vectors. In Molecular cloning a laboratory manual.** Volume 1. 2nd edition. Edited by Nolan C. New York. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **1989**:1.53-1.72.
- Sanchez IJ, Ruiz BH. **A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice.** *J. Gen. Virol* **1996**. 77(Pt. 10):2541–2545.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**:74 (12): 5463–
- Schreiber MJ, Holmes EC, Ong SH, Soh HSH, Liu W, Tanner L, Aw PPK, Tan HC, Ching NL, Leo YS, Low JGH, Ong A, Ooi EE, Vasudevan SG, Hibberd ML. **Genomic Epidemiology of a Dengue Virus Epidemic in Urban Singapore.** *J Virol* 2009.

- Seah CL, Chow VT, Tan HC, Can YC. **Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers.** *J Virol Methods* **1995.** 51(2-3):193-200.
- Secretaria de Salud del Estado de Tamaulipas. **Boletín epidemiológico 2006.** [<http://salud.tamaulipas.gob.mx/epidemiologia/pdfs/MANUAL-DENGUE%202006.pdf>].
- Shafikhani S. **Factors affecting PCR-mediated recombination.** *Environ Microbiol* **2002.** 4(8):482-6.
- Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH. **Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift.** *Am J Trop Med Hyg* **2009.** 80(6):1039-46.
- Sugiura N. **Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections.** *Comm Statist* **1978.** A7:13-26.
- Singh UB, Seth P. **Use of nucleotide sequencing of the genomic cDNA fragments of the capsid/premembrane junction region for molecular epidemiology of dengue type 2 viruses.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **2001.** 32(2):326-35.
- Smith JM y NH Smith. **Detecting recombination from gene trees.** *Mol Biol Evol* **1998.** 15(5):590-599.
- Stiasny K y Heinz FX. **Flavivirus membrane fusion.** *J Gen Virol.* **2006.** 87:2755-2766.
- Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. **Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA polymerase.** *Gene* **1992.** 122:281-288.
- Talarico LB, Duarte ME, Zibetti RG, Nosedá MD, Damonte EB. **An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection.** *Planta Med* **2007** Nov. 73(14):1464-8. Epub 2007 Oct 18.
- Tan BH, Fu J, Sugrue RI, Yap EH, Chan YC & Tan YH. **Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity.** *Virology* **1996.** 216, 317-325.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Biol Evol* **2007**. 24(8):1596-1599.
- Tamura K, Nei M. **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** *Mol Biol Evol* **1993**. 10(3):512-526.
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. **DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells.** *J Exp Med*. **2003**. 197(7):823-9.
- Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM, Aaskov J. **Risk factors in dengue shock syndrome.** *Am J Trop Med Hyg* **1997**, 56(5):566-572.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nu Acids Resear* **1994**. 22:4673-4680.
- Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, Thant KZ, Thein S, Aaskov JG. **Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3 and 4 by dengue 1.** *Emerg Infect Dis* **2004**. 10:593-597.
- Tolou HJG, Couissinier-Paris GP, Durand JP, Mercier V, dePina JJ, de Micco P, Billoir F, Charrel RN, de Lamballerie X. **Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences.** *J Gen Virol*. **2001**. 82:1283-1290.
- Tomashek KM, Rivera A, Muñoz-Jordan JL, Hunsperger E, Santiago L, Padro O, Garcia E, Sun W. **Description of a large island-wide outbreak of dengue in Puerto Rico, 2007.** *Am J Trop Med Hyg* **2009**. 81(3):467-74.
- Torres JR, Castro J. **The health and economic impact of dengue in Latin America.** *Cad Saude Publica*. **2007**. 23 Suppl 1:S23-31.
- Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC. **Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature.** *J Gen Virol*. **2002** Jul. 83(Pt 7):1679-89.

- Twiddy SS, Farrar JF, Chau NV, Wills B, Gould EA, Gritsun T, Lloyd G, Holmes EC. **Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus.** *Virology*. **2002**. 298, 63–72.
- Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA. **The molecular epidemiology of Dengue type 2 virus in Venezuela: Evidence for in situ virus evolution and recombination.** *J Gen Virol* **2001**. 82:2945-2953.
- Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, Weaver SC. **Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge.** *Virology* **2007**.1 358(2):402-12. Epub 2006 Oct 2.
- Vasilakis N, Weaver SC. **The history and evolution of human dengue emergence.** *Adv Virus Res*. **2008**. 72:1-76.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. **Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses.** *J Virol* **2000** Apr. 74(7):3227-34.
- Wang WK, Chao DY, Lin SR, King CC, Chang SC. **Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan.** *J Microbiol Immunol Infect*. **2003**. 36:89–95.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. **Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever.** *Lancet* **1999**. 354(9188):1431-1434.
- Weaver SC, Vasilakis N. **Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease.** *Infect Genet Evol* **2009** Jul. 9(4):523-40. Epub 2009 Feb 13.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nat Rev Microbiol* **2007** Jul. 5(7):518-28.
- Wierzchoslwski R, A Dziaott, S Kunimalayan y JJ Bujarski. **A transcriptionally active sugenomic promoter supports homologous crossovers in a plus-strands RNA virus.** *J Virol*. **2003**. 77: 6769-6776.

- Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG. **Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period.** *Virology* **2002**, 301(1):148-156.
- Worobey M, EC Holmes. **Evolucionari aspects of recombination in RNA viruses.** *J Gen Virol.* **1999.** 80:2535-2543.
- Worobey M, Rambaut A, Holmes EC. **Widespread intraserotypic recombination in natural populations of dengue virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999.** 96:7352-7357.
- You S, Falgout B, Markoff L, Padmanabhan R. **In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure.** *J Biol Chem* **2001** May. 11;276(19):15581-91. Epub 2001 Feb 5.
- Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. **Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996** Jan. 23;93(2):548-53.
- Zhang C, Mammen MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Nisalak A, Vaughn DW, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC. **Structure and age of genetic diversity of dengue virus type 2 in Thailand.** *J Gen Virol* **2006.** 87(Pt 4):873-883.
- Zhang C, Mammen MP Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC: **Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence.** *J Virol* **2005.** 79(24):15123-15130.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. **Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus.** *Nat Struct Biol.* **2003.** 10(11):907-12. Epub 2003 Oct 5.
- Zhang XG, Mason PW, Dubovi EJ, Xu X, Bourne N, Renshaw RW, Block TM, Birk AV. **Antiviral activity of geneticin against dengue virus.** *Antiviral Res* **2009** Jul. 83(1):21-7. Epub 2009 Mar 11.

Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. **Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions.** *J Gen Virol.* **2008** Dec. 89(Pt 12):3047-51.

PUBLICACIONES

Research article

Open Access

Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico

Catalina E Gardella-Garcia^{†1}, Gerardo Perez-Ramirez^{†2}, Joel Navarrete-Espinosa³, Alejandro Cisneros⁴, Fabiola Jimenez-Rojas⁵, Luis R Ramirez-Palacios⁵, Rocio Rosado-Leon⁶, Minerva Camacho-Nuez² and Maria de L Munoz^{*1}

Address: ¹Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Mexico D. F., Mexico, ²Program of Genomic Sciences, Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico, San Lorenzo #290 Col. Del Valle, Mexico D. F., Mexico, ³Division de Epidemiologia, Coordinacion de Programas Integrados de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Insurgentes Sur 253, 7° Piso, Col. Roma, C.P. 06700 Mexico D. F., Mexico, ⁴Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma Benito Juarez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico, ⁵Laboratorio Estatal de Salud Publica de Oaxaca, Servicios de Salud de Oaxaca, Oaxaca, Mexico and ⁶Delegacion Veracruz Norte. IMSS, Veracruz, Mexico

Email: Catalina E Gardella-Garcia - evgardella@yahoo.com.mx; Gerardo Perez-Ramirez - geraperami@gmail.com; Joel Navarrete-Espinosa - joel.navarrete@imss.gob.mx; Alejandro Cisneros - acisneross@gmail.com; Fabiola Jimenez-Rojas - fajiro1@hotmail.com; Luis R Ramirez-Palacios - acisneross@gmail.com; Rocio Rosado-Leon - rocio.rosado@imss.gob.mx; Minerva Camacho-Nuez - mcamachonuez@yahoo.com.mx; Maria de L Munoz* - lmunoz@cinvestav.mx

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 15 July 2008

Received: 22 December 2007

BMC Microbiology 2008, 8:117 doi:10.1186/1471-2180-8-117

Accepted: 15 July 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/117>

© 2008 Gardella-Garcia et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Dengue (DEN) is an infectious disease caused by the DEN virus (DENV), which belongs to the *Flavivirus* genus in the family *Flaviviridae*. It has a (+) sense RNA genome and is mainly transmitted to humans by the vector mosquito *Aedes aegypti*. Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) are caused by one of four closely related virus serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). Epidemiological and evolutionary studies have indicated that host and viral factors are involved in determining disease outcome and have proved the importance of viral genotype in causing severe epidemics. Host immune status and mosquito vectorial capacity are also important influences on the severity of infection. Therefore, an understanding of the relationship between virus variants with altered amino acids and high pathogenicity will provide more information on the molecular epidemiology of DEN. Accordingly, knowledge of the DENV serotypes and genotypes circulating in the latest DEN outbreaks around the world, including Mexico, will contribute to understanding DEN infections.

Results: 1. We obtained 88 isolates of DENV, 27 from Oaxaca and 61 from Veracruz. 2. Of these 88 isolates, 16 were serotype 1; 62 serotype 2; 7 serotype 3; and 2 serotype 4. One isolate had 2 serotypes (DENV-2 and -1). 3. Partial nucleotide sequences of the genes encoding C- prM (14 sequences), the NS3 helicase domain (7 sequences), the NS5 S-adenosyl methionine transferase domain (7 sequences) and the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain (18 sequences) were obtained. Phylogenetic analysis showed that DENV-2 isolates belonged to the Asian/American genotype. In addition, the Asian/American genotype was divided into two clusters, one

containing the isolates from 2001 and the other the isolates from 2005–2006 with high bootstrap support of 94%.

Conclusion: DENV-2 was the predominant serotype in the DF and DHF outbreak from 2005 to 2006 in Oaxaca State as well as in the 2006 outbreak in Veracruz State, with the Asian/American genotype prevalent in both states. Interestingly, DENV-1 and DENV-2 were the only serotypes related to DHF cases. In contrast, DENV-3 and DENV-4 were poorly represented according to epidemiological data reported in Mexico. We found that isoleucine was replaced by valine at residue 106 of protein C in the isolates from these 2005–2006 outbreaks and in those from the 1997, 1998 and 2001 outbreaks in the Caribbean islands. We suggested that this amino acid change may be used as a signature for isolates arising in the Caribbean islands and pertaining to the Asian/American genotype. Other amino acid changes are specific for the Asian/American, Asian and American strains.

Background

DF and DHF/DSS are mosquito-borne infectious diseases transmitted by the vector *Ae. Aegypti* and have become a major global health concern. This mosquito vector is endemic in several regions of Mexico, especially the South Pacific Coast [1-3]. DF and DHF/DSS occur in tropical and sub-tropical regions around the world, predominantly in urban and suburban areas. The illness is endemic in more than 100 cities in Africa, America, the Mediterranean region and Southeast Asia [4]. Fifty million people are infected every year; approximately 500,000 of them are hospitalized and between 5% and 15% die [5]. This viral illness is characterized by a sudden onset of symptoms including high fever, severe headaches, extreme myalgias and arthralgias, retro-orbital pain, anorexia, gastrointestinal disturbances, exanthema, nausea and vomiting; a rash may appear three or four days after the fever begins [6,7].

The infection caused by any of the four serotypes of DENV confers specific permanent immunity to the virus but does not protect against the other serotypes [8]; however, short-term cross-immunity against the other three serotypes has been reported [9]. People living in an endemic area can be infected with any of the four serotypes of DENV and can even be simultaneously infected by two serotypes [10]. The relevance to pathology of the serotype and genotype of the infecting strain has been described several times [11-13].

The increase in the number of DHF and DSS cases worldwide is not fully understood. It was first explained by mutations making DENV more virulent, but this hypothesis has not been supported. Then, the "secondary infection" or "immune enhancement" hypothesis was proposed to explain the increased virulence of DENV in patients with secondary infections. This hypothesis is still favoured [14]. However, observations in Southeast Asia, some Pacific islands and the Americas are not consistent with it, so it has been modified several times. Advances in molecular biology have led to the recognition that some

viral strains are more virulent than others [11-13]. The introduction of DHF into Cuba in 1981 was linked to the arrival of a Southeast Asian strain of DENV-2 on the island [15]. Subsequently, an extended outbreak of DHF/DSS occurred in Venezuela and Mexico, and this was linked to the introduction of the same Southeast Asian strain of DENV-2 [16,17]. Furthermore, a major epidemic of DF due to DENV-2 with the American genotype was reported in Peru in 1995, about 5 years after an epidemic of DENV-1 [18]. The American DENV-2 genotype strains may have lacked the properties necessary to cause severe disease. The American genotype has been associated with mild disease (DF), while the Southeast Asian genotype coincided with the appearance of DHF on the American continent [11]. On this basis, viral virulence and immune responses have been considered two major factors in the pathogenesis of DHF.

Early phylogenetic studies organized DENV sequences into clusters on trees and classified them into a series of genotypes or subtypes [19-22]. Within DENV-2, six genotypes have been proposed, five of which occur in humans [22,23]. Although the Asian/American genotype originated in Southeast Asia and spread to the Americas in the early 1980s [22], the strains phylogenetically classified as Asian I and Asian II are currently restricted to Southeast Asia [24]; the American genotype is mostly found in the Americas and its frequency is now decreasing; and the Cosmopolitan genotype is widely distributed across the tropical and subtropical world [24,25]. DENV-1 consists of five subtypes (I-V) [22]. The DENV-3 and -4 viruses are currently classified into four and two genotypes, respectively [19,20].

As mentioned above, DENV genotypes differ in virulence, including their human pathogenicities and epidemic potential. Therefore, phylogenetic studies were conducted to determine the epidemic potential of DENV isolates from Veracruz and Oaxaca. These studies were carried out using partial sequences of the genes encoding C-prM, NS5

and NS3. C and prM were chosen because they represent a region that is commonly analyzed in studies of the molecular epidemiology of DEN [17,26]. NS5 and NS3 are important because they may be useful for determining the genotype and may help us to establish additional specific genetic markers. Also, NS5 has more nucleotide substitutions [27] and five of the eight amino acid differences between the American and Asian genotypes are located in the N terminus of this protein [12]. The RdRp of NS5 is crucial for viral RNA replication. NS5 also contains an MTase domain that is essential for the interaction with RdRp required for virus replication and/or infectivity [28]. In addition, NS5 has been used thoroughly in studies of flavivirus phylogenies [29,30].

The interdomain (linker) region 169–179 of NS3 and the two loops that encircle the entrance of the ATP binding pocket [31] were also studied because of the role of this protein in virus replication. This region has also been implicated in the intrinsic flexibility that couples movements between the NS3 protease and helicase domains [32].

In summary, phylogenetic and genetic analyses of Oaxaca and Veracruz virus isolates reveal the putative geographic origins of the viruses and potential molecular determinants of virulence.

Results

Virus isolation and serotyping

The Mac-Elisa test has been implemented by the Ministry of Health in Mexico for diagnosing DENV infections [33]. Patients whose clinical reports show symptoms of DHF are exclusively evaluated using an IgG-ELISA kit. Reported cases are under-notified and the circulating serotype is not widely known. Analysis of the circulating serotype is important since it has been observed that DEN cases in Mexico are increasing annually (Figure 1). This Figure also shows that the percentage of DHF cases has increased in comparison to DF cases [34].

The serotypes of 88 DENV samples from different sites in Oaxaca and Veracruz States, Mexico (Figure 2) were evaluated and the results are shown in Figure 3. Serotyping was performed by RT-PCR using the RNA obtained from isolates in C6/36 cells; each test to determine serotype was repeated at least twice. C6/36 cells were chosen because the nucleotide sequence of the virus genome is conserved [35,36].

Out of 27 isolates from Oaxaca, 18 were diagnosed with DHF; 12 were serotype 2 and six were serotype 1 (Table 1). Among the 61 isolates obtained from patient sera in Veracruz State, fifteen with DHF were serotype 2, two were serotype 1 and the isolate VER/MEX013A/06 showed both serotypes 1 and 2.

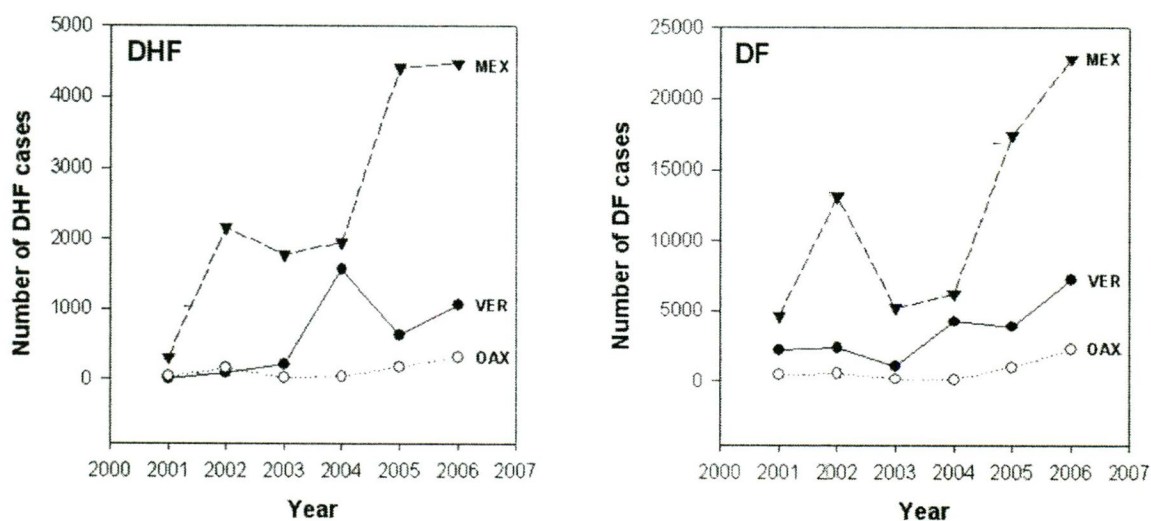


Figure 1

Epidemiology of DEN in Mexico (2000–2006). The numbers of DF and DHF cases were obtained from CENAVECE [34]. The total numbers of DF and DHF cases in Oaxaca and Veracruz states are compared with the numbers in Mexico as a whole.

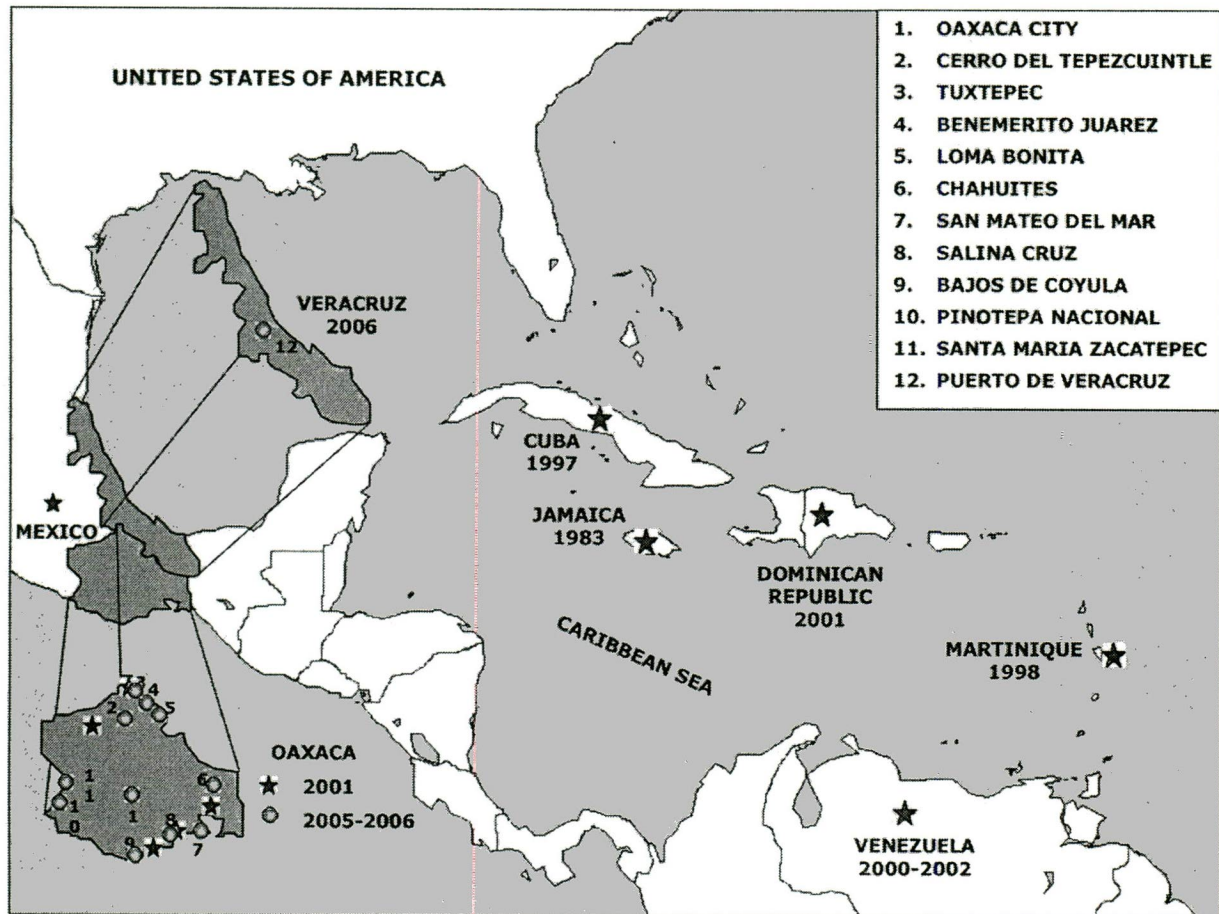


Figure 2

Mexican and Caribbean region map. The virus sample collection sites for the 13 isolates that were sequenced from Oaxaca and Veracruz States are shown in addition to the sites of origin of the GenBank sequences from the strains used in this phylogenetic study. These strains are from Caribbean countries and are grouped in the same branch as the sequences of our isolates corresponding to the Asian/American genotype.

Out of a total of 52 isolates with DF, 35 were serotype 2, seven serotype 3, eight serotype 1 and two serotype 4 (Table 1). Known strains of DENV-1, -2, -3 and -4 were used as positive controls for the RT-PCR assays.

Figure 3 shows the percentages of cases of DENV-1 (22%, 16%), DENV-2 (67%, 72%) and DENV-3 (11%, 6%) in Oaxaca and Veracruz respectively; DENV-4 cases had the lowest percentages (0%, 3%). These values were consistent in both States.

Phylogenetic analysis of Oaxaca isolates

Portions of the C_{91} -prM₁, NS5₇₃, NS5₂₂₀₆ and NS3₄₈₄ genes were amplified and sequenced as described in the Methods section. Fourteen sequences were obtained from 8 isolates from Oaxaca and 6 from Veracruz for the C-prM

fragment (11 with DF and 3 with DHF); 7 sequences were obtained from 5 Oaxaca isolates and 2 from Veracruz isolates for the MTase domain (NS5₇₃) fragment (4 with DF and 3 with DHF); 18 sequences were obtained from 7 Oaxaca isolates and 11 from Veracruz isolates for the RdRp domain (NS5₇₃) fragment (12 with DF and 6 with DHF); 7 sequences were obtained from 7 Oaxaca isolates for the helicase domain fragment (6 with DF and 1 with DHF).

Phylogenetic analysis was then performed on these sequences, including other prototype sequences of characterized isolates for DENV-2 (Table 2, 3).

This analysis showed that C_{91} -prM₁, NS5₇₅ and NS3₄₈₄ in the DENV-2 isolates from Oaxaca and Veracruz were most

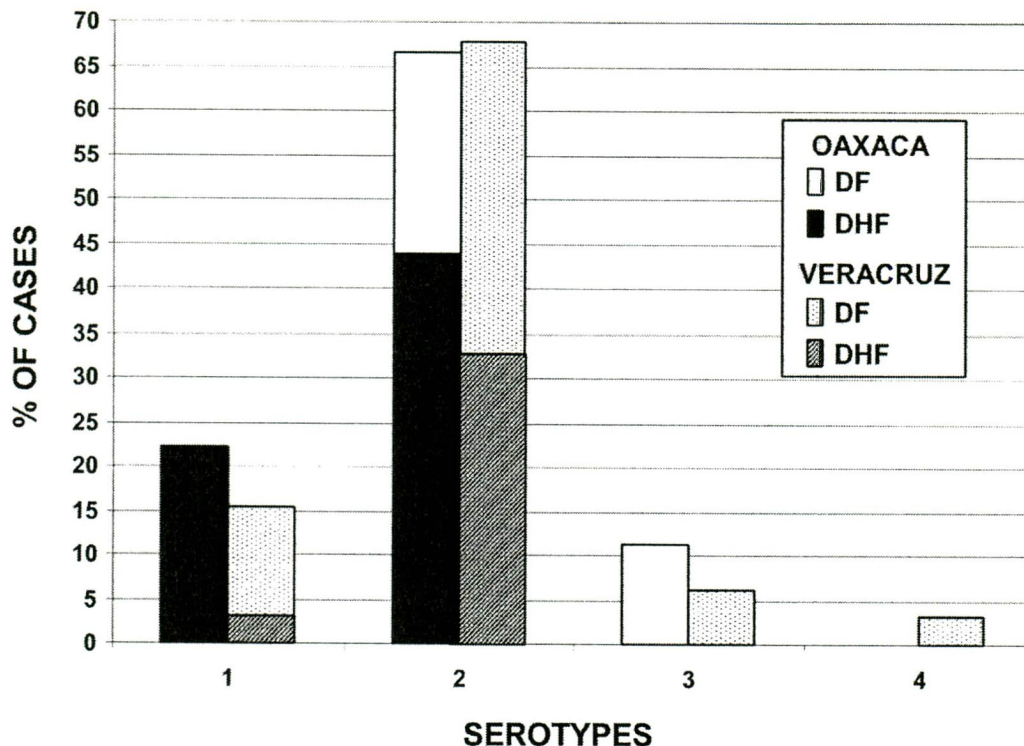


Figure 3
Summary of all DENV analyzed in this study. The percentages of DENV-1, 2, 3 and 4 detected in Oaxaca and Veracruz States during outbreaks in 2005–06. The graph shows that the relative percentages of DENV-1, 2, 3 and 4 do not differ between Oaxaca and Veracruz, although the numbers of samples analyzed were different.

closely related to strains from the Caribbean islands Cuba, Dominican Republic and Martinique (Figure 4). The phylogenetic tree for NS5₇₅ and NS3₄₈₄ is not shown. The strains from Brazil, Venezuela and Jamaica formed an independent clade. Interestingly, analysis of C₉₁-prM₁ showed that the isolates obtained in 2001 belonged to a

different clade from those obtained in 2005–2006, with a high bootstrap support of 94%.

Phylogenetic analysis of NS5₂₂₀₆ gave a somewhat different pattern: essentially, the isolates belonged to the same clade as those from Venezuela, Brazil and Jamaica and were distinct from the Caribbean islands isolates (Figure 5). Bootstrap support was maintained in this analysis.

Table 1: Serotype determination of isolates from Oaxaca (2005–2006) and Veracruz (2006).

| SEROTYPE | DIAGNOSIS | OAXACA | VERACRUZ |
|----------|-----------|--------|----------|
| 1 | DHF | 6 | 2 |
| | DF | 0 | 8 |
| 2 | DHF | 12 | 15 |
| | DF | 6 | 29 |
| 3 | DF | 3 | 4 |
| 4 | DF | 0 | 2 |
| 1,2 | DHF | 0 | 1 |

All the genotypes clustered in separate branches with high bootstrap support, as previously shown in phylogenetic analysis of other virus sequences [25,17,37]. Our analysis supports the view that the Asian/American strains are phylogenetically different from the main Asian and American genotypes.

Sequence analysis of Oaxaca isolates

Most of the amino acid (aa) differences were associated with nucleotide changes in the prM fragment (13.6%, 6/

Table 2: Summary of consistent amino acid change among the five DENV-2 genotypes viruses.

| PROTEIN | | | | AMINO ACID POSITIONS ^a | | | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|-----------|----------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| C and PrM | | | | 101 | 104 | 106 | 108 | 112 | 129 | 130 | 142 | 143 | 145 | 153 | |
| PrM | | | | | | | | | 14 | 15 | 28 | 29 | 31 | 39 | |
| STRAIN/YEAR | ACCESSION GENBANK No. | DIAGNOSIS | GENOTYPE | | | | | | | | | | | | |
| Tonga/74 | AY744147 | DF | AMERICAN | T | M | I | L | V | S | R | K | D | T | M | |
| SI vaccine/USA/93 | M19197 | DF | AMERICAN | T | M | I | L | V | S | R | K | D | T | M | |
| I31/MEX/92 | AF100469 | DF | AMERICAN | T | M | I | L | V | S | R | K | D | T | M | |
| I348600/COL/86 | AY702040 | DF | AMERICAN | T | M | I | L | V | S | R | K | D | T | M | |
| P23085 INDI-60/01 | DQ448238 | DF | AMERICAN | T | M | I | L | V | S | R | K | D | T | M | |
| Ven2/87 | AF100465 | DF | AMERICAN | T | M | I | L | V | S | R | K | D | T | L | |
| HUAT2/MEX/01 | AY692469 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | K | V | V | L | |
| SALC9/MEX/01 | AY692465 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | K | D | V | I | |
| HUAT11/MEX/01 | AY692470 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | K | D | V | I | |
| HUAT12/MEX/01 | AY692471 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| TUX19/MEX/01 | AY692467 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| TON4/MEX/01 | AY692468 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| JUCH5/MEX/01 | AY692466 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAX/MEXS707/05* | EF595822 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | M | |
| OAX/MEXS1038/05* | EF595828 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAXS1656/MEX/05* | EF595834 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAX/MEXS739/05* | EF595829 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAX/MEXS1733/06* | EF595821 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAX/MEXS14946/06* | EF595800 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAX/MEXS14760/06* | EF595824 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| OAX/MEXS1020/06* | EF595823 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| VER/MEXS013A/06* | EU552535 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| VER/MEXS011A/06* | EU552536 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| VER/MEXS008A/06* | EU552538 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| VER/MEXS015A/06* | EU552534 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| VER/MEXS033A/06* | EU552537 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| VER/MEXS020A/06* | EU552539 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| Cuba13/97 | AY702034 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| Cuba115/97 | AY702036 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| Cuba205/97 | AY702039 | DSS | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| Cuba165/97 | AY702038 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| Cuba58/97 | AY702035 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| Cuba89/97 | AY702037 | DHF/DSS | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| MART/98-703/98 | AF208496 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| DR23/01 | AB122020 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |
| DR31/01 | AB122021 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I | |

Table 2: Summary of consistent amino acid change among the five DENV-2 genotypes viruses. (Continued)

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|---------------------------|-----|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|----------|---|----------|
| DR59/01 | AB122022 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I |
| LARD1701/Ven/01 | AF360861 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I |
| LARD1432/Ven/01 | AF360860 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | V | L | A | G | R | E | D | V | I |
| LARD1910/Ven/01 | AF360862 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I |
| LARD1996/Ven/01 | AF360863 | DF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I |
| Mara3/Ven/02 | AY0444421 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I |
| BR64022/02 | AF489932 | NA | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I |
| Jamaica/1409/83 | M20558 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I |
| China 04 | U87411 | DHF | ASIAN/AMERICAN | T | V | I | L | A | G | R | E | D | V | I |
| CO390/Th/99 | AF100462 | DHF | ASIAN I | S | V | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| Bangkok 1974 | AJ487271 | NA | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| 16681/USA/97 | U87411 | NA | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | V | V | M |
| PDK53/USA/97 | U87412 | NA | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | V | V | M |
| 16681-PDK53/97 | U87411 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| ThNH-p11/93 | AF022437 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| ThNH-p12/93 | AF022438 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| ThNH-p14/93 | AF022439 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| ThNH-7/93 | AF022434 | DSS | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH-28/93 | AF022435 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH-52/93 | AF022436 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH-p16/93 | AF022440 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH-p36/93 | AF022441 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH29/93 | AF169678 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH36/93 | AF169679 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH45/93 | AF169680 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH55/93 | AF169681 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH54/93 | AF169682 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH62/93 | AF169683 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH63/93 | AF169684 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH69/93 | AF169685 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH73/93 | AF169686 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH76/93 | AF169687 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| ThNH81/93 | AF169688 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| Mara 4/Ven/90* | AF100466 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| K0008/Th/99 | AF100459 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| K0010/Th/99 | AF100460 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| C0371/Th/99 | AF100461 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| C0166/Th/99 | AF100463 | DF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| C0167/Th/99 | AF100464 | DHF | ASIAN I | S | M | I | L | V | S | I | E | D | V | M |
| New Guinea C/44 | D00346 | DHF | ASIAN 2 | T | M | I | L | V | S | R | E | D | V | M |
| 43/China/89 | AF204178 | DF | ASIAN 2 | T | M | I | L | V | S | R | G | D | V | M |
| 44/China/87 | AF204177 | DF | ASIAN 2 | T | M | I | L | V | S | R | G | D | V | M |
| BA05i/Indon/05 | AY858035 | DF | COSMOPOLITAN | T | I | I | M | V | S | R | E | N | V | M |
| TSV01/Austra/93 | AY037116 | NA | COSMOPOLITAN | T | I | I | M | V | S | R | E | N | V | M |
| 98900666/Indo/04 | AB189124 | DSS | COSMOPOLITAN | T | V | I | M | V | S | R | E | N | V | M |
| ZS01/China/01 | EF051521 | NA | COSMOPOLITAN | T | V | I | M | V | S | R | E | N | V | M |
| GWL18/INDI/01 | DQ448231 | NA | COSMOPOLITAN | T | V | I | L | A | S | R | E | D | V | M |
| GWL39/INDI/01 | DQ448232 | NA | COSMOPOLITAN | T | V | I | L | A | S | R | E | D | V | M |

^aAmino acid sequence was numbered starting from protein C or prM to the end of the last codon sequenced. *Sequences of this study.

^bRecombinant strain [16].

Table 3: Summary of consistent amino acid change among the five DENV-2 genotype viruses.

| PROTEIN | AMINO ACID POSITIONS ^A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--|-----------|--------------------|---|-------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | DOMAIN | | | | MTase | | | | RdRp | | | | Helicase † | | | | | | | |
| NS5 | | | | | 026 | 155 | 179 | 192 | 748 | 762 | 784 | 799 | 810 | 818 | 835 | 864 | | | | |
| NS3 | | | | | | | | | | | | | | | | | 187 | 249 | 250 | |
| STRAIN/ YEAR | ACCESSION GENBANK | DIAGNOSIS | GENOTYPE | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tonga/74 | AY744147 | DF | AMERICAN | I | V | V | R | R | S | S | S | T | L | I | T | R | R | A | | |
| S1 vaccine/USA/ 93 | M19197 | NA | AMERICAN | I | V | V | R | R | S | S | S | T | L | I | T | R | R | A | | |
| I31/MEX/92 | AF100469 | DF | AMERICAN | I | V | V | R | R | S | S | S | T | L | I | T | R | R | A | | |
| Ven2/87 | AF100465 | DF | AMERICAN | I | V | V | R | R | S | S | S | T | L | I | T | R | R | A | | |
| I348600/COL/86 | AY702040 | DF | AMERICAN | I | V | V | R | R | S | S | S | T | L | I | T | R | R | A | | |
| OAX/MEX/ S707/05 ¹ | EF595821 | DF | ASIAN/ AMERICAN | - | - | - | - | K | T | P | K | A | Q | V | T | K | K | T | | |
| OAX/ MEXS1038/05 ² | EF595817/ EF595825 | DF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | K | K | T | | |
| OAX/ MEXS1656/05 ³ | EF595815/ EF595820 | DF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | K | K | T | | |
| OAX/MEXS739/ 05 ⁴ | EF595818/ EF595822 | DF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | K | K | T | | |
| OAX/ MEXS1020/06 ⁵ | EF595816/ EF595824 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | K | K | T | | |
| OAX/ MEXS1733/06 ⁶ | EF595819/ EF595823 | DF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | K | K | T | | |
| VER/MEX024A/ 06 ⁷ | EU570975/ EU570983 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | - | - | - | | |
| VER/MEX013A/ 06 ⁸ | EU570980/ EU570982 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | V | I | I | K | K | T | P | K | A | Q | V | T | - | - | - | | |
| Cuba13/97 | AY702034 | DF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| Cuba115/97 | AY702036 | DF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| Cuba205/97 | AY702039 | DSS | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| Cuba165/97 | AY702038 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| Cuba58/97 | AY702035 | DF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| Cuba89/97 | AY702037 | DHF/DSS | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| MART/98-703/ 98 | AF208496 | DF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| DR23/01 | AB122020 | DF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| DR31/01 | AB122021 | DF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| DR59/01 | AB122022 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| BR64022/02 | AF489932 | NA | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| Mara 4 ⁸ /Ven/90 | AF100466 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | I | T | K | R | A | | |
| Jamaica/N.1409/ 83 | M20558 | NA | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | T | S | K | A | Q | V | T | K | R | A | | |
| China 04/85 | AF119661 | DHF | ASIAN/ AMERICAN | I | I | I | K | K | S | S | K | T | Q | V | T | K | R | T | | |
| Bangkok 1974 | AJ487271 | NA | ASIAN I | I | V | I | K | R | T | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| CO390/Th/99 | AF100462 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| I6681/USA/97 | U87411 | NA | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| PDK53/USA/97 | U87412 | NA | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| I6681-PDK53/ 97 | U87411 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-p11/93 | AF022437 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-p12/93 | AF022438 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-p14/93 | AF022439 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-7/93 | AF022434 | DSS | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-28/93 | AF022435 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-52/93 | AF022436 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-p16/93 | AF022440 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH-p36/93 | AF022441 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH29/93 | AF169678 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH36/93 | AF169679 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |
| ThNH45/93 | AF169680 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A | | |

Table 3: Summary of consistent amino acid change among the five DENV-2 genotype viruses. (Continued)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------|-----|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ThNH55/93 | AF169681 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH54/93 | AF169682 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH62/93 | AF169683 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH63/93 | AF169684 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH69/93 | AF169685 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH73/93 | AF169686 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH76/93 | AF169687 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| ThNH81/93 | AF169688 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| K0008/Th/99 | AF100459 | DHF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| K0010/Th/99 | AF100460 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| C0371/Th/99 | AF100461 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| C0166/Th/99 | AF100463 | DF | ASIAN I | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | A | R | R | A |
| New Guinea C/44 | D00346 | DHF | ASIAN 2 | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | T | R | R | A |
| 43/China/89 | AF204178 | DF | ASIAN 2 | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | T | R | R | A |
| 44/China/87 | AF204177 | DF | ASIAN 2 | I | V | I | K | R | S | S | K | T | Q | I | T | R | R | A |
| BA051/Indon/05 | AY858035 | DF | COSMOPOLITAN | I | V | I | K | R | S | S | T | T | Q | I | T | K | R | A |
| TSV01/Austra/93 | AY037116 | NA | COSMOPOLITAN | I | V | I | K | R | S | S | T | T | Q | I | T | K | R | A |
| 98900666/Indo/04 | AB189124 | DSS | COSMOPOLITAN | I | V | I | K | R | S | S | T | T | Q | I | T | K | R | A |
| FJ-10/China/00 | AF276619 | NA | COSMOPOLITAN | I | V | I | K | R | S | S | R | T | Q | I | T | K | R | A |

*Amino acid sequence was numbered starting from protein NS5 or NS3 to the end of the last codon sequenced.

*Recombinant strain [16].

†NS3 Accession number for Oaxaca isolates: [EF591287](#)–[EF591293](#).

‡Accession numbers for SAM/RdRp Domains

44 aa). In addition, phylogenetic analysis of NS3₄₈₄ showed low variability (1.9%, 2/103 aa). Tables 2 and 3 summarizes the aa changes among the Asian I, Asian II, Cosmopolitan, American and American/Asian Genotype viruses. We compared the aas related to C₉₁-prM₁, NS5₇₅, NS5₂₂₀₆ and NS3₄₈₄ in all Southeast Asian genotype viruses with American genotypes (Table 2 and 3). The former have greater potential to cause DHF while the latter are associated with DF [18,25]. The Oaxaca isolates in this study and all genotypes with potential to produce DHF contained valine at position 145 in C-prM (prM-31), except for the isolate S707OAX05/MEX, which contained threonine at this position as did in the American genotype. In addition, the Oaxaca isolates in this study and all genotypes with potential to produce DHF contained isoleucine, lysine and glutamine at positions 179, 192 and 818 respectively in NS5. In contrast, the American genotype had valine, arginine and leucine at these positions.

Frequency analysis included in addition to the sequences of Table 2, one sequence with Asian II genotype (M29095) and twelve with Cosmopolitan genotype ([AF276619](#), [AF359579](#), [AY858036](#), [AB189122](#), [AB189123](#), [EF440433](#), [DQ448233](#), [DQ448234](#), [DQ448235](#), [DQ448236](#), [DQ448237](#), [AB111454](#)). In addition to the sequences in Table 3, it was included 9 ([EU570976](#), [EU570977](#), [EU570978](#), [EU570979](#), [EU570981](#), [EU552540](#), [EU552541](#), [EU552542](#), [EF595827](#)) from Veracruz and 1 ([EF595826](#)) from Oaxaca in RdPd domain; and 1([EF591291](#)) from Oaxaca in the Helicase domains.

Interestingly, the Oaxaca isolates in this study and the Caribbean islands strains contained valine at position 106 in C₉₁-prM₁ with a frequency of 0.65 in the Asian/Ameri-

can genotype, while all other genotypes had isoleucine at this position (Table 2). All American/Asian viruses had valine, alanine and glycine at positions 104 (C), 112 (C) and 129 (prM-14), respectively, with a frequency of 1, and isoleucine at position 153 (prM-39) with a frequency of 0.95 because HUAT2/MEX/01 had leucine at this position. The Cosmopolitan genotype had valine and alanine at positions 104 and 112 with a frequency of 0.67 and 0.61, respectively (Table 2). American viruses had lysine and threonine at positions 142 (prM-28) and 145 (prM-31) respectively, with a frequency of 1. Three isolates from Oaxaca 2001 also contained lysine at position 142 (prM-28), resulting in a frequency of 0.075 in the Asian/American genotype. Asian I genotype viruses had serine and isoleucine at positions 101 (C) and 130 (prM-15) with frequencies of 1 and 0.73 respectively. The other genotypes did not contain these amino acids. Cosmopolitan viruses had methionine and asparagine at positions 108 and 143 (prM-29) with a frequency of 0.44 in this genotype. The other genotypes did not contain this aa.

The American/Asian genotype viruses contained isoleucine, lysine, threonine, alanine and valine at positions 155, 748, 762, 810 and 835 in NS5 (Table 3) with a frequency of 1 for positions 155 and 748 and 0.96 for the positions 762, 810 and 835 (Table 3). Asian I contained the same aa at position 762 with a very low frequency of 0.035 in this genotype. Interestingly, our analysis showed that the Asian I genotype, unlike the others, had alanine at position 864 in NS5 rather than threonine with a frequency of 1 (Table 3). Furthermore, the American genotype had valine, arginine, serine and leucine with a frequency of 1 at positions 179, 192, 799 and 818 in NS5; none of the other genotypes has these aas at these positions, resulting in a frequency of 0 (Table 3).

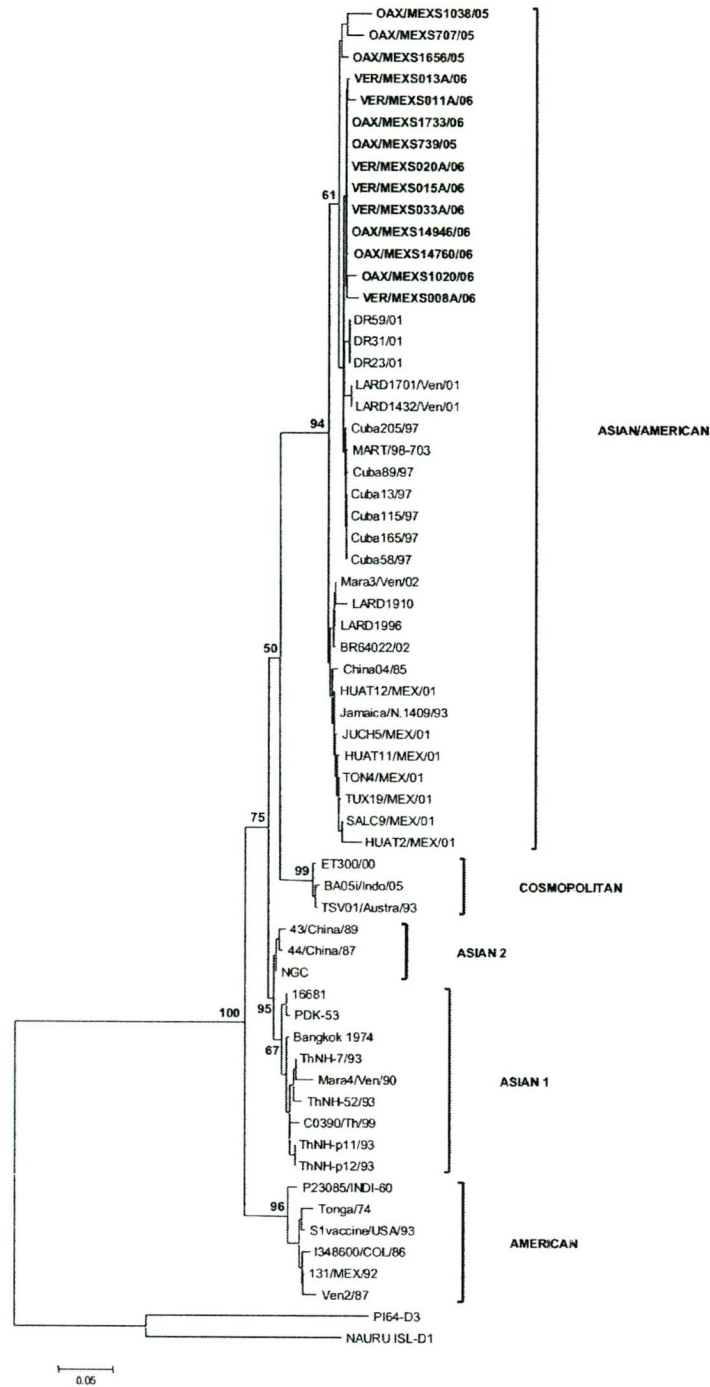


Figure 4
Minimal evolutionary tree of DENV-2 derived from the C₉-prM₁ gene. Branch lengths are proportional to percentage divergence. For distance/neighbor joining, maximum likelihood and Tamura Nei analyses, 1000 bootstrap replications were performed with MEGA 4.0 [55]. The percentage of replications supporting each branch, by parsimony analysis with gaps included, appears below the relevant branch. Oaxaca isolates appear in bold in the Asian/American genotype cluster. DENV-1, 3 and 4 were used as outgroups.

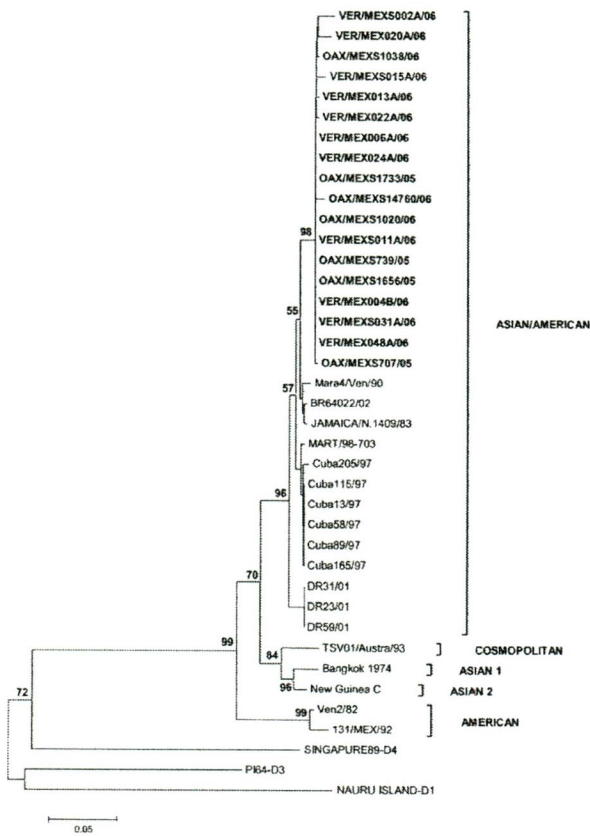


Figure 5
Minimal evolutionary tree of DENV-2 derived from NS₅₂₂₀₆ gene. The tree was constructed as described in Figure 4. The isolates from Veracruz and Oaxaca clustered in the Asian/American genotype. DENV-1, 3 and 4 were used as outgroups.

American/Asian and Cosmopolitan genotypes had arginine at position 187 with a frequency of 1 in NS3 (Table 3). Oaxaca isolates had lysine and threonine at positions 249 and 250 in NS3 with frequencies of 0.33 and 0.38. Oaxaca and Veracruz isolates had valine and proline at positions 26 in NS5 and 784 in NS5 with frequencies of 0.33 and 0.56 respectively in the Asian/American genotype. Lysine at position 249 in NS3 may be signature of the Oaxaca strains, and valine and proline at positions 26 and 784 in NS5 may be signatures for the Oaxaca and Veracruz strains.

It is evident that the genotypically different strains contain specific aas that may be used as genotype markers.

Discussion

The Pan American Health Organization (PAHO) led a campaign to exterminate *Ae. aegypti*, which resulted in the eradication of YF and disappearance of DF in America. *Ae.*

aegypti was absent from Mexico in 1947 until 1970. Because the mosquito was not completely exterminated in America and the campaigns were gradually relaxed, *Ae. aegypti* reappeared in most countries. There was a DENV-1 outbreak in Mexico in 1978 and epidemics spread throughout the country. The first reports of outbreaks of DENV-2 were in 1981 and 1984, with 30,000 and 23,000 cases respectively. There were 8 reported DHF cases and 4 deaths associated with DENV-4 in Mexico in 1984. Four DHF cases and one death were reported in 1989 and 2 cases in 1991. DENV-1, -2 and -4 were isolated in 1994, and DENV-3 was reported in 1995. Furthermore, DENV-1, -2, -3 and -4 were isolated in 1997 [34]. This data shows that even when DENV serotypes were co-circulating in Mexico, DHF cases were rare, suggesting that simultaneous circulation of several serotypes (hyperendemicity) is not necessarily sufficient to cause DHF epidemics in the absence of highly virulent strains, as previously reported [18]. Interestingly, the DENV-2 American genotype was replaced by the Asian/American genotype over this period. DF and DHF epidemics increased dramatically in the closing decades of the 20th century, especially in the New World, and Mexico was not excluded [34]. Furthermore, in south Texas (US), all dengue serotypes have circulated periodically, but locally acquired DHF has been recently reported [38]. The causes of this increased incidence of DENV infection, apart from the introduction of the DENV-2 Asian genotype, include demographic, cultural, environmental and political changes. This is clearly shown in Figure 1; DF and DHF cases have increased significantly since 2001 [34]. Furthermore, the proportion of DHF to DF cases has also increased (Figure 1), as in Thailand, where three DENV-2 genotypes have circulated but only viruses assigned to Asian genotype 1 have been sampled from the population since 1991 [25]. The genotype distribution in Mexico is mostly unknown; consequently, it is very important for epidemiological studies to determine the serotypes and genotypes of the viruses circulating in this country to contribute to the knowledge of geographic distribution, evolution and dispersion of DENV; besides, knowing the virus genotype may allow doctors to judge the risk of DHF to the patient. This may also be useful for laboratory diagnosis, which is an issue of serious concern in all endemic countries; diagnosis may well help in the rigorous follow-up of patients and could save them from the most severe DEN infection (DSS) and death.

Our results showed that DHF was associated with DENV-1 and -2 and one case showed both serotypes (Table 1). Interestingly, we observed no DHF cases associated with DENV-3, as has been shown in epidemiological studies in Mexico [39]. Recently, DENV-3 has been isolated in Brazil but its association with DHF has not been clearly established [40]. In contrast, DENV-3 was associated with DHF

in an outbreak in Cuba [13]. Phylogenetic analysis using portions of *C*_{91-prM}, *NS5*₇₅, *NS5*₂₂₀₆ and *NS3*₄₈₄ showed no substantial differences (Figures 4, 5).

In this study, we detected the amino acids glutamic acid and valine in place of lysine and threonine at positions 28 and 31 in prM. These aas have been described as specific for the Asian strains correlated with DHF [12]. NS5 also contains lysine 46, arginine 47 and glutamic acid 49 in the MTase domain, essential for the interaction with RdRp required for virus replication and/or infectivity [28]. These three aas are conserved in all sequences of all strains or isolates.

We detected lysine and glutamine at positions 800 and 819 of NS5; these have been reported as markers of the Asian and Asian/American DENV-2 genotypes that have the potential to produce DHF [12]. The interdomain (linker) region 169–179 and the two loops that encircle the entrance of the ATP binding pocket of NS3 [31] were also studied because of the role of this protein in virus replication. This region has also been implicated in the intrinsic flexibility required to couple movements between the NS3 protease and helicase domains [31,32]. We found no change in these amino acids. However, at position 250 in the helicase domain, alanine (apolar) was replaced by threonine (polar) in the isolates in this study and in one strain from China (Table 3). It would seem important to study the structure of this region to determine whether this aa has any role in the enzymatic activity or in maintaining the protein structure.

The NS5 polymerase fragment (737 to 877 residues) contains conserved aas: cysteine at position 847, which participates in the zinc pocket; threonine 790 to aspartic acid 808 and arginine 815 in the priming loop motif; and arginine 737, threonine 794, tryptophan 795 and serine 796, which are involved in GTP binding. However, the aa at position 810 in the priming loop is changed from threonine (polar) to alanine (apolar) in the Asian/American strains including our isolates (Table 3). It would seem important in the future to study the structure around this region to determine the function of this amino acid, particularly whether it has any role in polymerase activity [41].

A dramatic observation was obtained from the analysis of longitudinally sampled data on a temporal scale, where individual lineages or entire clades of viruses frequently arise, persist for a period of time and then disappear [42,43]. All strains analyzed in this work clustered in one branch with the Asian/American strains. Previously, in a survey during 2001 by the Department of Health [17,33], we reported this genotype in isolates from Oaxaca on the basis of the protein C sequence and a fragment of the prM

gene (438–572). The finding of the same Asian/American genotype in the isolates from the 2005 and 2006 outbreaks indicates that they circulated and became prevalent in Oaxaca and Veracruz States; however, the isolates in this study were grouped with the strains from the Caribbean islands, and the 2001 isolates with the Jamaica strain, with a high consistency of 94%. Also, these 2005–2006 isolates from Oaxaca and Veracruz showed valine in position 106 in prM, which was also shown by the Caribbean islands strains. These isolates also clustered with the Caribbean islands strains Cuba 97, Dominican Republic 2001 and Martinique 98 in the phylogenetic analysis of NS5₇₅ and NS3₄₈₄ (results not shown), supporting this view of their geographic origin (Figure 2). All trees clearly distinguish among the five genotypes of DENV-2, as reported previously [24,25], with strong bootstrap support (Figures 4, 5). Little is known of the history of this American/Asian signature circulating in the Caribbean islands. However, Rodriguez-Roche et al. [44] found that clinical severity increased over time during the epidemics expressed by a higher ratio DHF to DF for the Cuban strains.

Apparently, there has been a clade replacement of the American genotype for the Asian/American genotype originated in Southeast Asia in Oaxaca (2001 outbreak) and lately that strains were substituted for the Oaxaca strains (2005–2006 outbreaks) with the probable origin in the Caribbean islands, possibly Cuba (1997 outbreak). Furthermore, the geographic origin of the Veracruz strains may be also the Caribbean islands.

Since analysis of the 98 C-prM sequences showed that all Asian/American viruses had valine, alanine, glycine and isoleucine at positions 129 (prM-14) and 153 (prM-39) with a frequency of 1, while none of the other genotypes had these aas, they may be used as signatures of this genotype. The signature for American genotype viruses may be threonine at position 145 (prM-31) since none of the other genotypes had this amino acid. The signature for the Asian I genotype viruses may be serine at position 101 (C) with a frequency of 1.

From the 65 (MTase) and 76 (RdRp) sequences analyzed, all Asian/American genotype viruses contained isoleucine, lysine, threonine, alanine, lysine and valine at positions 155, 748, 762, 810 and 835 (Table 3) and none of the other genotypes had these aas. Our analysis also showed that the Asian I genotype, unlike the others, had alanine at position 864 (RdRp). The American genotype had valine, arginine, serine and leucine with frequency of 1 at positions 179, 192, 799 and 818, but none of the DENV-2 genotypes had it. All aas specific for a genotype may be used as signatures for that genotype. Although fewer sequences were analyzed than for C-prM, because

these genes have been less studied and consequently fewer sequences have been reported. The Asian 2 and Cosmopolitan genotypes showed no specific signature in the present study. This may be attributable to the broad spectrum of the Cosmopolitan genotype strains and the low number of Asian 2 sequences reported.

Lysine at position 249 in NS3 may be signature of the Oaxaca strains, and valine and proline at positions 26 and 784 in NS5 may be signatures for the Oaxaca and Veracruz strains, since none of the other genotypes or strains from the Asian/American genotype had these aas.

Some of the observed changes in the viruses could be due to mosquito adaptation as well as to the vertebrate hosts, since there is evidence that strains of DENV-2 may differ in their ability to infect *Ae. aegypti* [45], perhaps through specific virus-cell receptor interactions [46,47] by strong selection, or competition between DENV serotypes [48]. It has been suggested that the Asian genotype may spread more readily because it infects *Ae. aegypti* mosquitoes more efficiently than the American genotype [45].

The amino acid changes between the isolates of this study and those from 2001 may be due to a high mutation rate [49] or recombination [50] contributing to the generation of new biologically successful strains.

Phylogenetic analysis of the C₉₁-prM₁, NS5₇₅, NS5₂₂₀₆ and NS3₄₈₄ sequences in the DENV-2 isolates demonstrated that the Asian/American genotype is circulating in Oaxaca and Veracruz, showing specific amino acid changes that may be used successfully as genotype markers. Differences in the NS5₂₂₀₆ tree, which showed that the isolates in this study clustered with the strains from the contained American genotype, may be due to the low variability of this domain. In addition, this analysis shows a clear correlation between genetic diversity and geographical location. As has been suggested previously [43,51], viral dispersion may play a significant role in generating new varieties and effects on people who contract the illness.

Conclusion

We have demonstrated that DENV-1, -2 and -3 are circulating in Oaxaca and DENV-1, -2, -3 and -4 in Veracruz (2006), resulting in many DHF cases (Figure 1, 3). Eight DHF cases were associated with DENV-1, 27 with DENV-2 and one case with both DENV-1 and -2. The origin of the isolates in this study appears to be linked to the signature from the Caribbean islands genotypes. Our results confirm that DHF is endemic in Oaxaca and Veracruz States and that the presence of the DENV-2 Asian/American genotype and DENV-1 contributes to the increased number of DHF cases, a finding linked to the epidemiological data showing an increase in the ratio of DHF to DF cases in

2005–2006. We also identified amino acids encoded in C₉₁-prM₁, NS5₇₅, NS5₂₂₀₆ and NS3₄₈₄ that are specific to the Asian/American strains; and one amino acid specific to the isolates of this study and the Caribbean islands strains. These aas may be used as markers of genotypes and geographic origins.

Methods

Viruses

The strains of DENV used in this study were: DENV-1 Hawaii; DENV-2 New Guinea C (NGC); DENV-3 H-87; and DENV-4 H-341. These strains were provided by Dr. D. J. Gubler (Division of Vector-borne Infectious Diseases, Center for Disease Control, Fort Collins, CO, USA) and kindly provided by Dr. Blanca Ruiz (Biomedicas, UNAM). Isolates of DENV-2 viruses were obtained from acute-phase plasma collected from patients with DF or DHF by the Secretaria de Salud in Oaxaca, Mexico during 2005–2006, and by the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) during 2006. Twenty-nine isolates were kindly provided by the State of Oaxaca Public Health Laboratory and 65 by the IMSS in Veracruz. These were anonymous samples; only information about the clinical disease associated with the respective infection was provided (Tables 1).

DENV infected cells and virus isolation

Ae. albopictus clone C6/36 cells were grown at 28°C. 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 previously described [17] with a few modifications. After 18 h of culture, C6/36 cells (10⁶/15 ml tube) were infected with 0.01 to 0.1 ml of serum specimen per tube, diluted to 1 ml with medium, and incubated for 2 h at 28°C. After one wash, 3 ml MEM was added and the cells were cultivated for approximately 15 days at 28°C (passage number 1). Cells were observed every day and when a cytopathic effect was apparent from syncytium formation and cellular lysis, the cells were harvested and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The pellet was 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 ml and one of 0.5 ml at -70°C. To obtain passage numbers two and three, C6/36 cells were incubated with 1 ml of the supernatant obtained from the first or second passage for 2 h at 28°C and the same procedure described above was followed. Serotypes in all samples were determined in the isolates obtained from the first, second or third culture passages.

RNA extraction

Total RNA was extracted from cell culture supernatant using Trisol® LS (Gibco BRL., Gaithersburg, Md.) accord-

ing to the manufacturer's recommendations. Ethanol-precipitated RNA was recovered by centrifugation and air-dried. The RNA pellet was suspended in 50 µl water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich) and used as template for Reverse Transcription with the Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The RT-PCR protocol described by Seah et al. [52] was followed to determine the DENV serotype. Reaction mixtures were stored at -20°C pending further processing.

Synthetic oligonucleotide primer pairs were designed on the basis of published sequence data for DENV strains 16681, New Guinea C and Jamaica 1409 to amplify and partially sequence the following genes: *protein C* from nucleotides 91 to 351(C₉₁); *prM* from nucleotides 1 to 123 (prM₁) [17]; *NS5* from nucleotides 73 to 588 (NS5₇₃) and 2206 to 2613 (NS5₂₂₀₆); and *NS3* from nucleotides 484 to 786 (NS3₄₈₄). All assays were performed using the ThermoScript™ RT-PCR System containing PlatinumR Taq (Invitrogen, Life Technologies). A mixture of 5 µl total RNA (0.1–0.5 µg), 50 ng of hexamers/reaction and DEPC-treated water (total volume 50 µl) was incubated at 85°C for 5 min and chilled on ice. The first extension was carried out at 25°C for 10 min and then at 50°C for 70 min. The PCR reaction was carried out by incubation of 50 pmol of the corresponding sense and antisense PCR primers, 2 µl of the cDNA synthesis reaction mixture and 2.4 mM magnesium sulfate as per the manufacturer's recommendations.

To amplify the NS5 gene we used the sense primer from nucleotides 7398–7413 (CAT GGG CNY TNT GYGA) and the antisense primer from nucleotides 10551–10570 (GGA GGG GTC TCC TCT AACC). The PCR conditions for amplifying the 2700 bp fragment for NS5 were: 95°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 49°C for 30 s, 72°C for 2 min 30 s, and final extension of 72°C for 10 min followed by storage at 4°C.

Sequencing of PCR fragments

For automated sequencing, spin column-purified (Quia-gen, Chatsworth, CA.) DNA fragments were analyzed by the cycle-sequencing dye terminator method. A Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI-PRISM 100, Applied Biosystems, Foster City, CA) was chosen and sequencing was conducted using an Applied Biosystems Prism 310 in a short capillary (47 cm by 50 µm inside diameter), and Performance Optimized Polymer 6 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems).

Phylogenetic analyses

Neighbor-joining (NJ), maximum parsimony and minimal evolutionary [53] analysis methods were used to reconstruct phylogeny. Distance with gamma correction was generated by Neighbor-joining, maximum likelihood and Tamura and Nei [54] evolutionary models. Support for the derived phylogenies was examined with bootstrapping over 1000 replications. For all DENV-2 analyses, DENV-1, -3 and -4 were used as outgroups. All these analyses were performed using MEGA V4 [55].

Authors' contributions

CEGG carried out the RT-PCR assays using RNA isolates from passages 1, 2 and 3 to determine serotype and to amplify the NS5 and NS3 genes for genotyping, and co-wrote the manuscript. GPR obtained the isolates and carried out the RT-PCR assays using RNA from passages 1, 2 or 3 to sequence the C-prM gene for genotyping by phylogenetic analysis. CEGG, GPR and MLM participated in the discussion of results, helped to review the manuscript and assisted with the literature validation. JNE and RRL provided the serum samples from Veracruz and the clinical data corresponding to each patient, and helped in obtaining the isolates. FJR, LRRP and AC collected the patient serum samples from Oaxaca, Mexico, and helped to obtain the isolates and clinical data from Oaxaca. MCN participated in the discussion of results and reviewed the manuscript. MLM proof-read and assembled the manuscript. All authors participated in the discussion of results and read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Rosalinda Tovar and Dr. Alvaro Diaz-Badillo are gratefully acknowledged for their help during the development of this research. This work was supported by the CONACYT grant CB-2005-01-50603 and CONACYT-COVECYT M0034-2007-68123.

References

- Garcia-Franco F, Munoz ML, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC 4th: **Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the South Pacific coast of Mexico.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**(5):594-598.
- Gorrochotegui-Escalante N, Munoz ML, Fernandez-Salas I, Beaty BJ, Black WC 4th: **Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico.** *Am J Trop Med Hyg* 2000, **62**(2):200-209.
- Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas L, Munoz ML, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC 4th: **Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**(2):213-222.
- Gubler DJ: **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**(3):480-496.
- WHO (World Health Organization): **Dengue haemorrhagic fever: early recognition, diagnosis and hospital management – an audiovisual guide for health care workers responding to outbreaks.** *Weekly Epidemiological Record* 2006, **81**(38):362-363.
- Clinical diagnosis Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control** 2nd edition. 1997:12-23 [<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>]. World Health Organization. Geneva

7. Navarrete-Espinosa J, Gomez-Dantes H, Celis-Quintal JG, Vazquez-Martinez JL: **Clinical profile of dengue hemorrhagic fever cases in Mexico.** *Salud Publica Mex* 2005, **47**:193-200.
8. Rothman AL: **Immunology and immunopathogenesis of dengue disease.** *Adv Virus Res* 2003, **60**:397-419.
9. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Montes T, Vazquez S, Morier L, Alvarez A, Gould EA, Kouri G, Halstead SB: **Neutralizing antibodies after infection with dengue I virus.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(2):282-286.
10. Wang WK, Chao DY, Lin SR, King CC, Chang SC: **Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan.** *J Microbiol Immunol Infect* 2003, **36**(2):89-95.
11. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT: **Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas.** *Virology* 1997, **230**(2):244-251.
12. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R: **Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis.** *J Virol* 1999, **73**(6):4738-4747.
13. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzman MG: **Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**(6):1113-1117.
14. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM, Aaskov J: **Risk factors in dengue shock syndrome.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **56**(5):566-572.
15. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sorial C, Kouri G: **Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**(3):241-246.
16. Uzcatogui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcatogui R, Holmes EC, Gould EA: **Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination.** *J Gen Virol* 2001, **82**(Pt 12):2945-2953.
17. Cisneros A, Diaz-Badillo A, Cruz-Martinez G, Tovar R, Ramirez-Palacios LR, Jimenez-Rojas F, Beaty B, Black WC 4th, Munoz LM: **Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico.** *Arch Virol* 2006, **151**(1):113-125.
18. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB: **Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever.** *Lancet* 1999, **354**(9188):1431-1434.
19. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW: **Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses.** *J Gen Virol* 1994, **75**(Pt 1):65-75.
20. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW: **Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses.** *J Gen Virol* 1997, **78**(Pt 9):2279-2284.
21. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW: **Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses.** *Virology* 1993, **197**(1):216-224.
22. Rico-Hesse R: **Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature.** *Virology* 1990, **174**(2):479-493.
23. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, Lloyd G, Holmes EC: **Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus.** *Virology* 2002, **298**(1):63-72.
24. Holmes EC, Twiddy SS: **The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus.** *Infect Genet Evol* 2003, **3**(1):19-28.
25. Zhang C, Mammen MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Nisalak A, Vaughn DW, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC: **Structure and age of genetic diversity of dengue virus type 2 in Thailand.** *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 4):873-883.
26. Chua SK, Selvanesan S, Sivalingam B, Chem YK, Norizah I, Zuridah H, Kumarasamy V, Chua KB: **Isolation of monoclonal antibodies-escape variant of dengue virus serotype 1.** *Singapore Med J* 2006, **47**(11):940-946.
27. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG: **Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic.** *Arch Virol* 2005, **150**(3):415-425.
28. Malet H, Eglhoff MP, Selisko B, Butcher RE, Wright PJ, Roberts M, Gruetz A, Sulzenbacher G, Vonrhein C, Bricogne G, Mackenzie JM, Khromykh AA, Davidson AD, Canard B: **Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5.** *J Biol Chem* 2007, **282**(14):10678-10689.
29. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB: **Phylogeny of the genus *Flavivirus*.** *J Virol* 1998, **72**(1):73-83.
30. Baleotti FG, Moreli ML, Figueiredo LT: **Brazilian *Flavivirus* phylogeny based on NS5.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**(3):379-382.
31. Luo D, Xu T, Hunke C, Grüber G, Vasudevan SG, Lescar J: **Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus.** *J Virol* 2008, **82**(1):173-183.
32. Rosales-Leon L, Ortega-Lule G, Ruiz-Ordaz B: **Analysis of the domain interactions between the protease and helicase of NS3 in dengue and hepatitis C virus.** *J Mol Graph Model* 2007, **25**(5):585-594.
33. Cisneros-Solano A, Moreno-Altamirano MM, Martinez-Soriano U, Jimenez-Rojas F, Diaz-Badillo A, Munoz ML: **Sero-epidemiological and virological investigation of dengue infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001.** *Dengue Bulletin* 2004, **28**:28-34.
34. DGEPI (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud) 2001-2006 *Boletín Epidemiología* [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>].
35. Chen WJ, Wu HR, Chiou SS: **ENSI modifications of dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells.** *Intervirology* 2003, **46**(5):289-295.
36. Lee E, Weir RC, Dalgarno L: **Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein.** *Virology* 1997, **232**(2):281-290.
37. Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC: **Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature.** *J Gen Virol* 2002, **83**(Pt 7):1679-1689.
38. Ramos MM, Mohammed H, Zielinski-Gutierrez E, Hayden MH, Lopez JL, Fournier M, Trujillo AR, Burton R, Brunkard JM, Anaya-Lopez L, Banicki AA, Morales PK, Smith B, Munoz JL, Waterman SH, Dengue Serosurvey Working Group: **Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever at the Texas-Mexico border: Results of a household-based seroepidemiologic survey, December 2005.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(3):364-369.
39. **Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue** [<http://salud.tamaulipas.gob.mx/epidemiologia/pdf/s/MANUAL-DENGUE%202006.pdf>].
40. Pires Neto RJ, Lima DM, de Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BA: **Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001.** *Braz J Med Biol Res* 2005, **38**(6):843-852.
41. Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Eglhoff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J: **Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution.** *J Virol* 2007, **81**(9):4753-4765.
42. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG: **Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period.** *Virology* 2002, **301**(1):148-156.
43. Zhang C, Mammen MP Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC: **Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence.** *J Virol* 2005, **79**(24):15123-15130.
44. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG: **Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997.** *Virology* 2005, **334**(2):154-159.
45. Armstrong PM, Rico-Hesse R: **Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**(5):539-544.
46. Mercado-Curiel RF, Esquinca-Aviles HA, Tovar R, Diaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Munoz ML: **The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells.** *BMC Microbiol* 2006, **6**:85.
47. Munoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A: **Putative dengue virus receptors from mosquito cells.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **168**(2):251-258.
48. Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA: **Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:28.
49. Drake JW: **Rates of spontaneous mutation among RNA viruses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**(9):4171-4175.

50. Worobey M, Rambaut A, Holmes EC: **Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96(13)**:7352-7357.
51. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO: **Selection-driven evolution of emergent dengue virus.** *Mol Biol Evol* 2003, **20(10)**:1650-1658.
52. Seah CL, Chow VT, Tan HC, Can YC: **Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers.** *J Virol Methods* 1995, **51(2-3)**:193-200.
53. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4(4)**:406-425.
54. Tamura K, Nei M: **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** *Mol Biol Evol* 1993, **10(3)**:512-526.
55. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Biol Evol* 2007, **24(8)**:1596-1599.

Publish with **Bio Med Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Research article

Open Access

Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico

Gerardo Perez-Ramirez^{1,2}, Alvaro Diaz-Badillo¹, Minerva Camacho-Nuez², Alejandro Cisneros³ and Maria de Lourdes Munoz*¹

Address: ¹Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Mexico D. F., Mexico, ²Genomic Sciences Program, Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico, San Lorenzo #290 Col. Del Valle, Mexico DF and ³Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma Benito Juarez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico

Email: Gerardo Perez-Ramirez - geraperami@gmail.com; Alvaro Diaz-Badillo - alvaro@cinvestav.mx; Minerva Camacho-Nuez - mcamachonuez@yahoo.com.mx; Alejandro Cisneros - acisneross@gmail.com; Maria de Lourdes Munoz* - lmunoz@cinvestav.mx

* Corresponding author

Published: 15 December 2009

Received: 21 April 2009

BMC Microbiology 2009, 9:260 doi:10.1186/1471-2180-9-260

Accepted: 15 December 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/260>

© 2009 Perez-Ramirez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Dengue (DEN) is a serious cause of mortality and morbidity in the world including Mexico, where the infection is endemic. One of the states with the highest rate of dengue cases is Oaxaca. The cause of DEN is a positive-sense RNA virus, the dengue virus (DENV) that evolves rapidly increasing its variability due to the absence of a repair mechanism that leads to approximately one mutational event per genome replication; which results in enhancement of viral adaptation, including the escape from host immune responses. Additionally, recombination may play a role in driving the evolution of DENV, which may potentially affect virulence and cause host tropism changes. Recombination in DENV has not been described in Mexican strains, neither has been described the relevance in virus evolution in an endemic state such as Oaxaca where the four serotypes of DENV are circulating.

Results: To study whether there are isolates from Oaxaca having recombination, we obtained the sequence of 6 different isolates of DENV-2 Asian/American genotype from the outbreak 2005-6, one clone of the C₍₉₁₎-prM-E-NSI₍₂₄₀₀₎ structural genes, and 10 clones of the E gene from the isolate MEX_OAX_1656_05. Evidence of recombination was found by using different methods along with two softwares: RDP3 and GARD. The Oaxaca MEX_OAX_1656_05 and MEX_OAX_1038_05 isolates sequenced in this study were recombinant viruses that incorporate the genome sequence from the Cosmopolitan genotype. Furthermore, the clone of the E gene namely MEX_OAX_165607_05 from this study was also recombinant, incorporating genome sequence from the American genotype.

Conclusions: This is the first report of recombination in DENV-2 in Mexico. Given such a recombinant activity new genomic combinations were produced, this could play a significant role in the DENV evolution and must be considered as a potentially important mechanism generating genetic variation in this virus with serious implications for the vaccines and drugs formulation as occurs for other viruses like poliovirus, influenza and HIV.

Background

DEN is a serious cause of mortality and morbidity in the tropical and subtropical regions that infects fifty million people every year; approximately 500,000 of them are hospitalized and 5% to 15% of them die, which is a dramatic data [1]. Positive-sense RNA viruses evolve rapidly, [2-4] allowing the virus population to quickly adapt to new environments and escape from host anti-viral responses. One of the principal causes of genetic diversity in DENV is the error-prone replication with RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), [5] so that one genomic mutation occurs in nearly every cycle of virus replication. RNA virus, such as DENV populations at a particular region, may also rapidly change due to periodic selective sweeps [6], by the introduction of foreign strains of virus [7-9,2], and due to intra-serotypic recombination [10-14]. However, there has been considerable debate about whether recombination occurs in DENV [15] and the relevance of any recombination to the development of live-attenuated *flavivirus* vaccines [16,17]. Besides, there is a number of reasons for believing that recombination can occur in DENV and this process is being described with increasing frequency in DENV-1 [13,18] and other members of the family *Flaviviridae* [19-22]. The recombination in DENV was reported in the structural genes region and particularly in E gene sequence through the use of the BOOTSCAN, DIVERSE PLOTS, and LARD software [14].

The co-circulation of multiple DENV populations increases the opportunities for a mosquito vector to ingest several variants by feeding on a number of diverse infected hosts, or for a host to be infected by vectors infected with distinct DENV variants. These conditions exist in Mexico, the Caribbean Area and South-East Asia [23]. This is supported by the fact that there are many reports of multiple serotypes of DENV from single hosts [3,23-25]. Furthermore, it is likely that mixed infections with different genotypes of the same serotype may also occur where they co-circulate [26,27].

Oaxaca, Mexico is one of the states where DENV is endemic and serotypes -1, -2 and -3 of DENV are co-circulating [23]. DENV-2 was reported as the serotype with higher frequency compared with DENV-1, -3 or -4. Six partial sequences of the genes encoding proteins: capsid (C), pre-membrane-membrane (prM-M), envelop (E), and non-structural 1 (NS1) represented as $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ from six different isolates of DENV-2 from the Oaxaca outbreaks 2005-2006 were obtained. In addition, the RT-PCR products of $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ and E genes obtained from the MEX_OAX_1656_05 isolate were cloned and sequenced.

MEX_OAX_1656_05 and MEX_OAX_1038_05 isolates displayed recombination in the prM-E and E-NS1 genes

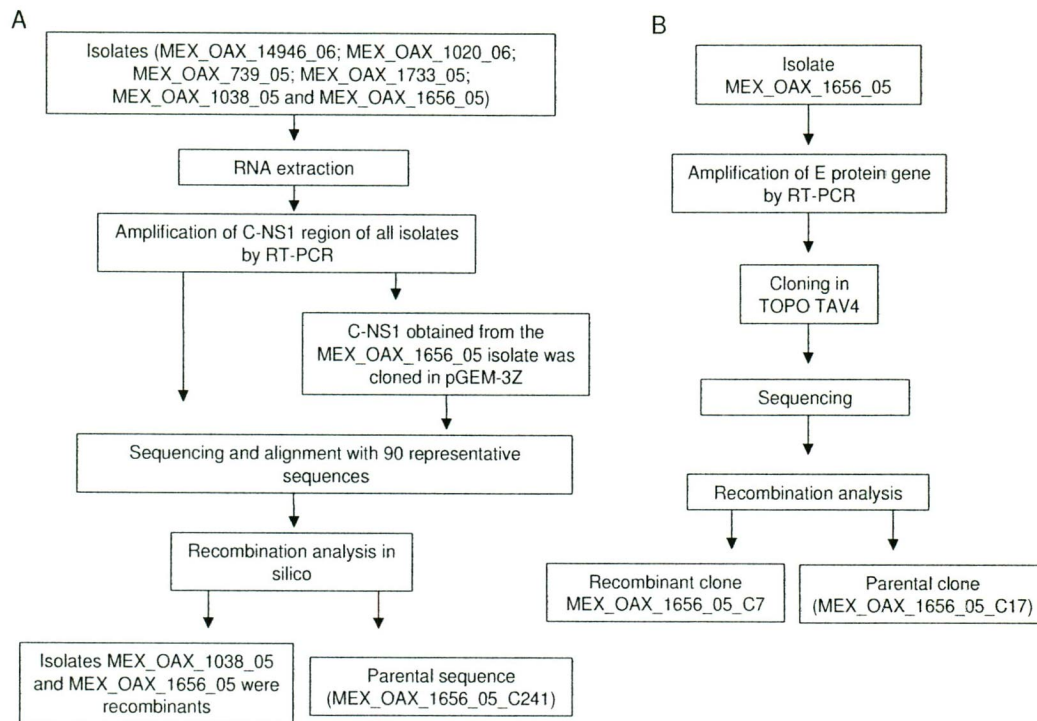
and the parental strains were the Asian/American and Cosmopolitan genotypes. In addition, the E gene sequences from the clone 7 (MEX_OAX_1656_05_C07) showed recombination between the nucleotides 906 to 1047 and the parental strains were Asian/American and American genotypes.

Results

To determine recombinant sequences in DENV-2, the nucleotide sequences of the partial $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ genome from six isolates and 90 representative sequences of the different genotypes were aligned and analyzed by RDP3 and GARD. In addition, the RT-PCR product of the partial $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ genome from the MEX_OAX_1656_05 isolate was cloned in pGEM-3Z. The sequences of 9 clones were aligned with all of the above sequences (Figure 1A). We also sequenced 10 clones of the E structural gene from the isolate MEX_OAX_1656_05 and aligned with 180 representative sequences containing different genotypes by the programs mentioned above (Figure 1B).

The first task in this phylogenetic analysis was to determine the best model of nucleotide substitution for DENV-2 virus sequence evolution. This assignment was undertaken using the Model Selection test from DataMonkey online server [28,29], which compares 201 models of DNA substitution. Our results demonstrated that the best model was TrN93 [30]. Accordingly, the most complex general time-reversible value was the best fit to the data (relative substitution rates of $A \leftrightarrow C = 0.057$, $A \leftrightarrow G = 1$, $A \leftrightarrow T = 0.057$, $C \leftrightarrow G = 0.057$, $C \leftrightarrow T = 1$, and $G \leftrightarrow T = 0.057$); the Ln likelihood = -4550.59; parameter count = 38; and AIC = 9177.19. Finally, the estimated base composition was A = 0.340, C = 0.278, G = 0.225, and T = 0.157.

Our analysis with RDP3 showed that the sequences of isolate MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 present statistical evidence of recombinants for GENE-COV (P-Val = 2.467×10^{-2}), BOOTSCAN (P-Val = 4.289×10^{-5}), MAXCHI (P-Val = 1.438×10^{-5}), CHIMERA (P-Val = 3.790×10^{-3}), SISCAN (P-Val = 1.108×10^{-9}), and 3SEQ (P-Val = 4.478×10^{-4}), in two regions (Figure 2): the first breakpoints were located in 499nt and 512nt respectively; the second breakpoints were located in 868nt and 826nt respectively, and the third breakpoint was located in 2239nt in both recombinants (Figure 2A, 2B respectively). In addition, the analysis with GARD confirmed the breakpoints and recombination data for maximum likelihood. This analysis displayed the same site for the three breakpoints in both isolates: the first, second and third breakpoints were located in the nucleotides 498, 828 and 2226, respectively (Figure 2C). The recombinant regions were the intersection of prM-M structural gene to intersection

**Figure 1**

Experimental strategy. A) The flow chart shows the experimental strategy that we followed to detect the recombinants in DENV-2 isolates. The $C_{(91)}$ -prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ region from the MEX_OAX_14946_06; MEX_OAX_1020_06; MEX_OAX_739_05; MEX_OAX_1733_05; MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 isolates and the clone MEX_OAX_1656_05 were amplified and sequenced. All sequences were analyzed with RDP3 and GARD software to detect the recombinants. The analysis *in silico* displayed the recombinants and one parental strain. B) The E protein gene from MEX_OAX_1656_05 was cloned in TOPO TAV4 to detect possible recombinants and/or the parental sequences. One parental sequence was detected in addition to one recombinant.

of M-E structural genes and the second recombinant region started in the intersection of E-NS1 genes (Figure 2D). Interestingly, we found that the parental major strain was the non-recombinant clone MEX_OAX_1656_05_C241 (obtained from the MEX_OAX_1656_05 isolate) and the minor parental strain was the Cosmopolitan genotype strain INDI_GWL_102_01 (accession number DQ448235).

The ML tree constructed with our sequence of structural gene C-prM from nucleotide 1-497 from the MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 isolates clustered with the Asian/American genotype (Figure 3A); the analysis of the region from nucleotides 498-828 of the isolates MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 moved to the Cosmopolitan genotype (Figure 3B) and when the region from the nucleotides 828-2222 was analyzed the two strains clustered again with the Asian/American genotype (Figure 3C). Finally, when the region corresponding to nucleotides 2223-2310 was analyzed

the isolates clustered with the Cosmopolitan genotype (Figure 3D).

To determine the nucleotides involved in these recombinants, the $C_{(91)}$ -prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ sequences of the clone MEX_OAX_1656_05_C241, recombinants sequences MEX_OAX_1038_05, MEX_OAX_1656_05 and the Cosmopolitan strain INDI_GWL_102_01 were analyzed. The changes in the recombinant isolates are labeled with a black dot (Figure 4). This analysis showed no evidence of recombination in the recombinant strain MEX_OAX_1656_05.

Like other RNA viruses, DENV undergoes low fidelity replication [31], resulting in virus pools of mutants. Therefore, to determine if one of the parental strains and/or a recombinant sequence is present in these pools, the RT-PCR product of the E protein gene from the recombinant strain, MEX_OAX_1656_05 was cloned and analyzed (Figure 1B). We obtained 10 E protein gene clones that were studied using the RDP3 software and it was deter-

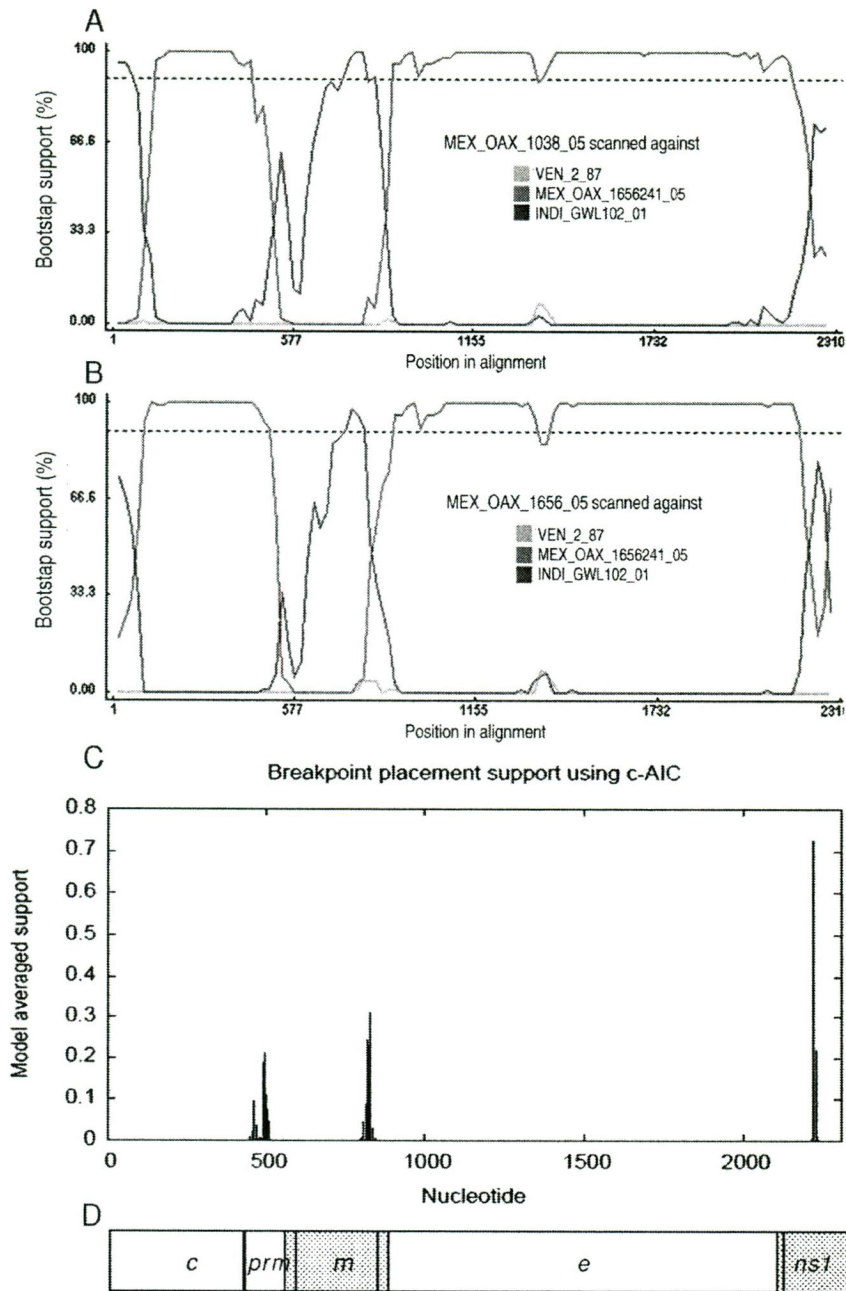


Figure 2

Recombination plots of structural gene regions from MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 sequences.

A) BOOTSCAN plot analysis of the $C_{(91)}$ -prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ gene sequences from the MEX_OAX_1038_05 isolate and the parental strains INDI_GWL102_01 and MEX_OAX_1656_05_C241. The first breakpoint is located in the nucleotide 499, the second breakpoint is located in the nucleotide 868 and the third breakpoint is located in the nucleotide 2239; B) BOOTSCAN plot analysis of the $C_{(91)}$ -prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ gene sequences from the MEX_OAX_1656_05 isolate and the parental strains INDI_GWL102_01 and MEX_OAX_1656_05_C241. The first breakpoint is located in the nucleotide 512; the second breakpoint is located in the nucleotide 826 and the third breakpoint is located in the nucleotide 2239; C) The breakpoint plots of sequences of isolates MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 determined by GARD displayed the first breakpoint in the nucleotide 498, the second breakpoint in the nucleotide 828nt and the third breakpoint in the nucleotide 2226; D) Representation of recombinant regions in the genome of DENV. The nucleotide number is determined for the first nucleotide of our sequence corresponding to the nucleotide 91 starting with the coding region in the C gene.

mined that the sequence of clone MEX_OAX_1656_05_C07 presents statistical evidence of recombination by GENECOV (P-Val = 7.356×10^{-7}), BOOTSCAN (P-Val = 1.378×10^{-5}), MAXCHI (P-Val = 1.764×10^{-3}), CHIMERA (P-Val = 1.392×10^{-4}) and 3SEQ (P-Val = 4.478×10^{-4}). The E protein gene of said clones contains two breakpoints. The first breakpoint was located in the nucleotide 906 of the coding region for protein E; the second breakpoint was located in the nucleotide 1047 of the same gene (Figure 5A, Figure 6). GARD analysis confirmed that this clone is recombinant displaying the first breakpoint in the nucleotide 906 and the second breakpoint in the nucleotide 1047 (Figure 5B). The constructed ML trees showed that the MEX_OAX_1656_05_C07 clone clustered in the Asian/American genotype branch when the 1-905 E gene region was examined, and clustered in the American genotype when the E gene region from nucleotide 906 to 1047 was analyzed (Figure 5C). Finally, when region 1048-1485 was analyzed, the clone clustered again with the Asian/American strains.

The nucleotides involved in this recombinant are displayed in the alignment of the E gene region sequences of the recombinant MEX_OAX_1656_05_C07 clone, the parental clone MEX_OAX_1656_05_C17 and the strain MEX_95 (Figure 6).

Discussion

Mutation rate studies indicate that DENV genome averages 1 nucleotide change per cycle of virus replication [32] because of the lack of proofreading activity. Another means to generate genetic changes is through recombination that has been reported in different *Flaviviruses*, including hepatitis C virus (HCV), diarrhea bovine virus (DBV), DENV, Japanese encephalitis virus (JEV), and Saint Louis encephalitis virus (SLEV) [14,16,21]. Recently, some evidences have showed recombination in natural populations of DENV-1 -2, -3 and -4 [13,14,25,33] and the incorporation of this recombination as a probable mechanism contributing to genetic variation in DENV. Furthermore, the circulation of different serotypes and genotypes of DENV in a particular geographical region has been documented [23,34,35], as well as the coexistence of two different serotypes or genotypes in a given mosquito or patient [23,26,27], which makes feasible the recombination in DENV. From the first identification of an intergenotypic DENV recombinant [12], several DENV-1, -2, -3 and -4 recombinant strains have been identified [14]. More importantly, the identification of this recombinant strains demonstrates that DENV is capable of successfully completing all the simultaneous stages of the infection in the same cell: the simultaneous replication of both viral genomes and the template shift by the viral RNA polymerase, while keeping the correct reading frame, encapsida-

tion and release of the recombinant genomes in the process. The products will be subjected to the population processes guiding the maintenance, expansion or disappearance of new variants in the heterogeneous viral population.

All these reports focused on DENV-1 [13,18,27] recombination, and to date, there are a few reports of DEN-2 recombinant strains detected by analysis of protein E sequences [14,25,26]. Besides, protein E gene of clones or $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ region from human serum isolates have not been reported. There is only one single report of putative DENV-2 recombinant clone isolated from mosquitoes in the coding region for protein E [26]. In this report, the isolates MEX_OAX1656_05 and MEX_OAX1038_05 showed recombination within the $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ region. In addition, there was recombination clearly identified within the E protein gene of the clone MEX_OAX1656_05_C7. Furthermore, the parental strains from the recombinants were identified. These results are a strong evidence of the creation of new variants in a heterogeneous viral population. Furthermore, this is the first report of DENV-2 recombination in Mexico.

We detected two isolates containing recombination highly similar to the one obtained from different cities in the state of Oaxaca, which is an evidence of the maintenance and expansion of new variants. These two recombinants in the $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ region contained 3 breakpoints non-previously reported: one in the prM and two in the E protein (Figure 2, 3, 4, 5). We are showing DENV-2 recombination between different genotypes in the isolates and clones analyzed with high frequency of approximately 30% and 10%, respectively. The detection of the DENV recombinants supports a potentially significant role for recombination in the evolution of DENV by creating genetic variation. This result is very important since recombination may shift the virulence of DENV. One could speculate if this shift may increase or diminish the virulence, like has happened in other RNA viruses, such as poliovirus [36,37] influenza virus [38] and the HIV virus [39]. A dramatic example is the loss of the attenuated phenotype of the poliovirus vaccine by recombination, resulting in the generation of new phenotypes that produce the acute paralytic disease. Consequently, recombinants have the potential to generate strains with a higher or lower virulence. To test this issue for DENV recombinants will be necessary to have an animal model to study the virulence of these recombinants.

The two points in our experimental procedure that have been instrumental in obtaining the reported result and to build confidence are: First, we analyzed 6 isolates and one clone in the coding region $C_{(91)}\text{-prM-E-NS1}_{(2400)}$ from

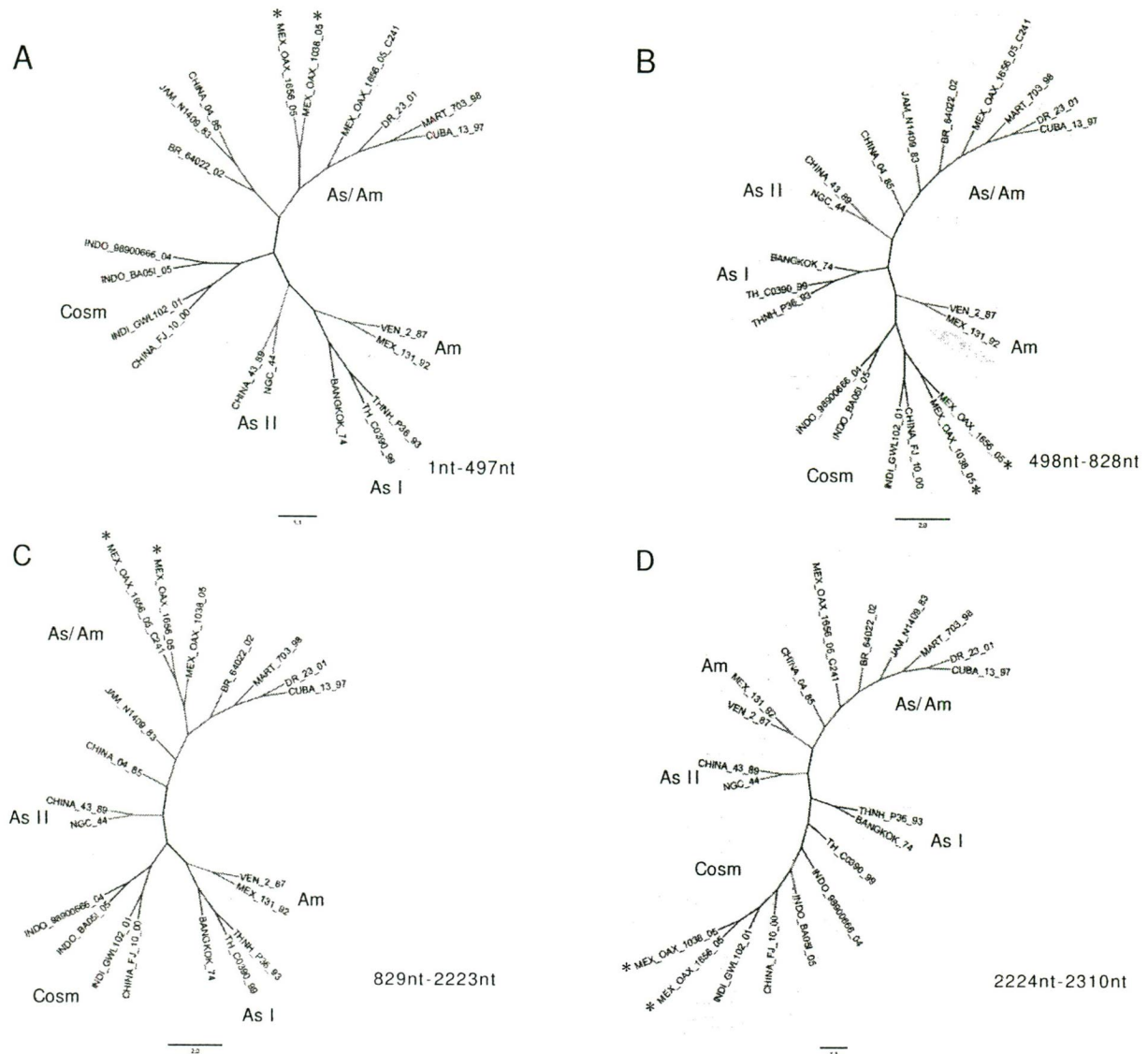


Figure 3
Phylogenetic trees of MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 based on putative recombination regions.
 Maximum Likelihood trees of the putative recombination regions and non-recombination regions of the structural genes C₍₉₁₎-prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ of MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 isolates. Nucleotides (nt) 1-497, nt 498-828, nt 829-2222 and 2223-2310 are displayed in A, B, C and D respectively.

Oaxaca and concentrated our efforts in sequencing the E gene of 10 clones from one isolate. These regions were chosen based on its biological relevance and on the location of breakpoints identified in previous reports of recombination in DENV [12,13,26,27,33]; secondly, we minimized the chance of detecting false, artifactual recombination by using long extension times [40] and a proofreading DNA polymerase (Platinum Taq Hi-Fi) [41].

Moreover, the breakpoints tested by RDP3 resulted significant by 7 statistical methods; besides, the GARD software

displayed the same breakpoints as the RDP3 software package.

The analysis of 10 clones obtained from the isolate MEX_OAX_1656_05 showed one clone (MEX_OAX_1656_05_C07) containing recombination in the E gene (Figure 5, 6). Interestingly, the parental strains for this recombinant were the Asian/American and the American genotypes. This result is very important because the American genotype has the highest divergence among all the genotypes for DENV-2. Furthermore, this is the first report on recombination between the Asian/American

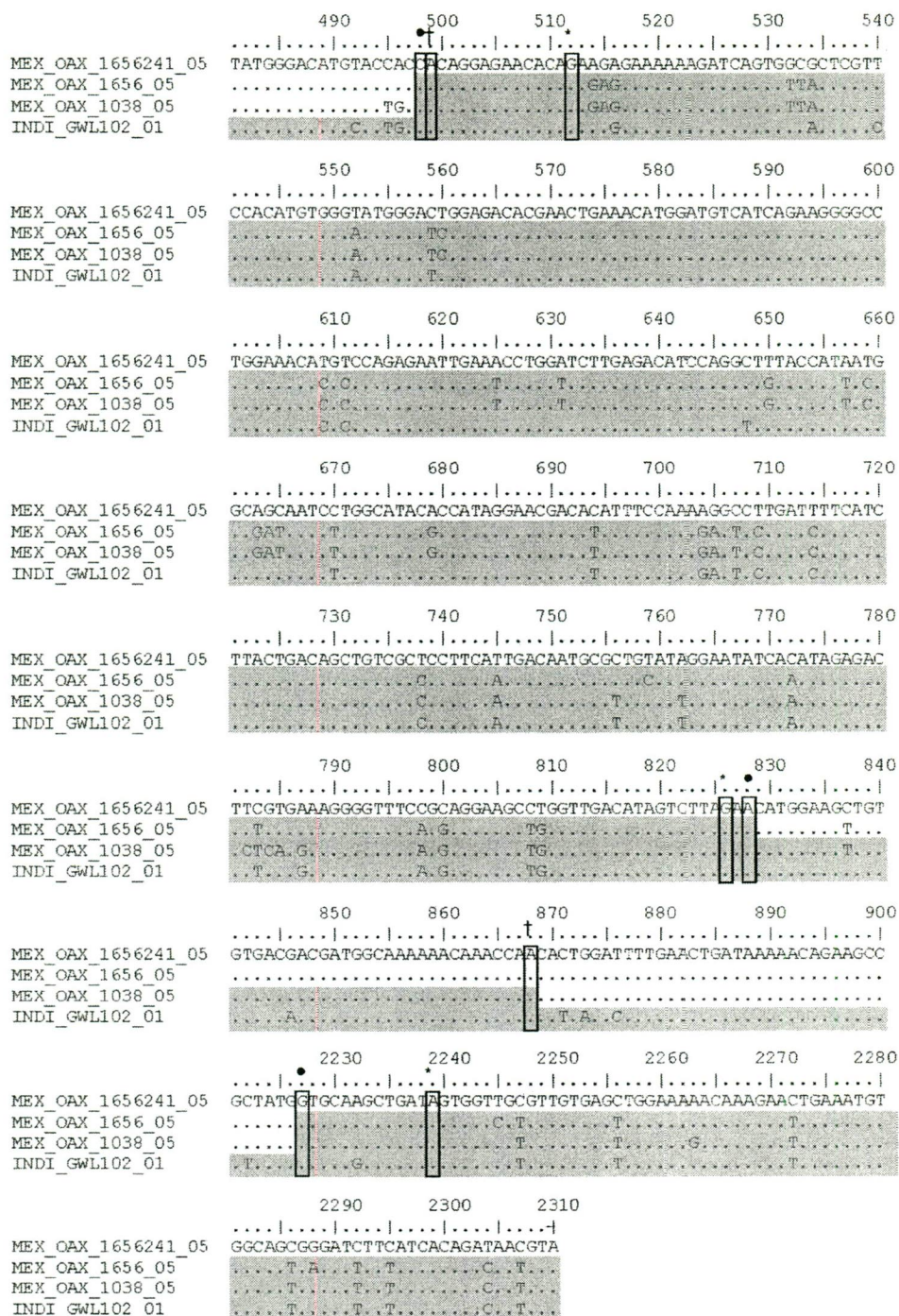


Figure 4
Nucleotide alignment of C(91)-prM-E-NSI(2400) sequence of MEX_OAX_I038_05 and MEX_OAX_I656_05 putative recombinant isolates with the parental strains. The number of nucleotide is determined by the position in our sequences of DENV as described in Methods; the location of the breakpoints of MEX_OAX_I038_05 sequence determined for BOOTSCAN is highlighted by (+); the breakpoints of MEX_OAX_I656_05 sequence determined for BOOTSCAN are indicated by (*); the breakpoints of MEX_OAX_I038_05 and MEX_OAX_I656_05 sequences, determined for GARD are labeled by (•). MEX_OAX_I656241_05 clone is the putative mayor parent and INDI_GWI_I02_01 is the putative minor parents.

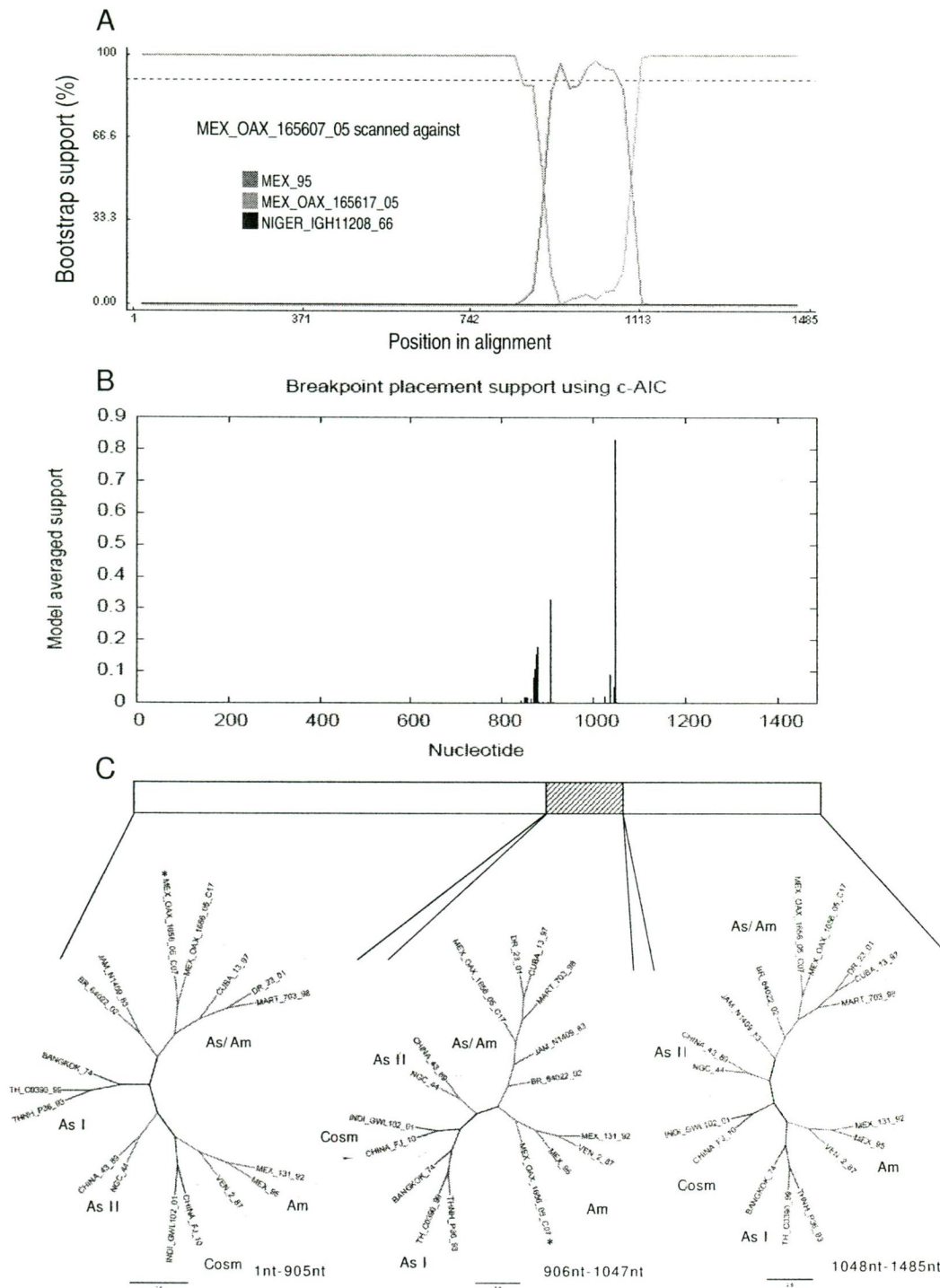


Figure 5
Recombination plots of clone MEX_OAX_165607_05 of E protein gene. A) BOOTSCAN plot resulted from the analysis of the clone MEX_OAX_165607_05 sequence with 1000 bootstrap, the putative mayor parent MEX_OAX_165617_05, and the putative minor parent MEX_95; B) Breakpoints plot obtained with GARD algorithm by using the sequences as above; C) Phylogenetic trees (E gene) based on putative recombination and non-recombination regions by maximum likelihood methods.

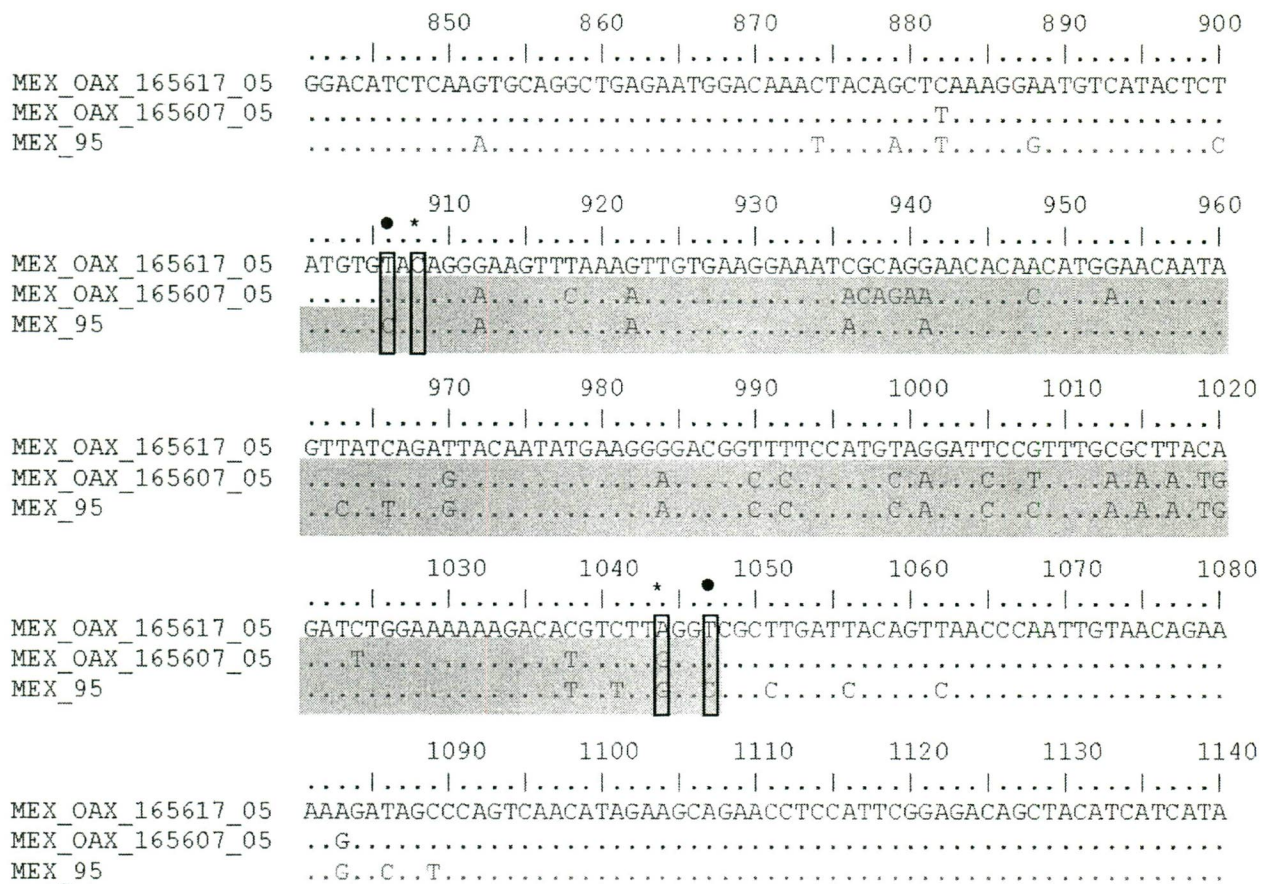


Figure 6
Alignment of recombinant E protein gene sequence MEX_OAX_165607_05 with parental sequences. Location of the breakpoints of MEX_OAX_165607_05 sequence determined by BOOTSCAN is highlighted by (*); and the one determined by GARD is labeled by (•). The number of nucleotide is determined by the position in the sequence of E gene.

(MEX_OAX_1656_05_C17) and American genotypes (MEX_95), which is supported by the analysis with RDP3 and GARD (Figure 5A-B). This recombinant displays the breakpoints between the nucleotides 906 and 1047. These results suggest that the frequency of recombination in DENV is higher than thought earlier, and the process will remain fundamentally hidden until more studies of clonal diversity to be undertaken. Nevertheless, the precise mechanism underlying the recombination events for DENV is unknown. To understand the mechanism of recombination the development of experimental models for co-infection to generate DENV recombinants is required.

The second breakpoint in the C₍₉₁₎-prM-E-NS1₍₂₄₀₀₎ region (nucleotide 868 and 826) for the MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 isolates was different for 40 nucleotides when determined by BOOTSCAN, but it was the same when GARD was used (Figure 4). This was not associated with a sequence that

permits the inference of a hot-spot of recombination as previously reported [12,13,26,27] and does not permit the deduction of the mechanism of recombination as has been described for other flavivirus [31][42].

Recombination may be a consequence of circulation of several genotypes at the same time in the same site and probably inside the same cell in the mosquito or human patient; in addition to the high density of different viruses circulating in the geographic area of Oaxaca. This is supported by a previous work that suggests that density of geographical and temporal sampling increases the probability for identifying recombinant sequences [25].

Phylogenetic studies have shown the circulation of the American [43], American/Asian [23], and Cosmopolitan [44] genotypes in Mexico, which makes feasible their recombination and explains the fact of the Cosmopolitan and American genotypes to recombine with the Asian/American genotype spread more broadly. Our results in

combination with previous reports [26] on DENV-2 recombination suggest that the different genotypes of DENV-2 are circulating in the virus pool infecting the mosquitoes or the human cells around the world. Until now, it remains unclear whether the frequency of recombination seen in this and previous studies is driving an increasing virulence of DENV strains. However, the recombinant strains of this study were obtained from the outbreak 2005-2006 where the frequency of DHF cases was higher than the DF cases in comparing to previous epidemics [45]. To elucidate the role of recombination in DENV virulence will be necessary to follow the generation of recombinants in outbreaks from other Mexican states.

Conclusions

It is unclear whether the recombination events took place in a human host or a mosquito vector co-infected by multiple DENV genotypes. In this study, we detected two recombinant isolates of DENV-2 from human hosts namely MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05, which identify 3 breakpoints within the prM-E-NS1 genome. Particularly the recombination appeared to have involved two genotypes of DENV-2, the Asian/American clone (MEX_OAX_1656_05_C241) from the same strain and the Cosmopolitan strain (INDI_GWI_102_01).

It is remarkable that parental and recombinant viral sequences of protein E were observed in an isolate from a single patient, particularly when the recombination appeared to have involved two genotypes of DENV-2 (Asian/American and the American) from the same geographic area (Oaxaca, Mexico). This is only the second observation of one parental and recombinant of DENV-2 in a population within a single host [26]. There are two more studies where both parental and recombinant viral genomes were observed in a DENV-1 isolate from a single patient. DENV recombination mechanism will be clarified by undertaking more studies of clonal diversity in both human and mosquito vector in Mexico.

Methods

DENV infected cells and virus isolation

Aedes albopictus clone C6/36 cells were grown at 28°C. After 18 h of culture, cells (2×10^6 /100 mm plate) were infected with 0.2 ml DEN-2 inoculums with an input MOI of 600 PFU/cell and were incubated at 28°C for 10 days.

Viruses were isolated as previously described [46] with a few modifications. After 18 h of culture, C6/36 cells (10^6 /15 ml tube) were infected with 0.01 to 0.1 ml of serum specimen per tube, diluted to 1 ml with medium, and incubated for 2 h at 28°C. After one wash, 3 ml MEM was added and the cells were cultivated for approximately 15 days at 28°C (passage number 1). Cells were observed every day and when a cytopathic effect was apparent from

syncytium formation and cellular lysis, the cells were harvested and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The pellet was 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 ml and one of 0.5 ml at -70°C. To obtain passages number two and three, C6/36 cells were incubated with 1 ml of the supernatant obtained from the first or second passage for 2 h at 28°C and the same procedure described above was followed. Serotypes and recombination studies in all samples were determined in the isolates MEX_OAX_14946_06, MEX_OAX_1020_06, MEX_OAX_739_05, MEX_OAX_1733_05, MEX_OAX_1038_05 and MEX_OAX_1656_05 obtained from the third culture-passage. All isolates were obtained by the Health Department from patients with DF, except for the isolate MEX_OAX_14946_06 obtained from a patient with DHF [47].

RNA extraction

Total RNA was extracted from cell culture supernatant using Trizol® LS (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) according to the manufacturer's recommendations. Ethanol-precipitated RNA was recovered by centrifugation and air-dried. The RNA pellet was suspended in 50 µl water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich) and used as template for Reverse Transcription with the Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

All assays were performed with the ThermoScript™ RT-PCR System containing Platinum Taq Hi-Fi (Invitrogen, Life Technologies). A mixture of 5 µl of total RNA (0.1-0.5 µg), 50 ng of hexamers/reaction, and DEPC-treated water (in a total volume of 50 µl) was incubated at 65°C for 5 min and chilled on ice. The first extension was carried out at 25°C for 10 min and then at 50°C for 90 min. PCR reaction was carried out by incubation of 20 µM of corresponding sense and antisense PCR primers, 2 µl of the cDNA synthesis reaction and 2.4 mM magnesium sulfate as per manufacture's recommendations. Synthetic oligonucleotide primer pairs were designed based on pairwise of different sequences of DENV-2; to amplify and sequence the partial open reading frame genome region C-prM-E-NS1 from nucleotide 91 (C₉₁) to 2400 (NS1₂₄₀₀): C(+) CAATATGCTGAAACGCGHG and NS1(-) GTTCTGTCCANGTRTGNAC, and for E gene: primers EPP-F (+) GAATGACAATGCCGTTGC and EPP-R (-) TCAGCTCACAACGCAACC.

Cloning

The RT-PCR product of the partial genome (C₉₁-prM-E-NS1₂₄₀₀) was restricted with *KpnI* and ligated in the

pGEM[®]-3Z vector (Promega) following previous protocols [48].

The RT-PCR products of E gene were ligated in the pCR[®]4-TOPO vector included in TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions

Sequencing of PCR products

For sequencing the structural genes or E gene the following primers were used: PrM(+) GGATGTCNKCNAAAGG; PrM(-)CCTTCNGMNGACATCC; E(+) GACAGAGGNTGGGGMAATGG; E(-) CCATKCCCCANCTCTGTG; E(-) CNCAAGARGGMGCCAGCC; E(+)GGCTGGCKC-CYTCTTNG. The automated sequencing of purified DNA fragments by spin columns (Qiagen, Chatsworth, Calif.) was performed by the cycle-sequencing dye terminator method. The Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABIPRISM 100, Applied Biosystems, Foster City, CA) was chosen for sequencing. The sequences obtained were deposited in the GenBank database ([AF856321-AF856328](#); [AF856341-AF856350](#)).

Phylogenetic and Recombination studies

TrN93 substitution model was used to make the phylogenetic analysis since this model showed to be the best to analyze DENV sequences by using "Model Selection" implemented in "DataMonkey" [28,29]

The DENV-2 sequences of partial C₉₁-prM-E-NS₁₂₄₀₀ genome (90) or E gene (180) were aligned using Clustal W [49]; keeping the more representative sequences (17 and 16 respectively) to obtain plots and phylogenies trees to evaluate recombination in our isolates and clones. The accession number of sequences are as follow: VEN_2_87 ([AF100465](#)), MEX_131-92([AF100469](#)), THNH_P36_93 ([AF022441](#)), TH_CO390_99 ([AF100462](#)), BANGKOK_74 ([AJ487271](#)), NGC_44 ([D00346](#)), CHINA_43_89 ([AF204178](#)), CHINA_FJ_10_00 ([AF276619](#)), INDI_GWL102_01 ([DQ448233](#)), INDO_BA05i_05 ([AY858035](#)), INDO_98900666_04 ([AB189124](#)), BR_64022_02 ([AF489932](#)), JAM_N1409_83 ([M20558](#)), CHINA_04_85 ([AF119661](#)), DR_23_01 ([AB122020](#)), MART_703_98 ([AF208496](#)), CUBA_13_97 ([AY702034](#)), MEX_95 ([DQ364562](#)). The aligned sequences were analyzed by Recombinant Detection Program version 3 (RDP3) [50] using default parameters (window of 200nt, step of 20nt, Jin and Nei, 1990 [51] substitution models and 1000 bootstrap) and by the genetic algorithm for recombination detection (GARD) [52,29].

Authors' contributions

GPR obtained the isolates and clones, carried out the RT-PCR assays using RNA from passages 3 to sequence the partial C91-prM-E-NS12400 genome and E gene to develop recombination and phylogenetic analysis. ADB

determined serotype and helped in the phylogenetic analysis. MCN participated in obtaining the clones of E gene. AC, collected serum samples from patients from Oaxaca and helped to obtain the isolates and clinical data from Oaxaca, Mexico. GPR and MLM participated in the writing and discussion of results, helped to review the manuscript and assisted with the literature validation. MLM proof-read and assembled the manuscript. All authors participated in the discussion of results and read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Maria Guadalupe Aguilar Gonzalez (Nucleic Acids Unity of CINVESTAV-IPN) and Eduardo Carrillo Tapia (Sequencer Unity of Genomic Sciences Program from UACM) are gratefully acknowledged for their assistance with the automated sequencing. This work was supported by the CONACYT grant CB-2005-01-50603.

References

- Gubler DJ, Meltzer M: **Impact of dengue/dengue haemorrhagic fever on the developing world.** *Adv Virus Res* 1999, **53**:35-70.
- Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, Thant KZ, Thein S, Aaskov JG: **Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3 and 4 by dengue 1.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:593-597.
- Wang WK, Chao DY, Lin SR, King CC, Chang SC: **Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan.** *J Microbiol Immunol Infect* 2003, **36**:89-95.
- Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG: **Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period.** *Virology* 2002, **301**:148-156.
- Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ: **Lack of evidence for proof-reading mechanisms associated with an RNA polymerase.** *Gene* 1992, **122**:281-288.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO: **Selection-driven evolution of emergent dengue virus.** *Mol Biol Evol* 2003, **20**:1650-1658.
- Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai LQ, Ninh TU, Pyke A, Reid M, Reynes JM, Su Yun ST, Thu HM, Wong SS, Holmes EC, Aaskov J: **Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains.** *Virology* 2004, **329**:505-512.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, De-Silva AM: **Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus.** *Emerg Infect* 2003, **9**:800-809.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, De-Mesa MTR, Nogueira RMR, Da-Rosa AT: **Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas.** *Virology* 1997, **230**:244-251.
- AbuBakar S, Wong PF, Chan YF: **Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia.** *J Gen Virol* 2002, **83**:2437-2442.
- Domingo C, Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, Gascon J, Cabrerizo M, Lipkin WI, Tenorio A: **Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus I in India.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:1519-1529.
- Holmes EC, Worobey M, Rambaut A: **Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**:405-409.
- Tolou HJG, Couissinier-Paris GP, Durand JP, Mercier V, dePina JJ, de-Micco P, Billoir F, Charrel RN, de-Lamballerie X: **Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type I based on the analysis of complete genome sequences.** *J Gen Virol* 2001, **82**:1283-1290.
- Worobey M, Rambaut A, Holmes EC: **Widespread intraserotypic recombination in natural populations of dengue virus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:7352-7357.
- Rico-Hesse R: **Microevolution and virulence of dengue viruses.** *Adv Virus Res* 2003, **59**:315-341.
- Monath TP, Kanesa-Thanan N, Guirakhoo F, Pugachev K, Almond J, Lang J, Quentin-Millet MJ, Barrett ADT, Brinton MA, Cetron MS, Bar-

- wick RS, Chambers TJ, Halstead SB, Roehrig JT, Kinney RM, Rico-Hesse R, Strauss JH: **Recombination and flavivirus vaccines: a commentary.** *Vaccine* 2005, **23**:2956-2958.
17. Seligman SJ, Gould EA: **Live flavivirus vaccines: reasons for caution.** *Lancet* 2004, **363**:2073-2075.
 18. Chen SP, Yu M, Jiang T, Deng YQ, Qin CF, Han JF, Qin ED: **Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China.** *Arch Virol* 2008, **153**:1175-1179.
 19. Bernardin F, Herring B, Page-Shafer K, Kuiken C, Delwart E: **Absence of HCV viral recombination following superinfection.** *J Viral Hepat* 2006, **13**:532-537.
 20. Gao F, Nainan OV, Khudyakov Y, Li J, Hong Y, Gonzales AC, Spelbring J, Margolis HS: **Recombinant hepatitis C virus in experimentally infected chimpanzees.** *J Gen Virol* 2007, **88**:143-147.
 21. Legrand-Abbravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J: **New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus.** *J Virol* 2007, **81**:4357-4362.
 22. Moreno MP, Casane D, Lopez L, Cristina J: **Evidence of recombination in quasispecies populations of a hepatitis C virus patient undergoing anti-viral therapy.** *Virol J* 2006, **3**:87.
 23. Gardella-Garcia CE, Perez-Ramirez G, Navarrete-Espinosa J, Cisneros A, Jimenez-Rojas F, Ramirez-Palacios LR, Rosado-Leon R, Camacho-Nuez M, Munoz Mde L: **Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:117.
 24. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Waterman SH: **A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses.** *Am J Trop Med Hyg* 1985, **34**:170-173.
 25. Twiddy SS, Farrar JF, Chau NV, Wills B, Gould EA, Gritsunt T, Lloyd G, Holmes EC: **Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus.** *Virol J* 2002, **298**:63-72.
 26. Craig S, Thu HM, Lowry K, Wang XF, Holmes EC, Aaskov JG: **Diverse dengue type 2 virus populations contain recombinant and both parental viruses in a single mosquito host.** *J Virol* 2003, **77**:4463-4467.
 27. Aaskov J, Buzacott K, Field E, Lowry K, Berlioz-Arthaud A, Holmes EC: **Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient.** *J Gen Virol* 2007, **88**:3334-3340.
 28. Kosakovsky-Pond SL, Frost SDW: **Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection.** *Mol Biol Evol* 2005, **22**:1208-1222.
 29. Kosakovsky-Pond SL, Frost SDW: **Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments.** *Bioinformatics* 2005, **21**:2531-2533.
 30. Tamura K, Nei M: **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** *Mol Biol Evol* 1993, **10**:512-526.
 31. Amanda EJ, Hong Y, George JK, Yacov R, Bradley DP, Joseph PD: **High Rate of Recombination throughout the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome.** *J Virol* 2000, **74**:1234-1240.
 32. Weaver SC, Vasilakis N: **Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease.** *Infect Genet Evol* 2009, **4**:523-540.
 33. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cello-de-Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA: **The molecular epidemiology of Dengue type 2 virus in Venezuela: Evidence for in situ virus evolution and recombination.** *J Gen Virol* 2001, **82**:2945-2953.
 34. Salda-Leonora TD, Parquet MDC, Matias RR, Natividad FF, Kobayashi N, Morita K: **Molecular epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:796-802.
 35. Schreiber MJ, Holmes EC, Ong SH, Soh HSH, Liu W, Tanner L, Aw PPK, Tan HC, Ching LN, Leo YS, Low JGH, Ong A, Ooi EE, Vasudevan SG, Hibberd ML: **Genomic Epidemiology of a Dengue Virus Epidemic in Urban Singapore.** *J Virol* 2009, **83**:4163-4173.
 36. Rakoto-Andrianarivelo M, Gumedé N, Jegouic S, Balanant J, Andriamamonjy SN, Rabemanantsoa S, Birmingham M, Randriamanalina B, Nkolomon L, Venter M, Schoub BD, Delpeyroux F, Reynes JM: **Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar.** *J Infect Dis* 2008, **197**:1427-1435.
 37. Georgescu MM, Delpeyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combescu M, Combescu AA, Guillot S, Crainic R: **High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis.** *J Virol* 1994, **68**:8089-8101.
 38. Ghedin E, Fitch A, Boyne A, Griesemer S, DePasse J, Bera J, Zhang X, Halpin RA, Smit M, Jennings L, St George K, Holmes EC, Spiro DJ: **Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity.** *J Virol* 2009, **83**:8832-8841.
 39. Carobene MG, Rodrigues CR, DeCandia CA, Turk G, Salomón H: **In vitro dynamics of HIV-1 BF intersubtype recombinants genomic regions involved in the regulation of gene expression.** *Virol J* 2009, **6**:107.
 40. Judo MS, Wedel AB, Wilson C: **Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:1819-1825.
 41. Shafikhani S: **Factors affecting PCR-mediated recombination.** *Environ Microbiol* 2002, **4**:482-486.
 42. Kalinina O, Norder H, Magnus LO: **Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation.** *J Gen Virol* 2004, **85**:1853-1857.
 43. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO: **Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction.** *J Gen Virol* 2006, **87**:885-893.
 44. Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, García-Rejón JE, Díaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narváez M, Jiménez-Ríos E, Blair CD, Olson KE, Black W, Beaty BJ: **Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**:485-492.
 45. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud: **Situación de Dengue en México.** [<http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=32>].
 46. Cisneros A, Diaz-Badillo A, Cruz-Martinez G, Tovar R, Ramirez-Palacios LR, Jimenez-Rojas F, Beaty B, Black WC, Munoz LM: **Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico.** *Arch Virol* 2006, **151**:113-125.
 47. Cisneros-Solano A, Moreno-Altamirano MM, Martinez-Soriano U, Jimenez-Rojas F, Diaz-Badillo A, Muñoz ML: **Sero-epidemiological and virological investigation of dengue infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001.** *Dengue Bulletin* 2004, **28**:28-34.
 48. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Strategies for cloning in plasmid vectors.** In *Molecular cloning: A laboratory manual Volume 1*. 2nd edition. Edited by: Nolan C. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:1.53-1.72.
 49. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nu Acids Resear* 1994, **22**:4673-4680.
 50. Martin DP, Williamson C, Posada D: **RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments.** *Bioinformatics* 2005, **21**:260-262.
 51. Jin L, Nei M: **Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis.** *Mol Biol Evol* 1990, **7**:82-102.
 52. Sugiura N: **Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections.** *Comm Statist* 1978, **7**:13-26.

Publish with **Bio Med Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

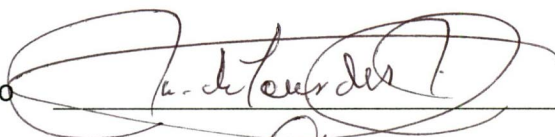
- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

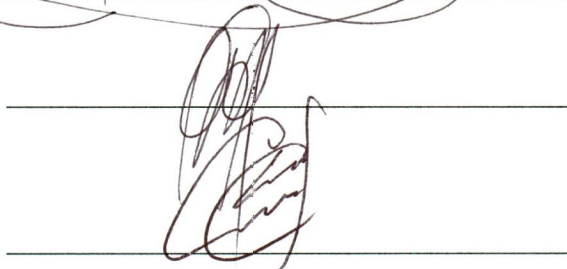


El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 1 de octubre del 2010, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Gerardo Pérez Ramírez

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno



Dra. Minerva Camacho Nuez



Dr. Alejandro Cisneros Solano



Dr. Juan Bautista Kouri Flores



Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez



Dra. Elisa Azuara Liiceaga



Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno