

GENOTIFICACIÓN DEL VIRUS DENGUE CIRCULANTE EN EL ESTADO ARAGUA DESDE 1987 A 2008.

Luis E. Ojeda¹, Nirza Noguera², Eymi Vilorio³, y Liz Vielma³

¹Departamento de Fisiología y Bioquímica, Escuela de Medicina, ²Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Bioanálisis, ³Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Maracay. Venezuela. luis_ojedaojeda@yahoo.es

Resumen

En las últimas décadas, el dengue en Venezuela ha sido reconocido como un problema de salud pública por el número de casos anuales que se reportan. El estado Aragua por su ubicación geográfica y clima, presenta casos de dengue todo el año. Según la vigilancia epidemiológica circulan los cuatro serotipo de virus dengue (VDEN). Dada la importancia de esta enfermedad en la región, se planteó genotipicar los cuatro serotipos de dengue mediante un análisis filogenético de la secuencia que codifica la proteína de envoltura (E). Esto con la finalidad de identificar los genotipos que han circulado en la entidad (entre 1987 y 2008), determinar si ha existido una co-circulación de varios genotipos del mismo serotipo. Para tal fin se analizaron y editaron un conjunto de secuencias disponibles en el GENBANK de algunos serotipos que han sido reportados para el estado Aragua y otras regiones del mundo (como referencia). El análisis filogenético determinó que el genotipo circulante de DENV -1 es el V, de DENV -2 es el Asiático/Americano, de DENV -3 fue el III y del DENV -4 fue el II. Se observó que no existió ninguna co-circulación de varios genotipos. Se observó poca variabilidad genética en el área.

Palabras clave: Dengue en Aragua, Filogenia y Genotipificación del Dengue

Abstract

Genotypification of dengue virus circulating in aragua state from 1987 to 2008.

In the last decades, dengue in Venezuela has been acknowledged as a public health problem since the numerous annual cases reported. Dengue cases are present in Aragua state all year round due to this state geographic location and weather, and according to epidemiological surveillance the four dengue virus serotypes (DENV) circulate in the state. Given the prevalence of this disease in the region, the aim of this study was the genotypification of the four dengue serotypes by means of a phylogenetic analysis of the sequence codified by

the protein envelope (E). This was done in order to identify the genotypes that have circulated in the state (between 1987 and 2008), and determine whether there has been a co-circulation of several strains of the same serotype. A set of sequences of some serotypes reported for Aragua state and other world regions, and available in the GenBank were analyzed and published (as reference). Phylogenetic analysis determined that the circulating genotype for the DENV -1 was the V, for DENV -2 was the Asian / American, for DENV -3 was the III, and for DENV-4 was the II. No co-circulation of several genotypes was found. Little genetic variability was observed in the area.

Key words: Dengue in Aragua, phylogeny and genotypification of dengue

INTRODUCCIÓN.

El dengue es una enfermedad producida por cualquiera de los serotipos que conforman el complejo dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*). Estos virus son transmitidos principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*; sin embargo, otras especies como el *Aedes albopictus* también pueden ser vectores de esta enfermedad (Savage y Smith 1995).

Algunas investigaciones han comprobado la recombinación entre cepas, posiblemente por la circulación simultánea de diversos genotipos de un serotipo en un mismo hospedero (Twiddy et al. 2002) y aunque se desconoce el significado de estos hallazgos, se ha descrito que la diversidad genética del DENV ha producido la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, más fácil transmisión o mayor virulencia (Rico-Hess et al. 1997).

Una de las regiones más afectadas por el DENV en Venezuela, ha sido el estado Aragua, en el que ocurrió una epidemia en 1989, la emergencia por FHD ocurrió en Maracay, la ciudad más grande del estado (Salas et al. 1998). Entre los años 1994 y 2000 en el estado circularon el serotipo 1, el 2 y el 4, y ha existido co-circulación de los cuatro serotipos desde finales del año 2000 cuando se reintrodujo el serotipo 3 en Venezuela (Camacho et al. 2009).

Desde la emergencia de FHD en 1989, la detección de serotipos/genotipos, ha sido documentada por diferentes investigadores (Salas et al. 1998; Uzcátegui et al. 2001; Goncalvez et al. 2002; Uzcátegui et al. 2003; Camacho et al. 2009 y Ramírez et al. 2010), pero han considerado solo determinados momentos epidémicos y serotipos específicos.

En vista de la importancia que esta enfermedad tiene a nivel nacional y debido a la ausencia de un trabajo que agrupe todos los serotipos de DENV, en el estado Aragua; se planteó en este estudio genotipificar cada uno de los serotipos mediante el análisis filogenético de la proteína de envoltura (E). Esto con la finalidad de determinar el o los

genotipo(s) correspondientes a los DENV que han circulados en el estado y conocer si ha existido una co-circulación simultánea de varios genotipos del mismo serotipo.

METODOLOGÍA.

Las secuencias fueron seleccionadas usando un muestreo aleatorio, en el que se escogió una por año para cada serotipo (el número de secuencias dependieron de la disponibilidad en la base de datos). Algunas secuencias correspondían a la proteína E, el resto al genoma completo del virus. Estas estaban almacenadas en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI de sus siglas en inglés).

Datos. Las secuencias fueron seleccionadas y descargadas de la página web de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en función de la información reportada en la bibliografía para cada serotipo. Para ubicar las secuencias se usaron sus números de acceso.

Edición de las secuencias. En este estudio se escogió la secuencia nucleotídica que codifica la proteína de envoltura (E), de 1485 nt de longitud para los serotipos 1, 2 y 4, y 1479 nt para el serotipo 3. Se consideró dicha secuencia, puesto que esta proteína (E) es el principal componente de la superficie externa del virión, es responsable de las propiedades fenotípicas del virus y es una proteína muy conservada, lo que sugiere que su secuencia nucleotídica debe presentar poca variabilidad. Posteriormente se agruparon por serotipo y fueron editadas mediante el uso del programa BIOEDIT 7.0 (www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html), a fin de que al ser alineadas tuviesen el mismo número de nucleótidos y coincidieran con la región E.

Análisis filogenético. Las secuencias editadas fueron alineadas usando el Clustal W del programa MEGA 4 (Tamura et al. 2007). Cada árbol filogenético fue analizado asumiendo la igualdad de las tasas de evolución en todos los linajes fueron dibujados a escala con la longitud de las ramas en las mismas unidades de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol. Las distancias

evolutivas fueron calculadas usando el método de máxima probabilidad mediante el método *neighbor-joining*. Cada análisis fue soportado estadísticamente con un *bootstrap* de 1000 réplicas.

Análisis aminoacídico. Las secuencias de nucleótidos fueron transformadas en secuencias de aminoácidos usando el programa Bioedit 7.0. Se alinearon y fueron comparadas entre sí, para establecer las posiciones donde hubo sustituciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En esta investigación se muestran los resultados del análisis de 156 cepas (de los serotipos 1, 2, 3 y 4) de DENV de varias regiones del mundo y del estado Aragua (entre 1987 y 2008).

DENV-1. Los estudios previos sobre aislados venezolanos han clasificados a estos de manera diferente, como pertenecientes al genotipo I (Rico-Hess 1990), genotipo V (Goncalvez et al. 2002) y al genotipo América-África (Domingo et al. 2006). En vista de que la clasificación más usada es la que ubica a cepas venezolanas dentro del genotipo V, se usó ésta como referencia.

Se realizó la genotipificación del DENV-1, circulante durante el periodo entre 1997 y 2007. Para tal fin se analizaron seis cepas (1997, 1998, 1999, 2004, 2006 y 2007). El árbol generado (Fig. 1) muestra la existencia de cinco grupos correspondientes a los genotipos descritos como I, II, III, IV y V (Goncalvez et al. 2002). Se observó que los aislados virales de América (México, Trinidad y Tobago, Perú, Nicaragua, Puerto Rico y Venezuela) se ubicaron en el genotipo V. También se verificó la división en tres linajes, del genotipo V: el primero constituido por virus aislados en Puerto Rico (1986 y 1998) y Perú (1991), un segundo linaje conformado por aislados virales de Trinidad y Tobago (1978), México (1980-1983) y Venezuela (1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2004, 2005, 2006 2007 y 2008) y un tercer linaje constituido por Nicaragua (2006). Las cepas de Venezuela a su vez se ubicaron en dos ramas (con un 98% de similitud), una correspondiente a 1997 y una la segunda que agrupó al el resto de las cepas (1998, 1999, 2000, 2001, 2004, 2005, 2006, 2007 y 2008).

En la figura 1 se evidencia que no ha existido una co-circulación de otro genotipo de DENV-1 en el estado Aragua durante el tiempo en estudio, resultado que se corresponde con estudios hechos con cepas de la zona (Camacho et al. 2009). En el país hasta el 2002 tampoco se había reportado circulación simultánea de más de un genotipo (Goncalvez et al. 2002), a diferencia de lo ocurrido

en Colombia, donde ha existido co-circulación del genotipo V y I, pero en diferentes provincias (Méndez et al. 2006).

Es importante mencionar que dentro del genotipo V del árbol, quedo incluido un aislado de Nigeria (1968), el *bootstrap* (100%) y lo antiguo de este aislado pudiesen sugerir que esta cepa es la responsable de la introducción de este genotipo en el continente americano proveniente de África, este hallazgo coincide con los reportado por Repik et al. (2002).

Los resultados del análisis de las secuencias de aminoácidos de la región E de las cepas venezolanas de VDEN-1 se muestran en la tabla 1.

De todos los cambios resaltados en la tabla 1, el más significativo es el ocurrido en la posición E-297, donde ocurrió una sustitución no conservativa de un aminoácido polar sin carga por uno alifático (Thr por Met). Este cambio sumado al ocurrido en E-96 distinguen los dos linajes de las cepas venezolanas dentro del genotipo V, esto concuerda con lo reportado (Goncalvez et al. 2002 y Camacho et al. 2009). Entre 1999 y 2008 han ocurrido pocos cambios aparentes, lo que sugiere que este genotipo está conservado.

Tabla 1. Sustituciones en la secuencias de aminoácidos de la cepas de DENV-1 del estado Aragua

Cepa	Posición del aminoácido en la cadena			
	96	297	325	394
Aragua 1997	Phe	Thr	Lys	Lys
Aragua 1998	Leu	Met	Lys	Lys
Aragua 1999	Phe	Thr	Arg	Lys
Aragua 2000	Phe	Thr	Lys	Lys
Aragua 2001	Phe	Thr	Lys	Arg
Aragua 2004	Phe	Thr	Lys	Lys
Aragua 2005	Leu	Met	Lys	Lys
Aragua 2006	Phe	Thr	Arg	Arg
Aragua 2007	Phe	Thr	Lys	Arg
Aragua 2008	Leu	Met	Lys	Lys

DENV-2. En el análisis realizado para DENV-2 se observan (Fig. 2) cinco genotipos: Americano, Asiático I, Asiático II, Cosmopolita y Asiático/Americano. Los aislados virales que corresponden a las islas del Caribe [Martinica (1998), Puerto Rico (1988) y Jamaica (1983)] y Latinoamérica [Colombia (1992), Paraguay (2005) y el estado Aragua (1990, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 y 2008)], pertenecen al genotipo Asiático/Americano. Las cepas de Aragua se ubicaron en dos ramas, la primera corresponde a los años 1990 y 1998, y una segunda rama que a su vez se sub divide en dos

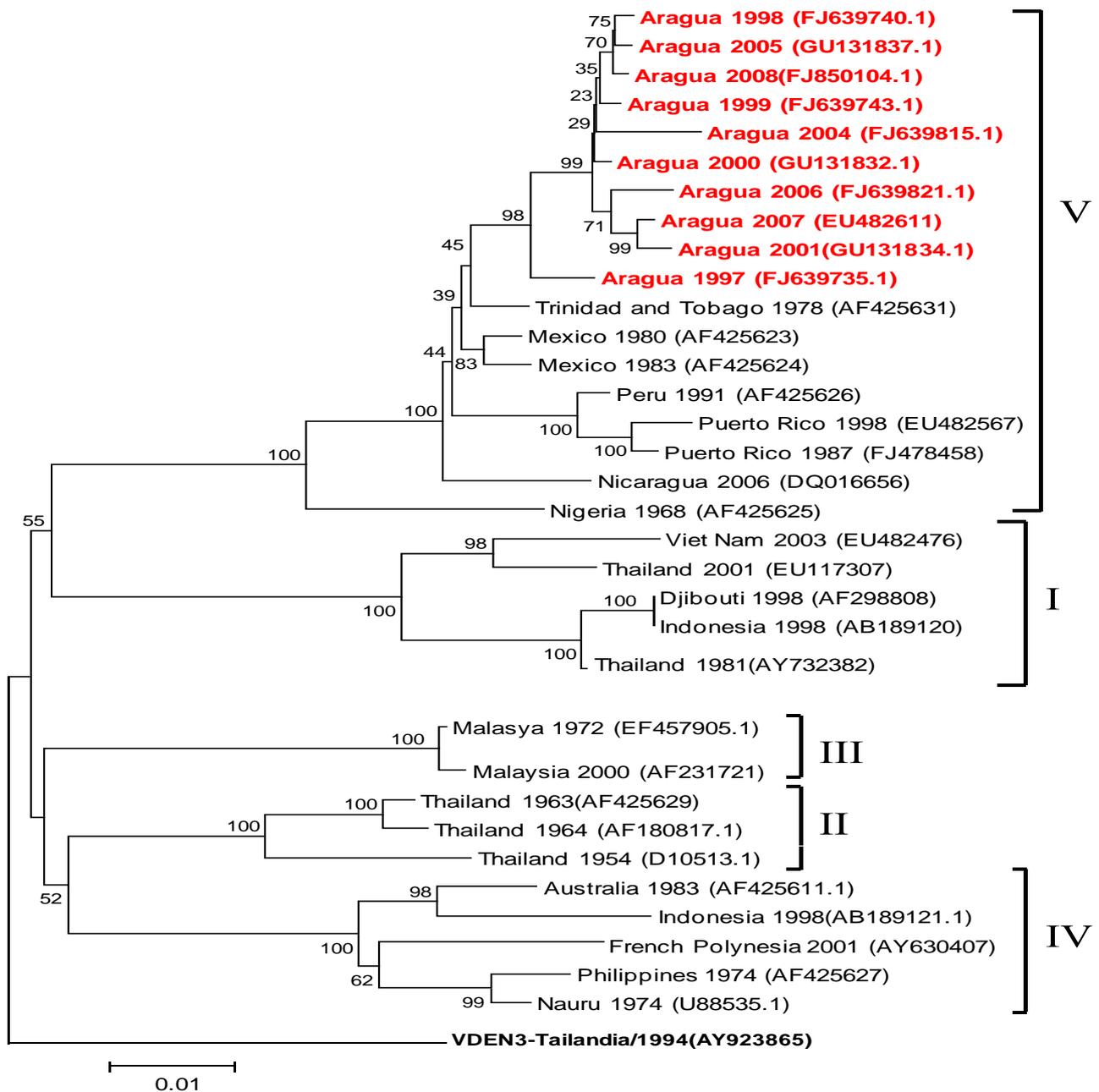


Fig.1. Árbol filogenético muestra las relaciones entre el gen E de 33 secuencias de DENV-1, cada país tiene su número de acceso al GENBANK. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de máxima probabilidad. En cada una de las ramas se indican los porcentajes de las réplicas de los árboles mediante el test de *bootstrap* de 1000 réplicas.

grupos, uno en el que están 2003, 2005, 2007 y 2008. El segundo grupo lo constituyen los aislados de 1996, 1997, 1999, 2000, 2004 y 2006. Adicionalmente, hay que destacar que en la zona que corresponde al genotipo Americano hay una secuencia de Aragua de 1987, que corresponde a una cepa que circulaba en el país antes de la epidemia de 1989.

El genotipo circulante en la región fue el Americano, hasta la epidemia de dengue ocurrida Venezuela entre 1989–1990 (Uzcátegui et al. 2001). Estudios posteriores encontraron evidencia que las epidemias de FHD/SCD estuvieron asociadas a la introducción de un serotipo originario del Sudeste Asiático (Rico-Hess, 1990; Rico-Hess et al. 1997) lo que sugiere que este puede haber desplazado gradualmente al DENV-2 del genotipo Americano.

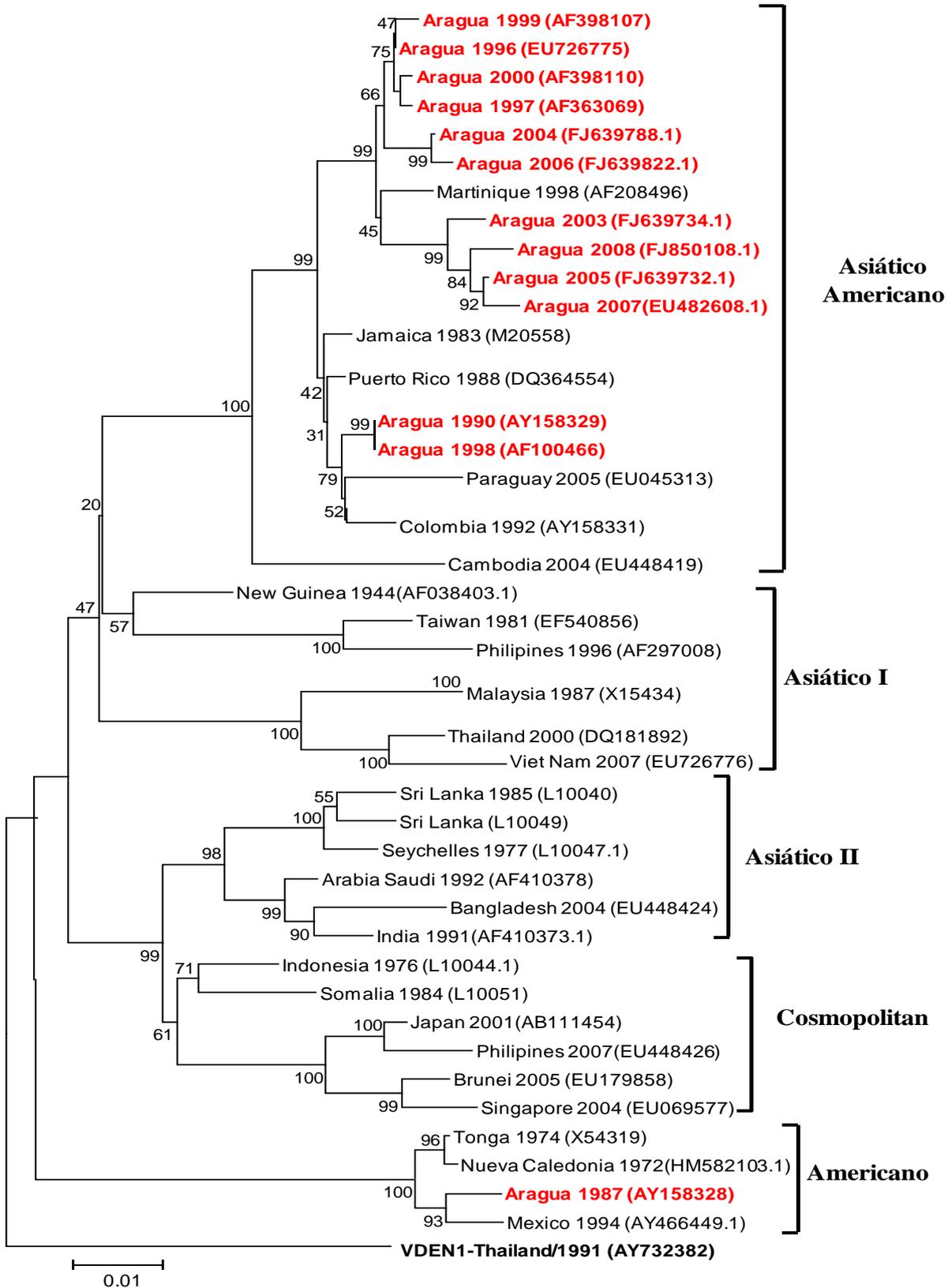


Fig. 2. Árbol filogenético muestra las relaciones entre el gen E de 43 secuencias de DENV-2, cada país tiene su número de acceso al GENBANK. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de máxima probabilidad. En cada una de las ramas se indican los porcentajes de las réplicas de los árboles mediante el test de *bootstrap* de 1000 replicas.

Tabla 2. Sustituciones en la secuencias de aminoácidos de la cepas de DENV-2 del estado Aragua

	Posición del aminoácido en la cadena											
<i>Cepas</i>	<i>71</i>	<i>91</i>	<i>118</i>	<i>129</i>	<i>131</i>	<i>139</i>	<i>162</i>	<i>203</i>	<i>324</i>	<i>340</i>	<i>390</i>	<i>393</i>
Aragua 1987	Asp	Val	Met	Ile	Gln	Val	Val	Asp	Val	Met	Asp	Arg
Aragua 1990	Glu*	Ile*	Met	Val*	Leu*	Ile*	Ile*	Glu*	Val	Met	Asn*	Lys*
Aragua 1996	Glu	Ile	Met	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys
Aragua 1997	Glu	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys
Aragua 1998	Glu	Ile	Met	Val	Leu	Ile	Ile	Glu	Val	Met	Asn	Lys
Aragua 1999	Glu	Ile	Met	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys
Aragua 2000	Glu	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys
Aragua 2003	Glu	Ile	Met	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Ile	Thr	Asn	Lys
Aragua 2004	Glu	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys
Aragua 2005	Glu	Ile	Met	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Ile	Thr	Asn	Lys
Aragua 2006	Glu	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys
Aragua 2007	Glu	Ile	Met	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Ile	Thr	Asn	Lys
Aragua 2008	Glu	Ile	Met	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Val	Thr	Asn	Lys

Nota: *indica el cambio de genotipo de las cepas a partir de 1990 con respecto a la cepa 1987 (genotipo Americano)

Durante la epidemia de dengue ocurrida en Aragua en 1998, el riesgo de padecer FHD/SCD estuvo significativamente asociado a las infecciones con este DENV-2 genotipo Asiático/ Americano (Salas et al. 1998).

En lo que respecta al resto de países de Latinoamérica, el único país que ha registrado la circulación de tres genotipos (Americano, Asiático/Americano y Cosmopolita) entre 1980 y 2000, es México (Loroño-Pino et al. 2004).

Desde el punto de vista clínico se puede señalar que el genotipo Asiático/Americano tiene la capacidad de producir las formas más severas de la enfermedad (FHD/SCD), incluso la muerte. Esto puede estar asociado a una mayor capacidad de replicación, transmisión, virulencia y agresividad (Bennett et al. 2003). Entre el 2001 y finales del 2006 el número de casos reportados en la entidad asociados con este serotipo fue muy bajo (Camacho et al. 2009).

Los resultados del análisis de las secuencias de aminoácidos de la región E de las cepas venezolanas correspondientes al serotipo DENV -2, se muestran en la tabla 2.

La diferencia entre el genotipo americano (cepa 1987) y el genotipo Asiático/Americano del resto de los aislados de Aragua está dada por nueve sustituciones, tal como se observa en la tabla 2. De éstas, la sustitución más relevante corresponde a E-390 (Asn por Asp). El Asn en E-390 fue asociada como una probable determinante genética de las cepas asiáticas (Bennett et al. 2006). Otra sustitución que característica del genotipo Asiático, es la ocurrida en E-131 donde se sustituye una Leu por una Gln, lo que se presume debe tener algún

efecto en la carga viral del genotipo. Las sustituciones en E-91 y E-129 se encuentran en el dominio (II) de la proteína y serían responsables de la fusión de la membrana con la célula huésped (Rico-Hess et al. 1998). Desde 1990 hasta el 2008 se observan pocas sustituciones y las que ocurrieron son semi conservativas.

DENV-3. En lo que respecta al DENV-3 su genotipificación se realizó estudiando el periodo comprendido entre 2000 y 2008. En la figura 3 se observa el árbol correspondiente a las secuencias de DENV-3, se observan cinco genotipos para este serotipo.

Las secuencias correspondientes a Venezuela se ubicaron en el genotipo III. Dentro de este genotipo también observamos: Brasil (2000), Colombia (2006), Perú (2005), México (1997-2000), Panamá (1994), Paraguay (2006) y Martinica (1999). Casi todas las cepas de América se ubicaron en este genotipo exceptuando Puerto Rico (1963 y 1977) que corresponden al genotipo V. Los aislados del estado Aragua se ubicaron en dos ramas, una donde solo estaba Aragua 2005 y una segunda donde estaba el resto de los aislados (2000, 2001, 2003, 2004, 2006, 2007 y 2008). La presencia de un único genotipo, para la mayoría cepas de Latinoamérica coincide con trabajos reportados para este serotipo en Venezuela (Uzcátegui et al. 2003), en sur América (Kochel et al. 2008), Brasil (Araujo et al. 2008) y Colombia (Villabona-Arenas et al. 2007).

El DENV-3 estuvo ausente en el país por por más de 30 años y reapareció a finales del 2000 (Uzcátegui et al. 2003). Su reaparición vino acompañada por un gran número de casos

reportados (más de 100 mil entre el 2000 y el 2001), esta epidemia se asemejó a la causada por DENV-2 en 1989 (Uzcátegui et al. 2003). Es oportuno mencionar que la severidad de los casos de FD y FDH de este serotipo no está asociada directamente al genotipo III, puesto que los brotes asociados con este serotipo muestran variabilidad en cuanto a su virulencia, lo que sugiere que este genotipo puede exhibir un potencial de patogenicidad diferente (Ramírez et al. 2010).

Las cepas venezolanas se ubicaron en dos ramas, una que correspondía a 2005 y la otra que incluía el resto de las cepas. Esa división está relacionada con tres sustituciones (E-6, E-81 y E-132) que posee la cepa 2005 y que no tienen el resto de los aislados (tabla 3). Las dos primeras son sustituciones semi-conservativas, donde se cambia el aminoácido, pero no su naturaleza, mientras que E-132 se cambia tirosina que es un aminoácido aromático, por histidina que es un aminoácido de carga positiva. Estos cambios coinciden con los reportados en estudios previos, donde se compararon aislados de 2000, 2001 y 2005 provenientes del estado Aragua y se observaron las mismas sustituciones (Ramírez et al. 2010).

Este serotipo al igual que el DENV-1 y el DENV-2, presenta gran divergencia en lo que respecta al número de linajes que poseen (5 cada uno), lo que sugiere una rápida tasa de ramificación (Twiddy et al. 2003).

DENV-4. La genotipificación del DENV-4 se realizó estudiando el periodo comprendido entre 1995 y 2008, para tal fin se analizaron siete cepas (1995, 1998, 1999, 2000, 2001, 2007 y 2008). Este serotipo presenta poca variabilidad genética, razón por la cual solo existen tres genotipos que afectan a los humanos y un genotipo selvático (Foster et al. 2003).

En el árbol se observó una subdivisión en tres genotipos I, II y III (Fig. 4). Las cepas del continente americano se ubicaron en el tipo II, Trinidad y Tobago (1999), Puerto Rico (1986, 1987, 1994 y 1998), Costa Rica (1996), México (1984), Honduras (1991), El Salvador (1983-1994), Suriname (1982) y Aragua (1995, 1998, 2001 y 2007).

Las cepas venezolanas se agrupan en dos ramas diferentes, la primera incluyó aislados de 1995, 1998 y 2008 y una donde se ubicaron 1999, 2000, 2001 y 2007.

La cepa que presentó mayor divergencia fue la del 2001 que presenta cambios en las posiciones E-222, E-291 y E-354 (ver tabla 4). Estos cambios sugieren modificaciones que son semi-conservativas en vista

de que ocurrieron entre aminoácidos de la misma naturaleza.

El DENV-4 fue introducido en América en 1981 y desde entonces ha circulado por el Caribe de manera continua (Bennett et al. 2003); sin embargo, no ha sido asociado a ninguna de las epidemias que ha causado el DENV. En el estado Aragua entre el 2002 y el 2003 no fue detectado ningún caso de FD asociada con este serotipo (Camacho et al. 2009). A diferencia de los otros serotipos existe menos información sobre la evolución molecular del DENV-4 que ha circulado en Venezuela.

Tabla 3. Sustituciones en la secuencias de aminoácidos de la cepas de DENV-3 del estado Aragua

Cepas	Posición del aminoácido en la cadena			
	6	81	132	208
Aragua 2000	Val	Val	Tyr	Arg
Aragua 2001	Val	Val	Tyr	Arg
Aragua 2003	Val	Val	Tyr	Lys
Aragua 2004	Val	Val	Tyr	Arg
Aragua 2005	Ile	Ala	His	Arg
Aragua 2006	Val	Val	Tyr	Lys
Aragua 2007	Val	Val	Tyr	Arg
Aragua 2008	Val	Val	Tyr	Arg

Tabla 4. Sustituciones en la secuencias de aminoácidos de la cepas de DENV-4 del estado Aragua

Cepa	Posición del aminoácido en la cadena		
	222	291	354
Aragua 1995	Ala	Lys	Ser
Aragua 1998	Ala	Lys	Ser
Aragua 1999	Thr	Lys	Ala
Aragua 2000	Thr	Lys	Ala
Aragua 2001	Thr	Arg	Ala
Aragua 2007	Thr	Lys	Ala
Aragua 2008	Ala	Lys	Ser

CONCLUSIONES.

El genotipo de DENV-1 que circuló en el estado Aragua entre 1987 y 2008 fue el V, para DENV-2 fue el Asiático/Americano, en el caso de DENV-3 fue el III y para DENV-4 fue el genotipo II. En el estado Aragua no ha ocurrido co-circulación de más de un genotipo para cada serotipo entre 1987 y 2008. Sin embargo, el no contar con secuencias de los últimos dos años (2009 y 2010) de desconoce si ha ocurrido la introducción de otro u otros genotipos diferentes a los encontrados en este estudio.

REFERENCIAS.

Ojeda et al. 2011. Genotipificación del virus dengue en el estado Aragua. *MedULA* 20: 16-25.

- Araujo JM, Nogueira RM, Schatzmayr HG et al. 2008. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Gen Evol* 9: 716–725.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M et al. 2003. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 20:1650–1658.
- Bennett SN., Holmes EC., Chirivella M. et al. (2006). Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol* 87: 885–893.
- Camacho D; Ferrer E; Rodríguez-Henríquez F et al. 2009. Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el Estado Aragua durante el período 1997 – 2007. *Salus* 12 Sup. 1: 73
- Domingo C, Palacios G, Jabado O et al. 2006. 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* 44: 1519-1529.
- Foster JE, Bennett SN, Vaughan H et al. 2003. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology* 306: 126-134.
- Goncalvez A, Escalante A, Pujol F et al. 2002. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 303: 110-119.
- Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. 1999. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol* 16: 405-409.
- Kochel T, Aguilar P, Felices V et al. 2008. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000-2005. *Infect Gen Evol* 8: 682–688.
- Loroño-Pino, M, Farfan-Ale J, Zapata-Peraza A et al. 2004. Introduction of the american/asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan state of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 71: 485-492.
- Méndez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C et al. 2010. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virol J*. 7: 226.
- Ramírez A., Fajardo A., Moros Z. et al. (2010). Evolution of dengue virus type 3 Genotype III in Venezuela: Diversification, Rates and Population Dynamics. *Virology Journal*, 7: 329.
- Repik PM, Dalrymple JM, Brandt WE et al. 1983. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg* 32: 577-589.
- Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 174: 479-493.
- Rico-Hesse R., Harrison LM, Salas RA et al. 1997. Origins of dengue viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244-250.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A et al. 1998. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 58: 96–101.
- Salas RA, Tovar D, Barreto A et al. 1998. Serotipos y genotipos de virus dengue circulantes en Venezuela, 1990–1997. *Acta Cient Venez* 49 (Sup. 1): 33-37.
- Savage H, Smith G. 1995. *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* en las Américas: implicaciones para la transmisión de arbovirus e identificación de hembras adultas dañadas. *Bol Of Sanit Panam*;. 118: 473-478.
- Tamura K; Dudley J; Nei M, Kumar S. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*.. 24: 1596-1599.
- Tibaïre M. 2000. Actualización en dengue. Parte 1. *Rev Soc Ven Microbiol* 21: 1.
- Twiddy S; Woelk CH, Holmes EC. 2002. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J Gen Virol* 83: 1679-1689.
- Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut C. 2003. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution.. *Mol. Biol. Evol.* 20: 122–129.
- Uzcátegui NY, Camacho D, Comach G et al. 2001. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol*: 82: 2945-2953.
- Uzcátegui NY, Comach G, Camacho D et al. 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J. Gen. Virol.* 84: 1569–1575.
- Villabona-Arenas CJ, Miranda-Esquível DR, Ocazonez-Jimenez RE. 2009. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Intern Health*.. 14: 1241–1250.

Recibido: 24 marzo 2011. Aceptado: 10 junio 2011.

MedULA le invita a publicar en sus páginas, los resultados de sus investigaciones u otra información en ciencias de la salud. **Apartado 870. Mérida. Venezuela.** medula@ula.ve

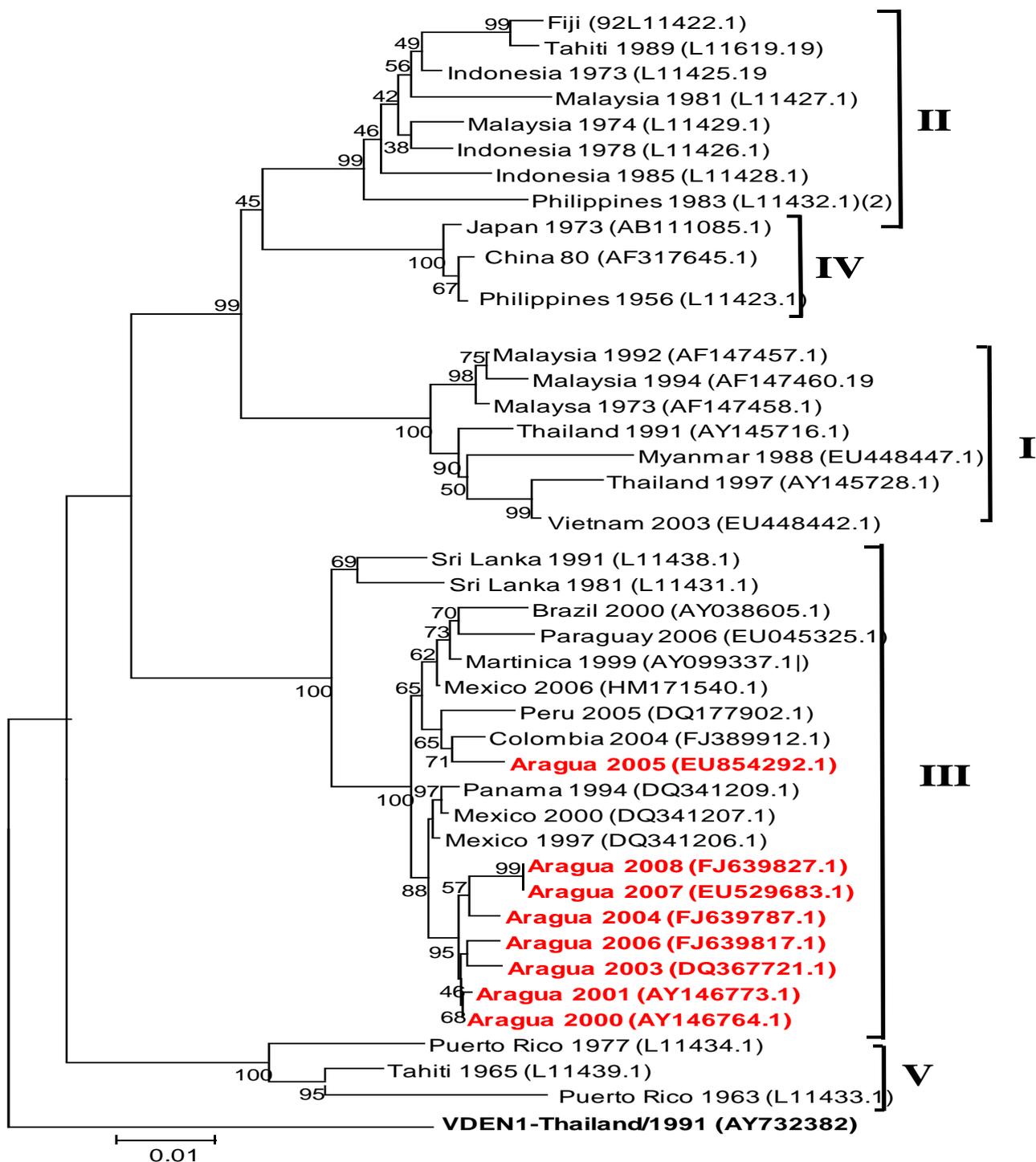


Fig. 3. Árbol filogenético muestra las relaciones entre el gen E de 42 secuencias de DENV-3, cada país tiene su número de acceso al GENBANK. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de máxima probabilidad. En cada una de las ramas se indican los porcentajes de las réplicas de los árboles mediante el test de *bootstrap* de 1000 réplicas.

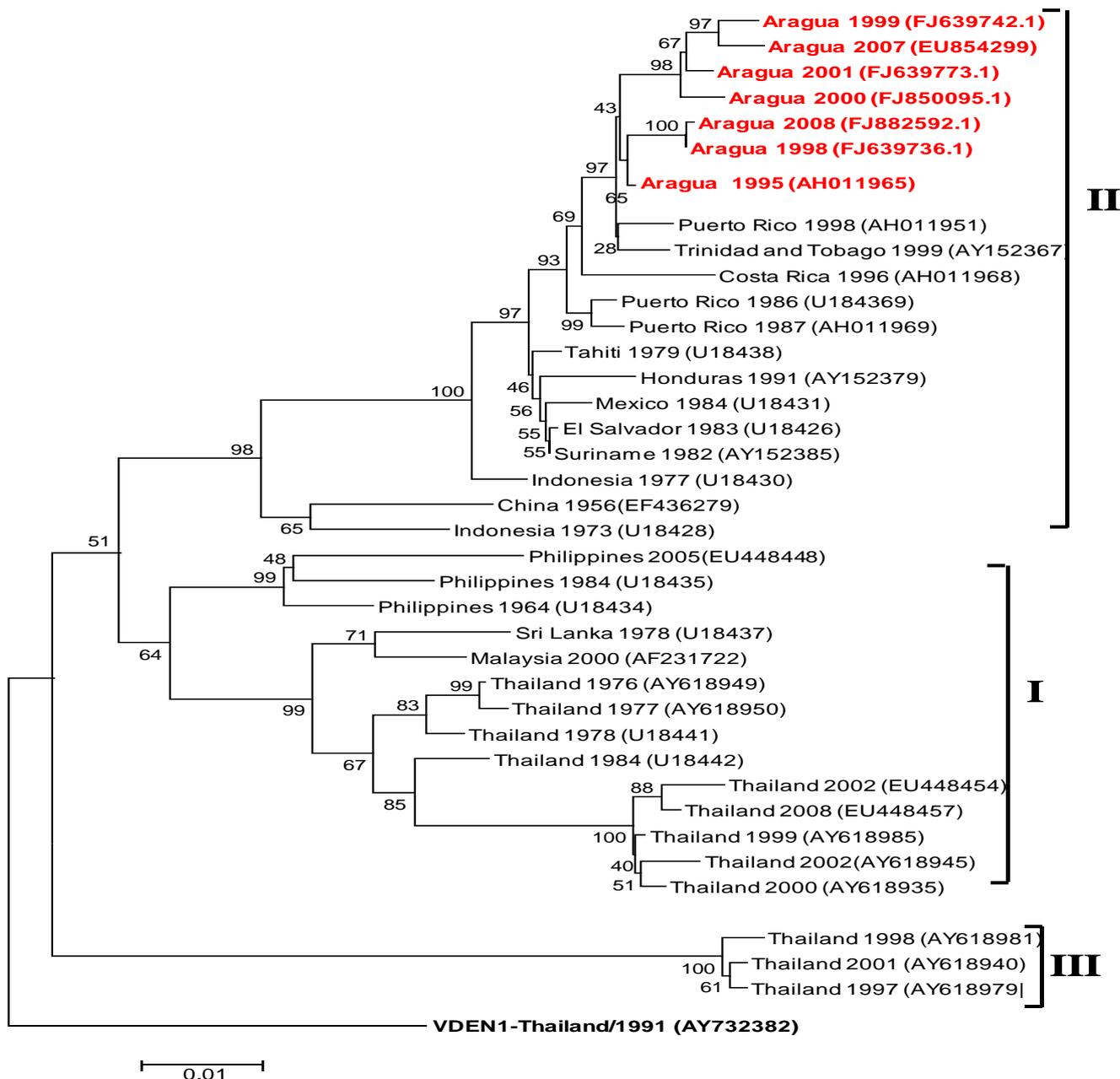


Fig. 4. Árbol filogenético muestra las relaciones entre el gen E de 38 secuencias de VDEN-4, cada país tiene su número de acceso al GENBANK. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de máxima probabilidad. En cada una de las ramas se indican los porcentajes de las réplicas de los árboles mediante el test de *bootstrap* de 1000 réplicas.

MedULA le invita a publicar en sus páginas, los resultados de sus investigaciones u otra información en ciencias de la salud.
Apartado 870. Mérida. Venezuela. medula@ula.ve