



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ  
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNOSTICO Y REFERENCIA  
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

*Tesis presentada en opción al Título de Máster en Virología*

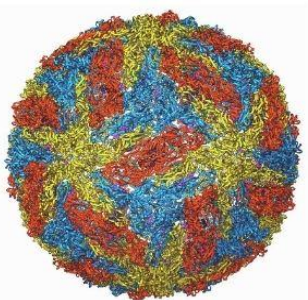
**Caracterización genética y evolutiva de Dengue 3 en Cuba, 2022.**

**Autor: Lic. Luis Javier Acanda Barrizonte**

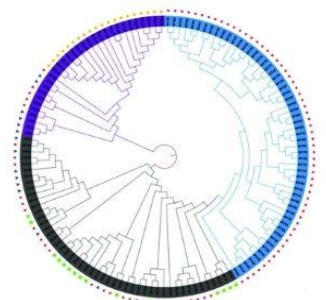
**Tutores: Prof. Lisette Pérez Santos, DrC**

**Prof. Mayling Álvarez Vera, DrC**

**Asesora: Prof. Maria G. Guzmán Tirado, DrCs**



**La Habana 2024**





INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ  
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNOSTICO Y REFERENCIA  
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

## **Caracterización genética y evolutiva de Dengue 3 en Cuba, 2022.**

*Tesis presentada en opción al Título de Máster en Virología*

**Autor:** Lic. Luis Javier Acanda Barrizonte

**Tutores:** Prof. Lisette Pérez Santos, DrC

Prof. Mayling Alvarez Vera, DrC

**Asesora:** Prof. Maria G. Guzmán Tirado, DrCs

**“La ciencia no es solo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión”**

**Stephen Hawking**

**“A mis padres, fuente interminable de inspiración”**

## **Agradecimientos**

Agradecimientos especiales a mis tutoras, las DrC. Mayling Álvarez Vera y DrC Lissete Pérez Santos por darme la oportunidad de realizar mi investigación en el departamento de Arbovirus. Un reconocimiento bien merecido al colectivo docente, por habernos enseñado tanto durante estos dos años y convertirnos en profesionales de la salud. A la DrC Magile Fonseca y al MsC Mario Pupo Meriño por su sapiencia en filogenética. A todo el personal de los laboratorios por acogernos durante las rotaciones, a nuestros compañeros de la mención en Virología; agradecido de los momentos geniales, de tensión en los seminarios y la experiencia que pasamos juntos. A todos ellos Gracias

### Resumen

El Dengue 3 es uno de los serotipos pertenecientes al complejo dengue con más expansión global y causante de periodos epidémicos en América Latina tras su re-introducción en 1994. La epidemiología del dengue en Cuba se ha caracterizado por un escenario complejo, con la circulación en la última década de varios serotipos simultáneamente, aunque tendiendo a la endemicidad de los brotes. Teniendo en cuenta este fenómeno se realizó un análisis filogenético y filodinámico de muestras de Dengue 3 cubanas durante el periodo 2022, mediante inferencia bayesiana en BEAST 1.10. Con motivo de establecer una caracterización evolutiva y estructural funcional se evaluaron las fuerzas evolutivas que actúan sobre la proteína de Envoltura en la plataforma DataMonkey, y los cambios aminoacídicos detectados y su implicación en epítomos conformacionales a linfocitos B mediante el software SEMA 2.0. Se identificó que las secuencias cubanas se agrupan con el nuevo linaje detectado (genotipo III Americano II), formando un clado monofilético con representantes de EE. UU, Brasil y Puerto Rico. Los análisis filodinámicos mostraron que el virus mantiene una población efectiva estable, con un ligero repunte a partir del 2021 asociado con la circulación del nuevo linaje. Las rutas de transmisión evaluadas mediante filogeografía apuntan a una dispersión desde Cuba hacia EE. UU y Puerto Rico constituyendo al centro de expansión en la región del Caribe; sin embargo, no se identificó a Cuba como destino en las introducciones intercontinentales. Las presiones evolutivas negativas predominan sobre dengue, con sitios sometidos a selección positiva que radican el Dominio II,III y la región transmembrana. Se observaron cambios aminoacídicos compartidos en el clado que ocupan las posiciones 150,158,329 y 380; y aunque pertenecen a regiones de epítomos a células B no se consideran mutantes de escape. Los resultados de este estudio aportan nuevos conocimientos en la epidemiología molecular de Dengue 3 necesarios para la vigilancia genómica de las arbovirosis.

**Palabras Clave:** dengue 3, genotipo III Americano II, linaje, población efectiva estable, presiones evolutivas negativas, análisis filogenético, Cuba

## Listado de Abreviaturas

% HPD: porcentaje de densidad posterior más alta, siglas del inglés

AIC: Criterio de Información de Akaike, siglas del inglés Akaike Information Criterion

BEAST: programa de inferencia filogenética, siglas del inglés Bayesian Evolutionary Analysis Sampling

BSP: modelo de coalescencia no paramétrico Bayesian Skyride Plot

MCC: árbol de mayor credibilidad, siglas del inglés Maximum Clade Credibility

MCMC: cadenas de Markov y Monte Carlo

Ne: tamaño de población efectiva

DENV: virus de Dengue

kDa: unidad de peso molecular kilodaltons

DC-SIGN: molécula 3 de adhesión intracelular no integrina dendrítica

ARN: Ácido Ribonucleico

Gen E: gen Envoltura

ED: ectodominio

ssRNA: ARN de simple cadena

aa: aminoácido

NGS: Secuenciación de nueva generación

MEME: Modelo de Evolución de Efectos Mixtos, siglas del inglés Mixed Effects Model of Evolution

FUBAR: del inglés Fast Unconstrained Bayesian AppRoximation

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

MAbs: Anticuerpos monoclonales

dN: Sitios no sinónimos

dS: Sitios sinónimos

iss: Índice de saturación de sustitución

Iss.c: Índices de saturación crítica

OMS: Organización Mundial de la Salud

NJ: Método de unión de vecinos, del inglés, Neighbor-Joining



## Índice de Tablas

**Tabla 1:** Distribución geográfica de cada serotipo de dengue.

**Tabla 2.** Clasificación de los métodos de inferencia filogenética de acuerdo al tipo de datos y algoritmo de construcción del árbol.

**Tabla 3.** Cambios aminoacídicos detectados de las secuencias de interés respecto a Panamá 1994.

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Organización estructural del genoma del virus del dengue.

**Figura 2.** Estructura de la glicoproteína de Envoltura del virus dengue.

**Figura 3.** Ciclo de replicación del virus del dengue.

**Figura 4.** Ciclo de transmisión urbana del virus del dengue.

**Figura 5.** Distribución mundial del dengue 2020-2021.

**Figura 6.** Distribución de casos de dengue, chikunguña y Zika por año de notificación. Región de las Américas, 2008-2022.

**Figura 7.** Representación esquemática de un árbol filogenético.

**Figura 8.** Diagrama de flujo de la investigación.

**Figura 9.** Árbol obtenido por Inferencia Bayesiana de las secuencias de Dengue 3, región envoltura (1479 pb).

**Figura 10.** Gráfico del análisis Bayesiano Skyride.

**Figura 11.** Visualización de las rutas de transmisión con  $BF > 3$  mediante el programa SPREAD 4.

**Figura 12.** Resumen gráfico de los métodos empleados en la determinación de los sitios sometidos a presiones evolutivas sobre el gen de la Envoltura.

**Figura 13.** Representación de la estructura dimérica de la proteína de Envoltura(1Uzg) y los cambios detectados en las secuencias cubanas.

**Figura 14.** Predicción de epítomos conformacionales a linfocitos B en el servidor SEMA 2.

# Índice

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
II.1 Objetivo General .....	6
II.2 Objetivos Específicos.....	6
<b>CAPÍTULO III.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>8</b>
III.1 Antecedentes de la enfermedad del dengue .....	8
III.2 Virus del dengue: Clasificación y estructura .....	9
III 2.1 Estructura y organización del genoma viral .....	9
III. 3 Proteínas Virales.....	10
II.3.1 Proteínas Estructurales .....	10
III.3.2 Proteínas no estructurales .....	11
III.4. Serotipos, Genotipos y Linajes.....	12
III.5 Replicación Viral .....	14
III.6 Ciclo de transmisión del virus del dengue .....	15
III.7 Dengue en América Latina.....	16
III.7.1 Dengue en Cuba.....	18
III.8 Secuenciación de genomas virales .....	20
III.9 Genética evolutiva.....	21
III.9.1 Aspectos relacionados con la evolución del virus del dengue .....	21
III.10 Implicaciones clínicas de la variabilidad genética del virus del dengue .....	22
III.11 Filogenética.....	22
III.11.1 Inferencia Filogenética .....	23
III.11 .2 Inferencia Bayesiana y Filodinámica .....	25
<b>CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
IV.1 Diseño General de la investigación.....	28
IV.2 Universo de estudio .....	28
IV.3 Alineamiento de secuencias .....	28
IV.4 Evaluación de la saturación y la señal filogenética .....	28
IV.5 Inferencia filogenética y filodinámica.....	29
IV.6 Análisis de Presiones evolutivas .....	30
IV.7 Análisis estructural -funcional de la proteína de Envoltura.....	30
IV.7.1 Sitios de inmunidad a linfocitos B.....	31
<b>Aspectos éticos de la investigación</b> .....	<b>32</b>
<b>Diagrama de flujo en la investigación</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
V.1 Caracterización filogenética y filodinámica de Dengue 3 .....	35
V.2 Caracterización filodinámica de Dengue 3.....	39

V.3 Inferencia Filogeográfica.....	42
V.4 Análisis de presiones selectivas en la evolución de Dengue 3.....	44
V.5. Análisis Estructural-Funcional.....	46
V.5 Predicción de epítomos conformacionales a linfocitos B.....	49
V.6 Discusión general .....	51
<b>CÁPITULO VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO IX. ANEXOS .....</b>	<b>69</b>

## I. INTRODUCCIÓN

---



## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las arbovirosis más frecuentes a nivel mundial y que supone una importante carga sanitaria en los países tropicales y subtropicales. Es endémico en muchas regiones, como el Sudeste Asiático, las Américas, el Pacífico Occidental, África y el Mediterráneo Oriental, y se calcula que unos 3.900 millones de personas corren el riesgo de contraer la infección, de las cuales más del 70% viven en países asiáticos (1). Es transmitido por las hembras de los mosquitos *Aedes*, especialmente *A. aegypti*, *A. albopictus* y *A. vitattus*. Estos vectores son ectoparásitos hematófagos tropicales comunes. La enfermedad zoonótica se propagó a partir de primates no humanos africanos o asiáticos entre 500 y 1000 años atrás, convirtiéndose en endémica en más de 100 países de todo el mundo, afectando incluso a zonas no tropicales o subtropicales (2). El período de incubación de la infección por el virus del dengue es de 4-7 días. En el 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo una nueva clasificación clínica para dengue (con signos de alarma o sin estos) y dengue grave (3) para un mejor manejo clínico de los pacientes y evitar que estos evolucionen al dengue grave .

Hoy en día, afecta a la mayor parte de los países de Asia y América Latina y se ha convertido en una de las principales causas de hospitalización y muerte entre niños y adultos de dichas regiones. En las zonas donde el dengue es endémico, factores ambientales como el agua estancada, donde los mosquitos depositan sus huevos, la mala calidad de las viviendas, y los factores climáticos ( la temperatura, las precipitaciones y la humedad) aumentan el riesgo de exposición al *Aedes aegypti*, el principal vector responsable de la transmisión del dengue. También se espera que la urbanización, el aumento de la densidad de población, la migración humana y los crecientes factores sociales y ambientales asociados a la pobreza y los desplazamientos forzados impulsen el aumento de la incidencia del dengue y la infección a nivel mundial. Las migraciones son un motor importante de la expansión del dengue al introducirlo en zonas no endémicas con vectores competentes o al introducir nuevos serotipos en zonas endémicas. Existen cuatro serotipos del virus del dengue antigénicamente diferentes: Dengue 1, 2, 3, y 4. Aunque los serotipos comparten alrededor de un 75% de similitud de secuencia entre ellos, cada serotipo se subdivide a su vez en genotipos, que presentan hasta un 94% de similitud de secuencia (4). Genéticamente es un virus ARN monocatenario de sentido positivo, de aproximadamente 10.700 nucleótidos de longitud. El genoma contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una poliproteína, que se procesa post-traduccionalmente para producir tres proteínas estructurales que incluyen la cápside (C), la pre-membrana (prM) y la envoltura (E), y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (5).

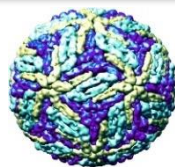
La respuesta inmune innata y adaptativa contribuyen a la resolución de la infección y desempeñan un papel fundamental en la protección frente a la reinfección. Sin embargo, pueden contribuir a aumentar la gravedad de la enfermedad, causando dengue grave. La investigación sobre los determinantes que contribuyen a la gravedad de la enfermedad se centra principalmente en la inmunología del huésped. Por ejemplo, la inmunidad no neutralizante, pero de reacción cruzada, inducida por la infección primaria es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de dengue grave durante una segunda infección **(6)**. El diagnóstico de la infección es principalmente clínico y puede apoyarse en pruebas virológicas como la prueba del antígeno NS1, la detección de anticuerpos específicos del dengue o la detección del genoma del dengue **(7)**. No existe un tratamiento específico para el dengue y se basa principalmente en la administración de fluidos y el tratamiento sintomático con analgésicos. Una multitud de factores como el tipo de virus infectante, los cambios en los serotipos circulantes, la inmunidad del huésped, el vector, los cambios en el entorno y la accesibilidad a los centros sanitarios desempeñan un papel importante en el manejo de las epidemias. Además, la naturaleza inespecífica de la infección y la falta de medidas terapéuticas específicas hacen que sea importante tener un alto índice de sospecha para identificar los casos clínicos de forma precoz y emprender el tratamiento necesario. Al mismo tiempo, el serotipo circulante tiene un impacto significativo en la gravedad de la enfermedad debido a la patogenicidad única del virus. Uno de los principales retos de la medicina reconocido por muchos investigadores desde la secuenciación del genoma humano, ha sido identificar a escala genómica la variación génica que puede estar asociada con algunas enfermedades humanas. En el campo de la Virología, los análisis de secuencias constituyen una herramienta fundamental en el entendimiento de procesos tan complejos como la resistencia a determinado fármaco, las clasificaciones taxonómicas, los análisis filogenéticos y filodinámicos de nuevas cepas, así como posibles mecanismos de microevolución en la interacción con el huésped.

En la epidemiología molecular, las técnicas de secuenciación de genomas, los análisis filogenéticos y filodinámicos han perfeccionado las investigaciones científicas acerca de la dispersión de los patógenos identificando la historia evolutiva y factores de riesgo asociados a cambios genéticos y moleculares. Los resultados derivados de estos estudios han permitido el desarrollo de estrategias de intervención y prevención más efectivas. Al integrar los métodos filogenéticos con los epidemiológicos tradicionales, los investigadores pueden inferir relaciones entre la dinámica de la población de los patógenos, como la diversidad genética, las presiones selectivas y la distribución espacio temporal **(8)**. En el periodo comprendido entre 1977-2007, Cuba tuvo una situación epidemiológica única en relación al dengue ya que las epidemias fueron causadas en su mayoría

por un solo serotipo y las mismas fueron controladas. Sin embargo, del 2009 a la fecha, los brotes han sido causados por más de un serotipo y no han sido controlados tendiendo a la endemidad. En el año 2022 circularon los cuatro serotipos en el país. El Dengue 3 fue el más frecuente (78,2 %), seguido de Dengue 2 (12 %), aunque hubo diferencias entre las provincias. En las provincias Pinar del Río (PR), Matanzas (MT), Sancti Spíritus (SS) y Holguín (HO) se detectaron tres serotipos y en Camagüey (CM), La Habana (LH), Granma (GR) y Santiago de Cuba (SC) se detectaron los cuatro serotipos circulando (Fuente Base de Datos LNR Arbovirus, IPK, 2022). Durante el 2023 se mantuvo una situación semejante, pero con un porcentaje de transmisión menor, donde el Dengue 3 predominó (94,8%), seguido de Dengue 2 (3,6 %), Dengue 1(0,7 %) y Dengue 4(1%). En el primer semestre del 2024 la frecuencia de detección ha sido Dengue 3 (89 %), Dengue 4 (9%) y Dengue 2(2%).

Teniendo en cuenta la situación de Cuba respecto al dengue, la vigilancia genómica es fundamental en la caracterización epidemiológica, de tal manera que la identificación de los serotipos cambiantes a lo largo del tiempo juega un rol importante en la predicción de la gravedad e impacto durante las epidemias.

**II OBJETIVOS**





## CAPÍTULO II. OBJETIVOS

### II.1 Objetivo General

Analizar la filogenia y evolución del serotipo 3 circulante en Cuba en el 2022

### II.2 Objetivos Específicos

1. Establecer la caracterización filogenética y filodinámica del serotipo 3 circulante en Cuba en el período de enero a diciembre de 2022.
2. Identificar los sitios sujetos a presiones evolutivas en las secuencias de virus Dengue 3 en el periodo de estudio.
3. Determinar el impacto de las variaciones aminoacídicas en la estructura de la proteína de Envoltura.

### **III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



### CAPÍTULO III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### III.1 Antecedentes de la enfermedad del dengue

El dengue es la arbovirosis de mayor importancia en términos de morbilidad y mortalidad en áreas tropicales y subtropicales, y causa aproximadamente de 100 a 400 millones de infecciones anualmente **(9)**. Actualmente, el dengue es endémico en regiones de África, el Mediterráneo Oriental, América, el Sureste de Asia y el Pacífico Occidental. De acuerdo a reportes recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el incremento del número de casos en 2020 ha hecho del dengue un serio problema epidemiológico tras la pandemia de COVID-19 **(10)**. Existen 4 serotipos de dengue (Dengue 1, 2, 3, y 4). En 2013, un nuevo serotipo de dengue fue reportado en Sarawak (Malasia). A partir de una serie de análisis genéticos, se identificó como un nuevo serotipo (Dengue 5) y se distribuye fundamentalmente en áreas boscosas del Sureste de Asia **(4)**. La infección ocurre tras la picadura de las hembras del mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* fundamentalmente. La infección inicial con cualquiera de los serotipos proporciona protección permanente a ese serotipo y parcial, de corta duración, contra el resto debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos generados **(11)**. Hasta el 2008, el dengue se clasificaba de acuerdo a los criterios de la OMS de 1987 en Fiebre del dengue (DF), Dengue Hemorrágico (DHF) y Síndrome de Shock del Dengue (DSS). A partir del 2009, la OMS actualizó el sistema de clasificación clínica de la enfermedad: dengue con signos y sin signos de alarma y dengue grave **(12)**. La infección puede cursar en formas asintomáticas o sintomáticas. Los síntomas incluyen dolor de cabeza, anorexia, fatiga, dolor muscular y abdominal, malestar general, pérdida del apetito, vómito, rash y diarrea **(13)**. Las formas graves de la enfermedad se han asociado principalmente a las infecciones secundarias por un serotipo diferente al de la primera infección. Otros factores como la secuencia de infección, el intervalo entre las mismas, la virulencia de la cepa circulante y factores dependientes del individuo incluyendo la genética del hospedero influyen en el desarrollo final de la infección **(14)**. Actualmente, el manejo clínico involucra el tratamiento de los síntomas y no hay terapia antiviral o tratamiento específico contra el dengue. El diseño de nuevos candidatos vacunales representa un reto debido a las diferencias entre los serotipos, la rápida evolución del virus, el papel protector de la inmunidad celular, la patogenicidad directa de la proteína no estructural NS1 y la disminución de los títulos de anticuerpos en el tiempo **(7)**. Los candidatos vacunales más avanzados contra dengue incluyen formulaciones tetravalentes de virus vivos atenuados a partir de cepas representativas de cada serotipo. Dengvaxia (CYD-TDV) es una vacuna tetravalente recombinante, viva y atenuada autorizada para uso clínico en 2015. Está compuesta por el esqueleto de la vacuna contra la fiebre amarilla de Sanofi Pasteur (YFV 17D) reemplazando las proteínas de Premembrana (prM) y de

Envoltura (E) de YF por proteínas de los cuatro serotipos de dengue. A pesar de su comercialización, Dengvaxia provocó graves efectos secundarios adversos y una baja eficacia **(15)**. En septiembre de 2023, el Grupo Estratégico de Expertos en Inmunización (SAGE) de la OMS recomendó la introducción del TAK-003 para niños de 6 a 16 años en entornos con alta intensidad de transmisión del dengue **(16)**.”La precalificación de TAK-003 es un paso importante en la expansión del acceso mundial a las vacunas contra el dengue, ya que ahora puede ser adquirida por organismos de las Naciones Unidas, como el UNICEF y la OPS” comentó el Dr. Rogerio Gaspar, Director de Reglamentación y Precalificación de la OMS **(17)**.

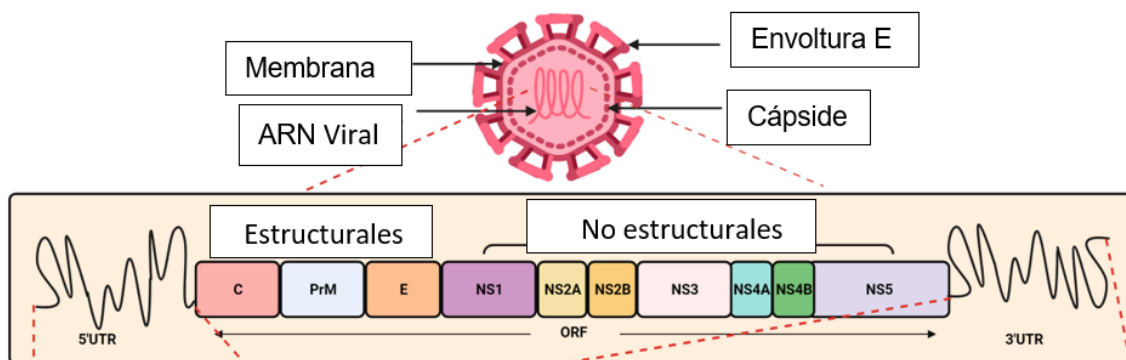
### III.2 Virus del dengue: Clasificación y estructura

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) constituyen un grupo taxonómicamente diverso de virus que se caracterizan por la transmisión entre vectores artrópodos y huéspedes vertebrados. Se clasifican según sus relaciones antigénicas, morfología y mecanismos replicativos. Las familias que incluyen los arbovirus son Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae y Reoviridae **(18)**. Aproximadamente 500 arbovirus son conocidos, de los cuáles 100 causan enfermedades en humanos y 40 en animales domésticos **(19)**. El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* de la familia Flaviviridae ,junto a otros patógenos causantes de la Fiebre Zika, la Encefalitis japonesa B, la Fiebre amarilla y la Encefalitis del Nilo Occidental **(5)**. Los viriones son partículas esféricas caracterizadas por superficies lisas o llanas con un diámetro aproximado de 50 nm, una capa externa de proteínas bien organizadas, insertadas en la superficie de una bicapa lipídica, proveniente del hospedero y una nucleocápside que contiene el genoma viral **(20)**. Presenta un genoma de ARN monocatenario con sentido positivo de aproximadamente 11,7 kb de longitud y codifica para tres proteínas estructurales: cápside(C),membrana (PreM) y Envoltura (E) y siete no estructurales involucradas en la replicación viral: NS1, NS2a,NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 **(21)**. La envoltura tiene simetría icosaédrica, en la cual los dímeros de proteína E se organizan en forma de espigas. Los estadios infeccioso y no infeccioso de la partícula viral dependen de los cambios conformacionales de las proteínas E y M, a diferentes condiciones de pH **(22)**. La cápside se encuentra debajo de la cubierta proteica exterior y de la bicapa lipídica y no está bien ordenada como las otras proteínas estructurales **(6)**.

#### III 2.1 Estructura y organización del genoma viral

El genoma viral de ARN de simple cadena (ssRNA), está compuesto por una región codificante (ORF- del inglés Open Reading Frame) flanqueado por dos regiones no codificantes (UTR)

ubicadas en los extremos 5' y 3' (**Figura 1**). Posee una caperuza (m7GpppAmpN2) hacia el extremo 5' como sitio iniciador de la traducción y carece de cola poli A (**23**). La región 5' UTR incluye secuencias de 95-101 nucleótidos en los cuatro serotipos de dengue y contiene regiones que actúan como promotores para la ARN Polimerasa ARN dependiente (NS5) necesaria para la replicación viral, además de regiones esenciales para las interacciones ARN-ARN y circularización del genoma. Por otra parte, la región 3' UTR posee secuencias variables (114-650 nucleótidos) que facilitan los cambios conformacionales del genoma durante la replicación (**24**).



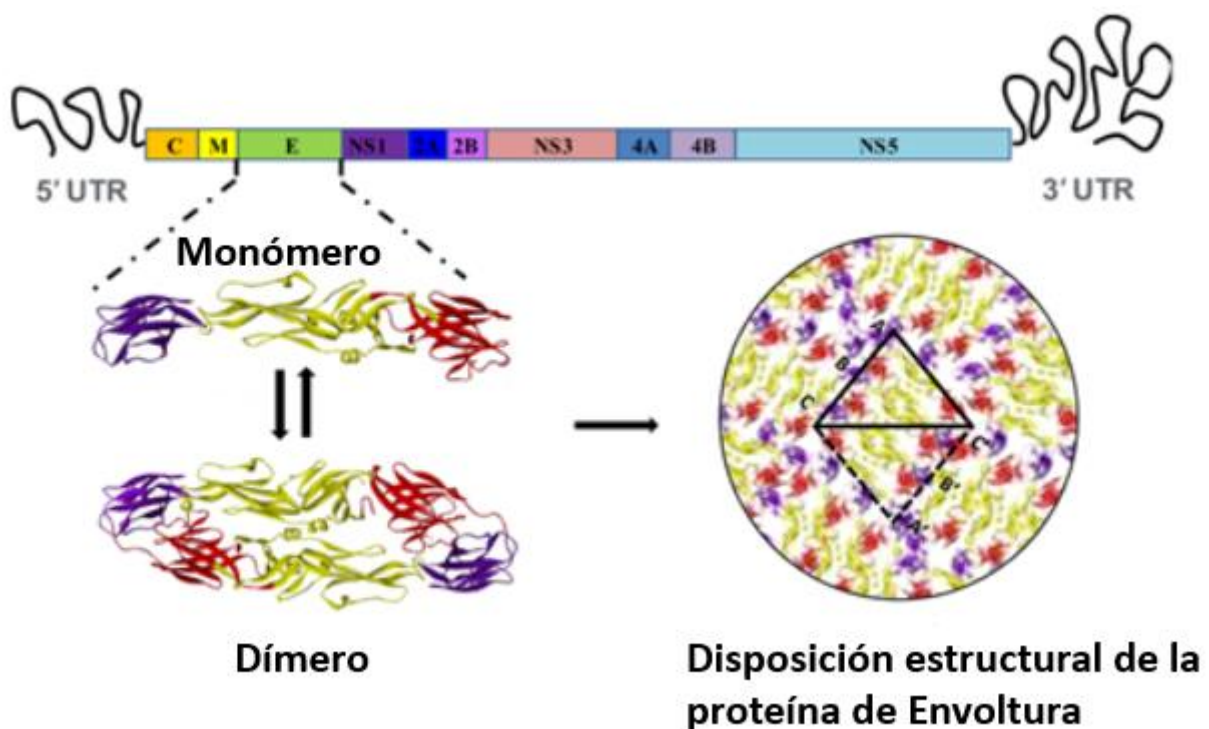
**Figura 1.** Organización estructural del genoma del virus del dengue. Desde el extremo 5' al 3' se presentan las proteínas estructurales y no estructurales (**23**).

### III. 3 Proteínas Virales

#### II.3.1 Proteínas Estructurales

Las proteínas estructurales incluyen la envoltura (E), la membrana (M) y la cápside (C) altamente catiónica. Estas proteínas conforman el virión y determinan las principales características morfológicas (**25**). La proteína PreM de 21 kDa es la precursora de la proteína M de 8 kDa. Proteasas de tipo furinas provenientes del huésped cortan el precursor prM en un pre-péptido (1-91 aa), un ectodominio (92-130 aa) y la proteína M (131-166 aa) (**26**). La proteína C (12 kDa), de 100 aa, presenta una estructura homodimérica y contiene 26 aa básicos y 3 aa ácidos. Consta de 4 regiones de  $\alpha$ -hélices con rearrreglos antiparalelos en los dominios homodímeros (**26**). Las conformaciones asimétricas de los residuos básicos permiten la unión al ARN viral y las regiones hidrofóbicas permiten la interacción con la envoltura lipídica. Esta estructura permite la encapsulación del ARN viral en la nucleocápside y posee señales para el anclaje a la membrana del Retículo endoplasmático (**25**). La glicoproteína E posee un peso molecular de 53 kDa. Forma dímeros en los viriones maduros y trímeros en viriones inmaduros o intermediarios de fusión, proyectándose al exterior en forma de espigas. Presenta tres dominios (I, II y III) y una región

transmembrana (27). El dominio I es fundamental para la estabilización de los cambios conformacionales de la proteína E, el dominio II posee un lazo de fusión altamente conservado responsable de la homodimerización mientras que el dominio III es esencial en el reconocimiento y unión al receptor. Este dominio incluye epítomos, los cuales son reconocidos por anticuerpos neutralizantes e intervienen en la entrada del virus a la célula. Las regiones transmembranas (TM) conformadas por hélices antiparalelas estabilizan la forma trimérica de la proteína de Envoltura e interviene en la fusión de membranas (28). Generalmente las proteínas no estructurales son responsables de la evasión de la respuesta inmune al inhibir varias rutas de señalización en las células infectadas.



**Figura 2.** Estructura de la glicoproteína de Envoltura del virus dengue (en rojo dominio I, en amarillo dominio II y en azul dominio III (29).

### III.3.2 Proteínas no estructurales

La proteína N-glicosilada NS1 de 45 kDa forma parte del complejo de replicación viral. Se sintetiza como monómero y después del procesamiento en el retículo endoplasmático y en Golgi se secreta como una partícula lipoproteica hexamérica en el medio extracelular y en la sangre. Su detección por ELISA y ensayos de inmunocromatografía en muestras de suero se ha empleado como diagnóstico confirmatorio durante la infección por dengue (11).

La proteína NS3 de 69 kDa presenta varias funciones enzimáticas: nucleósido trifosfatasa (NTPasa), helicasa y serino proteasa. Hacia el extremo N-terminal presenta los dominios proteasas que escinden la poliproteína viral en varios segmentos y el dominio ARN helicasa hacia el extremo C-terminal involucrado en la replicación viral. NS2B de 22 kDa es una proteína asociada a membranas y es requerida por NS3 para formar el complejo serino-proteasa actuando como cofactor. El dominio helicasa de NS3 contribuye al proceso de replicación viral y es vital en la fusión de elementos de estructura secundaria en las regiones UTR durante la síntesis de ARN viral **(30)**. Por otra parte, la NS4A, es una proteína altamente hidrofóbica, actúa junto a proteínas del hospedero y virales y promueve los rearrreglos estructurales en las membranas durante la replicación viral. Se ha encontrado que la hidrofobicidad de NS4B es capaz de inhibir la ruta de fosforilación STAT1 bloqueando la activación de interferón  $\alpha/\beta$ , además de modular la función del dominio helicasa de NS3 **(31)**.

La proteína NS5 de 100 kDa, es la proteína de mayor peso molecular de las no estructurales y comparte el 75% de homología de secuencia en los 4 serotipos. Forma parte del complejo de replicación viral con varias funciones enzimáticas: hacia el extremo N-terminal presenta el dominio metiltransferasa encargado de la formación de la caperuza (Cap), mientras que, hacia el extremo 5', se localiza la actividad ARN polimerasa ARN -dependiente relacionada con la síntesis del genoma viral en el ciclo replicativo. Por su papel crucial en este proceso es objetivo del diseño de fármacos en las terapias anti-dengue **(32)**. Generalmente las proteínas no estructurales son responsables de la evasión del virus a la respuesta inmune al inhibir varias rutas de señalización en las células infectadas.

### III 4. Serotipos, Genotipos y Linajes.

El complejo de los virus del dengue está integrado por cuatro serotipos antigénicamente diferentes (Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4) con notables diferencias en cuanto a distribuciones espacio-temporales y comparten aproximadamente del 65-70% de similitud de secuencias aminoacídicas **(33)**. Cada serotipo incluye varios genotipos, los cuales difieren en un 6% en secuencia nucleotídica. Actualmente Dengue 1 se divide en cinco genotipos (I, II, III, IV y V), Dengue 2 en seis genotipos (Asiático I, Asiático II, Cosmopolita, Americano, Americano/Asiático y Selvático), Dengue 3 en cuatro genotipos (I, II, III, y V) y Dengue 4 en cuatro genotipos (I, II, III, Selvático **(Tabla 1)**).

**Tabla 1.** Distribución geográfica de cada serotipo de dengue **(18)**.

DENV-1	I	Sudeste de Asia, China y el este de África.
	II	Tailandia (décadas de 1950 y 1960).
	III	Cepas selváticas colectadas en Malasia.
	IV	Islas del Oeste del Pacífico y en Australia.
	V	América, oeste de África y algunas cepas de Asia.
DENV-2	Asiático 1	Malasia y Tailandia.
	Asiático 2	China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas.
	Cosmopolita	Australia, África, Islas del Océano Pacífico e Índico y Medio Oriente.
	Americano	América Latina, el Caribe, la India e Islas del Pacífico en las décadas 1950 y 1960.
	Asiático/Americano	Aislamientos de origen asiático, y colectados en las Américas.
	Selvático	Aislamientos colectados en humanos, mosquitos selváticos o monos centinelas tanto en el Sudeste Asiático como en África Occidental.
DENV-3	I	Malasia, Filipinas, Indonesia y de las Islas del Pacífico Sur.
	II	Tailandia, Bangladesh y Vietnam.
	III	India, Sri Lanka, Samoa, África y aislamientos colectados desde 1994 a la fecha, en Latinoamérica y el Caribe.
	IV	Cepa prototipo aislada en Filipinas en el año 1956 y aislamientos de China y Malasia de los 80. En la India 2013.
	V	Puerto Rico de los años 60 y 70, así como un aislamiento de Tahití de 1965.
DENV-4	I	Tailandia, Filipinas, Japón y Sri Lanka.
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Las Américas y el Caribe.
	III	Aislamientos recientes de Tailandia.
	IV	Aislamientos selváticos colectados en Malasia.

Aunque las infecciones con serotipos diferentes se asocian con un alto riesgo de desarrollar o presentar síntomas severos hay poca información acerca del impacto de los genotipos en la patogénesis del virus del dengue **(33)**. La introducción de nuevos genotipos en la población tiene el potencial de causar brotes sin precedentes y está asociado con manifestaciones críticas de la enfermedad **(34)(30)**. Los genotipos muestran variada adaptabilidad como resultado de modificaciones genéticas que potencian la dispersión viral en diferentes áreas geográficas. Los serotipos Dengue 1 y Dengue 2 son los causantes de la mayoría de los brotes, siendo Dengue 2 responsable de la alta mortalidad ante reinfecciones, superior al resto de los serotipos **(35) (31)**. Basados en el análisis filogenético del gen E, cada genotipo se divide en múltiples linajes. En una región geográfica, un linaje particular puede surgir, persistir y después desaparecer y ser reemplazado. Este evento tiene varias explicaciones: la naturaleza estocástica de la transmisión del virus, variaciones en la dinámica de las poblaciones, incremento de la viremia, co-circulación de múltiples serotipos y la potenciación de la respuesta inmune **(36)**.



### III.5 Replicación Viral

La picada de un mosquito *Aedes* infectado con el virus del dengue inicia la infección en humanos. El virus puede replicarse en varias células y órganos como riñones, hígado, bazo y nodos linfáticos, pero las células dendríticas, monocitos y macrófagos son blanco celular debido al tropismo viral. El ciclo replicativo consiste en varios pasos que incluyen la entrada, replicación, ensamblaje y liberación. Los viriones interactúan a través de las proteínas de la superficie con los receptores celulares de las células hospederas. Se han propuesto algunos receptores celulares que incluyen: molécula 3 de adhesión intracelular no integrina dendrítica (DC-SIGN), heparán sulfato, lectina humana tipo C (CLEC5A) y receptores de manosa (37). Algunos estudios han revelado que el dominio III de la proteína E es responsable del reconocimiento por las células hospederas y media la entrada a través de endocitosis dependientes de clatrina. Alternativamente la fusión de membranas entre el virus y la célula hospederas conducen a la internalización de los viriones. El pH bajo de los endosomas interviene en la separación de los dímeros de la proteína E de la superficie de los viriones (38). El dominio II de la proteína de Envoltura se proyecta fuera de la superficie de los viriones permitiendo la formación de un lazo de fusión y la inserción de los viriones en la membrana de los endosomas. Los rearrreglos entre los dominios de la proteína de Envoltura promueven la formación de trímeros (39),(35). La interacción entre dominios y el lazo de fusión es crucial en la formación de poros y la liberación del genoma viral en el citoplasma. Posteriormente el ARN viral es traducido a una poliproteína, la cuál es escindida por proteasas virales y del huésped para generar las proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas no estructurales son esenciales durante la replicación viral y son responsables de las rondas de transcripción que generan los genomas de la progenie (40).

El ensamblaje ocurre en el retículo endoplasmático (ER), las glicoproteínas de la envoltura y la cápside forman las partículas inmaduras. Las partículas se transportan a través de Golgi y mediante procesamiento de la proteína PrM por proteasas furinas se transforman en la proteína M madura. Procesos proteolíticos sucesivos provocan la maduración de las partículas virales, las cuales son liberadas al medio extracelular (41) (Figura 3).

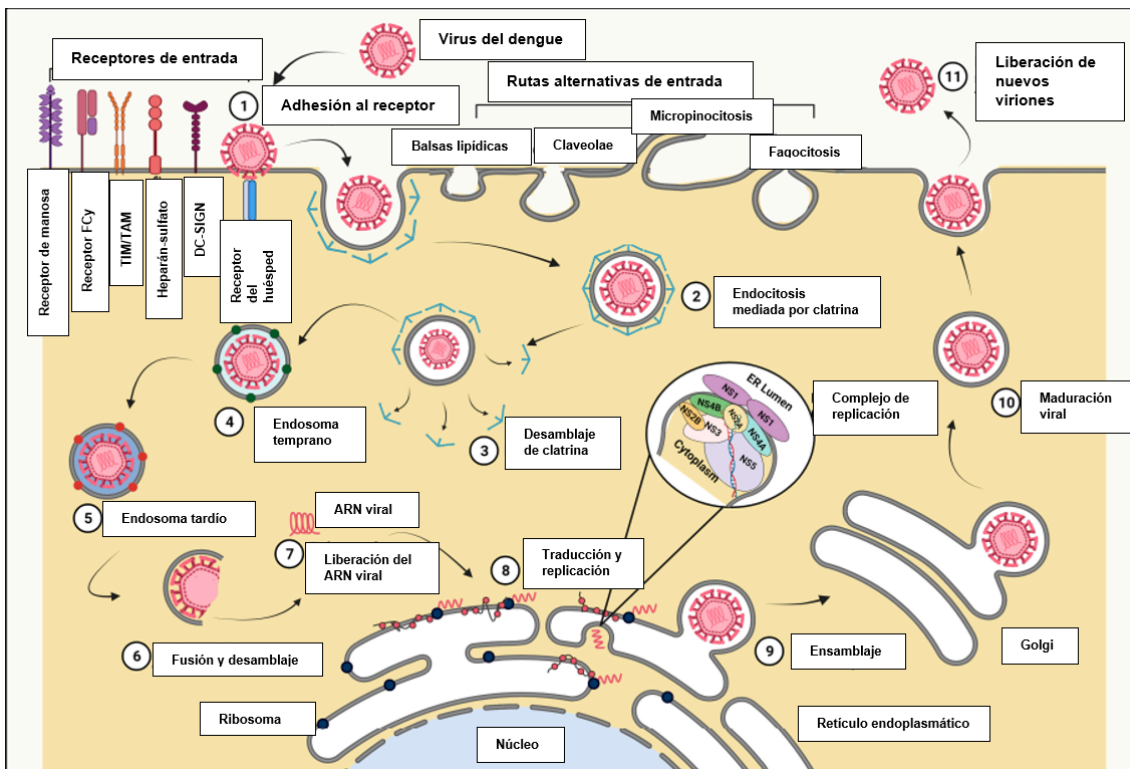


Figura 3. Ciclo de replicación del virus del dengue (23).

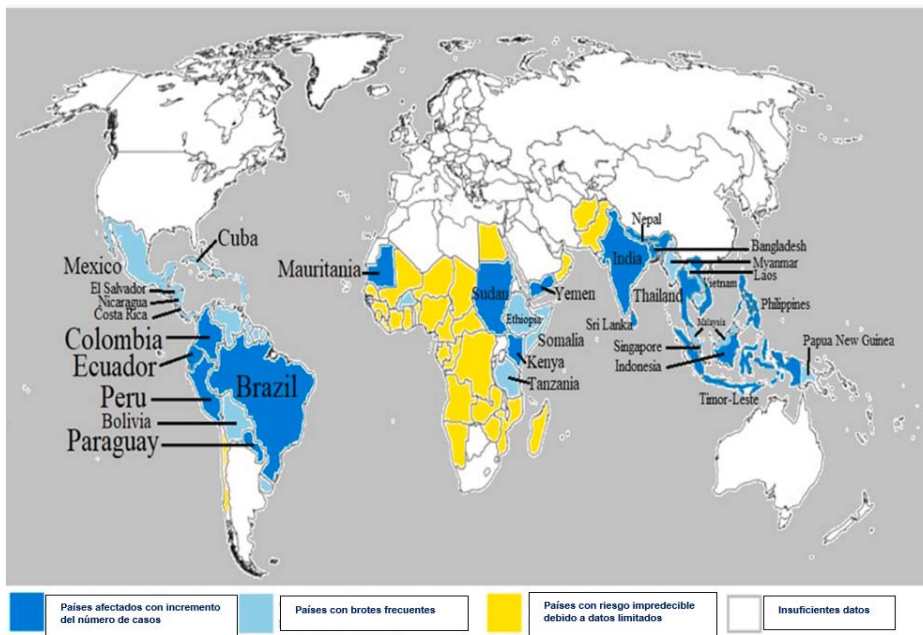
### III. 6 Ciclo de transmisión del virus del dengue

El virus del dengue se mantiene en la naturaleza principalmente mediante transmisión entre la hembra de un vector del género *Aedes* y el hombre (Figura 4 A). Aunque la transmisión horizontal es fundamental en la determinación de la epidemiología de esta enfermedad, existen hipótesis sobre vías alternativas de transmisión en las poblaciones del vector (42, 43).

Se reconocen dos ciclos de transmisión, el urbano y el selvático (Figura 4B) siendo el primero de mayor importancia epidemiológica. Ambos procesos son diferentes tanto ecológica como evolutivamente. La transmisión en humanos ocurre en 128 países y los principales vectores son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. En contraste, el ciclo de transmisión selvático ha sido identificado en el Sudeste de Asia y África Occidental y los principales vectores son *Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer* y *Aedes taylori* (44). El virus es transmitido al hombre a partir de mosquitos infectados durante la picadura del vector. Es esencial para virus ARNs, como el dengue, establecer contacto, penetrar y acceder a la maquinaria biosintética de la célula hospedadora para su multiplicación. Después de que el virus es ingerido por el mosquito, se transporta hasta las células epiteliales del intestino medio donde se replica. Posteriormente, la progenie viral es liberada, alcanza el hemocele y se disemina



continente, especialmente después de la reintroducción del Serotipo 3 en los años 90 (47). Las sucesivas introducciones de genotipos asiáticos, a partir de 1963, provocaron un cambio drástico en el patrón epidémico, definido inicialmente por la aparición de epidemias de amplia propagación, luego un aumento de la incidencia de dengue grave, una transición de la hipoendemicidad (establecimiento y circulación local de un serotipo) y el acortamiento de los períodos intraepidémicos. Actualmente, en la mayoría de los países tropicales y subtropicales de América se producen brotes anuales de dengue, a menudo con más de un serotipo (48).

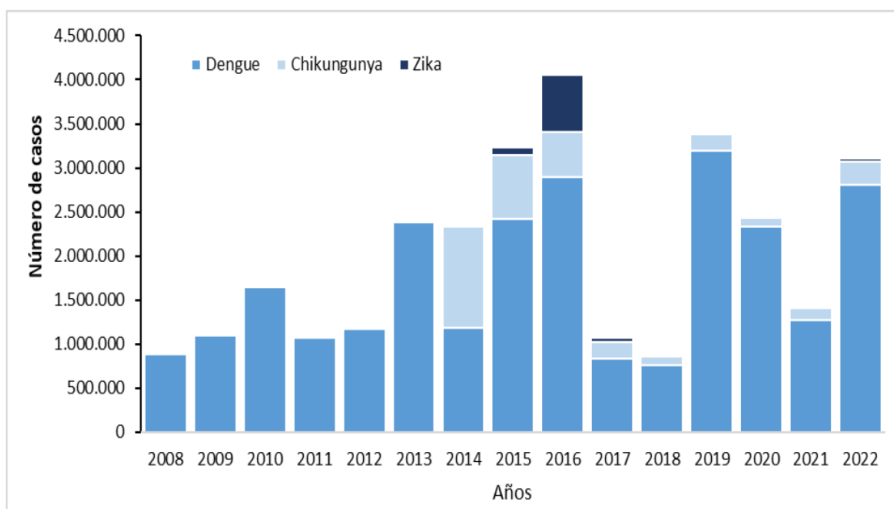


**Figura 5.** Distribución mundial del dengue 2020-2021 (48).

Los análisis filogenéticos actuales basados en el gen de la Envoltura confirman la existencia de cuatro genotipos en el Serotipo 3 del virus dengue: Genotipo I, de Indonesia, Malasia, Filipinas y las Islas de sudeste del Pacífico; Genotipo II, de Tailandia, Vietnam y Bangladesh; Genotipo III de Sri Lanka, India, África y Samoa y Genotipo IV de Puerto Rico, América Latina y Central y la cepa de Tahití de 1965 (49). Otros autores plantean la existencia del Genotipo V de Dengue 3, con cepas de Asia y algunos representantes de Brasil y Colombia (50, 51).

Después de 17 años de ausencia de Dengue 3, el Genotipo III reapareció en América Latina en 1994 durante los brotes en Nicaragua y Panamá. Los estudios filogenéticos realizados mostraron que el virus aislado tuvo su origen en Asia, relacionándose genéticamente con aislados en la India y Sri Lanka en los años ochenta y por tanto difiere del que circuló previamente en la región durante los años 1963-1977. Este nuevo taxón se propagó rápidamente a América Central y el Caribe entre 1995-2001, incluyendo Puerto Rico en 1998. En el 2000, apareció simultáneamente en Brasil,

Ecuador, Venezuela y Perú y después se dispersó a Paraguay, Argentina y Bolivia entre 2002 y 2007 **(52)**. En 2019 se notificó el mayor número de casos de dengue históricamente registrado hasta ese momento, con más de 3,1 millones de casos, incluyendo 28.203 casos graves y 1.773 fallecidos **(53)**. En 2022, entre la semana epidemiológica (SE) 1 y la 52, se notificaron 2.811.433 casos de dengue y se consideró que fue el tercer año de mayor registro en el número de casos de dengue, solo superado por los años 2016 y 2019 **(53)(Figura 6)**. El año 2022 inició con una alta transmisión de dengue, alcanzando su punto máximo en la SE 18.



**Figura 6.** Distribución de casos de dengue, chikunguña y Zika por año de notificación. Región de las Américas, 2008-2022 (hasta la SE 52 de 2022) **(53)**.

En la SE 40 del 2022, el mayor número de casos de dengue en la región lo reportaron Brasil con 2,182,229 casos (87.3%), Nicaragua con 63,857 casos (2.6%), Perú con 59,950 casos (2.4%), Colombia con 50,688 casos (2.0%), y México con 36,926 casos (1.5%) con la circulación de los cuatro serotipos, aunque en el 2021 estuvieron presente en la región los cuatro serotipos hubo predominio de Dengue 1 y 2.

### III.7.1 Dengue en Cuba

Las primeras referencias de dengue en Cuba se remontan al siglo XVIII, cuando en el poblado de Remedios, en la provincia de Santa Clara en 1782 aparece un brote que clínicamente se notificó como dengue. En 1828 se documentó la primera descripción de dengue en la isla. Varios elementos clínicos se incluyen en este informe como la teoría miasmática para explicar las causas.

En 1897 ocurre un brote en La Habana, documentado por M.Delfín y T.V.Coronado. En esta epidemia se reconocen pacientes con manifestaciones hemorrágicas. En 1941, Pittaluga notifica un brote en la ciudad de La Habana, que fue el último de la enfermedad en Cuba hasta el año

1977. En marzo de 1977 en Jamaica se comienza a registrar casos de dengue, cifras que ascendieron en poco tiempo a 60 000. Se reconoció el Dengue 1 como agente causal y los elevados índices del vector, así como el incremento de las relaciones comerciales entre los países de área favorecieron la propagación del serotipo en el Caribe. En julio y agosto de 1977 se detectan los primeros casos de este serotipo en Cuba, en las provincias de Santiago de Cuba y Guantánamo, extendiéndose posteriormente al resto del país. El cuadro clínico que predominó fue el de dengue clásico.

En 1980, se mantenía en circulación Dengue 1 en la región de las Américas con informes de Dengue 2 (genotipo americano). Las últimas noticias de circulación de Dengue 3 se registraron en Colombia y Puerto Rico en 1977, lo que coincidió con la entrada de Dengue 1 en la región. En el mes de mayo de 1981 se reportaron casos de dengue en las tres regiones del país con un total de 344 303 casos, de ellos 116 151 hospitalizados y 58 fallecidos. Se identificó el Serotipo 2 como agente causal de la epidemia de dengue hemorrágico, la primera ocurrida fuera del Sudeste Asiático y Pacífico Occidental **(54)**. Controlada la epidemia se estableció un sistema de vigilancia que permitió al país prácticamente libre de *Aedes aegypti* y consecuentemente de dengue **(55)**. En 1997 se reporta un brote de virus Dengue 2 en el municipio de Santiago de Cuba (genotipo americano- asiático) identificado mediante métodos virológicos y moleculares, tanto en muestras de sueros de pacientes de FD y FHD como en las vísceras de los fallecidos **(56)**.

En 2001-2002 se reporta una nueva epidemia de dengue hemorrágico (DH), causada por el virus Dengue 3, que afectó principalmente la Ciudad de la Habana. Esta epidemia que comenzó en junio de 2001, fue precedida por un pequeño brote por causado por los virus Dengue 3 y 4 en cuatro áreas de salud de los municipios Boyeros, Playa y La Lisa a finales del 2000 **(57, 58)**. Entre los años 2002 al 2013 se mantuvo una intensa vigilancia de dengue con búsqueda activa de casos sospechosos a nivel de la atención primaria de salud. El incremento del dengue en la región de las Américas, el arribo de personas procedentes de áreas endémicas en este periodo y los factores condicionantes del aumento de los índices de infestación del vector, condujeron a un incremento del riesgo de introducción y transmisión viral.

En 2006 se notificó una epidemia por Dengue 3 y Dengue 4 que afectó a varias provincias del país. Con posterioridad, del 2009 a la fecha, los brotes han sido causados por más de un serotipo y no han podido ser controlados tendiendo a la endemidad.

En el año 2022 circularon los cuatro serotipos en el país. El Dengue 3 predominó detectándose en el 78.2 % de las muestras estudiadas con identificación del linaje Americano II, seguido de Dengue 2 (12 %), aunque hubo diferencias entre las provincias. En las provincias de Pinar del Río, Matanzas, Sancti Spiritus y Holguín se detectaron tres serotipos y en Camagüey, La Habana,

Granma y Santiago de Cuba los cuatro serotipos (**Fuente: Base de Datos LNR Arbovirus, IPK, 2022**).

### III.8 Secuenciación de genomas virales

Los virus representan la mayor fuente de diversidad biológica en la Tierra, y con el empleo de las tecnologías de secuenciación, se dan pasos sólidos en la caracterización genómica de esta diversidad. Las secuencias génicas desempeñan un papel fundamental en la comprensión de la evolución viral, la epidemiología de las enfermedades, la vigilancia y el diagnóstico **(59)**. La aparición de agentes virales procedentes de reservorios zoonóticos ha impulsado la investigación en ecología y el descubrimiento de nuevos virus, necesarios para la predicción de pandemias **(60)**. El método de secuenciación de Sanger desarrollado en 1977 constituyó un avance tecnológico en la obtención de genomas para estudios moleculares. Se basa en la incorporación selectiva de terminadores dideoxinucleótidos durante la reacción de secuenciación del ADN viral. Aunque este ha sido el método de secuenciación más utilizado, con sus ventajas en cuanto a menor costo de cada reacción y simplicidad **(61)**. La secuenciación de nueva generación (NGS) se ha convertido en una herramienta para los estudios epidemiológicos. Debido a su impacto en la salud humana, la tecnología NGS se aplica ampliamente a los virus, desde la secuenciación del genoma viral hasta la metagenómica del viroma, pasando por la filogenómica, el seguimiento de la propagación de los virus, el análisis de variabilidad del genoma viral dentro del huésped (cuasiespecies), la detección de la resistencia a los fármacos antivirales y el desarrollo de terapias **(62)**. Estos métodos han revolucionado muchos aspectos de la genómica y están sustituyendo la estrategia convencional de secuenciación de Sanger para muchas aplicaciones, ya que ofrecen una producción de datos muy superior a un coste razonable **(63)**. La primera tecnología de secuenciación de alto rendimiento de nueva generación, la plataforma de pirosecuenciación 454 FLX desarrollada por 454 Life Sciences y posteriormente adquirida por Roche, estuvo disponible en 2005. A principios de 2007 Illumina lanzó el Genome Analyzer desarrollado por Solexa y, más tarde, Applied Biosystems lanzó SOLiD. Este campo se encuentra en rápida expansión y continuamente se desarrollan nuevas plataformas como Heliscope de Helicos, Ion Torrent PGM de Life Technologies y una plataforma de secuenciación en tiempo real de Pacific Biosciences **(22)**. Según la tecnología de secuenciación, las plataformas pueden agruparse en secuenciación por hibridación y síntesis (SBS). Actualmente, el enfoque SSB es el más utilizado por Illumina, el principal actor en esta modalidad. Los principales fabricantes son Pacific Biosciences y Oxford Nanopore. La plataforma de Pacific Biosciences se basa en enfoque de secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT) **(64)**. Los

secuenciadores de Oxford Nanopore (el MinION portátil, el GridION de sobremesa y el PromethION de alto rendimiento) utilizan secuenciación basada en nanoporos de proteínas. El principal cuello de botella de la NGS es la necesidad de herramientas bioinformáticas con gran capacidad de almacenamiento y potencia de cálculo para interpretar los datos. Entre los distintos enfoques y plataformas, el secuenciador MinION es el más citado.

### III.9 Genética evolutiva

Los genes son segmentos de ADN que codifican para un tipo particular de ARN. Pueden ser estructurales o funcionales si se traducen a proteínas o a ARN de diversa naturaleza (65). La alta diversidad genética resulta fundamentalmente de los errores de la enzima ARN polimerasa en los procesos de replicación viral. La mutación más común que se introduce al copiar secuencias de ADN o ARN es la sustitución de una base por otras en un lugar determinado del genoma. La sustitución de bases que involucra el reemplazo de una purina por otra o una pirimidina por otra se denomina transición; mientras que un intercambio de estas (purina x pirimidina) se denomina transversión. A menudo se observa que las transiciones ocurren con más frecuencia, quizás porque la estructura química de la molécula cambia menos en una transición que en una transversión. Otras mutaciones que pueden observarse incluyen la delección de bases, inserción e inversión de secuencias. Este tipo de modificación suele observarse con menos frecuencia debido a que tienen un efecto dramático en la estructura de las proteínas (66). En 1859, veinte años después regresar de su viaje a bordo del *Beagle*, Charles Darwin publicó *El origen de las especies*, donde formulaba detalladamente la teoría de la evolución. Esta propone que ciertos cambios espontáneos generan una variabilidad entre los organismos que puede heredarse (67). Las mutaciones del ADN son la fuerza productora de variabilidad sobre la que actúa la selección natural. Aunque se considera un proceso aleatorio, está influenciado por una amplia variedad de factores, como el modo de vida de los organismos, el tiempo de generación, o la tasa metabólica. Las mutaciones generan múltiples variantes genéticas en la población, y la existencia de esa variabilidad se denomina polimorfismo (66). Actualmente, la evolución no es más que la fijación consecutiva de mutaciones: surge una mutación, se mantiene como un polimorfismo y eventualmente se fija.

#### III.9.2 Aspectos relacionados con la evolución del virus dengue

El genoma de organismos patógenos posee un orden específico de nucleótidos que contiene no solo la información sobre la síntesis y expresión de proteínas, necesarios para el crecimiento y



supervivencia, sino también sobre su evolución. El cambio en el orden específico de sus nucleótidos puede originar nuevas cepas/especies que pueden ser más virulentas que sus progenitoras **(68)**.

El análisis comparativo de las secuencias del virus del dengue selvático y endémico ha proporcionado importantes conocimientos sobre la evolución viral. En los Serotipos 1, 2 y 4 la evolución y epidemiología de los linajes selvático y endémico sigue siendo distinta. Las pruebas filogenéticas han revelado que los serotipos endémicos 1, 2 y 4 no surgieron de un único ancestro, sino de ciclos selváticos independientes. No se dispone de datos sobre secuencias de dengue 3 selvático, pero este serotipo se cree que evolucionó desde distintos ancestros selváticos **(69)**. Debido a la relativa baja fidelidad de las ARN polimerasas dependientes de ARN, se estima que el número de errores de replicación del virus del dengue es de una mutación por cada ronda de replicación del genoma completo **(79)**. Los errores causados por estas enzimas conducen a la acumulación de diferentes genomas en los hospederos vertebrados, que dan lugar a una población con variación genética (cuasi-especies) **(70)**.

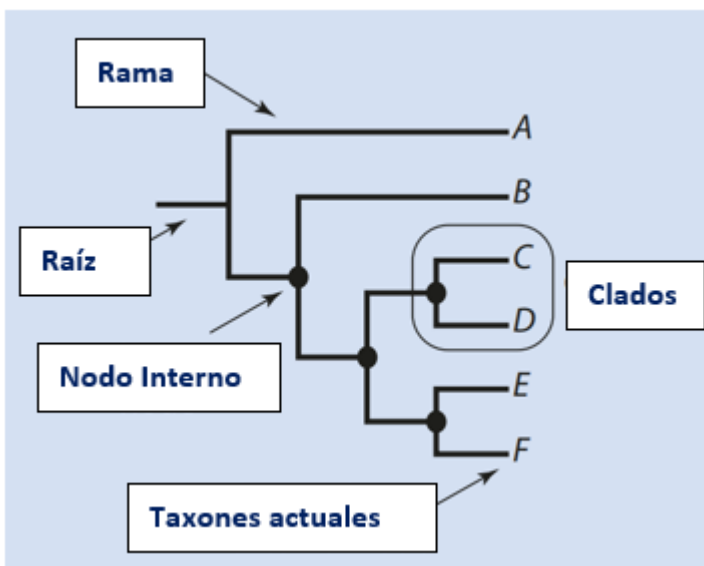
### **III 10. Implicaciones clínicas de la variabilidad genética del virus del dengue**

Se ha sugerido que existe una relación entre la gravedad de la enfermedad y el serotipo infeccioso, en particular Dengue 2. Sin embargo, esta relación depende de la inmunidad pre-existente, el orden de las infecciones por otro serotipo, y el intervalo de tiempo entre las infecciones y la edad del paciente **(71)**. Por ejemplo, estudios realizados en Tailandia y Cuba muestran que una infección secundaria con el virus Dengue 2 se asocia a una evolución grave de la enfermedad, especialmente si el serotipo durante la infección primaria es Dengue 1. Contrariamente, un estudio cubano demostró que una infección primaria con Dengue 2 no se asocia con mayores tasas de aparición de dengue grave **(72)**. En cuanto a la patogénesis, el genotipo Americano-Asiático se asocia con una mayor severidad comparado con el genotipo Americano en países de América del Sur **(73)**.

#### **III.11 Filogenética**

La vigilancia genómica y epidemiológica se ha convertido en parte integral de la respuesta a epidemias emergentes. Los avances en la secuenciación de alto rendimiento son paralelos a los continuos avances en la metodología para inferir historias evolutivas (dinámica y patrones) e identificar los factores que impulsan la propagación viral en tiempo y espacio. La filogenética es el estudio de las relaciones evolutivas entre grupos de organismos o genes de acuerdo a su nivel de

ancestralidad. Generalmente se presenta como diagramas de ramificación en forma de árbol en la cual, los taxones que se encuentran en la misma rama están más estrechamente relacionados entre sí que los taxones que se encuentran en ramas diferentes. Los árboles filogenéticos generados tienen dos componentes principales: las relaciones de parentesco (topología del árbol) y la cantidad de cambios acumulados en cada rama (longitudes de la rama) (74). Las ramas terminales (hojas) corresponden a las secuencias actuales (Taxones existentes) y a menudo se denominan unidades taxonómicas operativas (OTU) del inglés operational taxonomic units y las ramas internas representan sus ancestros hipotéticos. Los nodos relacionan estas ramas entre sí según su relación ancestro-descendiente. Un grupo de taxones que comparten la misma rama tiene un origen monofilético y se denomina agrupamiento, grupo o conjunto, del inglés cluster. La rama más interna, el ancestro común, representa la raíz del árbol y es esencial para dotar al árbol de un sentido histórico (66)(Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de un árbol filogenético (64).

Exactamente cuan relacionadas están las ramas y los nodos en un árbol depende de la escala del árbol y como está enraizado. Si las secuencias son demasiado divergentes, la resolución filogenética será menor, incluso secuencias muy distintas pueden agruparse porque sus diferencias son relativamente pequeñas comparadas con las demás secuencias del árbol. Los árboles filogenéticos no se observan, sino que se infieren a partir de secuencias u otro dato (64).

### III.11.1 Inferencia Filogenética

Para investigar la filogenética, pueden utilizarse diferentes tipos de datos; por ejemplo, las características morfológicas, los fragmentos de restricciones polimórficas, las secuencias

nucleotídicas o aminoacídicas, entre otros. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos constituyen en la actualidad los datos más abundantes y confiables, así como unidades estrictamente heredables y sin ambigüedad. Las diferencias entre un par de secuencias (mismo gen) de diferentes organismos refleja el tiempo de divergencia de las mismas a partir de un ancestro común.

Los métodos de reconstrucción filogenética se clasifican en dos categorías: de acuerdo al tipo de datos a utilizar en métodos de distancia y de caracteres discretos; y de acuerdo con el algoritmo de construcción del árbol: algoritmos de agrupamientos o de criterio óptimo (**Tabla 2**). Por lo general, en el caso del método de distancia, el mejor árbol se construye por agrupamiento, mientras que los basados en caracteres aplican un criterio óptimo para elegir el mejor árbol o árboles entre todas las topologías posibles (**66**).

**Tabla 2.** Clasificación de los métodos de inferencia filogenética de acuerdo al tipo de datos y algoritmo de construcción del árbol (66).

Tipos de datos que utilizan	Algoritmo de construcción del árbol	
	Criterio óptimo	Agrupamiento
Caracteres discretos	Máxima verosimilitud* (ML) Máxima parsimonia (MP) Inferencia Bayesiana	
Matriz de distancias	Fitch–Margoliash	UPGMA** Neighbor-joining (NJ)

\*ML del inglés Maximum likelihood, \*\*UPGMA del inglés unweighted pair group method with arithmetic means.

El algoritmo de Grupos de Pares no Ponderados con Medias aritméticas (UPGA) y el de Unión de vecinos (NJ) son métodos de distancias bien conocidos para la reconstrucción de filogenias (75). A diferencia de los métodos de distancia, que convierten todas las diferencias genéticas en distancia entre pares, los enfoques discretos actúan directamente sobre las propias secuencias, evitando así la pérdida de información que resulta de utilizar únicamente distancias. Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana son algoritmos que emplean caracteres discretos. La Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana utilizan modelos de sustitución de nucleótidos, mientras que Máxima Parsimonia no tiene un modelo explícito y sus suposiciones son implícitas (**76**). Los algoritmos más empleados en la inferencia filogenética de los serotipos de dengue

incluyen: el algoritmo de agrupamiento Neighbour joining, de Máxima Verosimilitud y el algoritmo de Inferencia Bayesiana.

### III.11 .2 Inferencia Bayesiana y Filodinámica

La inferencia bayesiana es una metodología general de inferencia estadística. Antes del análisis de los datos, se asignan a los parámetros una distribución a priori, que se combina con los datos (o verosimilitud) para generar la distribución a posteriori. Todas las inferencias relativas a los parámetros se basan entonces en la distribución posterior **(77)**. El algoritmo de inferencia bayesiana considera cada carácter de las secuencias en el cálculo de la probabilidad posterior de cada árbol. Depende de la especificación de una distribución de probabilidad anterior para cada parámetro en un modelo de sustitución, longitud de las ramas y topología del árbol. Buscan un conjunto de árboles o hipótesis plausibles para los datos a través de la distribución de probabilidad de los árboles. Esta distribución posterior de los árboles tiene inherentemente una estimación de confianza de cualquier relación de evolución **(78)**. Las probabilidades posteriores se obtienen explorando el espacio arbóreo mediante el uso de una técnica de muestreo llamada cadena de Markov Monte Carlo (MCMC).

La diversidad genética de los patógenos está determinada por la evolución a múltiples escalas (dentro de los huéspedes individuales, a nivel de una epidemia entre huéspedes infectados etc.) La importancia de la evolución de patógenos en contacto con los hospedadores fue destacada por Grenfell y col **(8)** que introdujo el término de filodinámica para referirse al estudio de la evolución de los patógenos que se originan de la interacción con el sistema inmune y la dinámica epidemiológica entre hospedadores **(79)**. Los métodos filogenéticos también proporcionan información en cuanto a la evolución tanto de las características genotípicas como fenotípicas. Aunque están limitados a ciertas áreas, como la restricción del análisis a solo la población infectada, un subconjunto significativo de estas limitaciones puede superarse mediante el uso complementario de datos de vigilancia (monitoreo de enfermedades). La filodinámica combina la biología evolutiva y la epidemiología para generar evidencias sobre la propagación y el origen de los patógenos, que de otro modo son inaccesibles con el análisis epidemiológico tradicional **(80)**.

La filodinámica se basa en la inferencia filogenética como herramienta analítica básica para comprender procesos evolutivos y epidémicos, a partir de las mutaciones que se acumulan en el genoma de patógenos durante la propagación de las epidemias **(81)**. Estas mutaciones pueden conferir diferencias fenotípicas que permitan a los virus infectar distintos tipos de células, evadir la respuesta inmune o transmitirse por rutas, huéspedes o vectores diferentes, pero también constituye

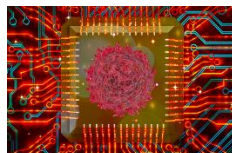
la huella molecular de procesos epidemiológicos que de otro modo no podrían observarse directamente **(82)**.

Los métodos filodinámicos pueden inferir las tasas de movimiento de los linajes entre ubicaciones geográficas y reconstruir las ubicaciones de los linajes ancestrales. La filogeografía estudia la evolución y el proceso de dispersión que ha dado lugar a la distribución espacial observada en las poblaciones o taxones. Los métodos filogeográficos pueden dividirse en dos enfoques: el primero realiza un análisis posterior a la reconstrucción del árbol para responder a las preguntas de localización geográfica; el segundo, estima conjuntamente la filogenia y los parámetros filogeográficos de interés. El resultado final es una tasa, medida en términos de años o en términos de sustituciones nucleotídicas por sitio, donde un linaje de una región se mueve a otra región sobre el curso del árbol filogenético. La validez de una ruta de transmisión o dispersión geográfica se determinan por el valor del factor de Bayes (BF) **(83, 84)**.

Las filogenias reconstruidas a partir de datos de secuencias virales y las anotaciones en el árbol constituyen el núcleo de muchos estudios evolutivos y epidemiológicos que implican, bases de datos, aplicaciones de filogenómica y filodinámica **(85)**. Los modelos epidemiológicos desempeñan un papel fundamental a la hora de decidir qué medidas de control de la enfermedad se adoptan para evitar o detener los brotes virales. Los efectos del aislamiento, la vacunación y otras medidas se estiman mediante simulaciones de modelos, que sirven de base para decidir qué políticas de salud aplicar y que medidas tomar. Sin embargo, el conocimiento de la historia filogenética de los brotes virales es vital para reconstruir las vías de transmisión, lo que contribuye a una gestión eficaz y mejores esfuerzos de prevención.

## **IV MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

#### IV.1 Diseño General de la investigación

Se realizó un estudio analítico, de corte transversal para determinar las relaciones filogenéticas, comportamiento espacio-temporal y carácter evolutivo de las secuencias genéticas de virus Dengue 3 obtenidas a partir de sueros de pacientes cubanos diagnosticados en el 2022.

#### IV.2 Universo de estudio

El universo de estudio estuvo conformado por 25 secuencias (posiciones 1-1479 del gen E) de virus Dengue 3 obtenidas de pacientes con una infección confirmada por este serotipo en 2022. El resto de las secuencias empleadas se obtuvieron de la base de datos GenBank del NCBI con dirección web (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Cada secuencia en el estudio posee su código de identificación, país de procedencia y el año de la muestra clínica o aislamiento correspondiente. Para su selección se tuvo en cuenta la historia epidemiológica del virus Dengue 3, incorporando secuencias de las regiones geográficas donde ocurrieron los principales brotes con énfasis en la región de América Latina. En el **Anexo I** (Tabla suplementaria I) se detalla la composición por países y año.

#### IV .3 Alineamiento de secuencias

Las 128 secuencias de Dengue 3 se alinearon con el algoritmo Mafft 7(Múltiple Alignment using Fast Fourier Transform) y protocolo L-INS-i ,eligiendo las matrices correspondientes en el software Phylosuite v 1.2.3 (86). Se editaron los alineamientos con la opción trimAl eliminando las regiones con espacios en blanco o gaps que pudieran ocasionar ruidos con precaución de no romper el marco abierto de lectura.

#### IV .4 Evaluación de la saturación y la señal filogenética

Se estimó el modelo de sustitución nucleotídica del alineamiento con el software PhyloSuite ver 1.2.3, en la opción ModelFinder (87), atendiendo al Criterio de información de Akaike corregido (AIC<sub>c</sub>).La determinación de la saturación en el alineamiento incluyó el método gráfico y el test de Xia y col (88) en el software Dambe ver 7.0 (89). El método gráfico permitió obtener las curvas de tasas de transiciones y transversiones contra la distancia genética, estimada empleando el modelo

de sustitución identificado en PhyloSuite 1.2.3. Para el test de Xia se generaron los análisis asumiendo dos tipos extremos de topología (simétrica y no asimétrica), comparando los índices de saturación en el alineamiento con el índice de saturación crítica, a un nivel de significación de 0,05. La señal filogenética se determinó mediante estudios de mapeo de verosimilitud utilizando el programa Tree Puzzle ver 5.3 con el algoritmo Quartet Puzzling **(90)**.

### IV.5 Inferencia filogenética y filodinámica

Las inferencias filogenéticas y filodinámicas se ejecutaron con los métodos bayesianos por el programa BEAST ver 1.10 **(91)**. Se generó el fichero de extensión XML de entrada al programa BEAST a través del software BEAUti (del inglés ,Bayesian Evolutionary Analysis Utility), que se incluye en el paquete de dicho programa **(92)**. Los cálculos de (log) verosimilitud marginal se realizaron a través del método de path sampling (PS) descrito por Baele y col **(93)** con 1000 réplicas en cada paso de estimación. Se empleó como modelo de reloj molecular uno relajado, con distribución exponencial no correlacionada (UCED) combinado con el modelo de coalescencia no paramétrico Bayesian Skyride **(94)**. Se seleccionó este modelo porque no asume *a priori una* tasa de mutación fija ni escenario demográfico particular. Se configuró para una corrida de las cadenas de Markov y Montecarlo (MCMC) del enfoque bayesiano, con 400 millones de generaciones para lograr convergencia en los resultados y obtener un tamaño efectivo de la muestra superior a 200 en los parámetros de interés. Se combinó además como “burn-in el 10%, mediante el programa Tracer v 1.7.1 **(95)**. La distribución posterior de los árboles y la selección del árbol de mayor credibilidad, del inglés Maximun Clade Credidibity (MCC), se analizó por el programa Tree Annotator v1.8.4. Los árboles se visualizaron en la plataforma iTOL ver 6 (del inglés Iteractive Tree of Life **(96)**. Las tasas de sustituciones por año y el tiempo de ancestro común más reciente, del inglés Most recent common ancestor (TMRCA), así como la reconstrucción de la población viral y la dinámica espacio-temporal sin grupo externo, con el BSP, se estimó igualmente en el BEAST ver 1.10. Los genotipos analizados se clasificaron de acuerdo a la Plataforma de Genotipage de Flavivirus (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/flavivirus>) **(Anexo 11. Tabla suplementaria 7)**.

Para los estudios filogeográficos se empleó la misma configuración que para la inferencia filogenética (modelo reloj molecular, sustitución nucleotídica, modelo coalescente y configuración de prioris) incluyendo las localizaciones geográficas de cada secuencia analizada. Se utilizó un modelo de difusión discreta donde los estados fueron los países usando una cadena de Markov continua tipo estándar. Para la identificación de la ruta de propagación del virus se utilizó el método de selección de variables por búsqueda estocástica bayesiana, del inglés Bayesian Stochastic



Search Variable Selection (BSSVS). Los resultados de los análisis filogeográficos se visualizaron con Spread 4 (97). Se realizó la prueba del Factor de Bayes (FB) para obtener los datos estadísticos necesarios que explicarán los procesos filogeográficos y se tomaron como significativos aquellos valores mayores que tres ( $BF > 3$ ).

### IV .6 Análisis de Presiones evolutivas

Se evaluó la existencia de sitios sujetos a selección positiva (tanto episódica como dominante) y negativa en el sitio web DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>) perteneciente al paquete HyPhy, y por inferencia bayesiana a través del programa BEAST ver 1.10. Para la determinación de eventos episódicos de selección se empleó MEME (Modelo de Evolución de Efectos Mixtos) (98). Se dedujeron dos clases de tasa  $\omega$  por sitio, y las correspondientes (la proporción de ramas que evolucionan bajo esa clase de tasa). Las dos clases de tasas se dedujeron mediante un único valor  $dS$  ( $\alpha$ ) y dos valores  $dN$  separados ( $\beta^-$  y  $\beta^+$ ) por sitio. En el modelo nulo,  $\beta^-$  y  $\beta^+$  se restringieron a ser menores o iguales que  $\alpha$ , pero en el modelo alternativo  $\beta^+$  no estaba limitado. Si  $\beta^+ > \alpha$  en un lugar, y era significativo mediante la prueba de la razón de verosimilitud, se inferirá una selección positiva para ese lugar. Para la selección dominante, tanto positiva como negativa se emplearon dos métodos: la inferencia bayesiana mediante MCMC en BEAST (como parte de la inferencia filogenética y filodinámica) y mediante el método FUBAR (del inglés, Fast Unconstrained Bayesian AppRoximation) disponible en DataMonkey.

### IV .7 Análisis estructural -funcional de la proteína de Envoltura.

Para la caracterización estructural se realizó el análisis mutacional con el empleo de la secuencia Panamá 1994(DQ341209). Como estructura de referencia se empleó la obtenida por cristalografía y difracción de rayos x de alta resolución con código **1UZG** disponible en la base de datos de estructuras RCSB PDB(<http://www.rcsb.org/>) para la localización de los cambios aminoacídicos detectados en los dominios. Las localizaciones de los residuos mutados en la cadena polipeptídica, en motivos de estructura secundaria, se determinaron en el servidor PDBSum (99). (<https://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/pdbsum/>). Se representaron en la estructura obtenida, los sitios donde se observaron las mutaciones en el software Discovery Studio ver 24 13.4

### IV.7.1 Sitios de inmunidad a linfocitos B.

Para identificar que regiones de la estructura de la proteína de envoltura se consideran epítomos conformacionales a linfocitos B se empleó el servidor SEMA 2.0 **(100)**. Este enfoque tiene en cuenta la disposición espacial del antígeno diana, así como su secuencia primaria, lo que permite la predicción de epítomos conformacionales de células B teniendo en cuenta los estados conformacionales y multiméricos del antígeno. Se estableció un valor de corte (threshold) de 0.5 en la clasificación de las regiones y el método SEMA 3D.

### Aspectos éticos de la investigación

Las normas éticas para realizar estudios biomédicos en sujetos humanos han sido desarrolladas y establecidas por Guías Internacionales, entre las que se incluyen la Declaración de Helsinki, las Guías Éticas Internacionales para estudios biomédicos en sujetos humanos: CIOMS (del inglés, Council for International Organizations of Medical Sciences). La presente investigación se conducirá según las normas mencionadas.

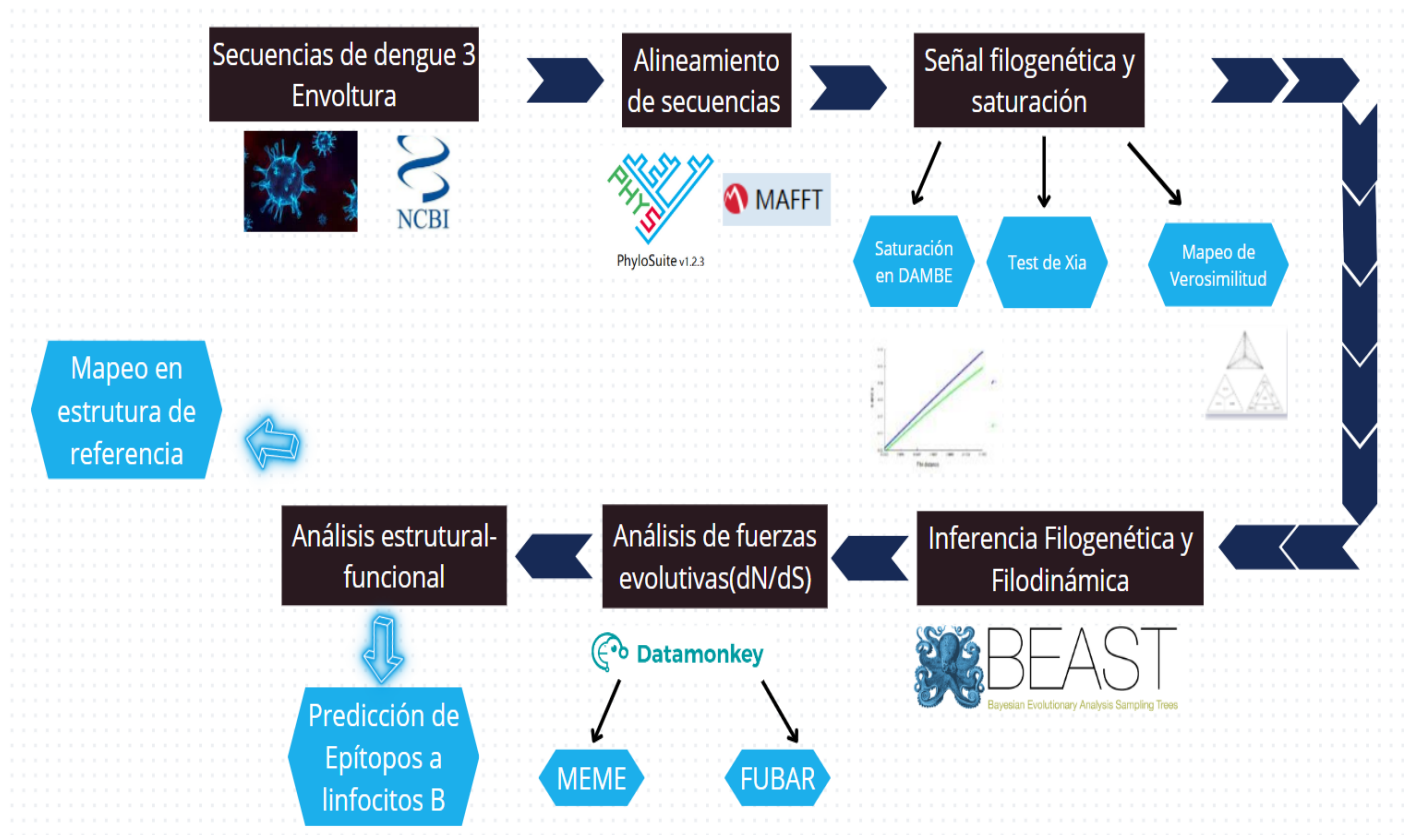
El Subcomité para la Seguridad de Laboratorio en Arbovirus (SALS), perteneciente al Comité Americano sobre Arbovirus (ACAV) incluye a los virus del dengue en el Grupo de Riesgo 2. Se siguieron las pautas referidas a la manipulación estricta establecidas por la Resolución 38/2006 de la Comisión Nacional de Seguridad Biológica para el manejo y manipulación de las muestras biológicas, así como la adherencia estricta a las recomendaciones del Nivel de Bioseguridad 2 (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC-NIH, 4th ed. 1999).

Una vez culminada la investigación, se conservará en formato digital e impresa. Los resultados se informarán a las instancias pertinentes del MINSAP, así como su publicación en revistas de alto impacto. Esta investigación pertenece al proyecto: Estudio de arbovirus con implicaciones en la clínica, el diagnóstico, la epidemiología y la patogenia de la enfermedad, jefe del Proyecto: Dr.Cs María G. Guzmán código del proyecto 2105013.

No se emplearon los datos individuales de los pacientes, solo se utilizaron las muestras clínicas colectadas como parte de la vigilancia nacional del laboratorio de Arbovirus para la determinación de los genotipos de dengue circulantes en el país durante el 2022.

## Diagrama de flujo en la investigación

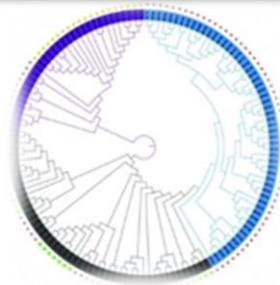
Para una mejor comprensión se muestra un diagrama de flujo que resume la estrategia seguida en cada etapa.



**Figura 8.** Diagrama de flujo de la investigación.

## **V RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



### CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El dengue es la enfermedad vírica transmitida por mosquitos más importante que afecta a los humanos. La mitad de la población mundial vive en zonas de riesgo de dengue, lo que supone unos 390 millones de infecciones al año en todo el mundo. Es endémico en 100 países; el sudeste asiático es la región más gravemente afectada, seguida del Pacífico occidental y América **(101)**. Es una enfermedad sistémica autoinflamatoria causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue, que sólo comparten entre un 60% y un 75% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Estudios previos muestran que estos cuatro serotipos evolucionaron a partir de su ancestro común en nichos ecológicos separados. Cada nicho ecológico era diferente, con una ubicación geográfica específica, poblaciones de primates hospedadores distintas y diferentes especies de vectores **(51)**.

Basándose en la diversidad genómica, los serotipos del complejo dengue se clasifican en varios genotipos, que fueron designados a finales de 1990 y principios del 2000, basados en secuencias genéticas parciales. Dengue 3 se divide a su vez en los genotipos del 1 al 5 siendo la mayoría de las infecciones causadas por los genotipos 1 y 3 en las regiones de las Américas, el Sudeste Asiático, África oriental y el Pacífico Sur **(102)**. De acuerdo al nuevo sistema de clasificación genotípica propuesto por Hill y col **(103)** el Genotipo III a su vez se divide en linajes mayores y menores: 3III\_A (A.1y A.2), 3III\_B (B.1,B.2 y B.3) y 3III\_C( C.1 y C.2). Los linajes mayores se asignan usando letras del alfabeto romano y responden a escalas regionales, mientras que los linajes menores se designan por números y proporcionan una escala más resolutive; similar a lo descrito para SARS-CoV-2.

Las enfermedades virales transmitidas por vectores, y en particular el dengue, constituyen hoy uno de los principales retos de salud a nivel mundial. A pesar de contar con un fuerte sistema de vigilancia y control vectorial, los factores ambientales que favorecen la cría del vector, hacen que el dengue constituya un riesgo constante. Comprender la evolución del virus del dengue ofrece valiosas oportunidades para mejorar la vigilancia y la respuesta a las epidemias, gracias a los avances en la secuenciación de virus ARN, la bioinformática, la filogenética y otros métodos de biología computacional.

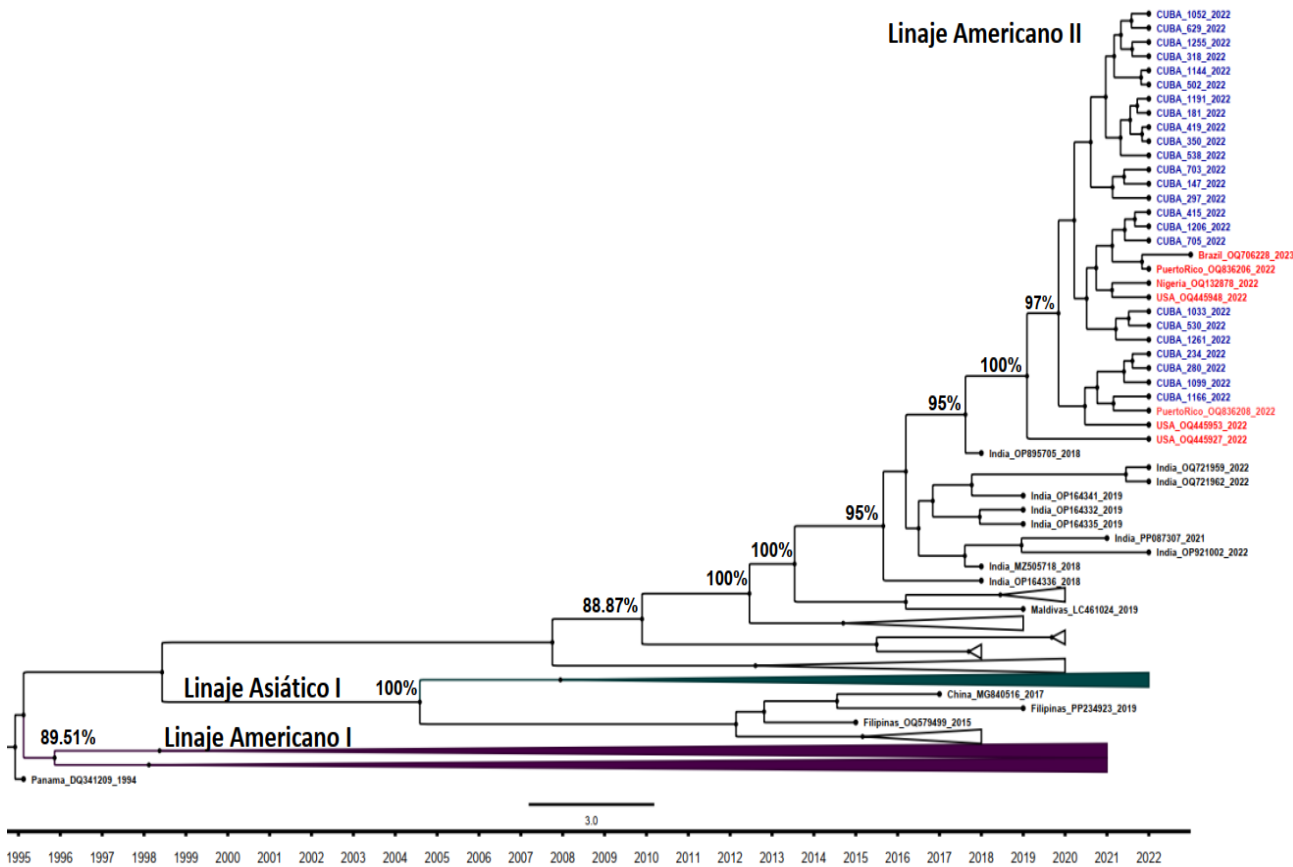
#### V.1 Caracterización filogenética y filodinámica de Dengue 3

El modelo de evolución que mejor se ajusta a los datos se determinó en la herramienta ModelFinder del software Phylosuite 1.2.3. Estos corrigen la diferencia entre la distancia esperada y la

observada, constituyendo un requisito determinante en los análisis filogenéticos. La **Tabla suplementaria II (Anexo 2)** muestra los modelos evolutivos ordenados de acuerdo al Criterio de información de Akaike (AIC), el corregido (AICc) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC).

De acuerdo al AICc, el modelo TIM2+F+G4 (del inglés, **Time Reversible Model**) es el que mejor se ajusta a la información genética de los datos. En el alineamiento de secuencias de la región que corresponde al gen Envoltura se evaluó el nivel de saturación a través de la representación gráfica de las transiciones -transversiones vs distancia génica, en las tres posiciones de los codones con el empleo del modelo evolutivo. En la gráfica, se observa que las transiciones (s, puntos azules) ocurren con más frecuencia que las transversiones (v, puntos verdes) sin intercepción de ambos comportamientos, lo que sugiere la no existencia de saturación (**Anexo 3. Figura suplementaria I**). El test de Xia, que compara el índice de saturación (Iss) de las secuencias con el Iss.c a un valor de  $-p$ , tanto para una topología simétrica como asimétrica, mostró diferencias significativas, por lo que, estadísticamente se comprueba que no existe saturación (**Anexo 3. Tabla suplementaria 3**).

La determinación de la señal filogenética fue realizada a través de mapeos de Verosimilitud, las que se muestran en el diagrama en dos triángulos equiláteros (**Anexo 3. Figura suplementaria 2**). El segundo triángulo está dividido en siete áreas que soportan diferente información evolutiva: los vértices implican los cuartetos totalmente resueltos, mientras que en el centro se representa los cuartetos sin resolver. Los porcentajes de cuartetos sin resolver (8.7%) implican que el 87 % forma parte de árboles filogenéticos resueltos, garantizando que el conjunto de datos de partida, son aptos para la realización de análisis filogenéticos. La **Figura 9** muestra el árbol obtenido por inferencia bayesiana, de las unidades taxonómicas actuales con el empleo de la secuencia de Dengue 3 Panamá 1994 (**DQ341209**) para enraizar el árbol.



**Figura 9.** Árbol obtenido por Inferencia Bayesiana de 128 secuencias de Dengue 3, región de la envoltura (1479 pb). Los valores numéricos en los nodos indican los valores de probabilidad posterior de la inferencia bayesiana superiores al 70 %. La longitud de las ramas indica el tiempo de evolución y la barra inferior el tiempo calendario. Se resaltan en verde (linaje Asiático), en violeta (linaje Americano I) y en azul las 25 secuencias cubanas de estudio. Se resaltan en rojo las secuencias de Brasil, EE. UU, Puerto Rico y Nigeria que pertenecen al mismo clado (Americano II)

Para el Genotipo III del virus Dengue 3 se reconocen dos linajes principales: Americano I que incluye las secuencias de América que circularon entre 1994-2021 y asiático que incluye todas las secuencias circulantes en las regiones de China, India e Indonesia. Las secuencias cubanas de nuestro estudio se agruparon con las ya reportadas de EE. UU y Puerto Rico del 2022, así como Brazil 2023 pertenecientes al linaje circulante en las Américas durante período 2022-2023. Este clúster no es una extensión del linaje Americano I bien establecido en el continente ya que comparte ancestros comunes con las secuencias de las India 2018 y alejados de las secuencias de América (1994-2021), por lo que indican una introducción de este nuevo linaje desde el sur de Asia. En un estudio reciente publicado por Lázaro y col (104) donde se realizó la caracterización filogenética de



4 secuencias de Dengue 3 de São Tomé del Príncipe ,se mostró que se agrupan con cepas circulante en América durante este periodo (identificadas por Naveca como linaje Americano II) y que presenta ancestros cercanos con cepas de la India del año 2018.

En el continente asiático, durante la primera epidemia de dengue en Bangladesh en 2002, se identificó el Dengue 3 como el principal serotipo circulante. Posteriormente, los serotipos 1 y 2 fueron predominantes en la circulación y no se detectaron los serotipos 3 y 4 hasta 2016. La reaparición de Dengue 3 comenzó en 2017 y aumentó repentinamente en 2018 con más intensidad y mayor número de casos que en 2019 **(105)**. En un análisis realizado por Shirin y col en 2018 **(106)** se plantea que si bien Dengue 1 y 2 estuvieron circulando más de una década, una gran parte de la población podría ser inmune, con el riesgo de desarrollar una infección grave por Dengue 3 o 4. El Genotipo I de Dengue 3 fue predominante en 2018 y 2019, a diferencia del Genotipo II que fue prevalente en 2002. En un estudio realizado por Titir y col **(107)** se identificaron dos casos de Dengue 3 (Genotipo III) por primera vez en 2019 y el análisis filogenético sugiere que podría haber sido introducido desde países vecinos, como la India o China.

En 2019 se registró el mayor número de casos de dengue a nivel mundial hasta ese momento. Todas las regiones se vieron afectadas, y por primera vez se registró transmisión de dengue en el Afganistán. En el brote de dengue de 2019 en Bangladesh, se notificaron unos 100.000 casos, lo que supone más del doble de todos los casos notificados en las dos décadas anteriores. Se registró un gran número de casos graves tras la reaparición de Dengue 3 debido a la disminución de la protección cruzada heteróloga de la inmunidad frente a Dengue 2 (es decir, la presencia prolongada de Dengue 2 entre 2003 y 2018) y al fenómeno ADE .En un estudio realizado por Rahim y col **(108)**,en aras de dilucidar la variabilidad genética de los serotipos de dengue circulantes se mostró que las secuencias de Dengue 3 de Bangladesh se agruparon en un clúster con el Genotipo I, reportándose el reemplazamiento del Genotipo II por Genotipo I en 2017 y hasta el 2022. Este genotipo se encuentra exclusivamente en Malasia, Singapur, Indonesia y China. En Malasia se han notificado cambios frecuentes y la circulación conjunta de diversos genotipos de Dengue 3 **(109)**.

En la región de Las Américas, tras la reintroducción del Genotipo III de dengue en 1994, este se ha mantenido como virus circulante asociado a brotes y casos graves por este serotipo. En los estudios realizados por Cerpas y col ,las secuencias de Dengue 3 circulantes en Nicaragua (2022), se identificaron como genotipo III y se agruparon más estrechamente con las identificadas en Puerto Rico (2022), Brasil (2023), Cuba (2023), Estados Unidos (Florida, 2023), e India (2018) pertenecientes al linaje Americano II previamente reportado por Naveca **(110)**. Los estudios de

Jones y col **(111)** identificaron que el genotipo circulante en Florida se agrupa dentro del nuevo linaje americano II identificado recientemente en Arizona, Puerto Rico y Brasil, lo que indica que el linaje se está extendiendo por las Américas.

Respecto a Cuba, estudios realizados durante el periodo 2010-2014, basados en el gen de la Envoltura, de aislamientos a partir de sueros humanos, revelaron una relación filogenética cercana con virus que circularon en Venezuela y Colombia **(112)**, los cuales pertenecen al Linaje americano I previamente descrito.

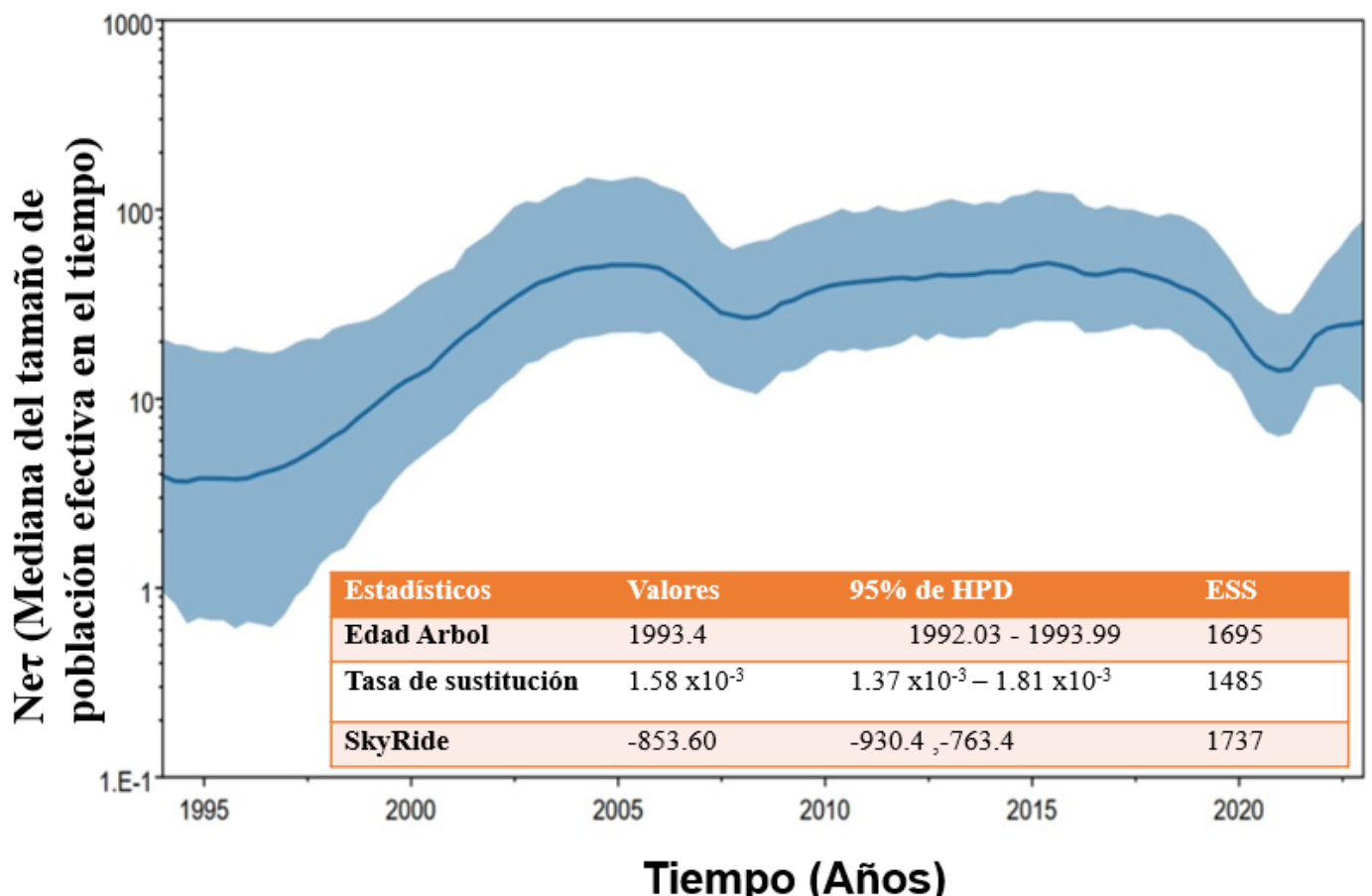
### V.2 Caracterización filodinámica de Dengue 3

Los modelos filodinámicos describen un proceso de diversificación, modelando tanto la evolución de una cadena de transmisión ramificada como el árbol filogenético. Estos modelos son fundamentales para vincular la dinámica epidemiológica a la evolución de un agente patógeno **(113)**. El Genotipo III de Dengue 3 se detectó por primera vez en Sri Lanka y se diseminó a múltiples países a lo largo del tiempo. Tras su propagación inicial, evolucionó hacia dos grupos geográficos distintos: los linajes IIIA (asiático) y IIIB (americano). La propagación del Genotipo IIIB en Las Américas se produjo entre 1990 y 2005; en cambio, la difusión del Genotipo IIIA en Asia se produjo después de 2005 **(114)**. Respecto a la región de las Américas, estudios realizados por Messer y col **(115)**, en el análisis filogenético de 564 secuencias del gen E del genotipo III muestreadas de todo el mundo, reveló que todas las cepas americanas segregan en un clúster monofilético lo que sugiere una única vía de entrada de este genotipo en el continente y concuerda con hallazgos anteriores.

El análisis topológico del árbol filogenético inferido muestra una distribución en forma de escalera (topología no equilibrada) con ramas internas largas (más cercanas a los nodos y a la raíz del árbol) y ramas terminales cortas **(8)**. Este patrón es característico de virus ARN cuyas tasas de crecimiento poblacional son constantes y presentan una selección inmune débil o ausente, aunque en el caso del complejo dengue, la existencia del fenómeno ADE podría explicar una dinámica compleja. De manera general, el comportamiento es similar para los serotipos reportados. Los datos revelan que todas las secuencias en el estudio tienen un origen (Edad del Árbol) en 1993, previo al primer aislamiento de Dengue 3 en América (reintroducción) en 1994 vía Nicaragua, seguido de Costa Rica y Panamá. El Genotipo III aparentemente originado en la parte asiática de la India, se dispersó hacia África durante 1980 y desde ese continente hacia América Latina durante 1994. Epidemias posteriores causadas por este genotipo se reportaron en Guatemala durante 1996-1998, así como en Venezuela (2000-2001) reemplazando al Genotipo V que circuló en este

país entre 1960-1970 (116). Estudios similares confirmaron la introducción hacia Brasil desde la región del Caribe, así como su diseminación hacia Paraguay y Ecuador (117).

La reconstrucción de la historia demográfica se muestra en el análisis del Skyride Bayesiano (Figura 10). Este método no paramétrico identifica predictores de la dinámica poblacional como la diversidad genética, la presión selectiva, el tamaño de población efectiva ( $N_e$ ) y la distribución espacio-temporal, los cuales se estiman o evalúan simultáneamente durante la inferencia. Dentro de ellos el tamaño de la población efectiva, de importancia fundamental para la epidemiología de las enfermedades infecciosas, describe el nivel de diversidad genética dentro de una población a lo largo de su historia evolutiva (83). Esto se puede definir como el tamaño de una población idealizada que se aparea al azar y que tiene los mismos cambios genéticos que la población estudiada. Durante el período de crecimiento exponencial de una epidemia, se demuestra que el cambio en la  $N_e$  se correlaciona linealmente con la prevalencia de la infección (79).



**Figura 10.** Gráfico del análisis Bayesiano Skyride. El eje de las abscisas (x) representa la escala del tiempo (años) y el eje de las ordenadas (y) es la escala logarítmica  $N_e$  (donde  $N_e$  es la mediana tamaño de población efectiva y  $\tau$  es el tiempo de generación). La línea sólida delgada indica los estimados de la mediana de la  $N_e$ .

Se describe un periodo estable entre 1994-1997 con un  $Net=4,68$ . En 1994, el virus se reintrodujo en las Américas tras una ausencia de 16 años. Colombia y Puerto Rico notificaron este serotipo en 1977 y 1978, pero no se volvió a observar hasta 1994 en Nicaragua y Panamá **(118)**. Entre 1996-2004 se aprecia una tendencia al crecimiento hasta un valor máximo  $Net=80$ , fenómeno epidemiológico que coincide con la expansión del genotipo III en la región, inicialmente en los países centroamericanos y México, y más tarde en Puerto Rico, otras islas del Caribe y Sudamérica **(119)**. Seguidamente se observa una caída alrededor del 2008 ( $Net=40$ ), con un leve incremento sostenido y casi lineal (pequeño pico en 2014 y 2016) hasta el 2019 donde ocurre una leve disminución ( $Net=25$ ). En este periodo coincidió la pandemia de Covid 19 con la reducción del número de casos reportados por la OMS. Se aplicaron restricciones a la movilidad para suprimir la tasa de transmisión del SARS-CoV-2, lo que provocó cambios de comportamiento que afectaron la transmisión de otras enfermedades que circulan en la comunidad como el dengue **(120)**.

A partir del 2021 hasta la actualidad se percibe un leve incremento, que se corresponde con un alza y prevalencia en la cantidad de casos de dengue **(53)** y la existencia de nuevo linaje americano II reportado. Las estimaciones del tamaño efectivo de la población vírica en términos de número efectivo de infecciones (a su vez un reflejo de los cambios subyacentes en la diversidad genética) indican un patrón de transmisión de máximos separados por mínimos que pueden describirse mejor como cuellos de botella de la población **(121)**. La evaluación de los historiales demográficos del dengue sugieren un aumento espectacular del tamaño efectivo de la población para los serotipos 1, 2 y 3 a finales del siglo XX y principios de la década de 2000, con una variación mucho menor en el caso de Dengue 4. Estos cambios son coherentes con la propagación del dengue por todo el mundo en las últimas décadas a nuevas zonas, siendo Dengue 3 y 4 los que han circulado más recientemente **(122)**.

Otro aspecto analizado fue la tasa de evolución viral o tasa de sustituciones por sitio. Este parámetro refleja la rapidez a la cual los diferentes individuos acumulan diferencias genéticas entre ellos, dentro de una población en el tiempo, como resultado de un régimen selectivo que actúa sobre esa población **(66)**. Se obtuvo una tasa de sustitución de  $1.58 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año (95% HPD,  $1.3769 \times 10^{-3}$ ,  $1.8027 \times 10^{-3}$ ). En otras investigaciones se ha descrito que para la región de estudio (gen E) se encuentran valores de  $7.86 \times 10^{-4}$  (95% CI:  $7.36-8.37 \times 10^{-4}$ ), mientras que para genoma completo de  $9.87 \times 10^{-4}$  (95% CI:  $9.1-10.63 \times 10^{-4}$ ). Las diferencias entre estas estimaciones se deben probablemente a diferente número de secuencias analizadas. De los miembros del complejo dengue, Dengue 4 muestra la mayor tasa de sustituciones ( $9.52 \times 10^{-4}$ ) **(123, 48)**. La capacidad del virus para mutar lógicamente está relacionada con la cantidad de

variantes que pueden surgir de él, y por tanto mientras más alta sea esta tasa de mutaciones, mayor puede ser la diversidad genética, lo que incide en las características fenotípicas del genotipo, ya que genera poblaciones con antigenicidad alterada, mayor transmisibilidad y virulencia. Los arbovirus suelen existir como una colección de genomas variables (cuasiespecies). Se podría esperar que el gen de la envoltura evolucionara más rápido que el resto del genoma debido a su interacción con el sistema inmunitario. De hecho, algunas investigaciones han planteado un aumento de la tasa en el gen E para los Serotipos 3 y 4, y ligeramente más lenta para 1 y 2. Estas elevadas tasas de mutación pueden deberse a varios factores o mecanismos como: la fidelidad de la ARN polimerasa, la capacidad de corrección de errores, la propensión del ácido ribonucleico a dañarse o la edición por las enzimas del huésped. Este mecanismo ofrece cierta ventaja a las diversas poblaciones mutantes como la plasticidad fenotípica y su adaptabilidad a entornos nuevos y dinámicos.

### V.3 Inferencia Filogeográfica

Las epidemias de dengue se producen cada 2-5 años en las regiones tropicales y subtropicales y están fuertemente influenciadas por estaciones. En muchos países, el aumento de la movilidad humana, los cambios sociales que afectan al contacto entre el hombre y el mosquito y los retos que plantea el control del vector han contribuido al aumento de la actividad epidémica del dengue y al cambio de patrones no endémicos o hipoendémicos (transmisión no continua de un solo serotipo) a patrones de transmisión hiperendémica (múltiples serotipos que co-circulan), lo que da lugar a un aumento de la duración interanual de la actividad de transmisión **(124)**.

Los estudios filogeográficos previos apuntan a que hubo una única introducción del Genotipo III de Dengue 3 en Las Américas a través de Nicaragua. Inicialmente, el flujo genético se produjo hacia el norte y hacia el sur a lo largo del continente. Desde 1994, Brasil fue la fuente principal de origen, sin embargo, Centroamérica (Nicaragua) fue la fuente del flujo genético inicial hacia las Antillas Mayores, a partir de 1996 **(125)**. Las tasas de movimiento de los linajes entre zonas geográficas fueron evaluadas mediante filogeografía discreta. Las rutas de transmisión con Factor de Bayes (BF) positivos ( $>3$ ) se muestran en **Anexo 4. Tabla suplementaria 4** y la visualización en el mapa del mundo en la **Figura 11**. Un total de 27 países se encuentran representados en las secuencias.



**Figura 11.** Visualización de las rutas de transmisión con  $BF > 3$  mediante el programa SPREAD 4.

Se identificaron 9 rutas con origen y destino en el continente asiático, siendo China, Bangladesh e India los países emisores. Aunque para los primeros mencionados están representados los genotipos I y III y la cercanía con el resto de las regiones justifica la rápida diseminación de ambos genotipos. Los mayores valores de BF se encuentran la región de América, siendo Cuba el país emisor hacia EE. UU y Puerto Rico. A principios de 2022, el Departamento de Salud de Florida (FDOH) identificó un aumento en las infecciones principalmente entre viajeros que regresaban de Cuba **(126)**. En julio de 2022, se informó de un brote de Dengue 3 en Cuba y un aumento de casos en otros países de las Américas **(127)**. Los análisis filogenéticos mostraron que tentativamente podrían pertenecer al Genotipo III linaje Americano II **(111)**, ya documentado en Brasil **(128)**.

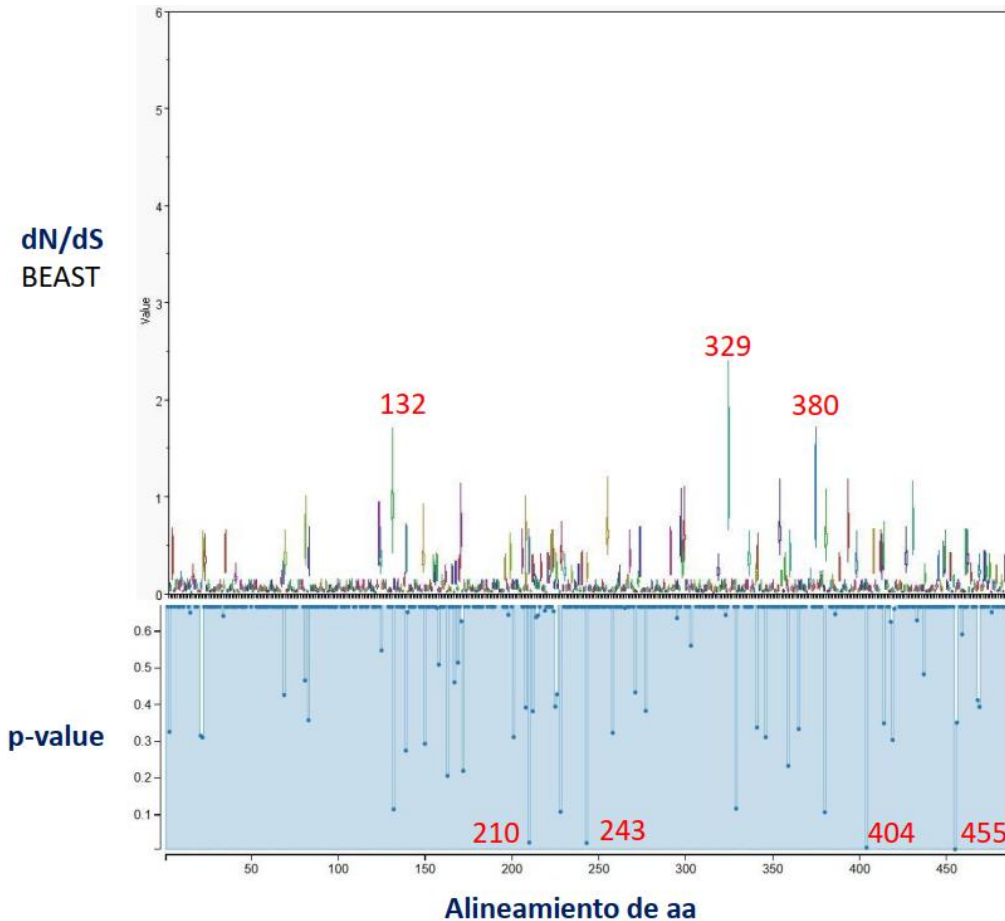
Los genotipos del dengue han mostrado históricamente distribuciones geográficas distintas en lugares endémicos. Sin embargo, la frecuencia de los brotes ha aumentado en las últimas décadas, acompañada de cambios en los patrones epidemiológicos, como la introducción y sustitución de genotipos existentes. De importancia en la vigilancia epidemiológica de la región resaltan la identificación de 4 rutas de transmisión intercontinental (tres de ellas pertenecen a Asia-América y una África-América). Los viajeros están más expuestos a las infecciones y si se encuentran en la fase virémica introducen nuevos serotipos en un país no endémico. La India se destaca como país emisor hacia América, con previos reportes de viajeros procedentes de esta región y tanto las

inferencias filogenéticas realizadas por Naveca y col (128), Cerpas y col (129) así como la descripción del clúster de las secuencias cubanas analizadas apuntan al continente asiático como el origen del nuevo linaje. Aunque no se identificó a Cuba como destino de las rutas intercontinentales, el complejo escenario que experimenta América, con varias rutas de transmisión entre países, que experimentaron un alza en el número de casos en el 2022 refuerza la idea de alguna vía de introducción. En este sentido, los estudios filogeográficos no son concluyentes en este aspecto por la limitada cantidad de secuencias empleada en el estudio.

### V.4 Análisis de presiones selectivas en la evolución de Dengue 3

Comprender el proceso de selección natural es quizá el aspecto más importante de los estudios evolutivos del virus del dengue. La observación más notable en este sentido es que la selección positiva (o darwiniana) es un proceso relativamente raro, que sólo se da de forma esporádica en el genoma y entre los serotipos. En consecuencia, la mayoría de los cambios mutacionales fijados en las poblaciones virales son neutros y están sujetos a la deriva genética. A pesar de ello, está claro que la presión de selección dominante que actúa sobre el virus del dengue es la selección purificadora; la mayoría de los cambios aminoacídicos son deletéreos, reducen la aptitud y, por tanto, se eliminan de la población vírica. Esta evidencia está presente en los virus de ARN transmitidos por artrópodos, en forma de pleiotropía antagonista :las mutaciones que son beneficiosas o neutras en un entorno (por ejemplo, el mosquito vector) son deletéreas en otro (el huésped humano) (130).

Las tasas evolutivas de los genes o partes de genes sometidos a selección natural se cuantifican mediante la relación entre las tasas de sustitución no sinónima y sinónima ( $\omega = dN/dS$ ), utilizando modelos de codones y pruebas de probabilidad (Likelihood Likelihood Ratio Tests (LRTs), con hipótesis nulas basadas en una evolución neutra ( $\omega = 1$ ); selección negativa (purificadora) por  $\omega < 1$  y selección positiva (diversificadora) indicada por  $\omega > 1$ . Los virus de ARN tienen tiempos de generación cortos y poblaciones de gran tamaño. Estas características favorecen tasas evolutivas rápidas, que dan lugar a poblaciones genéticamente muy diversas, con una gran capacidad de adaptación incluso bajo presiones selectivas muy fuertes (131). En consecuencia, las regiones del genoma que codifican las proteínas a las que se dirige la respuesta inmunitaria (antígenos) presentan una variabilidad mucho mayor que el resto del genoma confiriendo ventaja adaptativa. La **Figura 12** muestra un resumen gráfico de los métodos utilizados.



**Figura 12.** Resumen gráfico de los métodos empleados en la determinación de los sitios sometidos a presiones evolutivas sobre el gen de la Envoltura del virus dengue. La distribución de probabilidad posterior para el dN/dS obtenida en BEAST se muestra como un diagrama en violín, cuya amplitud es igual al intervalo HPD 95% de este parámetro. En el caso de MEME se muestra los sitios identificados con valor de corte  $<0.1$

El método **MEME** encontró evidencia de selección positiva en 4 sitios para un valor de corte ( $p$ -value  $<0.1$ ). Estos sitios ocupan las siguientes posiciones en el alineamiento (**210,243,404 y 455**). Los sitios 210 y 243 pertenecen al ED II. Este dominio presenta regiones epitópicas para anticuerpos subneutralizantes que durante la infección secundaria por un serotipo diferente son causantes del fenómeno ADE, direccionando en muchos casos hacia un estadio grave de la enfermedad. Los sitios 404 y 455 están ubicados en el dominio transmembrana que estabiliza la interacción con la envoltura que rodea al virión. Se ha reportado que, posterior a la entrada del virus a la célula, el bajo pH de los endosomas provoca el reordenamiento de los dominios a la forma trimérica de la proteína de Envoltura. Este proceso resulta en la interacción del dominio transmembrana con un motivo de fusión, con la consecuente liberación del genoma viral en el citosol de la célula (**26**). Aunque hay pocos estudios que se refieren a la funcionalidad de este



segmento, aparte de su marcado carácter estabilizador, el hecho de que también algunas posiciones estén sometidas a presión positiva podría indicar cierta ventaja en los procesos de replicación viral. Una profundización en el impacto que tendría los cambios estructurales y evolutivos en este segmento son necesarios para comprender la patogenicidad del dengue.

El cálculo de dN/dS realizado en BEAST identificó tres sitios sujetos de selección positiva que abarcan las posiciones 132,329 y 380. Las investigaciones de Tan y col también identificaron estas posiciones (métodos MEME, FEL, SLAC) en un estudio evolutivo de Dengue 3 Genotipo III en Malasia, con secuencias del gen de Envoltura entre los años 1966 y 2014 provenientes de 56 países **(132)**. Patil y col también reportaron los sitios 210 y 380 bajo selección positiva en secuencias de la India del 2017 **(133)** y otros autores han planteado que los codones 329 y 124 han identificado los linajes Americanos y Asiáticos **(50)**. Estos sitios son conocidos por formar parte de epítomos a células B y T respectivamente **(134)**.

El método FUBAR utiliza un enfoque bayesiano y supone que la presión de selección para cada sitio es constante a lo largo de toda la filogenia, por lo que permite detectar selección dominante. En el caso del método, para un valor de probabilidad posterior (fijado a 0.9) se encontraron 293 sitios sometidos a selección negativa y 198 sitios a selección neutral. Los bajos valores encontrados en los sitios **(Anexo 5. Tabla suplementaria 6)**, para toda la filogenia sugieren que las fuertes presiones evolutivas negativas o purificadoras actúan sobre el virus dengue. El virus se mantiene por transmisión horizontal a través de artrópodos (mosquitos) entre huéspedes vertebrados. Como consecuencia, debe replicarse alternativamente en entornos muy diferentes creados por invertebrados y vertebrados. Hasta la fecha, los análisis filogenéticos sugieren que estas restricciones selectivas moldean la evolución de los flavivirus. Los fenómenos de cambios genéticos en el genoma han afectado profundamente a la epidemiología y virulencia de la infección por dengue en todo el mundo. Estos cambios genéticos son cruciales para rastrear el origen de la enfermedad, lo que se lleva a cabo principalmente mediante el análisis evolutivo de las secuencias genómicas.

### V.5. Análisis Estructural-Funcional

Las proteínas se utilizan habitualmente como dianas moleculares contra patógenos como virus y bacterias. Sin embargo, los patógenos pueden evolucionar rápidamente, lo que permite que sus poblaciones aumenten en diversidad con el tiempo. Por consiguiente, para diseñar terapias más duraderas y robustas, así como para entender la evolución viral en un huésped y su posterior

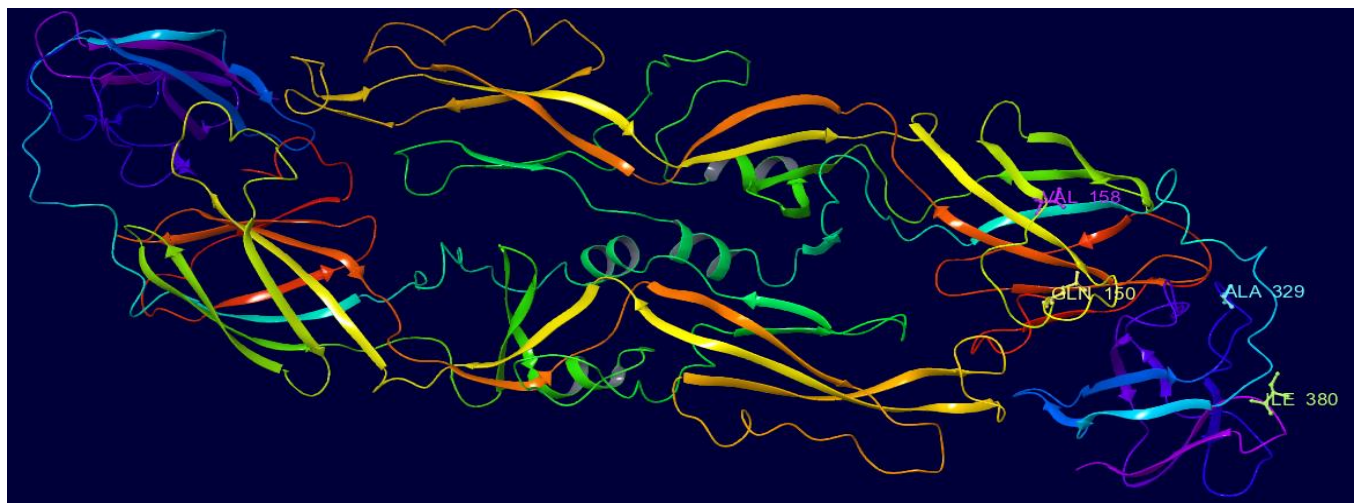
transmisión, es fundamental comprender los cambios que ocurren en las proteínas de los patógenos.

La proteína de Envoltura está compuesta por cuatro dominios principales: **Dominio I** (EDI, que abarca los residuos 1–52, 132–193, 280–296), **Dominio II** (EDII, residuos 53–131, 194–279), **Dominio III** (EDIII, residuos 297–394, el cual forma la apariencia globular de la proteína y se posiciona en la superficie de la envoltura viral; mientras que el **Dominio IV**(residuos 395–486) conecta los Dominios I y III a la región transmembrana (**135**). El dominio EDI se caracteriza por una estructura de barril  $\beta$  de ocho hebras y actúa como un puente que conecta EDII con EDIII. El EDII es responsable de la estabilización del dímero y posee un lazo de fusión, responsable de la unión entre la membrana viral y del huésped durante la infección. Por último, el EDIII se caracteriza por una estructura similar a la inmunoglobulina formada por seis hebras  $\beta$  antiparalelas y anclada al dominio C-terminal (**Anexo 7. Figura suplementaria 3**). Debido a su gran flexibilidad, el dominio es relativamente independiente del resto de la proteína, por lo que se considera que interactúa con los receptores de membrana del huésped para iniciar el proceso de infección.

Los cambios aminoacídicos detectados en las secuencias cubanas de estudio aparecen en la **Tabla 3** respecto a la cepa de dengue de Panamá 1994 (**DQ341209**) y el mapeo en la estructura de referencia (**1Uzg**, fragmento soluble) en la **Figura 13**.

**Tabla 3.** Cambios aminoacídicos detectados en las secuencias de Dengue 3 cubanas respecto a Panamá 1994.

		150	160	330	380
Panama DQ341209	1994	DQHLVGN	ETCGVTAEI	DVPCK	IGIGDI
CUBA 297	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 318	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 350	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 415	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 419	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 502	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 530	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 538	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 629	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 703	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
CUBA 705	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726361	2002	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726340	2001	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726341	2001	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726342	2001	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726345	2002	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726346	2002	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726349	2001	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726347	2002	...C...	...I...	...A...	...T...
Cuba KT726348	2002	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OQ445927	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OQ445948	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OQ445953	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OR771113	2023	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OR821960	2023	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OR977063	2023	...C...	...I...	...A...	...T...
USA OR977076	2023	...C...	...I...	...A...	...T...
USA PQ155026	2024	...C...	...I...	...A...	...T...
USA PQ155037	2024	...C...	...I...	...A...	...T...
USA PQ241324	2024	...C...	...I...	...A...	...T...
Brazil OQ706228	2023	...C...	...I...	...A...	...T...
PuertoRico OQ836206	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
PuertoRico OQ836208	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
India OP921002	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
India OQ721959	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
India OQ721962	2022	...C...	...I...	...A...	...T...
India PP087307	2021	...C...	...I...	...A...	...T...



**Figura 13.** Representación de la estructura dimérica de la proteína de Envoltura(1Uzg) y los cambios detectados en las secuencias cubanas. Los cambios aminoacídicos se encuentran identificados en colores distintivos.

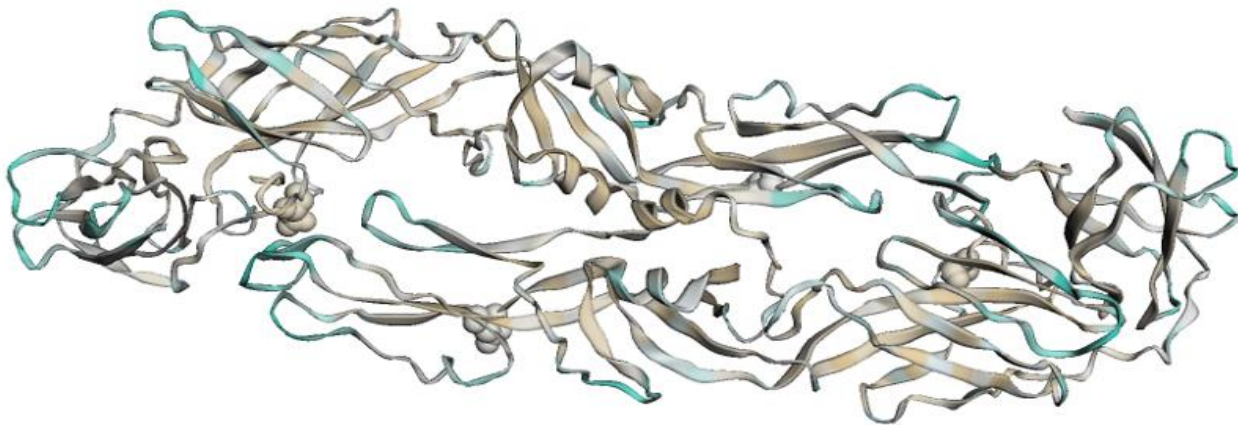
Se detectaron 4 cambios que ocupan las posiciones 150,158,329 y 380 los cuales están presentes en todos los miembros del linaje Americano II. Los sitios 158,329 y 380 están ausentes en las secuencias cubanas que circularon durante el periodo 2001-2002 y pertenecen al linaje Americano I. El cambio **L150Q**, implica la sustitución de un aminoácido alifático hidrofóbico (**Leucina**) por otro de cadena lateral polar neutra (**Glutamina**). Esta transición se localiza en el ED I y forma parte de un motivo de estructura secundaria de giro beta( $\beta$ ) tipo I. Como parte de este giro se establecen interacciones por puente de hidrógeno entre **Q150** y **N153 (Asparagina)** que pudieran estabilizar la estructura. La sustitución **V158I** se localiza igualmente en el ED I, en un elemento de estructura secundaria de hoja beta. Este cambio de tipo conservativo implica la sustitución de un aminoácido hidrofóbico, apolar (**Valina**), por otro con un aumento de CH<sub>2</sub> en la cadena lateral (**Isoleucina**). En el tercer cambio, ocurre la sustitución **V329A**. Esta transición reduce la hidrofobicidad al cambiar la Valina por la Alanina y se encuentra localizado en un lazo tipo giro beta( $\beta$ ) en el EC II. La transición **I380T**, se localiza en el ED III e implica el cambio de un aminoácido apolar hidrofóbico, por uno polar neutro (**Treonina**). El cambio en la posición 158 se ha detectado en aislados de Dengue 3 provenientes de Tailandia mientras que el sitio 380 se ha observado en muestras de genotipo I y IV de Puerto Rico, Indonesia, Brasil, Sri Lanka y Samoa (**136**). Hyatt y colab (**137**) han planteado que la proteína de Envoltura de los flavivirus se une a las moléculas receptoras del hospedero a través de sitios de unión a glicosaminoglicanos compuestos por residuos básicos, ácidos y polares que contribuyen a esta interacción. La presencia de Treonina pudiera establecer interacciones por puente de hidrógenos con las glicosilaciones presentes en los receptores DC SIGN favoreciendo la entrada del virus a la célula. Aunque la patogenia del dengue es multifactorial el hecho de que la posición 380 identificada como un sitio sometido a presiones evolutivas positivas y además presente este cambio particular, supone una ventaja de las poblaciones virales que involucra mayor transmisibilidad.

### V.5 Predicción de epítomos conformacionales a linfocitos B

Durante la infección viral, se espera que las glicoproteínas en la superficie del virus sean reconocidas por los componentes del sistema inmune desencadenando la respuesta humoral y celular con la formación de memoria inmunológica y el estado antiviral del huésped. Los linfocitos B reconocen los antígenos del virus y desencadenan una respuesta primaria de IgM, seguida por

una serotipo-específica de IgG (138). El principal objetivo de las respuestas neutralizantes es la proteína de la envoltura y la mayoría de los anticuerpos reconocen epítopos lineales, complejos y cuaternarios que abarcan los tres dominios (EDI, EDII y EDIII). Numerosos estudios han demostrado que los epítopos complejos de estructura cuaternaria que presentan los oligómeros de la proteína de Envoltura en la superficie vírica son dianas importantes de anticuerpos humanos fuertemente neutralizantes y protectores y los análisis de caracterización muestran que estos anticuerpos se unen a epítopos cuaternarios dependientes de dímeros de la proteína de Envoltura (139).

La **Figura 14** se muestra la predicción de epítopos conformacionales realizada en el servidor SEMA 2.0. La secuencia de la proteína está codificada por colores en función de los valores predichos: el marrón indica una puntuación de epítipo baja (cero) mientras que el ciano denota que la puntuación del epítipo supera el umbral (0,51), clasificando la región como epítipo. Los aminoácidos que, según las predicciones, presentan N-glicosilación están marcados con un asterisco en la secuencia.



### Cadena A

mrcvlgvGNRDFVEGLSGATWVDvvlEhGgcvttMaKNkptldielqkteatQlATLrklciEgkitn\*ittDsRCPTQGEaIlPEEQDqnyvckhtYv  
 DRGwNGCGLFGKgslytcakfqcLEsiEgkivqhEnlkytviitvhtgdqhvgv\*ETQgvtaEitsQastaEailpEygtlglEcsprTGLDfnEm  
 illtmKDkawmvhrQwffDlplpwtsGATTKTPTwnrkEllvtfKNAHAKKQEvvvLgsqegamhtaltgateiqtsGgtsifagHlKcRlKmDKlkl  
 kgmSYamcLntfvlKkEvsetqhgtilikvEYKGEDApckipfstEDGQGKAHNgrlitanpvvtkKEEpvniaeaappFGEsnivigIGDKA1KiNwY  
 rk

### Cadena B

mrcvlgvgnRDFVEGLSGATWVDvvlEhGgcvttmaKNkptldielqkteatQlaTLrklciEgkitn\*ittDsRCPTQGEaIlPEEQDqnyvckhtYv  
 DRGwNGCGLFGKgslytcakfqcLEsiEgkivqhEnlkytviitvhtgdqhvgv\*ETQgitaEitsQastaEailpEygtlglEcsprTglDfnEm  
 illtmKDkawmvhrQwffDlplpwtsGATTKTPTwnrkEllvtfKNAHAKKQEvvvLgsqegamhtaltgateiqtsGGtsifagHlKcRlKmDKlkl  
 kgmSYamcLntfvlKkEvsETQhgtilikvEYKGEDApckipfstEDGQGKAHNgrlitanpvvtkKEEpvniaeaappFGEsnivigTGDKA1KiNwY  
 RK

**Figura 14.** Predicción de epítopos conformacionales a linfocitos B en el servidor SEMA 2.0

Las sustituciones **L150Q** y **V158I** con un score de 0.35 y 0.41 respectivamente no son reconocidos para formar parte de una región epitópica conformacional; en cambio, las posiciones 329 y 380 fueron identificadas con un score de 0.59 y 0.69 respectivamente. Según la base de datos DENVab (<http://denvabdb.bhsai.org>), 159 posiciones de la proteína de Envoltura contribuyen a epítomos de anticuerpos caracterizados, mientras que 336 posiciones aún no se han asociado a ningún epítomo **(140)**. La respuesta de los anticuerpos neutralizantes humanos parece dirigirse preferentemente a la región bisagra DI/DII de los monómeros de proteína de Envoltura y a epítomos cuaternarios que sólo están presentes en el contexto de los viriones intactos **(141)**. Los mutantes de escape que se asignan a residuos específicos del serotipo no están distribuidos uniformemente por toda la estructura, en cambio, se encuentran exclusivamente en el dominio III (se incluyen los residuos **291, 305, 381-383**) **(142)**. Los trabajos de Wahala y col se han referido a que los cambios en los residuos de aminoácidos en las posiciones 301, 302, 304, 326-328, 330, 361, 380, 382 y 386 provocan la pérdida de unión de los anticuerpos monoclonales específicos Dengue 3 Genotipo III **(143)**. Los cambios detectados en las secuencias cubanas no son variantes de escape, sin embargo, el cambio **I380T** antes mencionados podría tener un impacto en este tipo de respuesta inmune. Varios investigadores han planteado que las modificaciones en el lazo BC del dominio III (**V/A 329**), expuesto al solvente, disminuye la afinidad de Abs neutralizantes en estudios *in vitro* **(144)**. Aunque el dominio III adopta un pliegue idéntico entre los cuatro serotipos de dengue, las diferencias en las secuencias de aminoácidos definen una red distinta de interacciones lo que define la energía de unión y la capacidad de protección **(145)**.

El paradigma de la inmunidad frente al dengue, según el cual los virus de un mismo serotipo inducen respuestas inmunitarias similares entre sí, ha ido cambiando, ya que cada vez hay más pruebas de que la inmunidad frente al dengue no sólo depende del serotipo, sino también de la cepa vírica de exposiciones anteriores **(146)**. Que implicaciones tendrán en el tropismo, carácter evolutivo y en la respuesta inmune los cambios detectados, así como el impacto en la estructura de la proteína de envoltura son cuestiones de vital importancia en el seguimiento epidemiológico de Dengue 3.

### V.6 Discusión general

El dengue es una de las enfermedades transmitidas por mosquitos más importantes del mundo y su morbilidad, una de las mayores en la sanidad mundial. La incidencia mundial ha aumentado sustancialmente en las últimas décadas, y el área de distribución ha pasado de sólo nueve países antes de 1970 a al menos 129 países en la actualidad. Además de su rápida propagación mundial,

los brotes de dengue en regiones endémicas provocan un número cada vez mayor de casos y contribuyen a aumentar la carga de los sistemas de salud pública. Las infecciones por cualquiera de los cuatro serotipos pueden ser asintomáticas, con presentaciones clínicas que van de formas leves a graves, aunque los Serotipos 2 y 3 han estado asociados a la mayor cantidad de casos graves y fallecidos. El dengue es endémico en Sudamérica desde la década de 1980. Generalmente sólo un serotipo circula episódicamente, pero todos los serotipos han circulado y reemergido en ciclos. Hoy predomina la co-circulación de al menos dos o tres serotipos en la mayoría de los países de la región.

Los trabajos de Campos y col (147) han mostrado las diferentes rutas de entrada de los serotipos de dengue en Las Américas. Estas introducciones alteraron la dinámica de las poblaciones virales en América del Sur, como se observó en los años 90 y 2010 (Dengue-1 genotipo V); en 2009 y 2010 en adelante (Dengue-2 linajes II-(AS/AM)) en 1999-2000; en 2010 (Dengue-3 linajes BR I, II y III, Caribe/América del Sur); y en 2013-2014 (Dengue-4 genotipos I y II). Desde la reintroducción de Dengue 3 en América en 1994, los períodos epidémicos de este serotipo hasta el 2021, se han caracterizado filogenéticamente por la existencia de un único linaje: Americano I. La más reciente muestra de este linaje se reportó en México en el 2021 (GenBank OM417340 y OM417341) sin embargo las últimas investigaciones han mostrado la existencia de un nuevo linaje (Americano II) con cepas representativas de Brasil, Cuba, EEUU y Puerto Rico del 2022 las cuales forman un clado monofilético. En nuestro estudio, las muestras cubanas del 2022 se agruparon, con las descritas de la región americana en igual periodo epidémico, con la particularidad de compartir ancestros con secuencias de la India, señalando una posible introducción desde el continente asiático.

Los análisis filodinámicos son una herramienta valiosa para entender la relación entre los estudios filogenéticos y geográficos de los serotipos del dengue, y puede proporcionar información importante sobre la diversidad genética de la enfermedad a lo largo del tiempo y el espacio. Además, el análisis filogeográfico puede ayudar a comprender la dinámica de transmisión del virus tanto dentro de una región concreta como entre regiones diferentes, lo que permite a los profesionales sanitarios adoptar medidas preventivas y de control más eficaces. Esta información también puede utilizarse para identificar cuándo surge una nueva cepa y cómo circula dentro y fuera de la región, incluso antes de que los sistemas de vigilancia puedan detectar su presencia, lo que permite una respuesta más rápida y eficaz a las epidemias de dengue (148). Los análisis filodinámicos en nuestro estudio mostraron que el ancestro común más reciente para ese clado data del 2019. Ello sugiere que este linaje ha estado circulando por la región de forma inadvertida

hasta su detección en Brasil en el 2022, quizás influenciado por la poca representación y análisis de secuencias genéticas en el periodo 2019-2022. La introducción de este linaje desde la India en la región de las Américas es un factor de suma preocupación para los sistemas de salud en el continente y se ha demostrado que la infección secundaria por Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4, así como la infección primaria por Dengue 3 (origen geográficamente diferente), aumentan el riesgo de transmisión y severidad en la población susceptible.

Los estudios filogenéticos de los virus, son habituales y a menudo se utilizan para comprender diversos aspectos como la evolución de rasgos fenotípicos clave como la virulencia o las fuerzas evolutivas que ejercen los hospederos. Las poblaciones virales pasan por un proceso de selección natural, que se basa en las capacidades de cada variante y su posibilidad de ser transmitida a hospederos nuevos. Por lo tanto, la adaptación del virus a dos o más especies necesarias para su ciclo de vida (especie humana y especie artrópoda) limita la acumulación de mutaciones y, en cierta medida, su evolución. Para Dengue 3, las presiones selectivas negativas dominantes para toda la filogenia, encontradas por el método FUBAR, están en correspondencia con lo reportado para esta arbovirosis **(123)** y se justifican por el tránsito de la población viral desde vectores invertebrados hacia hospederos humanos; sin embargo, el método MEME encontró 4 sitios sometidos a selección episódica positiva. Las posiciones 210,243,404 y 455 ocupan los dominios II (210,243) y la región transmembrana (404 y 455) respectivamente. Es conocido que el ED II presenta dominios de unión a anticuerpos subneutralizantes para todos los serotipos de dengue, los cuales aumentan su producción ante reinfecciones de serotipos diferentes, potenciando la respuesta ADE y el tránsito hacia el estado grave de la enfermedad, mientras que el dominio transmembrana favorece el anclaje en la membrana de los viriones los complejos de dímeros de Envoltura. Aunque el dominio transmembrana posee una función estructural, pocas investigaciones han evaluado los posibles cambios en la patogénesis y que algunas posiciones identificadas sobre la que actúan fuerzas de selección positiva que pudieran representar una ventaja evolutiva.

Estudios han indicado que los aislados Americanos del genotipo III están asociados a epidemias de dengue grave **(119)**. La sustitución aminoacídica en la posición 329 del dominio III, también se ha reportado en cepas de Ecuador, Perú y Venezuela del 2008. Este cambio de una Valina por una Alanina reduce la hidrofobicidad del entorno y además de estar expuesto a la superficie fue identificado bajo la acción de fuerzas de selección positiva. Un particular interés denota el cambio en la posición 380. La presencia de una Treonina incorpora un aminoácido polar neutro que pudiera establecer interacciones con residuos polares en los receptores descritos para dengue, con alguna implicación en la entrada del virus a la célula. La localización de estos cambios en el dominio III y



expuestos a la superficie es significativa, ya que están involucrados en la unión a receptores celulares, aunque estudios más profundos son necesarios para dilucidar posibles implicaciones en la estructura ya que es diana para el diseño de fármacos antivirales, así como en las estrategias vacunales actuales.

Algunas investigaciones han posicionado a Cuba como el centro de la dispersión del linaje Americano II. Aunque no se encontró suficiente evidencia desde la inferencia filogeográfica de Cuba siendo destino de estas introducciones, los altos flujos migratorios que experimentaron los países y los estudios filogenéticos y epidemiológicos apuntan a una introducción a Las Américas desde el continente asiático, particularmente de la región de la India. Se evidenció con un fuerte soporte estadístico la transmisión Cuba-EE. UU, así como Cuba-Puerto Rico, países que reportaron una elevada cantidad de casos en el periodo estudiado.

La propagación del dengue en las últimas décadas ha convertido esta enfermedad en un grave problema de salud pública en todo el mundo. En 2019, el dengue se encontraba dentro de las diez amenazas de salud a nivel global con 3.1 millones de casos reportados en América. Jamaica reportó el brote más elevado de Dengue 3, siendo la población infantil la más afectada con una alta tasa de hospitalizaciones y muertes, superando el umbral de mortalidad reportado por la PAHO para las Américas **(149)**. El Genotipo III de Dengue 3 se ha asociado a una amplia distribución mundial encontrándose en Asia, América, África y Europa. Los virus con características cosmopolitas demuestran una alta transmisibilidad y se diseminan rápidamente tras su introducción en nuevas localizaciones geográficas.

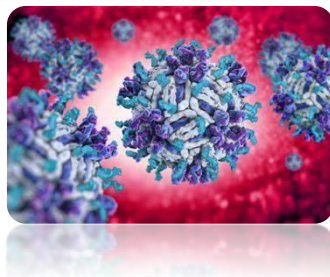
En 2023 se registró un incremento global en la transmisión del dengue, caracterizado por un aumento considerable del número de casos y por la simultaneidad de múltiples brotes, incluso en zonas libres de dengue. Durante el año 2024 y hasta la semana epidemiológica (SE) 12, se notificaron 3.578.414 casos de dengue a la Plataforma de Información de Salud para las Américas (PLISA). De este total, 2.888 fueron caracterizados como dengue grave (0,08%) y se registraron 1.039 casos fatales (tasa de letalidad 0,029%). El total de casos notificados a través de PLISA en 2024 representa un incremento de más de tres veces en comparación al mismo periodo del 2023 en la Región de las Américas **(150)**. Aunque la patogenia del dengue es multifactorial, la circulación del nuevo linaje Americano II de Dengue 3 en la región está asociado con el alza en el número de casos y los síntomas de alarma en la población infantil.

Durante la identificación de este nuevo linaje en el 2022 se confirmaron 306 niños con dengue entre los meses de Junio y Noviembre (5-14 años), de ellos un 67 % fueron admitidos con signos de

alarma y un 37,6% clasificados como dengue severo (**Fuente: Base de Datos LNR Arbovirus, IPK, 2022**). Es importante destacar que desde el año 1981 no teníamos asociación de gravedad a dengue en niños. Este hecho estuvo influenciado por la exposición prolongada de la población infantil a los Serotipos 1 y 2 (con ausencia de circulación de Dengue 3 hasta el 2022) y el impacto de la respuesta inmune en una población susceptible. También se podría considerar una mayor capacidad de replicación del nuevo linaje en el hombre o en el vector. Dengue 3 supuso un reto para nuestro sistema de vigilancia debido al riesgo de una nueva epidemia en una población altamente susceptible donde la vigilancia genómica de nuevos linajes circulantes es prioridad para el sistema de salud cubano.

## VI. CONCLUSIONES

---



### CÁPITULO VI. CONCLUSIONES

- 1) Las relaciones filogenéticas de las secuencias cubanas durante el periodo epidémico del 2022 confirman su agrupamiento en el nuevo linaje Americano II con representantes de EE. UU, Brasil y Puerto Rico.
- 2) El Serotipo 3 mantiene una población efectiva estable, con fluctuaciones que se corresponden con la periodicidad reflejados en la epidemiología de la enfermedad.
- 3) Las presiones evolutivas a lo largo de toda la filogenia indican que la selección negativa es dominante sobre dengue, con varios sitios sometidos a presiones evolutivas episódicas.
- 4) Las secuencias cubanas muestran cambios aminoacídicos en regiones funcionales de la proteína de envoltura, compartidos por los miembros del clado y con posibles implicaciones en la patogenia del virus.

## I. RECOMENDACIONES

---



### CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

- 1) Emplear secuencias de Dengue 3 de anteriores periodos epidémicos, para una caracterización completa de este serotipo en Cuba.
- 2) Realizar análisis filogeográficos continuos para analizar la dispersión del Serotipo 3 en las provincias cubanas.
- 3) Analizar el grado de conservación epitópica de las secuencias de dengue 3 cubanas respecto a los candidatos vacunales CYD-TDV, TAK -003 y TV003 mediante cartografía antigénica.
- 4) Realizar estudios sobre las implicaciones de los cambios aminoacídicos detectados en la proteína de Envoltura en la patogenia de Dengue 3.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



### CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Janaki A. Recent Trends in Dengue Virus Infection; An Analysis of Virological, Clinical and Laboratory Profiles of Patients with Dengue Virus Infection in the Center for Clinical Management of Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Sri-Lanka. *Virology & Immunology Journal* 2022; 6(3):1–8.
2. Cabrera M, Leake J, Naranjo-Torres J, Valero N, Cabrera JC, Rodríguez-Morales AJ. Dengue Prediction in Latin America Using Machine Learning and the One Health Perspective: A Literature Review. *Tropical medicine and infectious disease* 2022; 7(10).
3. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nature reviews. Disease primers* 2016; 2:16055.
4. Roy SK, Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian journal of microbiology* 2021; 67(10):687–702.
5. Fibriansah G, Lim X-N, Lok S-M. Morphological Diversity and Dynamics of Dengue Virus Affecting Antigenicity. *Viruses* 2021; 13(8).
6. Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging microbes & infections* 2018; 7(1):167.
7. Park J, Kim J, Jang Y-S. Current status and perspectives on vaccine development against dengue virus infection. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 2022; 60(3):247–54.
8. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JLN, Daly JM, Mumford JA et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science (New York, N.Y.)* 2004; 303(5656):327–32.
9. OMS. Dengue y dengue grave; 2021. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
10. Kok BH, Lim HT, Peng, Chin, Lim, Lai NS, Yee, Chiuan, Leow, Leow CH. Dengue virus infection-a review of pathogenesis,vaccines,diagnosis and therapy 2022; 324.
11. Arshi Khanam, Hector Gutiérrez-Barbosa, Kirsten E. Lyke, Joel V. Chua. Immune-Mediated Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viruses* 2022; 14(2575):19.
12. WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition; 2009.
13. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current microbiology* 2021; 78(1):17–32.
14. Maria G. Guzman, Gubler.Duane J, Izquierdo A, Martínez.Eric, Halstead SB. Dengue infection 2016.
15. Pintado Silva J, Fernandez-Sesma A. Challenges on the development of a dengue vaccine: a comprehensive review of the state of the art. *The Journal of general virology* 2023; 104(3).
16. Freedman DO. A new dengue vaccine (TAK-003) now WHO recommended in endemic areas; what about travellers? *J Travel Med* 2023; 30(7).
17. OMS. La OMS pre-califica nueva vacuna contra dengue; 2024. Available from: URL: <https://www.who.int/es/news/item/15-05-2024-who-prequalifies-new-dengue-vaccine>.
18. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview 2020; 12(8).
19. García-Romero C, Carrillo Bilbao GA, Navarro J-C, Martín-Solano S, Saegerman C. Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine. *Viruses* 2023; 15(2).



## Referencias bibliográficas

20. Reddy T, Sansom MSP. The Role of the Membrane in the Structure and Biophysical Robustness of the Dengue Virion Envelope. *Structure (London, England : 1993)* 2016; 24(3):375–82.
21. Shum D, Bhinder B, Mahida J, Radu C, Calder PA, Djaballah H. A Genome-Wide RNAi Screen Reveals Common Host–Virus Gene Signatures: Implication for Dengue Antiviral Drug Discovery. *GEN Biotechnology* 2023; 2(2):133–48.
22. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *Journal of clinical medicine* 2020; 9(1).
23. Nanaware N, Banerjee A, Mullick Bagchi S, Bagchi P, Mukherjee A. Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. *Viruses* 2021; 13(10).
24. Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludueña SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *Journal of virology* 2005; 79(11):6631–43.
25. Priscilla L. S. Boon, Ana S. Martins, Xin Ni Lim, Francisco J. Enguita, Nuno C. Santos, Peter J. Bond et al. Dengue Virus Capsid Protein Facilitates Genome Compaction and Packaging. *International Journal of Molecular Science* 2023; 24:13.
26. Michelle Felicia Lee, Yuan Seng Wu, Chit Laa Poh. Molecular Mechanisms of Antiviral Agents against Dengue Virus. *Viruses* 2023; 15(705):37.
27. Ashlie Thomas, Devina J. Thiono. Dimerization of Dengue Virus E Subunits Impacts Antibody Function and Domain Focus. *Journal of virology* 2020; (94):11.
28. Mohd Ishtiaq Anasir, Babu Ramanathan. Structure-Based Design of Antivirals against Envelope Glycoprotein of Dengue Virus. *Viruses* 2020; 12:23.
29. Sarker A, Dhama N, Gupta RD. Dengue virus neutralizing antibody: a review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement 2023.
30. Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral research* 2015; 118:148–58.
31. Nemésio H, Palomares-Jerez F, Villalaín J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1818(11):2818–30.
32. Zhao Y, Soh TS, Zheng J, Chan KWK, Phoo WW, Lee CC et al. A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication. *PLoS pathogens* 2015; 11(3):e1004682.
33. Fonseca V, Libin PJK, Theys K, Faria NR, Nunes MRT, Restovic MI et al. A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes. *PLoS neglected tropical diseases* 2019; 13(5):e0007231.
34. Wei K, Li Y. Global evolutionary history and spatio-temporal dynamics of dengue virus type 2. *Scientific reports* 2017; 7:45505.
35. Yenamandra SP, Koo C, Chiang S, Lim HSJ, Yeo ZY, Ng LC et al. Evolution, heterogeneity and global dispersal of cosmopolitan genotype of Dengue virus type 2. *Scientific reports* 2021; 11(1):13496.
36. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *The Lancet. Infectious diseases* 2017; 17(3):e88-e100.
37. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho, Miguel A. R. B., Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS microbiology reviews* 2015; 39(2):155–70.
38. Nicholls CMR, Sevvana M, Kuhn RJ. Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. *Advances in virus research* 2020; 108:33–83.
39. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; 108(5):717–25.

## Referencias bibliográficas

40. Liao M, Sánchez-San Martín C, Zheng A, Kielian M. In vitro reconstitution reveals key intermediate states of trimer formation by the dengue virus membrane fusion protein. *Journal of virology* 2010; 84(11):5730–40.
41. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature microbiology* 2020; 5(6):796–812.
42. Ferreira-de-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasit Vectors* 2018; 11(1):77.
43. Golding MAJ, Noble SAA, Khouri NK, Layne-Yarde RNA, Ali I, Sandiford SL. Natural vertical transmission of dengue virus in Latin America and the Caribbean: highlighting its detection limitations and potential significance. *Parasit Vectors* 2023; 16(1):442.
44. Chen R, Vasilakis N. Dengue-quo tu et quo vadis? *Viruses* 2011; 3(9):1562–608.
45. Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in immunology* 2014; 5:290.
46. Frasca F, Sorrentino L, Fracella M, D'Auria A, Coratti E, Maddaloni L et al. An Update on the Entomology, Virology, Pathogenesis, and Epidemiology Status of West Nile and Dengue Viruses in Europe (2018-2023). *Tropical medicine and infectious disease* 2024; 9(7).
47. Añez G, Morales-Betoulle ME, Rios M. Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. *PloS one* 2011; 6(11):e27459.
48. Allicock OM, Sahadeo N, Lemey P, Auguste AJ, Suchard MA, Rambaut A et al. Determinants of dengue virus dispersal in the Americas. *Virus evolution* 2020; 6(2):veaa074.
49. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2009; 9(4):523–40.
50. Waman VP, Kale MM, Kulkarni-Kale U. Genetic diversity and evolution of dengue virus serotype 3: A comparative genomics study. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2017; 49:234–40.
51. Amir M, Hussain A, Asif M, Ahmed S, Alam H, Moga MA et al. Full-Length Genome and Partial Viral Genes Phylogenetic and Geographical Analysis of Dengue Serotype 3 Isolates. *Microorganisms* 2021; 9(2).
52. Schmidt DJ, Pickett BE, Camacho D, Comach G, Xhaja K, Lennon NJ et al. A phylogenetic analysis using full-length viral genomes of South American dengue serotype 3 in consecutive Venezuelan outbreaks reveals a novel NS5 mutation. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2011; 11(8):2011–9.
53. OMS. Actualización Epidemiológica:Dengue en la Región de las Américas; 2023.
54. Guzmán MG. Thirty years after the Cuban hemorrhagic dengue epidemic of 1981. *MEDICC review* 2012; 14:46–51.
55. Guzman MG, Vázquez S, Álvarez M, L, José, Pelegrino, Amores PA, Pupo M et al. Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba,1970-2027 2019.
56. Rodríguez Roche R, Alvarez M, Guzmán MG, Morier L, Kourí G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9):3508–10.
57. Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *The Lancet. Infectious diseases* 2002; 2(1):33–42.
58. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Holmes EC, Bernardo L, Kouri G, Gould EA et al. Dengue virus type 3, Cuba, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(5):773–4.
59. Ladner JT, Beitzel B, Chain PSG, Davenport MG, Donaldson EF, Frieman M et al. Standards for sequencing viral genomes in the era of high-throughput sequencing. *mBio* 2014; 5(3):e01360-14.

## Referencias bibliográficas

60. Djikeng A, Halpin R, Kuzmickas R, Depasse J, Feldblyum J, Sengamalay N et al. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC genomics* 2008; 9:5.
61. Ko H-Y, Salem GM, Chang G-JJ, Chao D-Y. Application of Next-Generation Sequencing to Reveal How Evolutionary Dynamics of Viral Population Shape Dengue Epidemiology. *Frontiers in microbiology* 2020; 11:1371.
62. Mori A, Pomari E, Deiana M, Perandin F, Caldres S, Formenti F et al. Molecular techniques for the genomic viral RNA detection of West Nile, Dengue, Zika and Chikungunya arboviruses: a narrative review. *Expert review of molecular diagnostics* 2021; 21(6):591–612.
63. Djikeng A, Spiro D. Advancing full length genome sequencing for human RNA viral pathogens. *Future virology* 2009; 4(1):47–53.
64. Bleidorn C. Phylogenetic Analyses. In: Bleidorn C, editor. *Phylogenomics*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 143–72.
65. E.Krebs, Elliott S, Goldstein, Stephen T, Kilpatrick J. *Lewin's Genes XII*; 2018.
66. Salemi M, Vandamme A-M, Lemey P. *The phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. 2nd ed. Cambridge, UK, New York: Cambridge University Press; 2009.
67. Mason KA, Losos JB, Singer SR. *Concepts in modern biology*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2017.
68. Dwivedi VD, Tripathi IP, Tripathi RC, Bharadwaj S, Mishra SK. Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Briefings in functional genomics* 2017; 16(4):217–27.
69. Rossi SL, Nasar F, Cardosa J, Mayer SV, Tesh RB, Hanley KA et al. Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 4 strains. *Virology* 2012; 423(1):58–67.
70. Parameswaran P, Charlebois P, Tellez Y, Nunez A, Ryan EM, Malboeuf CM et al. Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity. *Journal of virology* 2012; 86(16):8546–58.
71. Rodriguez-Roche R, Sanchez L, Burgher Y, Rosario D, Alvarez M, Kouri G et al. Virus role during intraepidemic increase in dengue disease severity. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 2011; 11(6):675–81.
72. Bleidorn C. *Phylogenomics*. Cham: Springer International Publishing; 2017.
73. Pollett S, Melendrez MC, Maljkovic Berry I, Duchêne S, Salje H, Cummings DAT et al. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2018; 62:279–95.
74. Yang Z, Rannala B. *Molecular phylogenetics: principles and practice*. *Nature reviews. Genetics* 2012; 13(5):303–14.
75. Lam TT-Y, Hon C-C, Tang JW. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2010; 47(1):5–49.
76. Roy SS, Dasgupta R, Bagchi A. A Review on Phylogenetic Analysis: A Journey through Modern Era. *Computational Molecular Bioscience* 2014; 04(03):39–45.
77. Hasija Y. *All About Bioinformatics: From Beginner to Expert*. Elsevier; 2023.
78. Kapli P, Yang Z, Telford MJ. *Phylogenetic tree building in the genomic age* 2020.
79. Volz EM, Koelle K, Bedford T. *Viral Phylodynamics* 2013.
80. Featherstone LA, Duchene S, Vaughan TG. *Decoding the fundamental Drivers of Phylodynamic Inference* 2023; 40.
81. Baele G, A, Marc, Suchard, Rambaut A. *Emerging Concepts of Data Integration in Pathogen Phylodynamics* 2017; 66.
82. A, Leo, Featherstone, Zhang JM, Vaughan T, Duchene Sebastian. *Epidemiological inference from pathogen genomes. A review of phylodynamic model and applications* 2022.

## Referencias bibliográficas

83. Rife BD, Mavian C, Xinguang C, Ciccozzi M, Salemi M, Min J et al. Phylodynamic applications in 21 century global infectious disease research 2017.
84. Lemey P, Andrew Rambaut, J, Alexei, Drummond, Suchard MA. Bayesian phylogeography finds its roots 2009; 5.
85. Kristof Theys, Lemey P, Vandamme A-M, Baele G. Advances in Visualization Tools for Phylogenomic and Phylodynamic Studies of Viral Diseases 2019.
86. Xiang C-Y, Gao F, Lei H-P, Hu Y, Zhang H, Zou H et al. Using Phylosuite for molecular phylogeny and tree-based analyses 2023.
87. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Haeseler A von, Jermin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 2017; 14(6):587–9.
88. Xia X, Wang Z, Salemi M, Chen L, Wang Y. An index of substitution saturation and its application. *Molecular phylogenetics and evolution* 2003; 26:1–7.
89. Xia X. DAMBE 7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular biology and evolution* 2018; 35(6):1550.
90. Schmidt HA, VHA. Maximum-likelihood analysis using TREE-PUZZLE. *Current protocols in bioinformatics* 2007; 17(1):6.
91. Suchard MA, Philippe Lemey, Baele G, Ayres DL, J, Alexei, Drummond, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 2018.
92. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian Phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution* 2012; 29(8):1969–73.
93. Baele G LP. Bayesian evolutionary model testing in the phylogenomics era: matching model complexity with computational efficiency. *Bioinformatics* 2013; 29(16):1970–9.
94. Vladimir N Minin, Erik W Bloomquist, Marck A Suchard. Smooth skyride through a rough sky: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Molecular biology and evolution* 2008; 25(7):1459–71.
95. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *System Biology* 2018; 67(5).
96. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research* 2021; 49(W1):W293–W296.
97. Nahata KD, Bielejec F, Monetta J, Dellicour S, Rambaut A, Suchard MA et al. SPREAD 4: online visualisation of pathogen phylogeographic reconstructions. *Virus evolution* 2022; 8(2):veac088.
98. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS genetics* 2012; 8(7):e1002764.
99. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci* 2018; 27(1):129–34.
100. Ivanisenko NV, Shashkova TI, Shevtsov A, Sindeeva M, Umerenkov D, Kardymon O. SEMA 2.0: web-platform for B-cell conformational epitopes prediction using artificial intelligence. *Nucleic Acids Res* 2024; 52(W1):W533–W539.
101. World Health Organization. Dengue and severe dengue; 2022. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/>.
102. Aquino VH, Amarilla AA, Alfonso HL, Batista WC, Figueiredo LTM. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. *PloS one* 2009; 4(10):e7299.
103. Hill V, Cleemput S, Pereira JS, Gifford RJ, Fonseca V, Tegally H et al. A new lineage nomenclature to aid genomic surveillance of dengue virus. *PLoS Biology* 2024; 22(9):e3002834.

## Referencias bibliográficas

104. Lázaro L, Winter D, Toancha K, Borges A, Gonçalves A, Santos A et al. Phylogenomics of Dengue Virus Isolates Causing Dengue Outbreak, São Tomé and Príncipe, 2022. *Emerging infectious diseases* 2024; 30(2):384–6.
105. Akram A. 29-30 Dengue outbreak 2022 in Bangladesh 2023; 2:29–30.
106. Shirin T, Muraduzzaman AKM, Alam AN, Sultana S, Siddiqua M, Jony MHK et al. The largest dengue outbreak of the decade with high fatality may be due to re-emergence of DEN-3 serotype in Dhaka, Bangladesh necessitate immediate public health attention. *New Microbes and New Infections* 2019; 29.
107. Titir SR, Paul SK, Ahmed S, Haque N, Nasreen SA, Hossain KS et al. Nationwide Distribution of Dengue Virus Type 3 (DENV-3) Genotype I and Emergence of DENV-3 Genotype III during the 2019 Outbreak in Bangladesh. *Tropical medicine and infectious disease* 2021; 6(2).
108. Rahim R, Hasan A, Phadungsombath J, Hasan N, Ara N, Biswas SM et al. Genetic Analysis of Dengue Virus in Severe and Non-Severe Cases in Dhaka, Bangladesh, in 2018-2022. *Viruses* 2023; 15(5).
109. Alagarasu K, Patil JA, Kakade MB, More AM, Yogesh B, Newase P et al. Serotype and genotype diversity of dengue viruses circulating in India: a multi-centre retrospective study involving the Virus Research Diagnostic Laboratory Network in 2018. *Int J Infect Dis* 2021; 111:242–52.
110. Edgerton SV, Thongsripong P, Wang C, Montaya M, Balmaseda A, Harris E et al. Evolution and epidemiologic dynamics of dengue virus in Nicaragua during the emergence of chikungunya and Zika viruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2021; 92:104680.
111. Jones FK, Morrison AM, Santiago GA, Rysava K, Zimler RA, Heberlein LA et al. Introduction and Spread of Dengue Virus 3, Florida, USA, May 2022-April 2023. *Emerging infectious diseases* 2024; 30(2):376–9.
112. Díaz G. *Molecular epidemiology of dengue viruses in Cuba, 2009-2014*. Havana: University of Havana 2014.
113. Featherstone LA, Di Giallonardo F, Holmes EC, Vaughan TG, Duchêne S. Infectious disease phylodynamics with occurrence data. *Methods Ecol Evol* 2021; 12(8):1498–507.
114. Jagtap S, Pattabiraman C, Sankaradoss A, Krishna S, Roy R. Evolutionary dynamics of dengue virus in India. *PLoS pathogens* 2023; 19(4):e1010862.
115. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, Silva AM de. Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):800–9.
116. Uzategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *The Journal of general virology* 2003; 84(Pt 6):1569–75.
117. Aquino JDJD, Tang W-F, Ishii R, Ono T, Eshita Y, Aono H et al. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res* 2008; 137(2):266–70.
118. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Alvarez M, Rodríguez R, Kourí G et al. [Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas]. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996; 121(2):102–10.
119. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2010; 82(1):128–35.
120. Sasmono RT, Santoso MS. Movement dynamics: reduced dengue cases during the COVID-19 pandemic. *The Lancet. Infectious diseases* 2022; 22(5):570–1.
121. Bennett SN, Drummond AJ, Kapan DD, Suchard MA, Muñoz-Jordán JL, Pybus OG et al. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Molecular biology and evolution* 2010; 27(4):811–8.
122. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in microbiology* 2014; 22(3):138–46.

## Referencias bibliográficas

123. Stica CJ, Barrero RA, Murray RZ, Devine GJ, Phillips MJ, Frentiu FD. Global Evolutionary History and Dynamics of Dengue Viruses Inferred from Whole Genome Sequences. *Viruses* 2022; 14(4).
124. Paz-Bailey G, Adams LE, Deen J, Anderson KB, Katzelnick LC. Dengue. *Lancet* 2024; 403(10427):667–82.
125. Allicock OM, Lemey P, Tatem AJ, Pybus OG, Bennett SN, Mueller BA et al. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Molecular biology and evolution* 2012; 29(6):1533–43.
126. Taylor-Salmon E, Hill V, Paul LM, Koch RT, Breban MI, Chaguza C et al. Travel surveillance uncovers dengue virus dynamics and introductions in the Caribbean. *medRxiv* 2023.
127. U.S. Embassy in Cuba. Health alert for U.S. citizens in Cuba on dengue fever; 2023. Available from: URL: <https://cu.usembassy.gov/health-alert-for-u-s-citizens-in-cuba-on-dengue-fever>.
128. Naveca FG, Santiago GA, Maito RM, Ribeiro Meneses CA, do Nascimento VA, Souza VC de et al. Reemergence of Dengue Virus Serotype 3, Brazil, 2023. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7):1482–4.
129. Cerpas C, Vásquez G, Moreira H, Juarez JG, Coloma J, Harris E et al. Introduction of New Dengue Virus Lineages of Multiple Serotypes after COVID-19 Pandemic, Nicaragua, 2022. *Emerg. Infect. Dis.* 2024; 30(6):1203–13.
130. Simmonds P, Tuplin A, Evans DJ. Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus evolution and host persistence. *RNA* 2004; 10(9):1337–51.
131. Wilson BA, Garud NR, Feder AF, Assaf ZJ, Pennings PS. The population genetics of drug resistance evolution in natural populations of viral, bacterial and eukaryotic pathogens. *Mol Ecol* 2016; 25(1):42–66.
132. Tan K-K, Zulkifli N-I, Sulaiman S, Pang S-P, NorAmdan N, MatRahim N et al. Emergence of the Asian lineage dengue virus type 3 genotype III in Malaysia. *BMC evolutionary biology* 2018; 18(1):58.
133. Patil JA, Alagarasu K, Kakade MB, More AM, Gadekar KA, Jadhav SM et al. Emergence of dengue virus type 1 and type 3 as dominant serotypes during 2017 in Pune and Nashik regions of Maharashtra, Western India. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2018; 66:272–83.
134. Nascimento EJM, Mailliard RB, Khan AM, Sidney J, Sette A, Guzman N et al. Identification of conserved and HLA promiscuous DENV3 T-cell epitopes. *PLoS neglected tropical diseases* 2013; 7(10):e2497.
135. Bergamaschi G, Fassi EMA, Romanato A, D'Annessa I, Odinolfi MT, Brambilla D et al. Computational Analysis of Dengue Virus Envelope Protein (E) Reveals an Epitope with Flavivirus Immunodiagnostic Potential in Peptide Microarrays. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(8).
136. Amarilla AA, Almeida FT de, Jorge DM, Alfonso HL, Castro-Jorge LA de, Nogueira NA et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Virology* 2009; 6:113.
137. Hyatt JG, Prévost S, Devos JM, Mycroft-West CJ, Skidmore MA, Winter A. Molecular Changes in Dengue Envelope Protein Domain III upon Interaction with Glycosaminoglycans. *Pathogens* 2020; 9(11).
138. Ubol S, Phuklia W, Kalayanaroj S, Modhiran N. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *The Journal of infectious diseases* 2010; 201(6):923–35.
139. Martinez DR, Metz SW, Baric RS. Dengue Vaccines: The Promise and Pitfalls of Antibody-Mediated Protection. *Cell Host Microbe* 2021; 29(1):13–22. Available from: URL: <http://www.cell.com/article/S1931312820306739/pdf>.
140. Chaudhury S, Gromowski GD, Ripoll DR, Khavrutskii IV, Desai V, Wallqvist A. Dengue virus antibody database: Systematically linking serotype-specificity with epitope mapping in dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases* 2017; 11(2):e0005395.
141. Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Rouvinski A et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol* 2015; 16(2):170–7.

## Referencias bibliográficas

142. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. *J Virol* 2005; 79(2):1223–31.
143. Wahala, Wahala M. P. B., Donaldson EF, Alwis R de, Accavitti-Loper MA, Baric RS, Silva AM de. Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses. *PLoS pathogens* 2010; 6(3):e1000821.
144. Brien JD, Austin SK, Sukupolvi-Petty S, O'Brien KM, Johnson S, Fremont DH et al. Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. *J Virol* 2010; 84(20):10630–43.
145. Zulueta A, Martín J, Hermida L, Alvarez M, Valdés I, Prado I et al. Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res* 2006; 121(1):65–73.
146. Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Bustos Arriaga J, Green A, James SL et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 349(6254):1338–43.
147. Campos TDL, Durães-Carvalho R, Rezende AM, Carvalho OV de, Kohl A, Wallau GL et al. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. *Int J Genomics* 2018; 2018:6941735.
148. Wolf J, Souza AP, Schardosim RF, Pille A, Maccari J, Mutlaq M et al. Molecular evolution of dengue virus: Bayesian approach considering 1,581 whole genome sequences from January 1944 to July 2022; 2023.
149. Lue AM, Richards-Dawson M-AEH, Gordon-Strachan GM, Kodilinye SM, Dunkley-Thompson JAT, James-Powell TD et al. Severity and Outcomes of Dengue in Hospitalized Jamaican Children in 2018-2019 During an Epidemic Surge in the Americas. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9:889998.
150. Organización Panamericana de la Salud. PLISA Plataforma de Información de Salud para las Américas, Portal de Indicadores de dengue: OPS/OMS; 2024. Available from: URL: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue.html>.

## **IX. ANEXOS**





**Anexo 1. Tabla Suplementaria 1.**

Resumen de las secuencias empleadas en el estudio. Se especifica el número de acceso a GenBank, País y Año.

<b>Número de Acceso GenBank</b>	<b>País</b>	<b>Año</b>
LC436661	Bangladesh	2027
LC436663	Bangladesh	2017
LC436665	Bangladesh	2017
OQ826973	Bangladesh	2021
OQ827009	Bangladesh	2022
OQ827013	Bangladesh	2022
OQ827014	Bangladesh	2022
OQ827015	Bangladesh	2022
DQ177886	Bolivia	2003
DQ118882	Brazil	2007
FJ850079	Brazil	2003
OQ706228	Brazil	2023
1033	CUBA	2022
1052	CUBA	2022
1144	CUBA	2022
1166	CUBA	2022
1191	CUBA	2022
1206	CUBA	2022
1255	CUBA	2022
1261	CUBA	2022
147	CUBA	2022
181	CUBA	2022
234	CUBA	2022
280	CUBA	2022
297	CUBA	2022
318	CUBA	2022
350	CUBA	2022
415	CUBA	2022
419	CUBA	2022
502	CUBA	2022
530	CUBA	2022
538	CUBA	2022
629	CUBA	2022
703	CUBA	2022
705	CUBA	2022
MG840490	China	2015
MG840492	China	2015
MG840494	China	2015
MG840496	China	2015
MG840505	China	2016
MG840514	China	2017
MG840515	China	2017
MG840516	China	2017
KX926478	Colombia	2009
KX926479	Colombia	2009

KX926480	Colombia	2010
MK040425	Colombia	2013
MK040426	Colombia	2013
MK040427	Colombia	2013
MK614071	Colombia	2013
MZ505712	Colombia	216
OQ821502	Colombia	2021
MZ505714	Costa Rica	2013
MH346207	Ecuador	2014
OQ579499	Filipinas	2015
PP234923	Filipinas	2019
PP234925	Filipinas	2018
PP234926	Filipinas	2018
OR229980	Guadalupe	2020
OR229981	Guadalupe	2020
MZ310551	India	2019
MZ505718	India	2018
OP164332	India	2019
OP164333	India	2019
OP164335	India	2019
OP164336	India	2018
OP164341	India	2019
OP895705	India	2018
OP921002	India	2022
OQ721959	India	2022
OQ721962	India	2022
PP087307	India	2021
MH036413	Indonesia	2016
MH036414	Indonesia	2015
MH036415	Indonesia	2016
MT122198	Indonesia	2017
MT122199	Indonesia	2017
MT122200	Indonesia	2017
ON229519	Indonesia	2020
LC461024	Maldivas	2019
OR229978	Martinica	2020
OR229983	Martinica	2020
OR229984	Martinica	2020
MH936415	Mexico	2016
MH936416	Mexico	2016
MH936417	Mexico	2016
OM417340	Mexico	2021
HQ541802	Nicaragua	2009
HQ541803	Nicaragua	2009
HQ541804	Nicaragua	2009
KF973478	Nicaragua	2012
KF973486	Nicaragua	2012
KF973487	Nicaragua	2011
OQ132878	Nigeria	2022
DQ341209	Panama	1994
EU045322	Paraguay	2004
EU045324	Paraguay	2006

EU045325	Paraguay	2006
DQ177888	Perú	2004
KJ189298	Perú	2008
KJ189300	Perú	2008
KJ189301	Perú	2008
EU529692	Puerto Rico	2006
EU596494	Puerto Rico	2007
EU854298	Puerto Rico	2002
OQ836206	Puerto Rico	2022
OQ836208	Puerto Rico	2022
MW288037	Senegal	2018
MW288040	Senegal	2018
OR394023	Siri Lanka	2019
OR394043	Siri Lanka	2019
OR394048	Siri Lanka	2019
OR394052	Siri Lanka	2020
OR394054	Siri Lanka	2020
KU728208	Suriname	2005
KU728209	Suriname	2005
KU728210	Suriname	2005
MG840498	Tailandia	2015
MZ636817	Tailandia	2020
MZ636818	Tailandia	2020
MZ636819	Tailandia	2020
OQ445927	Estados Unidos	2022
OQ445948	Estados Unidos	2022
OQ445953	Estados Unidos	2022
DQ367721	Venezuela	2003
KF955481	Venezuela	2007
KF955484	Venezuela	2008
OR821726	Nepal	2022

**Anexo 2.** Tabla suplementaria II.

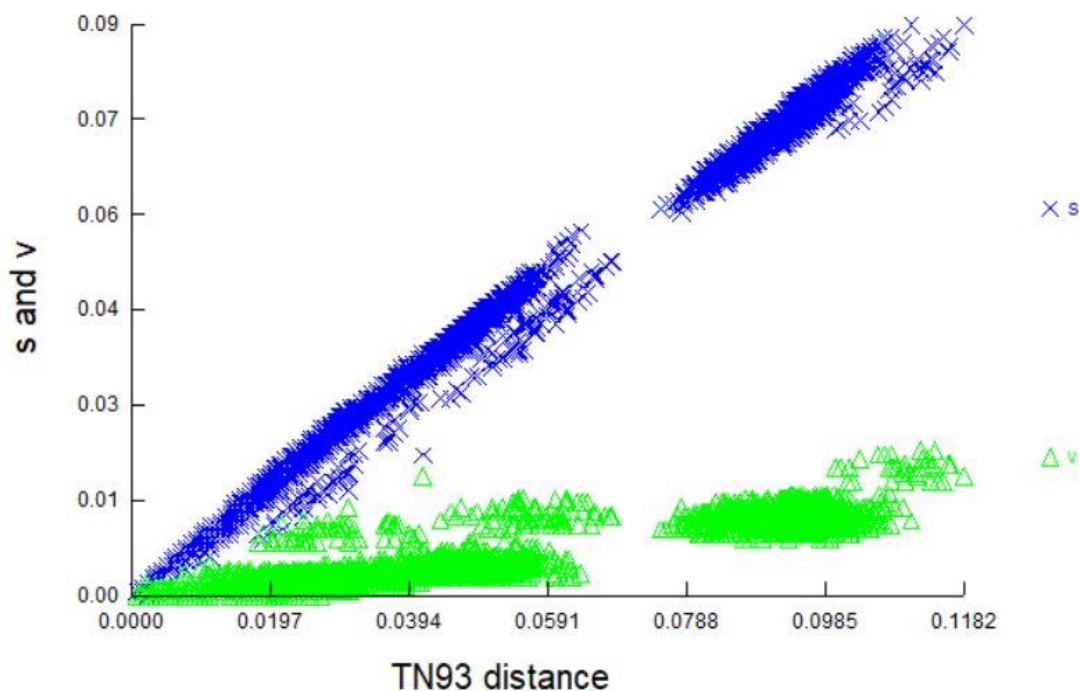
Resultados de la selección de modelos evolutivos en ModelFinder

**AIC** (Criterio de información de Akaike)**AICc** (Criterio de información de Akaike corregido)**BIC** (Criterio de información de Bayesiano)

Modelo	LogL	AIC	w-AIC	AICc	w-AICc	BIC	w-BIC
TIM2+F+G4	-7425.0486	15294.0971	-0.0177	15373.3067	-0.0484	16469.5996	0.6134
TIM2+F+I+G4	-7422.0979	15290.1957	0.1242	15370.1829	0.2307	16470.9933	0.3056
TN+F+G4	-7432.2091	15306.4182	0	15384.8546	-0.0002	16476.6256	-0.0183
TIM3+F+G4	-7428.6295	15301.259	-0.0005	15380.4686	-0.0013	16476.7615	-0.0171
GTR+F+G4	-7421.4841	15290.9683	0.0844	15371.7375	0.106	16477.0609	-0.0147
TN+F+I+G4	-7429.3075	15302.615	-0.0002	15381.8246	-0.0007	16478.1175	-0.0087
TIM3+F+I+G4	-7425.6634	15297.3268	-0.0035	15377.314	-0.0065	16478.1243	-0.0086
GTR+F+I+G4	-7418.4655	15286.9311	0.6352	15368.4868	0.5387	16478.3188	-0.0078
TIM2+F+R2	-7426.4285	15298.857	-0.0016	15378.8442	-0.003	16479.6546	-0.004
TIM+F+G4	-7431.7329	15307.4658	0	15386.6754	-0.0001	16482.9683	-0.0008
TIM+F+I+G4	-7428.8273	15303.6545	-0.0001	15383.6417	-0.0003	16484.4521	-0.0004
TIM2+F+R3	-7421.8505	15293.7011	-0.0215	15375.2568	-0.0183	16485.0888	-0.0003
TIM3+F+R2	-7430.0519	15306.1038	0	15386.091	-0.0001	16486.9014	-0.0001
TN+F+R2	-7433.782	15311.564	0	15390.7736	0	16487.0665	-0.0001
GTR+F+R2	-7423.1269	15296.2538	-0.006	15377.8095	-0.0051	16487.6415	-0.0001
TIM3+F+R3	-7425.5483	15301.0966	-0.0005	15382.6523	-0.0005	16492.4843	0
GTR+F+R3	-7418.2711	15290.5422	0.1044	15373.6844	-0.0401	16492.52	0
TN+F+R3	-7429.3165	15306.6331	0	15387.4023	0	16492.7257	0
TIM+F+R2	-7433.3283	15312.6567	0	15392.6438	0	16493.4542	0
TIM+F+R3	-7428.6662	15307.3323	0	15388.8881	0	16498.72	0
TIM2e+G4	-7451.9262	15341.8524	0	15418.7558	0	16501.4698	0
TIM2e+I+G4	-7448.5796	15337.1592	0	15414.8269	0	16502.0716	0
SYM+G4	-7447.4887	15336.9774	0	15415.4138	0	16507.1848	0
SYM+I+G4	-7444.0821	15332.1643	0	15411.3739	0	16507.6668	0
TIM2e+R2	-7453.0689	15346.1379	0	15423.8056	0	16511.0503	0
TIM3e+G4	-7456.7823	15351.5645	0	15428.468	0	16511.1819	0
TIM3e+I+G4	-7453.5005	15347.001	0	15424.6687	0	16511.9134	0
TIM2+F+I	-7446.606	15337.2121	0	15416.4217	0	16512.7146	0
TNe+G4	-7461.2454	15358.4908	0	15434.6344	0	16512.8131	0
TNe+I+G4	-7458.0618	15354.1235	0	15431.0269	0	16513.7409	0

**Anexo 3. Figura suplementaria I**

Prueba de saturación y ruido realizada en Dambe 7.0. Las transiciones (azul) y transversiones(verdes) contra distancia génica para las tres posiciones en los codones (+1, +2, +3)



**Tabla suplementaria 3.** Prueba de Xia y colaboradores para saturación.

**Iss:** Índice de saturación

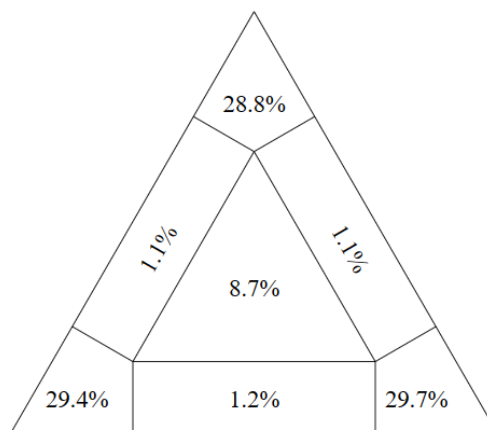
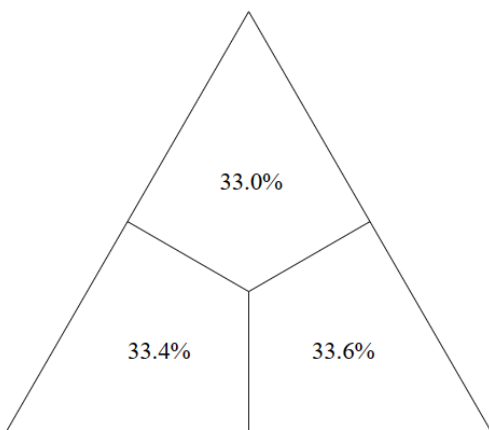
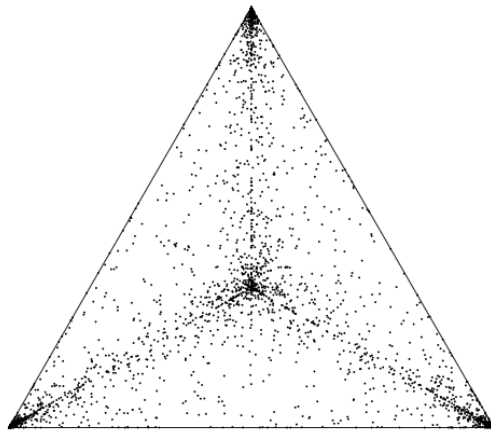
**Iss.cSym:** Índice de saturación crítica para prueba simétrica

**Iss.cAsym:** Índice de saturación crítica para prueba asimétrica

NumOTU	Iss	Iss.cSym	T	DF	P	Iss.cAsym	T	DF	P
4	0.057	0.833	126.302	1472	0.0000	0.803	121.349	1472	0.0000
8	0.059	0.808	112.277	1472	0.0000	0.708	97.245	1472	0.0000
16	0.057	0.792	112.325	1472	0.0000	0.607	84.151	1472	0.0000
32	0.058	0.774	108.571	1472	0.0000	0.489	65.407	1472	0.0000
<b>Diferencias Significativas</b>									
			<b>Si</b>			<b>No</b>			
	Iss>Iss.c		Poca Saturación			Saturación sustancial			
	Iss<Iss.c		Secuencias no utilizables			Pobre para filogenética			

**Anexo 3.** Figura suplementaria 2.

Mapeos de Verosimilitud para las secuencias del gen E realizados en TreePuzzle ver 5.3.



## Anexo 4. Tabla suplementaria 4.

Rutas de conexiones epidemiológicas con BF>3. Se puntualiza los sitios de origen, destino. En color verde las rutas de trasmisión con origen y destino en América(verde), asiática(rojo) e intercontinentales(azul).

Desde	Hasta	BF
CUBA	USA	1550.789534
CUBA	Puerto Rico	358.7174335
Brazil	Puerto Rico	300.438353
China	Indonesia	257.9881586
Guadalupe	Martinica	96.17306098
China	Filipinas	91.06350894
China	Tailandia	82.16584072
Costa Rica	Nicaragua	59.12464779
México	Nicaragua	43.5277731
Bolivia	Paraguay	41.08935491
CUBA	Nigeria	32.87349113
Brazil	Paraguay	25.57667088
India	Siri Lanka	24.44110225
Bangladesh	Indonesia	22.74871662
Colombia	Venezuela	21.82749192
Brazil	Venezuela	20.46031275
Martinica	Senegal	20.31516547
Ecuador	Venezuela	18.79984432
Colombia	Nicaragua	18.24103775
CUBA	India	15.90330851
Paraguay	Suriname	9.81957941
Guadalupe	Maldivas	8.434890362
Indonesia	Siri Lanka	8.186194892
Panamá	Puerto Rico	7.527846924
India	Martinica	7.300464915
Brazil	Panamá	6.713614264
Guadalupe	India	6.145829951
Brazil	Colombia	5.669080185
Brazil	Suriname	5.230339757
Paraguay	Puerto Rico	5.216546279
China	Siri Lanka	5.134243015
Maldivas	Martinica	4.891948361
India	Maldivas	4.682208167
Costa Rica	México	4.566482534

<b>Brazil</b>	Perú	4.464943126
<b>Colombia</b>	Perú	4.464943126
<b>Colombia</b>	Ecuador	4.277844191
<b>India</b>	USA	4.143294562
<b>Puerto Rico</b>	Venezuela	3.927813838
<b>Nigeria</b>	USA	3.581072152
<b>Perú</b>	Venezuela	3.281548956
<b>Guadalupe</b>	Senegal	3.120024274



## Anexo 5. Tabla suplementaria 5.

Resultado de la selección episódica por el método MEME con un valor de corte (p-value= 0.05)

Site	Partition	alpha	Beta <sup>1</sup>	P <sup>1</sup>	Beta <sup>+</sup>	P <sup>+</sup>	LRT	p-value	# branches under selection	Total branch length	MEME LogL	FEL LogL	FEL alpha	FEL beta
1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
2	1	5.01	0	0	1.62	1	0	0.67	0	0	-8.3	-8.3	1	5
3	1	0	0	0	3.04	1	0.96	0.33	1	0	-13.64	-13.63	0.99	0
4	1	11.16	0	0	2.85	1	0	0.67	0	0	-21.44	-21.44	1	11.31
5	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
6	1	16.77	1.3	0	1.09	1	0	0.67	0	0	-29.75	-29.75	1	16.66
7	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
8	1	5.24	0.02	0	6.67	1	0	0.67	1	0	-23.89	-23.9	1	5.29
9	1	20.13	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-21.34	-21.34	1	20.12
10	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
11	1	2.45	0	0	0.81	1	0	0.67	0	0	-9.81	-9.81	1	2.43
12	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
13	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
14	1	15.57	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-30.82	-30.82	1	15.49
15	1	2.97	0.04	0	5.72	1	0	0.65	1	0	-22.35	-22.35	1	2.97
16	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
17	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
18	1	8.62	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-22.4	-22.4	1	8.58
19	1	16.03	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-23.84	-23.84	1	16.22
20	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
21	1	0	0	0	1.25	1	1.01	0.32	1	0	-10.39	-10.39	1	0
22	1	0	0	0	1.85	1	1.04	0.31	1	0	-11.07	-11.07	1	0
23	1	3.67	0	0	1.36	1	0	0.67	0	0	-9.55	-9.55	1	3.72
24	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
25	1	8.55	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-28.78	-28.78	1	8.51
26	1	14.96	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-14.58	-14.58	1	14.9
27	1	8.33	0	0	1.33	1	0	0.67	0	0	-19.71	-19.71	1	8.42
28	1	5.92	0	0	1.68	1	0	0.67	0	0	-17.22	-17.22	1	6
29	1	3.68	0	0	1.4	1	0	0.67	0	0	-8.77	-8.77	1	3.67
30	1	2.41	0	0	1.08	1	0	0.67	0	0	-11.35	-11.35	1	2.4
31	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
32	1	13.23	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-28.11	-28.11	1	13.2
33	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
34	1	0.08	0.04	0	1.84	1	0.01	0.64	0	0	-11.37	-11.37	1	0.07
35	1	8.41	0	0	1.4	1	0	0.67	0	0	-20.51	-20.51	1	8.37
36	1	8.62	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-16.2	-16.2	1	8.58
37	1	2.64	0	0	1.15	1	0	0.67	0	0	-9.66	-9.66	1	2.64

## Anexos

38	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
39	1	10.51	0	0	1.48	1	0	0.67	0	0	-27.45	-27.45	1	10.44
40	1	7.2	0	0	5.91	1	0	0.67	0	0	-23.32	-23.27	0.96	7.43
41	1	4.95	0	0	1.3	1	0	0.67	0	0	-20.52	-20.52	1	4.87
42	1	16.69	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-26.28	-26.28	1	16.57
43	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
44	1	4.3	0	0	1.51	1	0	0.67	0	0	-9.48	-9.48	1	4.29
45	1	6.29	0	0	1.52	1	0	0.67	0	0	-16.87	-16.87	1	6.21
46	1	4.17	0	0	1.04	1	0	0.67	0	0	-9.07	-9.07	1	4.24
47	1	4.3	0	0	1.51	1	0	0.67	0	0	-10.03	-10.03	1	4.29
48	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
49	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
50	1	4.63	0	0	1.02	1	0	0.67	0	0	-13.01	-13.01	1	4.62
51	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
52	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
53	1	6.15	0	0	1.34	1	0	0.67	0	0	-22.67	-22.67	1	6.13
54	1	3.93	0	0	1.45	1	0	0.67	0	0	-8.63	-8.63	1	3.92
55	1	2.27	0	0	1.04	1	0	0.67	0	0	-9.8	-9.8	1	2.27
56	1	2.96	0	0	0.97	1	0	0.67	0	0	-14	-14	1	2.91
57	1	4.18	0	0	1.45	1	0	0.67	0	0	-8.48	-8.48	1	4.24
58	1	9.25	0	0	1.44	1	0	0.67	0	0	-10.94	-10.94	1	9.2
59	1	7.46	0	0	2.35	1	0	0.67	0	0	-30.88	-30.88	1	7.44
60	1	2.88	0	0	1.18	1	0	0.67	0	0	-10.8	-10.8	1	2.91
61	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
62	1	4.27	0	0	1.25	1	0	0.67	0	0	-9.34	-9.34	1	4.29
63	1	11.7	0	0	4.01	1	0	0.67	0	0	-15.35	-15.35	1	11.64
64	1	5.5	0	0	8.25	1	0.02	0.63	1	0	-15.84	-15.82	0.98	5.5
65	1	4.69	0	0	1.24	1	0	0.67	0	0	-13.98	-13.98	1	4.65
66	1	9.46	0	0	1.44	1	0	0.67	0	0	-23.64	-23.64	1	9.41
67	1	8.37	0.29	0	6.53	1	0	0.67	0	0	-27.42	-27.42	1	8.24
68	1	16.04	1.06	0	1.08	1	0	0.67	0	0	-18.79	-18.78	1	16.07
69	1	0	0	0	1.12	1	0.51	0.43	1	0	-12.35	-12.35	1	0
70	1	6.16	0	0	1.71	1	0	0.67	0	0	-16.32	-16.32	1	6.24
71	1	2.65	0	0	0.78	1	0	0.67	0	0	-8.87	-8.87	1	2.49
72	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
73	1	8.96	0	0	1.55	1	0	0.67	0	0	-11.48	-11.48	1	9.08
74	1	5.13	0	0	1.28	1	0	0.67	0	0	-11.88	-11.88	1	5.08
75	1	10.73	0	0	2.79	1	0	0.67	0	0	-26.77	-26.77	1	10.65
76	1	7.12	0	0	1.32	1	0	0.67	0	0	-15.96	-15.97	1	7.24
77	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
78	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
79	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
80	1	7.59	0	0	1.76	1	0	0.67	0	0	-13.24	-13.24	1	7.44
81	1	3.99	0.13	0	6.53	1	0.38	0.46	0	0	-36.02	-36.02	1	3.95
82	1	9.89	0	0	3.26	1	0	0.67	0	0	-25.56	-25.56	1	9.85

## Anexos

83	1	0	0	0	1.88	1	0.8	0.36	1	0	-13.32	-13.31	0.99	0
84	1	4.38	0	0	1.53	1	0	0.67	0	0	-9.42	-9.42	1	4.37
85	1	4.24	0	0	1.5	1	0	0.67	0	0	-9.65	-9.65	1	4.23
86	1	4.07	0	0	1.1	1	0	0.67	0	0	-9.58	-9.58	1	4.29
87	1	2.64	0	0	1.15	1	0	0.67	0	0	-11.05	-11.05	1	2.64
88	1	14.38	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-16.58	-16.58	1	13.66
89	1	5.33	0	0	1.61	1	0	0.67	0	0	-15.43	-15.43	1	5.39
90	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
91	1	7.34	0	0	1.38	1	0	0.67	0	0	-14.88	-14.88	1	7.59
92	1	7.62	0	0	1.36	1	0	0.67	0	0	-20.42	-20.42	1	7.59
93	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
94	1	15.28	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-22.75	-22.75	1	15.21
95	1	3.96	0	0	1.17	1	0	0.67	0	0	-10.29	-10.29	1	4.07
96	1	2.68	0	0	1.13	1	0	0.67	0	0	-10.77	-10.77	1	2.71
97	1	11.84	0	0	2.83	1	0	0.67	0	0	-18.49	-18.49	1	12.01
98	1	5.28	0	0	1.6	1	0	0.67	0	0	-15.11	-15.11	1	5.33
99	1	4.75	0	0	1.59	1	0	0.67	0	0	-12.88	-12.88	1	4.74
100	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
101	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
102	1	7.5	0	0	1.34	1	0	0.67	0	0	-13.6	-13.6	1	7.64
103	1	5.33	0	0	1.61	1	0	0.67	0	0	-13.93	-13.93	1	5.39
104	1	4.71	0	0	1.84	1	0	0.67	0	0	-17.88	-17.88	1	4.63
105	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
106	1	1.92	0	0	0.84	1	0	0.67	0	0	-11.84	-11.84	1	1.92
107	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
108	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
109	1	4.63	0	0	1.33	1	0	0.67	0	0	-14.59	-14.59	1	4.56
110	1	8.75	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-14.67	-14.67	1	8.7
111	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
112	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
113	1	3.91	0	0	1.13	1	0	0.67	0	0	-15.2	-15.2	1	3.84
114	1	3.96	0	0	1.45	1	0	0.67	0	0	-9.59	-9.59	1	3.95
115	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
116	1	7.77	0	0	1.37	1	0	0.67	0	0	-15.58	-15.58	1	7.73
117	1	8.23	0	0	2.3	1	0	0.67	0	0	-13.58	-13.58	1	8.02
118	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
119	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
120	1	5.41	0	0	1.43	1	0	0.67	0	0	-10.44	-10.44	1	5.35
121	1	5.29	0	0	1.39	1	0	0.67	0	0	-13.24	-13.24	1	5.21
122	1	14.57	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-43.18	-43.18	1	14.48
123	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
124	1	32.4	8.25	0	9.7	1	0	0.67	0	0	-80.28	-80.29	1	32.22
125	1	0	0	0	1.92	1	0.15	0.55	1	0	-11.3	-11.29	0.99	0
126	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
127	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

## Anexos

128	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
129	1	31.36	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-40.87	-40.87	1	31.63
130	1	6.95	0	0	1.54	1	0	0.67	0	0	-16.49	-16.49	1	6.94
131	1	15.36	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-19.28	-19.28	1	15.19
132	1	0	0	0	4.31	1	2.87	0.11	2	0	-21.29	-21.29	1	0
133	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
134	1	5.33	0	0	1.61	1	0	0.67	0	0	-13.99	-13.99	1	5.39
135	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
136	1	16.5	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-18.12	-18.12	1	16.47
137	1	2.65	0	0	0.78	1	0	0.67	0	0	-10.56	-10.56	1	2.49
138	1	13.66	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-26.57	-26.57	1	13.8
139	1	10.34	0	0	694.03	1	1.22	0.28	1	0	-28.88	-28.23	0.52	9.77
140	1	2.4	0.03	0	2.52	1	0	0.66	0	0	-27.33	-27.33	1	2.38
141	1	9.79	0	0	2.1	1	0	0.67	0	0	-25.18	-25.18	1	9.73
142	1	3.89	0	0	1.44	1	0	0.67	0	0	-10.83	-10.83	1	3.88
143	1	3.67	0	0	1.36	1	0	0.67	0	0	-9.64	-9.64	1	3.72
144	1	11.41	0	0	2.71	1	0	0.67	0	0	-23.14	-23.14	1	11.36
145	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
146	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
147	1	2.59	0	0	1.14	1	0	0.67	0	0	-9.66	-9.66	1	2.59
148	1	5.29	0	0	1.39	1	0	0.67	0	0	-10.47	-10.47	1	5.21
149	1	8.16	0	0	1.32	1	0	0.67	0	0	-21.88	-21.88	1	8.24
150	1	0	0	0	7.03	1	1.14	0.29	1	0	-12.43	-12.42	0.99	0
151	1	3.59	0	0	1.38	1	0	0.67	0	0	-11.76	-11.76	1	3.59
152	1	3.89	0	0	1.44	1	0	0.67	0	0	-9.68	-9.68	1	3.88
153	1	2.41	0	0	1.08	1	0	0.67	0	0	-9.18	-9.18	1	2.4
154	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
155	1	7.46	0	0	1.58	1	0	0.67	0	0	-13.62	-13.62	1	7.44
156	1	4.33	3.12	0	3.29	1	0	0.67	0	0	-17.15	-17.15	1	4.38
157	1	8.06	0	0	8.82	1	0	0.66	1	0	-24.32	-24.28	0.96	8.25
158	1	10.71	0	0	16.83	1	0.08	0.58	1	0	-43.68	-43.6	0.92	10.28
159	1	11.46	0	0	1.33	1	0	0.67	0	0	-19.17	-19.17	1	11.36
160	1	4.07	0	0	4.94	1	0.01	0.65	1	0	-19.3	-19.29	0.99	4.14
161	1	19.05	1.36	0	3.65	1	0	0.67	0	0	-31.35	-31.35	1	18.86
162	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
163	1	7.96	0	0	6.26	1	0	0.67	0	0	-23.98	-23.95	0.96	8.08
164	1	11.51	0	0	2.98	1	0	0.67	0	0	-24.76	-24.76	1	11.48
165	1	4.17	0	0	1.04	1	0	0.67	0	0	-10.9	-10.9	1	4.24
166	1	7.99	0	0	1.61	1	0	0.67	0	0	-14.06	-14.06	1	7.97
167	1	7.18	0	0	121.7	1	0.34	0.48	1	0	-21.76	-21.57	0.83	7.88
168	1	14.74	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-30.61	-30.61	1	14.68
169	1	11.08	0	0	21.17	1	0.24	0.51	1	0	-34.34	-32.9	0.24	11.21
170	1	5.37	0	0	1.09	1	0	0.67	0	0	-9.42	-9.42	1	5.35
171	1	2.29	0	0	4.08	1	0.02	0.62	1	0	-16.4	-16.39	0.98	2.29
172	1	0	0	0	5.26	1	1.66	0.22	2	0	-15.93	-15.92	0.99	0

## Anexos

173	1	6.09	0	0	1.26	1	0	0.67	0	0	-18.74	-18.74	1	6.06
174	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
175	1	16.25	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-15.11	-15.11	1	16.22
176	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
177	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
178	1	2.61	0	0	1.14	1	0	0.67	0	0	-11.09	-11.09	1	2.6
179	1	1.9	0	0	0.89	1	0	0.67	0	0	-10.58	-10.58	1	1.92
180	1	7.41	0	0	1.28	1	0	0.67	0	0	-13.98	-13.98	1	7.48
181	1	9.01	0	0	1.2	1	0	0.67	0	0	-32.93	-32.93	1	9.01
182	1	5.22	0	0	1.07	1	0	0.67	0	0	-8.32	-8.32	1	5.21
183	1	2.65	0	0	0.78	1	0	0.67	0	0	-10.45	-10.44	1	2.49
184	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
185	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
186	1	9.81	0	0	1.9	1	0	0.67	0	0	-17.38	-17.38	1	9.94
187	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
188	1	3.94	0	0	1.05	1	0	0.67	0	0	-15.24	-15.24	1	3.81
189	1	9.81	0	0	2.56	1	0	0.67	0	0	-31.41	-31.41	1	9.85
190	1	15.36	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-27.48	-27.48	1	15.19
191	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
192	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
193	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
194	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
195	1	8.43	0	0	1.55	1	0	0.67	0	0	-18.75	-18.75	1	8.65
196	1	8.16	0	0	1.86	1	0	0.67	0	0	-22.92	-22.92	1	8.22
197	1	4.83	0	0	1.02	1	0	0.67	0	0	-16.83	-16.83	1	4.79
198	1	3.87	0	0	4.94	1	0.01	0.64	1	0	-16.25	-16.23	0.98	3.97
199	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
200	1	8.62	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-13.67	-13.67	1	8.58
201	1	0	0	0	3.75	1	1.04	0.31	1	0	-13	-12.99	0.99	0
202	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
203	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
204	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
205	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
206	1	3.93	0	0	1.16	1	0	0.67	0	0	-9.08	-9.08	1	4.03
207	1	11	0	0	2.69	1	0	0.67	0	0	-21.1	-21.1	1	10.93
208	1	0	0	0	3.78	1	0.67	0.39	1	0	-11.05	-11.04	0.99	0
209	1	5.31	0	0	1.4	1	0	0.67	0	0	-9.02	-9.02	1	5.26
<b>210</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>247.15</b>	<b>1</b>	<b>5.87</b>	<b>0.02</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>-16.94</b>	<b>-14.02</b>	<b>0.05</b>	<b>0</b>
211	1	2.41	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-11.33	-11.33	1	2.43
212	1	0	0	0	1.01	1	0.69	0.38	1	0	-11.96	-11.96	1	0
213	1	8.19	0	0	1.47	1	0	0.67	0	0	-16.84	-16.84	1	8.15
214	1	1.44	0.02	0	1.75	1	0.01	0.64	0	0	-19.5	-19.5	1	1.45
215	1	3.99	0	0	62.24	1	0.25	0.51	1	0	-27.16	-27.03	0.87	3.86
216	1	7.62	1.35	0	3.57	1	0	0.67	0	0	-36.37	-36.38	1	7.68
217	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

## Anexos

218	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
219	1	3.94	0.05	0	4.28	1	0	0.65	0	0	-17.17	-17.17	1	3.79
220	1	3.9	0	0	1.4	1	0	0.67	0	0	-12.33	-12.33	1	3.95
221	1	3.84	0	0	1.43	1	0	0.67	0	0	-7.63	-7.63	1	3.84
222	1	20.92	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-36.41	-36.41	1	21
223	1	19.28	0	0	973.34	1	3.38	0.09	2	0	-38.53	-36.63	0.15	16.36
224	1	4.43	0.02	0	4.67	1	0	0.67	1	0	-16.72	-16.71	0.99	4.42
225	1	0	0	0	1.92	1	0.64	0.39	1	0	-8.85	-8.85	1	0
226	1	0	0	0	1.14	1	0.5	0.43	1	0	-9.64	-9.64	1	0
227	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
228	1	16.98	0	0	697.74	1	2.4	0.15	2	0	-40.99	-39.64	0.26	12.98
229	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
230	1	19.67	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-27	-27	1	19.72
231	1	4.09	3.56	0	3.81	1	0	0.67	0	0	-20.58	-20.58	1	4
232	1	4.57	0	0	1.56	1	0	0.67	0	0	-6.98	-6.98	1	4.56
233	1	4.09	1.69	0	2.51	1	0	0.67	0	0	-15.35	-15.35	1	4.24
234	1	2.09	0	0	0.72	1	0	0.67	0	0	-10.06	-10.06	1	2.08
235	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
236	1	3.59	0	0	1.38	1	0	0.67	0	0	-12	-12	1	3.59
237	1	7.89	1.09	0	1.32	1	0	0.67	0	0	-19.82	-19.82	1	7.96
238	1	12.29	0	0	2.88	1	0	0.67	0	0	-23.77	-23.77	1	12.36
239	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
240	1	35.64	1.85	0	1.25	1	0	0.67	0	0	-45.85	-45.85	1	35.42
241	1	7.77	0.73	0	2.72	1	0	0.67	0	0	-23.87	-23.88	1	7.71
242	1	5.47	0	0	1.32	1	0	0.67	0	0	-13.64	-13.64	1	5.42
<b>243</b>	<b>1</b>	<b>9.19</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2241.88</b>	<b>1</b>	<b>5.92</b>	<b>0.02</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>-26.03</b>	<b>-22.43</b>	<b>0.03</b>	<b>11.44</b>
244	1	10.34	0	0	2.03	1	0	0.67	0	0	-13.57	-13.57	1	10.18
245	1	5.27	0	0	1.66	1	0	0.67	0	0	-11.24	-11.24	1	5.26
246	1	5.11	2.32	0	3.82	1	0	0.67	0	0	-17.36	-17.36	1	5.34
247	1	5.73	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-9.39	-9.39	1	5.52
248	1	3.89	0	0	1.44	1	0	0.67	0	0	-11	-11	1	3.88
249	1	7.37	0	0	1.28	1	0	0.67	0	0	-20.05	-20.05	1	7.44
250	1	4.69	0	0	0.93	1	0	0.67	0	0	-13.24	-13.24	1	4.65
251	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
252	1	3.98	0	0	0.94	1	0	0.67	0	0	-9.8	-9.79	1	4.03
253	1	7.46	0	0	1.58	1	0	0.67	0	0	-13.47	-13.47	1	7.44
254	1	10.96	0	0	2.83	1	0	0.67	0	0	-16.29	-16.29	1	10.76
255	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
256	1	7.99	0	0	1.54	1	0	0.67	0	0	-15.65	-15.65	1	7.85
257	1	3.84	0	0	1.43	1	0	0.67	0	0	-12.15	-12.15	1	3.84
258	1	0	0	0	2927.31	1	0.97	0.32	1	0	-21.28	-13.84	0	0
259	1	13.62	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-22.72	-22.71	1	13.8
260	1	11.82	0	0	2.74	1	0	0.67	0	0	-21.53	-21.53	1	11.75
261	1	7.91	0	0	1.61	1	0	0.67	0	0	-17.7	-17.7	1	7.89
262	1	11.93	0	0	1.43	1	0	0.67	0	0	-35.2	-35.2	1	12.01

## Anexos

263	1	3.82	0	0	1.05	1	0	0.67	0	0	-11.13	-11.13	1	3.79
264	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
265	1	4.67	0	0	4.91	1	0	0.66	1	0	-22.4	-22.38	0.98	4.74
266	1	7.99	0	0	1.61	1	0	0.67	0	0	-15.84	-15.84	1	7.97
267	1	4.8	0	0	1.59	1	0	0.67	0	0	-6.91	-6.91	1	4.79
268	1	2.37	0	0	1.07	1	0	0.67	0	0	-10.64	-10.64	1	2.36
269	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
270	1	10.2	1.15	0	3.2	1	0	0.67	0	0	-26.57	-26.58	1	10.57
271	1	0	0	0	1.06	1	0.48	0.43	1	0	-11.96	-11.96	1	0
272	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
273	1	2.29	0	0	1.04	1	0	0.67	0	0	-11.26	-11.26	1	2.28
274	1	12.07	0	0	3.12	1	0	0.67	0	0	-21.92	-21.92	1	12.01
275	1	14.84	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-26.52	-26.52	1	14.68
276	1	6.59	0	0	5.54	1	0	0.67	0	0	-25.13	-25.11	0.98	6.72
277	1	0	0	0	0.98	1	0.69	0.38	1	0	-10.46	-10.46	1	0
278	1	15.4	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-23.1	-23.1	1	15.33
279	1	7.39	0	0	1.88	1	0	0.67	0	0	-13.24	-13.24	1	7.46
280	1	5.56	0	0	1.33	1	0	0.67	0	0	-17.49	-17.49	1	5.5
281	1	4.36	0	0	1.19	1	0	0.67	0	0	-15.08	-15.08	1	4.32
282	1	10.47	0	0	2.18	1	0	0.67	0	0	-12.19	-12.19	1	10.39
283	1	7.89	0	0	1.37	1	0	0.67	0	0	-17.99	-17.99	1	7.85
284	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
285	1	11.23	0	0	2.7	1	0	0.67	0	0	-26.88	-26.88	1	11.17
286	1	8.62	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-18.01	-18.01	1	8.58
287	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
288	1	2.65	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-10.61	-10.61	1	2.66
289	1	10.73	0	0	2.19	1	0	0.67	0	0	-13.85	-13.85	1	10.65
290	1	5.91	0	0	1.25	1	0	0.67	0	0	-21.32	-21.32	1	5.89
291	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
292	1	9.38	0	0	1.53	1	0	0.67	0	0	-23.01	-23.01	1	9.47
293	1	13.25	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-16.46	-16.46	1	13.38
294	1	3.63	0	0	0.91	1	0	0.67	0	0	-9.61	-9.61	1	3.72
295	1	0.08	0.04	0	1.84	1	0.01	0.64	0	0	-13.05	-13.05	0.99	0.07
296	1	2.61	0	0	1.14	1	0	0.67	0	0	-9.92	-9.92	1	2.6
297	1	2.41	0	0	1.08	1	0	0.67	0	0	-9.6	-9.6	1	2.4
298	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
299	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
300	1	5.51	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-18.02	-18.02	1	5.42
301	1	3.9	3.35	0	4.29	1	0	0.67	0	0	-22.51	-22.51	1	3.69
302	1	5.13	2.68	0	7.23	1	-0.01	0.67	0	0	-32.66	-32.66	1	4.99
303	1	2.3	0.14	0	3.48	1	0.14	0.55	0	0	-25.86	-25.86	1	2.29
304	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
305	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
306	1	6.02	0	0	1.26	1	0	0.67	0	0	-18.6	-18.6	1	6
307	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

## Anexos

308	1	5.22	0	0	1.65	1	0	0.67	0	0	-8.75	-8.75	1	5.21
309	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
310	1	4.7	0	0	1.3	1	0	0.67	0	0	-12.96	-12.96	1	4.56
311	1	9.41	0	0	1.1	1	0	0.67	0	0	-15.84	-15.84	1	9.47
312	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
313	1	12.61	0	0	2.66	1	0	0.67	0	0	-16.49	-16.49	1	12.17
314	1	29.93	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-24.69	-24.69	1	29.8
315	1	2.44	0	0	1.09	1	0	0.67	0	0	-10.56	-10.56	1	2.43
316	1	3.63	0	0	0.91	1	0	0.67	0	0	-9.98	-9.98	1	3.72
317	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
318	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
319	1	2.29	0	0	1.04	1	0	0.67	0	0	-12.2	-12.2	1	2.28
320	1	20.66	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-34.92	-34.92	1	20.74
321	1	4.24	0	0	1.5	1	0	0.67	0	0	-9.83	-9.83	1	4.23
322	1	4.97	0	0	1.15	1	0	0.67	0	0	-14	-14	1	4.91
323	1	4.23	0.08	0	6.97	1	0.01	0.64	0	0	-20.91	-20.91	0.99	4.34
324	1	2.65	0	0	0.78	1	0	0.67	0	0	-10.55	-10.55	1	2.49
325	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
326	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
327	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
328	1	8.41	0	0	1.49	1	0	0.67	0	0	-16.05	-16.05	1	8.37
329	1	3.32	1.48	0	172.59	1	2.38	0.15	0	0	-44.28	-43.32	0.38	3.9
330	1	3.88	0	0	1.44	1	0	0.67	0	0	-16.64	-16.64	1	3.88
331	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
332	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
333	1	2.06	0	0	0.97	1	0	0.67	0	0	-10.21	-10.21	1	2.06
334	1	10.63	0	0	2.79	1	0	0.67	0	0	-31.35	-31.35	1	10.65
335	1	5.41	0	0	1.09	1	0	0.67	0	0	-14.51	-14.51	1	5.39
336	1	7.08	0	0	1.57	1	0	0.67	0	0	-18.87	-18.87	1	6.95
337	1	3.86	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-7.55	-7.55	1	3.84
338	1	17.97	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-19.84	-19.84	1	18.03
339	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
340	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
341	1	0	0	0	6.23	1	0.9	0.34	1	0	-13.37	-13.37	0.99	0
342	1	11.38	0	0	2.71	1	0	0.67	0	0	-18.57	-18.57	1	11.31
343	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
344	1	4.23	0	0	0.98	1	0	0.67	0	0	-12.7	-12.7	1	4.22
345	1	5.56	0.38	0	4.26	1	0	0.67	0	0	-21.34	-21.34	1	5.43
346	1	0	0	0	1.68	1	1.04	0.31	1	0	-10.83	-10.83	1	0
347	1	2.26	0	0	0.95	1	0	0.67	0	0	-10.05	-10.05	1	2.27
348	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
349	1	6.02	0	0	1.33	1	0	0.67	0	0	-28.71	-28.71	1	6
350	1	7.96	0	0	1.65	1	0	0.67	0	0	-18.36	-18.36	1	7.85
351	1	3.95	0	0	1.14	1	0	0.67	0	0	-12.16	-12.16	1	3.81
352	1	6.62	0	0	1.24	1	0	0.67	0	0	-15.02	-15.02	1	6.67



## Anexos

353	1	2.67	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-9.14	-9.14	1	2.68
354	1	3.91	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-11.16	-11.16	1	3.88
355	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
356	1	11.82	0	0	2.39	1	0	0.67	0	0	-15.41	-15.41	1	11.85
357	1	13.25	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-30.17	-30.17	1	13.38
358	1	4.25	0	0	1.5	1	0	0.67	0	0	-8.58	-8.58	1	4.24
359	1	0	0	0	3.9	1	1.55	0.23	2	0	-14.39	-14.39	1	0
360	1	14.04	0.1	0	7.14	1	0	0.67	0	0	-24.92	-24.93	1	13.98
361	1	18.1	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-28.25	-28.25	1	17.86
362	1	6.23	0.03	0	6.81	1	-0.01	0.67	1	0	-28.72	-28.74	1	6.24
363	1	9.44	0	0	6.28	1	0	0.67	0	0	-29.38	-29.37	0.99	9.6
364	1	5.23	0	0	1.93	1	0	0.67	0	0	-12.98	-12.98	1	5.14
365	1	0	0	0	2.43	1	0.92	0.33	1	0	-11.54	-11.54	0.99	0
366	1	4.25	0	0	1.5	1	0	0.67	0	0	-10.06	-10.06	1	4.24
367	1	4.99	0	0	1.27	1	0	0.67	0	0	-16.69	-16.69	1	4.94
368	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
369	1	6.5	0	0	1.51	1	0	0.67	0	0	-16.92	-16.92	1	6.49
370	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
371	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
372	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
373	1	5.22	0	0	1.65	1	0	0.67	0	0	-11.23	-11.23	1	5.21
374	1	36.19	1.25	0	2.11	1	0	0.67	0	0	-54.09	-53.15	0.39	36.84
375	1	16.83	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-25.19	-25.19	1	16.72
376	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
377	1	14.72	1.31	0	0.98	1	0	0.67	0	0	-21.8	-21.8	1	14.77
378	1	2.06	0	0	0.97	1	0	0.67	0	0	-9.68	-9.68	1	2.06
379	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
380	1	2.07	0	0	113.87	1	2.9	0.11	5	0	-40.14	-39.23	0.4	2.11
381	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
382	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
383	1	10.21	1.75	0	1.92	1	0	0.67	0	0	-21.01	-21.01	1	10.4
384	1	7.21	0	0	6.1	1	0	0.67	0	0	-32.4	-32.36	0.96	7.35
385	1	1.87	0	0	0.9	1	0	0.67	0	0	-11.74	-11.74	1	1.87
386	1	5.28	0.15	0	5.76	1	0.01	0.64	0	0	-27.38	-27.38	1	5.13
387	1	10.8	0	0	2.79	1	0	0.67	0	0	-26	-26	1	10.86
388	1	5.64	0	0	1.65	1	0	0.67	0	0	-13.32	-13.32	1	5.71
389	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
390	1	11.26	1.32	0	2.86	1	0	0.67	0	0	-29.15	-29.16	1	11.11
391	1	4.25	0	0	1.5	1	0	0.67	0	0	-8.96	-8.96	1	4.24
392	1	8.9	0	0	1.42	1	0	0.67	0	0	-14.15	-14.15	1	8.85
393	1	12.16	0	0	4.06	1	0	0.67	0	0	-20.98	-20.98	1	12.1
394	1	2.6	1.55	0	1.74	1	0	0.67	0	0	-16.15	-16.15	1	2.65
395	1	10.12	0	0	2.12	1	0	0.67	0	0	-23.81	-23.81	1	10.06
396	1	2.06	0	0	0.97	1	0	0.67	0	0	-10.56	-10.56	1	2.06
397	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

## Anexos

398	1	8.75	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-14.73	-14.73	1	8.7
399	1	2.02	1.56	0	3.03	1	0	0.67	0	0	-18.2	-18.2	1	2.18
400	1	8.67	0	0	0.96	1	0	0.67	0	0	-15.32	-15.32	1	8.58
401	1	4.25	0	0	1.5	1	0	0.67	0	0	-9.17	-9.17	1	4.24
402	1	4.69	0	0	0.93	1	0	0.67	0	0	-13.79	-13.79	1	4.65
403	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<b>404</b>	<b>1</b>	<b>4.66</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1055.52</b>	<b>1</b>	<b>7.6</b>	<b>0.01</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>-39.84</b>	<b>-35.64</b>	<b>0.01</b>	<b>6.26</b>
405	1	20.1	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-21.58	-21.58	1	19.94
406	1	1.92	0	0	0.84	1	0	0.67	0	0	-9.93	-9.93	1	1.92
407	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
408	1	3.93	0	0	1.45	1	0	0.67	0	0	-10.22	-10.22	1	3.92
409	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
410	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
411	1	2.34	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-10.27	-10.27	1	2.33
412	1	2.44	0	0	1.09	1	0	0.67	0	0	-10.02	-10.02	1	2.43
413	1	14.3	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-36.75	-36.75	1	14.48
414	1	0	0	0	4.23	1	0.84	0.35	1	0	-11.85	-11.84	0.99	0
415	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
416	1	4	0	0	1.46	1	0	0.67	0	0	-10.71	-10.71	1	3.99
417	1	6.29	0	0	1.52	1	0	0.67	0	0	-16.24	-16.24	1	6.21
418	1	0.01	0.01	0	4.4	1	0.02	0.63	1	0	-13.9	-13.89	0.99	0
419	1	0	0	0	3.99	1	1.08	0.3	1	0	-14.08	-14.07	0.99	0
420	1	2.49	1.83	0	3.21	1	0	0.66	0	0	-25.92	-25.92	1	2.48
421	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
422	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
423	1	20.07	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-28.2	-28.2	1	19.94
424	1	6.39	0	0	1.29	1	0	0.67	0	0	-21.62	-21.62	1	6.49
425	1	3.88	0	0	1.25	1	0	0.67	0	0	-14.26	-14.26	1	3.95
426	1	7.98	0	0	1.38	1	0	0.67	0	0	-21.5	-21.5	1	7.94
427	1	10.28	1.57	0	2.36	1	0	0.67	0	0	-35.81	-35.81	1	10.25
428	1	2.55	0	0	1.12	1	0	0.67	0	0	-7.38	-7.38	1	2.54
429	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
430	1	15.4	1.73	0	6.77	1	0	0.67	0	0	-50.47	-50.47	1	15.32
431	1	18.18	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-31.56	-31.56	1	18.09
432	1	5.22	0	0	1.65	1	0	0.67	0	0	-8.99	-8.99	1	5.21
433	1	0.08	0.04	0	1.84	1	0.02	0.63	0	0	-12.54	-12.53	0.99	0.07
434	1	3.62	0	0	1.35	1	0	0.67	0	0	-12.92	-12.91	1	3.66
435	1	5.77	0	0	1.34	1	0	0.67	0	0	-12.23	-12.23	1	5.71
436	1	5.29	0	0	1.39	1	0	0.67	0	0	-9.82	-9.82	1	5.21
437	1	0	0	0	4.19	1	0.32	0.48	2	0	-17.4	-17.38	0.98	0
438	1	5.3	0	0	1.08	1	0	0.67	0	0	-12.48	-12.48	1	5.28
439	1	3.93	0	0	1.45	1	0	0.67	0	0	-9.12	-9.12	1	3.92
440	1	4.85	0	0	1.39	1	0	0.67	0	0	-13.2	-13.2	1	4.94
441	1	1.9	0	0	0.89	1	0	0.67	0	0	-11.35	-11.35	1	1.92
442	1	2.64	0	0	1.15	1	0	0.67	0	0	-10.36	-10.36	1	2.64

## Anexos

443	1	3.86	0	0	1.06	1	0	0.67	0	0	-7.55	-7.55	1	3.84
444	1	4.92	0	0	4.87	1	0	0.67	0	0	-23.15	-23.15	1	4.87
445	1	6.43	0	0	1.36	1	0	0.67	0	0	-27.65	-27.65	1	6.32
446	1	10.85	0	0	2.81	1	0	0.67	0	0	-23.08	-23.08	1	10.76
447	1	5	0	0	1.23	1	0	0.67	0	0	-15.82	-15.82	1	5
448	1	3.95	0	0	1.14	1	0	0.67	0	0	-10.88	-10.88	1	3.81
449	1	2.29	0	0	1.04	1	0	0.67	0	0	-9.85	-9.85	1	2.29
450	1	6.32	0	0	1.49	1	0	0.67	0	0	-15.59	-15.59	1	6.31
451	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
452	1	5.41	1.17	0	1.13	1	0	0.67	0	0	-13.33	-13.33	1	5.34
453	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
454	1	10.6	0	0	1.94	1	0	0.67	0	0	-14.59	-14.59	1	10.76
<b>455</b>	<b>1</b>	<b>4.3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>880.03</b>	<b>1</b>	<b>8.62</b>	<b>0.01</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>-32.19</b>	<b>-26.71</b>	<b>0</b>	<b>4.27</b>
456	1	0	0	0	4.23	1	0.83	0.35	1	0	-13.82	-13.82	0.99	0
457	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
458	1	2.3	0	0	0.96	1	0	0.67	0	0	-11.99	-11.99	1	2.31
459	1	11.08	0	0	21.81	1	0.07	0.59	3	0	-41.86	-41.8	0.94	10.87
460	1	11.42	0	0	2.83	1	0	0.67	0	0	-28.5	-28.5	1	11.48
461	1	8.2	0	0	7.66	1	0	0.67	0	0	-32.38	-32.35	0.97	8.41
462	1	4.11	0	0	1.35	1	0	0.67	0	0	-13.15	-13.15	1	4.12
463	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
464	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
465	1	11.43	0	0	2.71	1	0	0.67	0	0	-21.28	-21.28	1	11.36
466	1	5.85	0	0	1.24	1	0	0.67	0	0	-19.87	-19.87	1	5.82
467	1	8.75	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-19.13	-19.13	1	8.7
468	1	0	0	0	2.21	1	0.56	0.41	1	0	-13.6	-13.59	0.99	0
469	1	0	0	0	4.15	1	0.64	0.39	1	0	-10.98	-10.97	0.99	0
470	1	5.41	0	0	1.41	1	0	0.67	0	0	-14.01	-14.01	1	5.4
471	1	6.12	0.85	0	2.07	1	0	0.67	0	0	-18.22	-18.22	1	6.1
472	1	7.27	0	0	1.27	1	0	0.67	0	0	-17.07	-17.07	1	7.34
473	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
474	1	3.98	0	0	1.07	1	0	0.67	0	0	-12.07	-12.07	1	3.95
475	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
476	1	3.75	0	0	4.44	1	0	0.65	1	0	-18.42	-18.41	0.99	3.89
477	1	2.64	0	0	1.15	1	0	0.67	0	0	-10.62	-10.62	1	2.64
478	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
479	1	19.89	3.73	0	3.59	1	0	0.67	0	0	-40.16	-40.16	1	20.16
480	1	14.44	0.99	0	0.94	1	0	0.67	0	0	-17.11	-17.11	1	14.25
481	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
482	1	2.42	0.08	0	3.76	1	0	0.67	0	0	-16.97	-16.97	1	2.39
483	1	16.68	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-30.13	-30.13	1	16.47
484	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
485	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
486	1	4.84	0.17	0	5.31	1	-0.02	0.67	0	0	-22.55	-22.57	1	4.96
487	1	4.59	0	0	1.07	1	0	0.67	0	0	-22.33	-22.33	1	4.56

## Anexos

488	1	7.99	0	0	1.54	1	0	0.67	0	0	-16.53	-16.53	1	7.85
489	1	8.68	0.5	0	3.46	1	0	0.67	0	0	-27.09	-27.09	1	8.73
490	1	19.86	0	0	0	1	0	0.67	0	0	-25.42	-25.42	1	19.94
491	1	3.68	0	0	5.81	1	0.02	0.62	1	0	-18.32	-18.29	0.97	3.84

**Anexo 6.** Tabla suplementaria 6.

Resultado de la selección de presiones evolutivas dominantes determinados por el método FUBAR para un valor de corte (probabilidad posterior=0.9)

Site	Partition	alpha	beta	beta-&alpha	Prob[alpha>beta]	Prob[alpha<&beta]	BayesFactor[alpha<&beta]
1	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
2	1	2.414	0.175	-2.239	0.95	0.039	0.145
3	1	0.558	0.584	0.027	0.392	0.548	4.345
4	1	3.594	0.125	-3.47	0.998	0.001	0.004
5	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
6	1	6.543	0.493	-6.049	0.998	0.001	0.004
7	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
8	1	2.074	0.53	-1.544	0.848	0.116	0.468
9	1	5.834	0.218	-5.616	1	0	0.001
10	1	0.731	0.307	-0.424	0.638	0.301	1.538
11	1	1.73	0.165	-1.565	0.928	0.055	0.207
12	1	1.158	0.227	-0.931	0.765	0.188	0.828
13	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
14	1	5.551	0.227	-5.324	1	0	0
15	1	1.315	0.56	-0.755	0.742	0.204	0.918
16	1	1.242	0.197	-1.045	0.797	0.159	0.675
17	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
18	1	3.08	0.099	-2.982	0.999	0.001	0.003
19	1	4.844	0.149	-4.695	1	0	0.001
20	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
21	1	0.522	0.55	0.028	0.393	0.546	4.297
22	1	0.588	0.646	0.058	0.379	0.563	4.602
23	1	2.23	0.152	-2.078	0.953	0.036	0.134
24	1	1.158	0.227	-0.931	0.765	0.188	0.828
25	1	3.014	0.096	-2.918	0.999	0.001	0.003
26	1	4.166	0.175	-3.99	0.997	0.002	0.006
27	1	2.948	0.111	-2.837	0.996	0.003	0.01
28	1	2.706	0.149	-2.557	0.981	0.014	0.051
29	1	2.184	0.188	-1.996	0.935	0.051	0.192

30	1	1.646	0.208	-1.438	0.898	0.079	0.307
31	1	1.158	0.227	-0.931	0.765	0.188	0.828
32	1	4.294	0.134	-4.16	1	0	0
33	1	0.774	0.237	-0.537	0.7	0.238	1.117
34	1	3.404	0.453	-2.951	0.727	0.235	1.102
35	1	3.059	0.098	-2.961	0.999	0.001	0.003
36	1	3.036	0.153	-2.883	0.986	0.01	0.036
37	1	1.721	0.221	-1.5	0.895	0.083	0.323
38	1	1.144	0.281	-0.863	0.726	0.227	1.048
39	1	3.337	0.091	-3.247	0.999	0	0.001
40	1	3.035	0.418	-2.617	0.944	0.041	0.152
41	1	2.514	0.135	-2.379	0.985	0.011	0.039
42	1	5.102	0.206	-4.896	1	0	0
43	1	2.036	0.161	-1.875	0.884	0.09	0.354
44	1	2.253	0.192	-2.061	0.936	0.05	0.188
45	1	2.752	0.091	-2.661	0.996	0.003	0.01
46	1	2.207	0.23	-1.977	0.918	0.065	0.248
47	1	2.261	0.19	-2.071	0.937	0.049	0.184
48	1	0.774	0.237	-0.537	0.7	0.238	1.117
49	1	1.142	0.284	-0.858	0.725	0.228	1.059
50	1	2.418	0.123	-2.295	0.98	0.014	0.052
51	1	0.774	0.237	-0.537	0.7	0.238	1.117
52	1	1.226	0.316	-0.91	0.718	0.237	1.115
53	1	2.737	0.116	-2.621	0.995	0.003	0.011
54	1	2.303	0.139	-2.164	0.96	0.03	0.11
55	1	1.694	0.174	-1.52	0.921	0.06	0.229
56	1	1.831	0.2	-1.631	0.933	0.05	0.19
57	1	2.262	0.18	-2.082	0.942	0.045	0.17
58	1	3.126	0.154	-2.972	0.987	0.009	0.033
59	1	2.885	0.11	-2.775	0.998	0.001	0.003
60	1	1.835	0.193	-1.642	0.916	0.065	0.25
61	1	0.702	0.253	-0.449	0.672	0.263	1.274
62	1	2.246	0.192	-2.053	0.936	0.05	0.19
63	1	3.747	0.157	-3.59	0.997	0.002	0.007
64	1	2.161	0.562	-1.599	0.789	0.171	0.739

65	1	2.406	0.128	-2.278	0.979	0.016	0.057
66	1	3.161	0.099	-3.061	0.999	0.001	0.002
67	1	3.084	0.489	-2.595	0.95	0.033	0.121
68	1	5.671	0.447	-5.224	0.98	0.014	0.051
69	1	0.817	0.505	-0.312	0.523	0.42	2.588
70	1	2.746	0.1	-2.646	0.995	0.003	0.012
71	1	1.713	0.226	-1.487	0.892	0.085	0.334
72	1	1.242	0.197	-1.045	0.797	0.159	0.675
73	1	3.116	0.147	-2.97	0.988	0.008	0.03
74	1	2.431	0.143	-2.289	0.975	0.018	0.067
75	1	3.434	0.092	-3.342	1	0	0
76	1	2.849	0.1	-2.749	0.996	0.003	0.01
77	1	1.226	0.316	-0.91	0.718	0.237	1.115
78	1	1.101	0.277	-0.824	0.723	0.229	1.062
79	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
80	1	2.936	0.112	-2.824	0.992	0.006	0.021
81	1	1.319	2.288	0.97	0.193	0.668	7.193
82	1	3.263	0.122	-3.141	0.999	0	0.001
83	1	0.534	0.474	-0.061	0.448	0.488	3.409
84	1	2.273	0.191	-2.082	0.937	0.049	0.184
85	1	2.249	0.192	-2.056	0.936	0.05	0.189
86	1	2.21	0.229	-1.98	0.918	0.065	0.248
87	1	1.714	0.226	-1.488	0.892	0.085	0.334
88	1	4.155	0.203	-3.952	0.996	0.002	0.009
89	1	2.466	0.156	-2.31	0.972	0.021	0.075
90	1	0.799	0.287	-0.512	0.665	0.275	1.358
91	1	2.928	0.12	-2.808	0.99	0.007	0.024
92	1	2.844	0.119	-2.725	0.994	0.004	0.015
93	1	1.144	0.281	-0.863	0.726	0.227	1.048
94	1	4.317	0.146	-4.171	1	0	0
95	1	2.312	0.137	-2.175	0.962	0.029	0.106
96	1	1.755	0.209	-1.546	0.904	0.075	0.292
97	1	3.693	0.127	-3.566	0.998	0.001	0.004
98	1	2.461	0.159	-2.302	0.971	0.022	0.079
99	1	2.374	0.176	-2.198	0.947	0.041	0.152

100	1	0.728	0.309	-0.419	0.635	0.303	1.554
101	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
102	1	2.972	0.149	-2.824	0.986	0.01	0.036
103	1	2.466	0.156	-2.311	0.972	0.021	0.075
104	1	2.431	0.16	-2.271	0.97	0.022	0.082
105	1	0.747	0.279	-0.469	0.662	0.276	1.366
106	1	1.451	0.248	-1.203	0.863	0.109	0.436
107	1	0.629	0.3	-0.328	0.618	0.315	1.644
108	1	0.783	0.227	-0.556	0.71	0.228	1.057
109	1	2.362	0.164	-2.199	0.966	0.025	0.092
110	1	3.049	0.153	-2.895	0.986	0.01	0.036
111	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
112	1	0.798	0.29	-0.508	0.664	0.277	1.371
113	1	2.181	0.168	-2.013	0.959	0.031	0.113
114	1	2.298	0.149	-2.149	0.956	0.033	0.124
115	1	1.23	0.206	-1.024	0.789	0.166	0.714
116	1	2.867	0.119	-2.748	0.994	0.004	0.014
117	1	3.043	0.113	-2.93	0.993	0.005	0.018
118	1	1.274	0.266	-1.009	0.753	0.204	0.916
119	1	0.783	0.227	-0.556	0.71	0.228	1.057
120	1	2.428	0.215	-2.214	0.934	0.052	0.195
121	1	2.452	0.142	-2.31	0.976	0.018	0.065
122	1	5.51	0.216	-5.295	1	0	0
123	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
124	1	16.24 8	3.935	-12.313	0.974	0	0.001
125	1	1.63	0.465	-1.165	0.665	0.291	1.465
126	1	1.142	0.284	-0.858	0.725	0.228	1.059
127	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
128	1	1.274	0.266	-1.009	0.753	0.204	0.916
129	1	12.71 3	0.305	-12.408	1	0	0
130	1	2.856	0.12	-2.737	0.99	0.007	0.027
131	1	4.351	0.208	-4.142	0.996	0.002	0.008
132	1	0.506	1.258	0.752	0.151	0.804	14.662
133	1	1.142	0.284	-0.858	0.725	0.228	1.059



134	1	2.467	0.156	-2.312	0.972	0.021	0.075
135	1	0.789	0.217	-0.572	0.719	0.219	1.003
136	1	4.464	0.181	-4.283	0.998	0.001	0.005
137	1	1.736	0.21	-1.526	0.902	0.077	0.298
138	1	4.071	0.127	-3.945	1	0	0
139	1	3.769	0.419	-3.35	0.99	0.006	0.021
140	1	1.061	0.728	-0.333	0.541	0.389	2.278
141	1	3.192	0.106	-3.086	0.999	0.001	0.002
142	1	2.307	0.137	-2.17	0.961	0.029	0.107
143	1	2.24	0.152	-2.088	0.953	0.036	0.132
144	1	3.39	0.116	-3.273	0.999	0.001	0.002
145	1	1.23	0.206	-1.024	0.789	0.166	0.714
146	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
147	1	1.699	0.227	-1.472	0.891	0.086	0.338
148	1	2.397	0.216	-2.182	0.933	0.053	0.201
149	1	2.924	0.111	-2.813	0.996	0.003	0.011
150	1	0.751	0.841	0.09	0.391	0.554	4.439
151	1	2.23	0.152	-2.077	0.953	0.036	0.134
152	1	2.242	0.188	-2.054	0.938	0.049	0.183
153	1	1.619	0.227	-1.392	0.886	0.09	0.353
154	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
155	1	2.93	0.11	-2.82	0.992	0.006	0.02
156	1	1.798	0.733	-1.065	0.699	0.249	1.185
157	1	3.353	0.522	-2.831	0.925	0.054	0.205
158	1	4.369	0.897	-3.472	0.931	0.027	0.099
159	1	3.594	0.115	-3.479	0.998	0.001	0.004
160	1	1.871	0.441	-1.43	0.87	0.099	0.392
161	1	7.09	0.601	-6.489	0.995	0.001	0.005
162	1	2.036	0.161	-1.875	0.884	0.09	0.354
163	1	3.227	0.414	-2.812	0.951	0.036	0.132
164	1	3.602	0.097	-3.505	1	0	0
165	1	2.206	0.23	-1.976	0.918	0.065	0.249
166	1	3.003	0.113	-2.89	0.992	0.005	0.019
167	1	3.199	0.401	-2.797	0.954	0.034	0.125
168	1	4.676	0.147	-4.529	1	0	0

169	1	4.892	0.633	-4.26	0.99	0.003	0.012
170	1	2.456	0.181	-2.274	0.948	0.04	0.149
171	1	1.178	0.489	-0.69	0.714	0.233	1.09
172	1	0.533	0.745	0.212	0.284	0.66	6.933
173	1	2.682	0.126	-2.556	0.99	0.007	0.024
174	1	0.707	0.21	-0.497	0.709	0.224	1.031
175	1	4.426	0.181	-4.245	0.998	0.001	0.005
176	1	0.739	0.292	-0.447	0.65	0.288	1.45
177	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
178	1	1.814	0.165	-1.649	0.931	0.053	0.199
179	1	1.562	0.169	-1.393	0.919	0.061	0.233
180	1	2.947	0.148	-2.799	0.986	0.01	0.037
181	1	3.111	0.115	-2.996	0.999	0	0.001
182	1	2.422	0.182	-2.24	0.947	0.041	0.154
183	1	1.751	0.2	-1.55	0.908	0.072	0.276
184	1	1.242	0.197	-1.045	0.797	0.159	0.675
185	1	1.272	0.177	-1.095	0.815	0.141	0.589
186	1	3.41	0.124	-3.286	0.998	0.002	0.006
187	1	1.23	0.206	-1.024	0.789	0.166	0.714
188	1	2.231	0.174	-2.057	0.958	0.031	0.115
189	1	3.269	0.123	-3.146	0.999	0	0.001
190	1	4.372	0.176	-4.196	1	0	0.001
191	1	0.847	0.225	-0.622	0.722	0.219	1.004
192	1	0.734	0.301	-0.433	0.642	0.296	1.503
193	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
194	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
195	1	2.987	0.107	-2.88	0.997	0.002	0.008
196	1	2.972	0.117	-2.855	0.997	0.002	0.006
197	1	2.499	0.137	-2.363	0.984	0.011	0.041
198	1	1.868	0.453	-1.415	0.818	0.146	0.61
199	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
200	1	3.038	0.153	-2.885	0.986	0.01	0.036
201	1	0.583	0.634	0.051	0.381	0.56	4.56
202	1	1.274	0.266	-1.009	0.753	0.204	0.916
203	1	1.225	0.21	-1.015	0.786	0.169	0.73

204	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
205	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
206	1	2.289	0.15	-2.139	0.956	0.034	0.125
207	1	3.327	0.113	-3.214	0.999	0.001	0.002
208	1	0.841	0.611	-0.23	0.473	0.47	3.178
209	1	2.403	0.215	-2.188	0.933	0.053	0.199
210	1	3.66	1.087	-2.574	0.486	0.463	3.081
211	1	1.722	0.165	-1.557	0.927	0.055	0.208
212	1	0.572	0.506	-0.066	0.443	0.495	3.507
213	1	2.922	0.134	-2.788	0.993	0.005	0.017
214	1	0.809	0.597	-0.212	0.563	0.37	2.1
215	1	1.845	0.397	-1.448	0.889	0.083	0.325
216	1	3.081	0.437	-2.644	0.985	0.007	0.026
217	1	1.272	0.177	-1.095	0.815	0.141	0.589
218	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
219	1	1.876	0.45	-1.426	0.82	0.144	0.601
220	1	2.324	0.131	-2.193	0.965	0.027	0.097
221	1	2.226	0.187	-2.038	0.937	0.049	0.185
222	1	7.627	0.235	-7.392	1	0	0
223	1	6.901	0.666	-6.235	0.995	0.002	0.007
224	1	1.99	0.447	-1.543	0.832	0.134	0.554
225	1	0.863	0.634	-0.229	0.469	0.474	3.23
226	1	0.82	0.504	-0.316	0.525	0.418	2.57
227	1	1.272	0.177	-1.095	0.815	0.141	0.589
228	1	5.424	0.638	-4.786	0.993	0.002	0.007
229	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
230	1	5.887	0.232	-5.654	1	0	0
231	1	1.658	0.906	-0.752	0.588	0.344	1.875
232	1	2.312	0.186	-2.125	0.941	0.046	0.173
233	1	1.8	0.587	-1.213	0.745	0.208	0.942
234	1	1.649	0.163	-1.486	0.926	0.056	0.212
235	1	0.699	0.223	-0.476	0.697	0.236	1.106
236	1	2.222	0.153	-2.07	0.952	0.036	0.135
237	1	3.224	0.414	-2.81	0.951	0.036	0.132
238	1	3.507	0.106	-3.401	0.999	0	0.001

239	1	1.274	0.266	-1.009	0.753	0.204	0.916
240	1	13.95 5	0.716	-13.239	1	0	0
241	1	3.2	0.419	-2.781	0.949	0.037	0.139
242	1	2.487	0.128	-2.359	0.981	0.014	0.051
243	1	4.486	0.457	-4.03	0.978	0.016	0.057
244	1	3.246	0.155	-3.091	0.989	0.008	0.029
245	1	2.432	0.18	-2.252	0.948	0.04	0.15
246	1	2.066	0.696	-1.37	0.735	0.217	0.992
247	1	2.487	0.18	-2.307	0.95	0.039	0.145
248	1	2.29	0.15	-2.14	0.956	0.034	0.125
249	1	2.927	0.108	-2.818	0.996	0.003	0.01
250	1	2.405	0.132	-2.273	0.977	0.017	0.06
251	1	0.699	0.223	-0.476	0.697	0.236	1.106
252	1	2.241	0.188	-2.054	0.938	0.049	0.183
253	1	2.928	0.105	-2.823	0.993	0.005	0.018
254	1	3.358	0.185	-3.174	0.985	0.011	0.038
255	1	1.142	0.284	-0.858	0.725	0.228	1.059
256	1	3.022	0.15	-2.871	0.986	0.01	0.035
257	1	2.293	0.14	-2.153	0.96	0.03	0.112
258	1	3.604	0.643	-2.961	0.608	0.347	1.905
259	1	3.93	0.132	-3.798	1	0	0
260	1	3.587	0.112	-3.475	0.999	0	0.001
261	1	2.995	0.113	-2.882	0.992	0.005	0.019
262	1	3.989	0.151	-3.838	1	0	0
263	1	2.283	0.138	-2.145	0.96	0.03	0.11
264	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
265	1	2.036	0.433	-1.603	0.887	0.085	0.332
266	1	3.01	0.111	-2.899	0.993	0.005	0.018
267	1	2.362	0.185	-2.177	0.943	0.044	0.165
268	1	1.704	0.183	-1.521	0.916	0.064	0.246
269	1	1.226	0.316	-0.91	0.718	0.237	1.115
270	1	3.943	0.459	-3.485	0.987	0.007	0.025
271	1	0.824	0.491	-0.333	0.535	0.409	2.472
272	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03

273	1	1.618	0.233	-1.385	0.883	0.093	0.366
274	1	3.703	0.118	-3.585	0.999	0.001	0.003
275	1	4.249	0.162	-4.087	1	0	0.001
276	1	2.733	0.41	-2.323	0.959	0.028	0.105
277	1	0.572	0.504	-0.068	0.444	0.494	3.488
278	1	4.63	0.145	-4.485	1	0	0.001
279	1	2.952	0.148	-2.804	0.986	0.01	0.037
280	1	2.516	0.129	-2.388	0.981	0.014	0.05
281	1	2.292	0.158	-2.134	0.966	0.025	0.092
282	1	3.271	0.155	-3.115	0.989	0.008	0.029
283	1	2.879	0.119	-2.76	0.994	0.004	0.014
284	1	1.244	0.261	-0.983	0.753	0.203	0.913
285	1	3.548	0.101	-3.447	1	0	0
286	1	3.034	0.153	-2.881	0.986	0.01	0.036
287	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
288	1	1.712	0.226	-1.486	0.892	0.085	0.335
289	1	3.312	0.155	-3.156	0.989	0.008	0.027
290	1	2.66	0.127	-2.532	0.989	0.007	0.026
291	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
292	1	3.148	0.091	-3.057	0.999	0	0.002
293	1	3.91	0.166	-3.744	0.997	0.002	0.007
294	1	2.183	0.189	-1.995	0.935	0.051	0.192
295	1	3.311	0.453	-2.859	0.725	0.237	1.111
296	1	1.728	0.212	-1.515	0.9	0.078	0.304
297	1	1.629	0.219	-1.41	0.891	0.086	0.335
298	1	1.225	0.21	-1.015	0.786	0.169	0.73
299	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
300	1	2.488	0.141	-2.347	0.977	0.017	0.061
301	1	1.519	0.929	-0.59	0.532	0.393	2.32
302	1	1.678	1.41	-0.269	0.492	0.402	2.401
303	1	0.984	0.936	-0.047	0.413	0.508	3.694
304	1	0.783	0.227	-0.556	0.71	0.228	1.057
305	1	1.158	0.227	-0.931	0.765	0.188	0.828
306	1	2.673	0.127	-2.547	0.99	0.007	0.025
307	1	1.144	0.281	-0.863	0.726	0.227	1.048

308	1	2.425	0.18	-2.244	0.948	0.041	0.152
309	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
310	1	2.415	0.131	-2.284	0.978	0.016	0.059
311	1	3.228	0.1	-3.127	0.998	0.001	0.004
312	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
313	1	3.709	0.118	-3.591	0.999	0.001	0.003
314	1	10.69 7	0.407	-10.291	1	0	0
315	1	1.691	0.188	-1.503	0.912	0.067	0.259
316	1	2.182	0.189	-1.993	0.934	0.051	0.193
317	1	1.23	0.206	-1.024	0.789	0.166	0.714
318	1	2.036	0.161	-1.875	0.884	0.09	0.354
319	1	1.744	0.157	-1.587	0.933	0.05	0.19
320	1	7.051	0.228	-6.824	1	0	0
321	1	2.251	0.191	-2.06	0.937	0.049	0.186
322	1	2.456	0.129	-2.327	0.98	0.015	0.054
323	1	1.833	0.586	-1.247	0.749	0.205	0.923
324	1	1.736	0.21	-1.526	0.902	0.077	0.298
325	1	1.274	0.266	-1.009	0.753	0.204	0.916
326	1	1.101	0.277	-0.824	0.723	0.229	1.062
327	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
328	1	2.934	0.133	-2.801	0.993	0.005	0.016
329	1	1.331	2.95	1.62	0.105	0.776	12.372
330	1	2.325	0.11	-2.215	0.982	0.013	0.046
331	1	0.808	0.275	-0.533	0.676	0.265	1.287
332	1	1.144	0.281	-0.863	0.726	0.227	1.048
333	1	1.565	0.193	-1.373	0.904	0.074	0.285
334	1	3.472	0.093	-3.379	1	0	0
335	1	2.514	0.113	-2.4	0.985	0.011	0.039
336	1	2.821	0.093	-2.728	0.996	0.002	0.009
337	1	2.291	0.138	-2.154	0.961	0.03	0.109
338	1	5.271	0.213	-5.057	0.999	0	0.001
339	1	0.731	0.307	-0.424	0.638	0.301	1.538
340	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
341	1	0.832	0.779	-0.053	0.423	0.521	3.899

342	1	3.689	0.154	-3.535	0.997	0.002	0.007
343	1	1.274	0.266	-1.009	0.753	0.204	0.916
344	1	2.357	0.126	-2.231	0.978	0.016	0.058
345	1	2.14	0.456	-1.684	0.884	0.087	0.342
346	1	0.553	0.626	0.073	0.371	0.57	4.74
347	1	1.605	0.234	-1.371	0.881	0.094	0.371
348	1	1.244	0.261	-0.983	0.753	0.203	0.913
349	1	2.723	0.116	-2.607	0.995	0.003	0.012
350	1	2.906	0.105	-2.801	0.996	0.003	0.009
351	1	2.303	0.137	-2.165	0.961	0.029	0.108
352	1	2.792	0.101	-2.69	0.995	0.003	0.011
353	1	1.732	0.22	-1.511	0.896	0.082	0.319
354	1	2.336	0.117	-2.22	0.97	0.022	0.08
355	1	1.158	0.227	-0.931	0.765	0.188	0.828
356	1	3.706	0.128	-3.578	0.998	0.001	0.004
357	1	4.321	0.135	-4.186	1	0	0
358	1	2.246	0.191	-2.055	0.936	0.05	0.187
359	1	0.699	1.039	0.34	0.284	0.661	6.972
360	1	5.187	0.551	-4.636	0.982	0.01	0.037
361	1	5.195	0.211	-4.984	0.999	0	0.001
362	1	2.624	0.554	-2.07	0.924	0.053	0.201
363	1	3.697	0.418	-3.279	0.989	0.006	0.023
364	1	2.44	0.155	-2.284	0.971	0.021	0.077
365	1	0.534	0.538	0.004	0.405	0.533	4.083
366	1	2.243	0.193	-2.05	0.935	0.051	0.19
367	1	2.519	0.118	-2.401	0.984	0.012	0.042
368	1	1.272	0.268	-1.004	0.751	0.205	0.926
369	1	2.78	0.086	-2.695	0.997	0.002	0.008
370	1	0.707	0.21	-0.497	0.709	0.224	1.031
371	1	0.783	0.227	-0.556	0.71	0.228	1.057
372	1	1.101	0.277	-0.824	0.723	0.229	1.062
373	1	2.424	0.182	-2.242	0.947	0.041	0.154
374	1	14.38 7	0.686	-13.701	1	0	0
375	1	5.149	0.205	-4.945	1	0	0

376	1	2.036	0.161	-1.875	0.884	0.09	0.354
377	1	5.599	0.464	-5.135	0.992	0.005	0.018
378	1	1.565	0.193	-1.372	0.904	0.074	0.285
379	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
380	1	0.858	2.167	1.309	0.118	0.812	15.464
381	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
382	1	0.787	0.307	-0.48	0.649	0.291	1.47
383	1	3.672	0.495	-3.177	0.966	0.021	0.078
384	1	2.903	0.398	-2.504	0.967	0.023	0.083
385	1	1.407	0.239	-1.168	0.866	0.105	0.421
386	1	1.821	1.609	-0.212	0.424	0.483	3.345
387	1	3.363	0.111	-3.252	0.999	0.001	0.002
388	1	2.512	0.152	-2.36	0.975	0.019	0.068
389	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
390	1	4.089	0.474	-3.615	0.987	0.007	0.024
391	1	2.246	0.191	-2.055	0.936	0.05	0.187
392	1	3.071	0.154	-2.917	0.987	0.01	0.035
393	1	3.852	0.161	-3.691	0.997	0.002	0.006
394	1	1.221	0.57	-0.651	0.673	0.271	1.332
395	1	3.343	0.099	-3.245	0.999	0	0.001
396	1	1.564	0.193	-1.372	0.904	0.074	0.285
397	1	1.101	0.277	-0.824	0.723	0.229	1.062
398	1	3.056	0.154	-2.902	0.986	0.01	0.035
399	1	4.131	0.644	-3.487	0.617	0.339	1.833
400	1	2.958	0.097	-2.861	0.997	0.002	0.007
401	1	2.244	0.193	-2.051	0.935	0.05	0.19
402	1	2.416	0.123	-2.293	0.98	0.014	0.052
403	1	0.687	0.243	-0.444	0.678	0.256	1.229
404	1	2.505	0.699	-1.805	0.836	0.121	0.494
405	1	5.791	0.217	-5.574	1	0	0.001
406	1	1.459	0.248	-1.211	0.864	0.108	0.433
407	1	1.225	0.21	-1.015	0.786	0.169	0.73
408	1	2.215	0.182	-2.033	0.939	0.048	0.179
409	1	0.759	0.258	-0.501	0.68	0.258	1.243
410	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27



411	1	1.719	0.175	-1.544	0.921	0.06	0.228
412	1	1.733	0.181	-1.553	0.919	0.062	0.238
413	1	4.923	0.19	-4.733	1	0	0
414	1	0.777	0.634	-0.143	0.448	0.495	3.512
415	1	0.787	0.307	-0.48	0.649	0.291	1.47
416	1	2.326	0.136	-2.19	0.962	0.028	0.104
417	1	2.748	0.102	-2.647	0.995	0.004	0.013
418	1	3.511	0.642	-2.869	0.635	0.322	1.701
419	1	0.581	0.647	0.065	0.376	0.566	4.66
420	1	1.074	0.665	-0.409	0.576	0.356	1.981
421	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
422	1	1.242	0.197	-1.045	0.797	0.159	0.675
423	1	6.51	0.207	-6.303	1	0	0
424	1	2.773	0.133	-2.64	0.991	0.006	0.022
425	1	2.237	0.173	-2.064	0.959	0.031	0.114
426	1	2.997	0.103	-2.893	0.998	0.001	0.004
427	1	4.116	0.462	-3.654	0.995	0.001	0.004
428	1	1.691	0.222	-1.469	0.893	0.085	0.33
429	1	1.242	0.197	-1.045	0.797	0.159	0.675
430	1	6.574	0.785	-5.789	0.994	0	0.001
431	1	5.943	0.238	-5.705	1	0	0
432	1	2.424	0.18	-2.243	0.948	0.041	0.152
433	1	3.403	0.453	-2.951	0.727	0.236	1.102
434	1	2.202	0.154	-2.048	0.951	0.037	0.139
435	1	2.543	0.127	-2.416	0.982	0.013	0.047
436	1	2.396	0.216	-2.181	0.933	0.053	0.201
437	1	1.454	0.662	-0.791	0.517	0.43	2.702
438	1	2.499	0.113	-2.386	0.985	0.011	0.04
439	1	2.245	0.187	-2.057	0.938	0.049	0.183
440	1	2.392	0.151	-2.241	0.971	0.021	0.078
441	1	1.53	0.189	-1.341	0.905	0.073	0.281
442	1	1.738	0.21	-1.528	0.902	0.077	0.297
443	1	2.291	0.138	-2.154	0.961	0.03	0.109
444	1	2.062	0.433	-1.63	0.889	0.084	0.327
445	1	2.771	0.108	-2.663	0.996	0.002	0.008

446	1	3.266	0.099	-3.167	0.999	0	0.002
447	1	2.412	0.15	-2.261	0.972	0.021	0.075
448	1	2.241	0.188	-2.053	0.937	0.049	0.183
449	1	1.67	0.19	-1.48	0.911	0.069	0.265
450	1	2.753	0.094	-2.66	0.996	0.003	0.01
451	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
452	1	2.287	0.454	-1.833	0.848	0.121	0.493
453	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
454	1	3.308	0.155	-3.152	0.989	0.008	0.027
455	1	1.705	0.679	-1.026	0.741	0.202	0.904
456	1	0.78	0.634	-0.146	0.448	0.495	3.502
457	1	2.036	0.161	-1.875	0.884	0.09	0.354
458	1	1.677	0.228	-1.449	0.889	0.088	0.345
459	1	5.014	0.901	-4.113	0.96	0.009	0.032
460	1	3.59	0.102	-3.488	1	0	0
461	1	3.279	0.451	-2.828	0.978	0.012	0.044
462	1	2.349	0.125	-2.224	0.978	0.016	0.058
463	1	3.129	0.241	-2.888	0.857	0.118	0.478
464	1	2.036	0.161	-1.875	0.884	0.09	0.354
465	1	3.699	0.154	-3.545	0.997	0.002	0.007
466	1	2.65	0.128	-2.523	0.989	0.007	0.027
467	1	2.965	0.13	-2.835	0.994	0.004	0.015
468	1	0.824	0.49	-0.334	0.535	0.408	2.468
469	1	0.864	0.628	-0.236	0.472	0.472	3.199
470	1	2.464	0.156	-2.308	0.972	0.021	0.076
471	1	2.601	0.414	-2.186	0.928	0.053	0.201
472	1	2.858	0.093	-2.765	0.997	0.002	0.008
473	1	3.014	0.152	-2.862	0.909	0.07	0.27
474	1	2.324	0.13	-2.193	0.965	0.026	0.097
475	1	0.783	0.227	-0.556	0.71	0.228	1.057
476	1	1.879	0.437	-1.442	0.828	0.137	0.569
477	1	1.751	0.2	-1.551	0.908	0.071	0.276
478	1	0.702	0.253	-0.449	0.672	0.263	1.274
479	1	8.868	0.965	-7.903	0.995	0.001	0.002
480	1	4.687	0.435	-4.253	0.927	0.057	0.216

481	1	1.144	0.276	-0.868	0.729	0.224	1.03
482	1	1.189	0.502	-0.687	0.707	0.24	1.129
483	1	5.124	0.17	-4.954	1	0	0
484	1	1.23	0.206	-1.024	0.789	0.166	0.714
485	1	0.789	0.217	-0.572	0.719	0.219	1.003
486	1	1.951	0.512	-1.439	0.844	0.119	0.483
487	1	2.449	0.141	-2.308	0.982	0.013	0.047
488	1	3.023	0.15	-2.873	0.986	0.01	0.035
489	1	3.476	0.394	-3.082	0.989	0.006	0.023
490	1	6.448	0.206	-6.242	1	0	0
491	1	1.819	0.48	-1.339	0.799	0.162	0.691

Anexo 7. Figura suplementaria 3

Representación espacial del dímero E de dengue obtenido por Cristalografía y difracción de rayos X. Se identifican los ectodominios (Rojo EDI, Amarillo EDII y Azul EDIII) así como las posiciones de los aminoácidos involucrados. Fuente: Modis et al., 2015.

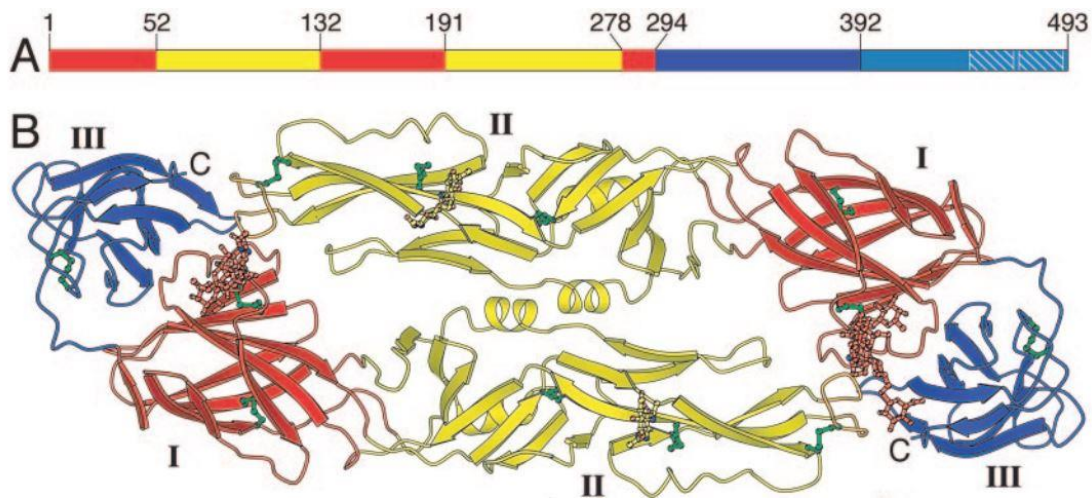
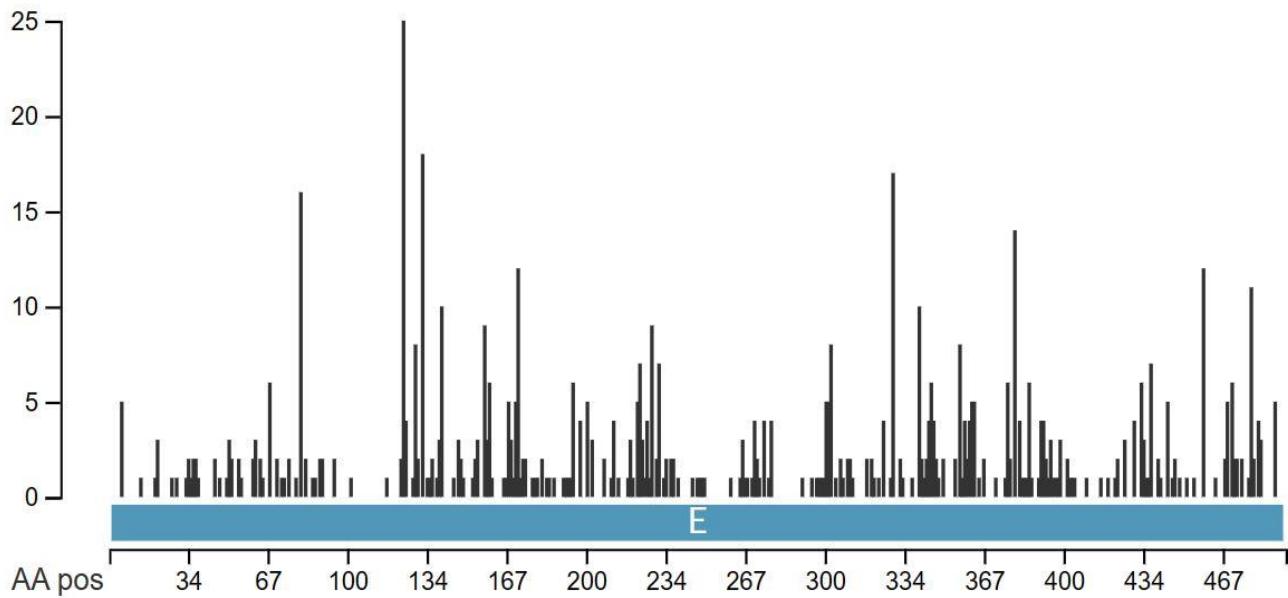


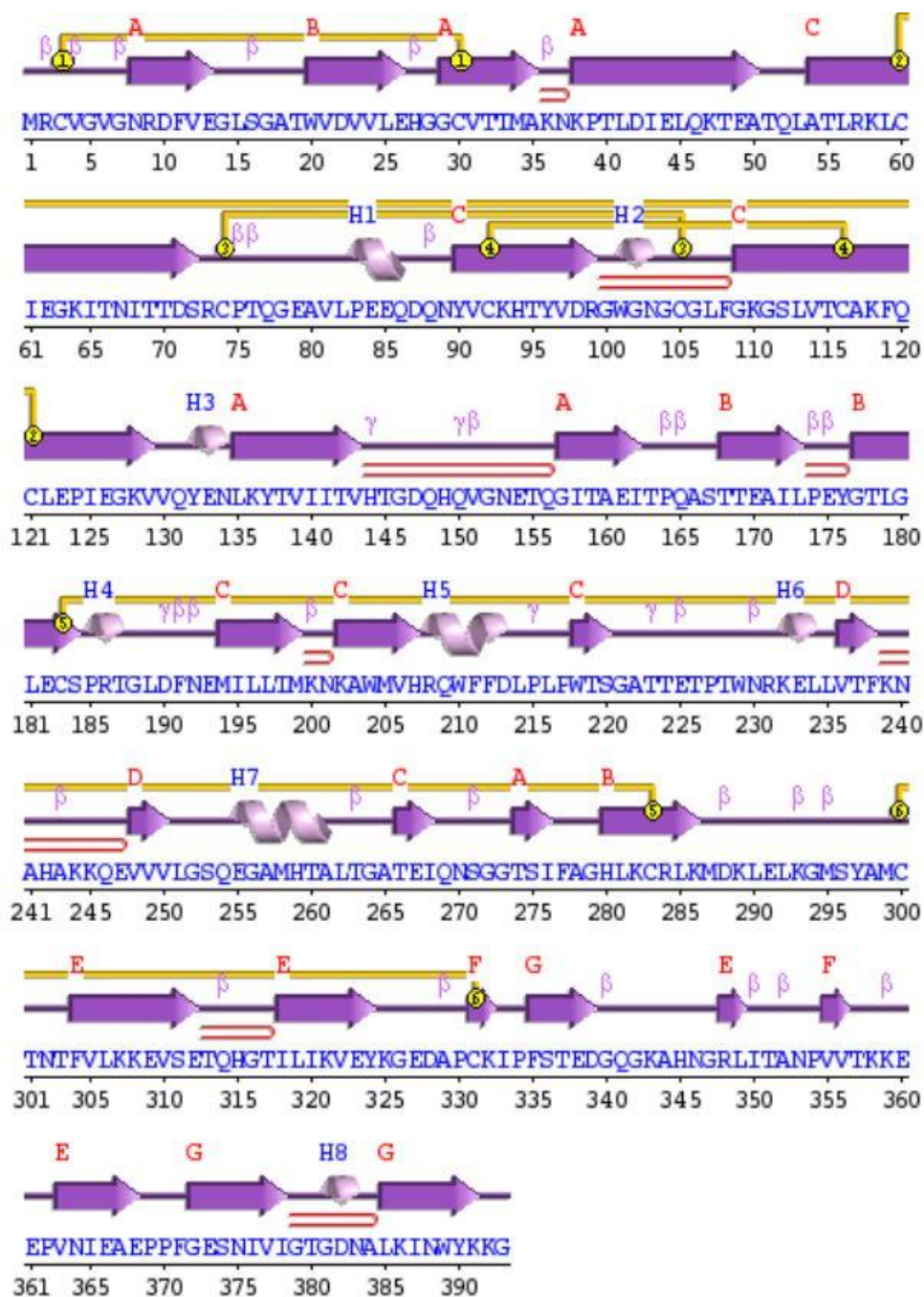
Figura suplementaria 4

Ploteos de variabilidad para el gen E de dengue 3. Fuente: Nextstrain 2024.



Anexo 8. Figura suplementaria 5

Descripción de los motivos de estructura secundaria realizados en el servidor PDBSUM.



Hélice y hoja plegada



Motivos de estructura secundaria

$\beta$  beta turn  $\gamma$  gamma turn beta hairpin

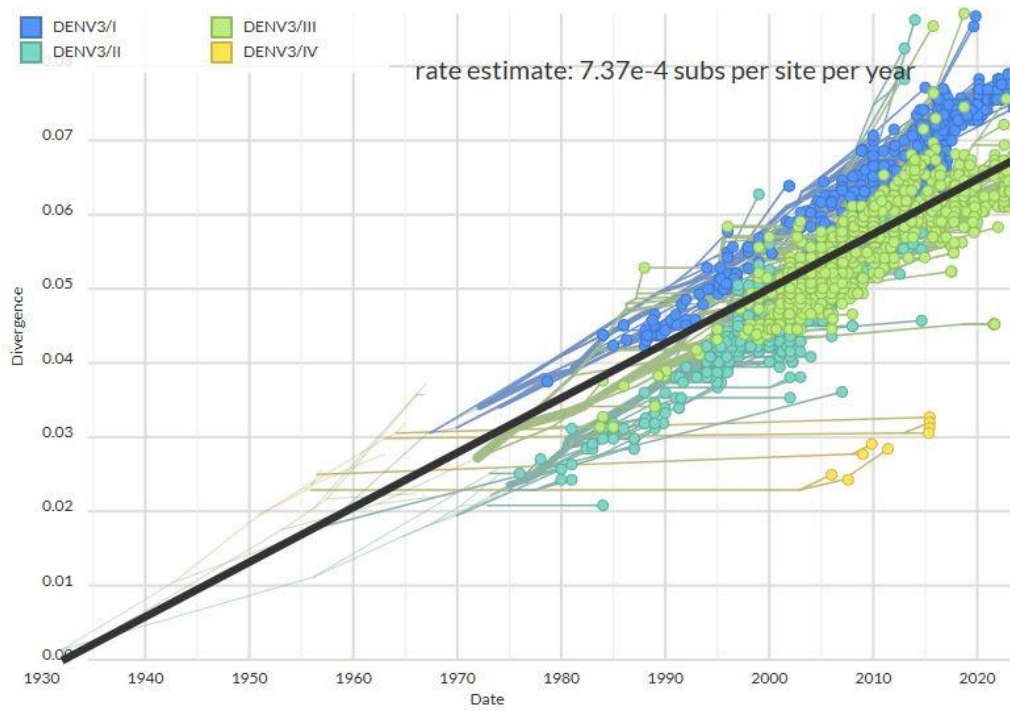
## Anexo 9. Figura suplementaria 6

Interacciones entre residuos de interés obtenidos en el servidor PDBSum.

No.	Turn	Sequence*	Turn type	Residue i+1			Residue i+2			i to i+3 CA-dist	H-bond
				Phi	Psi	Chi1	Phi	Psi	Chi1		
* 1.	Met1-Val4	MRCV	I	-90.2	-39.4	-177.8	-79.9	-14.5	-69.1	6.4	Yes
* 2.	Cys3-Val6	CVGV	I	-65.4	-32.8	-170.7	-80.8	-7.8	-	5.4	No
* 3.	Val6-Arg9	VGNR	IV	-58.6	-42.2	-	-90.4	50.0	-157.1	5.5	No
* 4.	Leu15-Ala18	LSGA	II	-58.1	122.2	-157.3	92.7	-11.3	-	5.6	No
* 5.	Glu26-Gly29	EHGG	II	-58.5	132.8	-87.3	74.0	-2.8	-	5.1	No
6.	Ala35-Lys38	AKNK	II	-59.0	127.9	-172.9	59.2	21.5	-54.5	5.3	No
7.	Cys74-Gln77	CPTQ	I	-53.9	-30.0	-27.1	-92.2	-0.2	53.4	5.3	No
8.	Pro75-Gly78	PTQG	I	-92.2	-0.2	53.4	-100.4	11.2	-70.2	6.6	Yes
9.	Asp87-Tyr90	DQNY	I	-61.8	-11.6	-64.1	-82.2	-11.3	-60.0	5.8	No
10.	Gln150-Asn153	QVGN	I	-61.3	-32.3	-174.6	-99.8	-4.3	-	5.6	Yes
11.	Thr163-Ala166	TPQA	I	-44.6	-41.0	-32.7	-82.3	-28.6	-55.9	4.8	Yes
12.	Pro164-Ser167	PQAS	IV	-82.3	-28.6	-55.9	-122.6	69.5	-	5.5	Yes
13.	Leu173-Tyr176	LPEY	II	-54.6	136.0	-24.2	66.4	-6.3	-44.9	5.3	No
14.	Pro174-Gly177	PEYG	IV	66.4	-6.3	-44.9	-118.7	-10.8	-64.9	6.3	Yes
15.	Asp190-Glu193	DFNE	I	-64.8	-13.1	-68.3	-72.6	-32.0	-62.2	5.7	No
16.	Phe191-Met194	FNEM	I	-72.6	-32.0	-62.2	-96.6	4.7	-70.8	4.8	Yes
17.	Met199-Lys202	MKNK	II'	50.3	-120.5	-54.1	-96.0	7.4	-63.0	5.4	No
18.	Thr224-Pro227	TETP	VIII	-58.9	-37.6	-68.1	-118.3	87.1	52.4	5.5	Yes
19.	Trp229-Lys232	WNRK	IV	-86.1	153.1	-58.0	54.0	42.2	-57.3	6.3	Yes
20.	His242-Lys245	HAKK	IV	55.0	-88.1	-	-116.1	3.0	-43.8	5.4	No
21.	Leu262-Ala265	LTGA	I	-56.4	-31.3	-59.3	-88.8	-0.1	-	5.0	No
22.	Asn270-Gly273	NSGG	II	-72.8	112.3	58.6	72.2	6.5	-	5.5	No
23.	Met287-Leu290	MDKL	I	-49.4	-55.8	-75.7	-84.0	12.3	-56.1	5.2	No
24.	Leu292-Met295	LKGM	II	-56.9	135.1	-173.0	76.1	15.5	-	6.2	No
25.	Gly294-Tyr297	GMSY	I	-54.5	-36.4	-80.1	-79.3	-9.4	56.4	5.1	No
26.	Thr313-Gly316	TQHG	I	-63.9	-6.5	67.8	-102.8	11.1	-57.8	5.7	No
27.	Asp328-Cys331	DAPC	IV	-75.9	139.3	-	-85.2	139.5	33.7	6.6	Yes
28.	Asp339-Gly342	DGQG	I	-60.4	-16.5	-	-94.5	5.0	-60.5	5.3	No
29.	Leu349-Ala352	LITA	IV	-87.2	-43.5	-53.7	-72.5	99.0	-57.9	6.5	Yes
30.	Thr351-Pro354	TANP	IV	-61.8	124.4	-	46.6	70.1	-169.1	6.1	Yes
31.	Lys358-Glu361	KKEE	II	-60.0	142.9	-160.4	63.1	-4.2	-49.8	5.6	No

**Anexo 10.** Figura suplementaria 7.

Tasa de sustitución nucleotídica por año del gen E de dengue 3. Fuente: Nextstrain 2024.



## Anexo 11. Tabla suplementaria 7

Genotipaje de las secuencias empleadas en el estudio a través del sitio Flavivirus Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/flavivirus/>)

Cepas de Dengue	BLAST result	BLAST score	refseq	Region1 subcluster result	Region1 subcluster support
Bangladesh_LC436661_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.64402	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_LC436663_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.71196	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_LC436665_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.64402	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_OQ826973_2021	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.57609	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_OQ827009_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.23641	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_OQ827013_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.30435	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_OQ827014_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.50815	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bangladesh_OQ827015_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.30435	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Bolivia_DQ177886_2003	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.671196	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Brazil_DQ118882_2007	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.875	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Brazil_FJ850079_2003	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.94294	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Brazil_OQ706228_2023	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.587234	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1033_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.723015	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1052_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1099_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1144_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1166_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1191_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1206_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.723015	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1255_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_1261_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_147_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_181_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_234_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_280_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_297_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_318_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_350_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_415_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100



CUBA_419_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_502_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_530_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_538_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_629_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99457	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_703_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
CUBA_705_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.65513	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
China_MG840490_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.33401	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
China_MG840492_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.1875	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
China_MG840494_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.198235	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
China_MG840496_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.25544	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
China_MG840505_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.198235	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
China_MG840514_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.915764	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
China_MG840515_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.847824	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
China_MG840516_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.32337	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Colombia_KX926478_2009	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.603264	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_KX926479_2009	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.33152	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_KX926480_2010	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.059784	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_MK040425_2013	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.652176	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_MK040426_2013	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.72011	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_MK040427_2013	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.652176	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_MK614071_2013	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.80706	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_MZ505712_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.39946	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Colombia_OQ821502_2021	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.33152	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Costa Rica_MZ505714_2013	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.99185	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Ecuador_MH346207_2014	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.39946	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Filipinas_OQ579499_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.32337	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Filipinas_PP234923_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.847824	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Filipinas_PP234925_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.05163	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Filipinas_PP234926_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.915764	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Guadalupe_OR229980_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Guadalupe_OR229981_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_MZ310551_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.33401	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_MZ505718_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.13035	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OP164332_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.198235	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OP164333_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.04413	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100

India_OP164335_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OP164336_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	94.636795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OP164341_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OP895705_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.198235	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OP921002_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.4019	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OQ721959_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.13035	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_OQ721962_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.13035	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
India_PP087307_2021	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.13035	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Indonesia_MH036413_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.372284	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Indonesia_MH036414_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.1875	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Indonesia_MH036415_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.50815	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Indonesia_MT122198_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.50815	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Indonesia_MT122199_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.57609	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Indonesia_MT122200_2017	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.77989	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Indonesia_ON229519_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.77989	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Maldivas_LC461024_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.198235	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Martinica_OR229978_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.198235	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Martinica_OR229983_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.587234	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Martinica_OR229984_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.65513	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
México_MH936415_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.85598	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
México_MH936416_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92391	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
México_MH936417_2016	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92391	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
México_OM417340_2021	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92391	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nicaragua_HQ541802_2009	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.26359	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nicaragua_HQ541803_2009	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.46739	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nicaragua_HQ541804_2009	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.46739	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nicaragua_KF973478_2012	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.127716	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nicaragua_KF973486_2012	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.26359	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nicaragua_KF973487_2011	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.33152	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nigeria_OQ132878_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.723015	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Panamá_DQ341209_1994	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	97.48641	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Paraguay_EU045322_2004	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.875	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Paraguay_EU045324_2006	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.535324	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Paraguay_EU045325_2006	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.26359	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Perú_DQ177888_2004	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.875	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Perú_KJ189298_2008	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.26359	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100

Perú_KJ189300_2008	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.46739	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Perú_KJ189301_2008	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.46739	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Puerto Rico_EU529692_2006	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.26359	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Puerto Rico_EU596494_2007	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	97.146736	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Puerto Rico_EU854298_2002	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	97.28261	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Puerto Rico_OQ836206_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.723015	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Senegal_MW288037_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.65513	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Senegal_MW288040_2018	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.587234	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Siri Lanka_OR394023_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.847824	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Siri Lanka_OR394043_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.915764	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Siri Lanka_OR394048_2019	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.13035	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Siri Lanka_OR394052_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.983696	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Siri Lanka_OR394054_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.915764	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Suriname_KU728208_2005	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.73913	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Suriname_KU728209_2005	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.603264	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Suriname_KU728210_2005	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.603264	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Tailandia_MG840498_2015	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.4019	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Tailandia_MZ636817_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	92.05163	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
Tailandia_MZ636818_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Tailandia_MZ636819_2020	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	91.847824	NC_001477	DENV-3 Genotype I	100
USA_OQ445927_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.46979	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
USA_OQ445948_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.858795	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
USA_OQ445953_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	95.92668	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Venezuela_DQ367721_2003	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.94294	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Venezuela_KF955481_2007	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.73913	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Venezuela_KF955484_2008	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.73913	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Nepal_OR821726_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100
Puerto Rico_OQ836208_2022	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	96.062454	NC_001477	DENV-3 Genotype III	100

