



Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
Tesis para optar por el título de Máster en Virología

Vigilancia genómica del virus Dengue 3 en Cuba, 2022-2023.

Autora:

Lic. Melissa María Pérez Millan

Tutoras:

Prof. Sonia Resik Aguirre DrCs.

Prof. Mayling Álvarez Vera DrC.

Asesora:

Prof. María Guadalupe Guzmán Tirado DrCs.

La Habana, Cuba 2025.



Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
Tesis para optar por el título de Máster en Virología

Vigilancia genómica
del virus Dengue 3 en Cuba,
2022-2023.

Autora:

Lic. Melissa María Pérez Millan

Tutoras:

Prof. Sonia Resik Aguirre DrCs.
Mayling Álvarez Vera DrC.

Asesora:

Prof. María Guadalupe Guzmán Tirado DrCs.

La Habana, Cuba 2025.

A mis padres, dignos merecedores de este triunfo,
a quienes les debo todo lo que soy.
A todos mis seres queridos, incluso aquellos a quienes no les alcanzó la vida para
acompañarme en este importante momento.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a mis padres por darme la vida y a mi hermano por estar junto a ellos, presentes en todo momento. Gracias por apoyarme en todas las circunstancias; por ayudarme a vencer las adversidades y a superar mis temores; por compartir las tristezas, el estrés, las noches de desvelo y las alegrías, y por su comprensión y amor incondicional.

Deseo agradecer a mi tutora, la profe Sonia que es como una madre para mí, por ser la persona más estricta, sincera y directa que he conocido; por su exigencia con el fin de demostrarme que si me esfuerzo y consagro puedo ser capaz de lograr cuanto me proponga y por siempre confiar en mis capacidades y ofrecerme su invaluable sostén.

A la familia adoptiva que la vida me brindó: los Resik-Carvajal, por todas las alegrías, el amor y apoyo necesarios en todo momento.

A mi Diosito y mi Virgen de la Caridad, por acompañarme siempre y ponerme pruebas difíciles para que me superase como ser humano.

A todos mis profesores, incluyendo a los que me educaron desde niña, a los de la maestría que me permitieron ratificar mi amor por la Microbiología y, en especial, a los de Virología.

Quiero agradecer a Jany, Dayana y Yoly: sin dudas ustedes hicieron que mi tránsito por esta etapa de la vida fuese mucho mejor, lidiaron con mis problemas y me acogieron como familia; más que amigas son mis hermanas.

A mis tutoras y a la asesora de este ejercicio académico, que guiaron mis pasos durante la investigación y sin las cuales habría sido imposible la presentación de esta tesis de Maestría.

Quiero agradecer a las compañeras y compañeros de los departamentos de Virología y Docencia que estuvieron vinculados a mi formación durante este proceso.

Y finalmente, deseo expresar mi gratitud por la gran oportunidad de formarme como especialista en un centro de tan alto reconocimiento en el ámbito de la ciencia en Cuba y el mundo como lo es el Instituto de Medicina Tropical que lleva el ilustre nombre del Profesor Pedro Kourí.

Resumen

La epidemiología del Dengue en Cuba es compleja. En las últimas décadas se reportaron brotes y epidemias de diferente magnitud causadas indistintamente por los cuatro serotipos del complejo del virus dengue. En el año 2021, con el levantamiento de las medidas de restricción instauradas durante la epidemia de COVID-19, aumentó la movilidad de la población humana, favoreciendo la dispersión del dengue por todo el país. En el año 2022, se notificó por primera vez la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus, con un predominio de dengue 3, superior al 90% del total de los casos, con respecto a los restantes serotipos. Entre los años 2022 y 2023, en el continente americano, se reportó la introducción de un nuevo linaje del genotipo III, del dengue 3. Teniendo en cuenta todo este panorama epidemiológico, se realizó un estudio filogenético y filodinámico con muestras colectadas entre los años 2022 y 2023, mediante secuenciación parcial del gen de la envoltura por el método de Sanger y secuenciación del genoma completo con tecnología de Nanoporos. Se realizaron construcciones filogenéticas de Máxima Verosimilitud con el objetivo de establecer inferencias filogenéticas. Las secuencias parciales del gen de la envoltura se analizaron en la plataforma NGPhyloeny.fr. Los genomas completos se analizaron con diferentes paquetes bioinformáticos como MAFFT, AliView, BEAST, R y TempEst. Tanto las secuencias parciales de la envoltura como los genomas completos, pertenecen al nuevo linaje (3III_B.3) reportado en 2022 en las Américas. Todos los genomas cubanos mostraron estrecha relación con secuencias de la región, del mismo período de tiempo en el que fueron colectadas. Las inferencias filogenéticas sugieren al subcontinente indio como origen de introducción del nuevo linaje. Como posible fecha de introducción, se infiere el año 2019, y como fecha de remplazo del linaje previamente establecido (3III_C), el año 2020. El análisis espacio-temporal y el de idoneidad viral en mosquitos, mostró una marcada estacionalidad entre los meses de mayo a noviembre, sugiriendo que la movilidad del nuevo linaje comenzó en el centro del país en el año 2019, extendiéndose al resto del territorio nacional, particularmente a finales de 2022 e inicios de 2023.

Palabras claves: dengue, linaje, genotipo, filogenética, filodinámica, genoma completo y Cuba.

Listado de Abreviaturas

OPS	Organización Panamericana de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
VDEN	virus dengue
FD	Fiebre de Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica de Dengue
SNC	Sistema Nervioso Central
d.C	después de Cristo
NC	nucleocápside
E	envoltura
C	cápside
ARNsc+	Ácido Ribonucleico de simple cadena y polaridad positiva
ORF	marco abierto de lectura
UTR	región no codificante
prM	precursor de Membrana
RE	retículo endoplasmático
RER	retículo endoplásmico rugoso
INF	interferón
IL	interleuquina
ARNpARNd	ARN polimerasa ARN dependiente
CD	células dendríticas
RIG-1	gen I inducible por ácido retinoico
ADE	Amplificación Dependiente de Anticuerpos
GIIIAI	Genotipo III Americano I
GIIIAII	Genotipo III Americano II

ÍNDICE

CAPITULO I. Introducción	1
CAPITULO II: Marco Teórico	4
II.1. Enfermedad del Dengue	4
II.2. Historia del Dengue en el mundo	5
II.3. Historia del Dengue en Cuba	7
II.4. Origen del virus dengue, clasificación taxonómica, estructura viral y genoma	8
II.4.1. Proteínas estructurales	9
II.4.2. Proteínas no estructurales	10
II.5. Ciclo replicativo	11
II.6. Diversidad genética de los VDEN	13
II.7. Transmisión de los VDEN	14
II.8. Inmunopatogenia de la infección por VDEN	14
II.9. Métodos de diagnóstico de VDEN	17
II.9.1 Técnicas de aislamiento e identificación de VDEN	17
II.9.2. Técnicas serológicas para el diagnóstico de VDEN	18
II.9.3. Técnicas moleculares de diagnóstico de VDEN	19
II.10. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis filogenético de secuencias de VDEN	21
II.10.1. Secuenciación de Sanger	21
II.10.2. Secuenciación de nueva generación	22
II.10.2. Edición de secuencias y análisis filogenético	23
CAPITULO III: Materiales y métodos	25
III.1. Diseño de estudio, universo y muestra	25
III.1.1. Universo	25
III.1.2. Criterios de inclusión	25
III.1.3. Criterio de exclusión	25
III.1.4 Criterio para suspensión y terminación del estudio	25
III.1.5. Tamaño muestral	25
III.1.6. Casos confirmados	26
III.1.7. Muestras	26
III.1.8. Aspectos éticos de la investigación	26
III.1.9. Publicación de resultados o usos para propósitos pedagógicos	26
III.1.10. Almacenamiento de datos	27
III.2. Técnicas y procedimientos	27

III.2.1. Tipos de muestras clínicas empleadas para el estudio.....	27
III.2.2. Extracción del ARN viral y mezcla para la RT-PCR en tiempo real	27
III.2.3. Controles de la RT-PCR.....	28
III.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa o Reverso Transcripción (RT-PCR).....	28
III.2.5. Selección de muestras para secuenciación	29
III.2.5.1. Secuenciación de gen de la envoltura de VDEN-3 mediante el método Sanger.....	29
III.2.6. Análisis filogenético.....	35
III.2.7. Equipos y materiales.....	36
CAPITULO IV. Resultados y Discusión	38
IV.1. Secuenciación parcial del genoma viral por el método de Sanger (gen que codifica para proteína de envoltura)	39
IV.1.1. Análisis filogenético de los genomas parciales del gen de envoltura	40
IV.2. Secuenciación del genoma viral completo mediante la tecnología Nanopore	42
IV.2.1 Construcción filogenética a partir del genoma completo.....	43
IV.1.2.2 índice de idoneidad viral y análisis espacio-temporal	46
IV. 1.2.3 Análisis filogeográfico de los genomas completos del VDEN-3	48
CAPITULO V. Conclusiones	55
CAPITULO VI. Recomendaciones	56
CAPITULO VII. Referencias Bibliográficas	57
CAPITULO VIII. Anexos.....	70

Índice de tablas

Tabla 1. Ciclos de la RT-PCR de Diagnostico de VDEN.....	28
Tabla 2. Cebadores de secuencia para VDEN-3	31
Tabla 3. Reactivos para la síntesis del ADNc	32
Tabla 4. Ciclaje para la generación del ADNc	32
Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación del producto de RT-PCR del VDEN-3 (800-900pb)	32
Tabla 6. Ciclaje para la reacción de amplificación	32
Tabla 7. Reactivos para la cuantificación del ADN	33
Tabla 8. Reactivos para la reparación de los extremos del ADN	33
Tabla 9. Marcadores para secuencia	34
Tabla 10. Adaptadores para secuenciación	34
Tabla 11. Reactivos para cargar la librería en la celda de flujo.....	34

Índice de tablas

Figura 1. Flujograma de trabajo	37
Figura 2. Construcción filogenética de Máxima Verosimilitud del gen de la envoltura del VDEN-3	41
Figura 3. Proporción de secuencias generadas por provincia	42
Figura 4. Filogenia de Máxima Verosimilitud del genoma completo del VDEN-3	44
Figura 5. Serie temporal de casos notificados semanalmente (2014-2022) normalizados por cada 100 000 personas y media diaria de idoneidad viral del mosquito	46
Figura 6. Tendencias de la temperatura en Cuba entre 1979 y 2022	47
Figura 7. Reconstrucción espacio-temporal de la propagación de DENV3-III de los clados I y II en Cuba.....	48

CAPITULO I. Introducción

El término dengue se origina en el continente africano y deriva de una frase en lengua swahili: "Ka-dinga pepo", que significa enfermedad provocada por un fantasma. El primer informe de dengue aparece en una enciclopedia médica china de la Dinastía Jin (265-420 d.C) que asocia el vuelo de insectos con agua venenosa. Se describe por primera vez en 1635, en Martinica y Guadalupe. La enfermedad fue identificada y nombrada como tal en el 1779. En ese mismo año, Benjamín Rush describe el dengue como "fiebre rompe huesos". Las primeras epidemias se produjeron casi simultáneamente en Asia, África y América del Norte, en 1781 (1).

La enfermedad producida por la infección con el virus dengue (VDEN) es la de causa viral transmitida por mosquitos que más rápidamente se extendió por el mundo. El vector principal de su transmisión es el mosquito *Aedes aegypti* (2). La enfermedad puede cursar con varias formas clínicas de presentación. Algunos casos evolucionan hacia un Dengue Grave con complicaciones vinculadas a hemorragias graves, insuficiencia orgánica o extravasación de plasma, lo cual es poco frecuente, aunque conlleva un mayor riesgo de muerte si no se trata adecuada y tempranamente (3, 4)

En nuestros días, la enfermedad es endémica en más de 100 países de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Suroriental y el Pacífico Occidental. Las regiones más gravemente afectadas son las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Con los años se hace notorio el aumento sustancial de la enfermedad a medida que la transmisión se extiende a nuevas zonas. Europa ya se enfrenta a la posibilidad de brotes de Dengue. La transmisión local se notificó por vez primera en Francia y Croacia en el 2010 y se detectaron casos importados en otros tres países (5).

La mayoría de las áreas endémicas de virus dengue en las Américas tienen co-circulación de varios serotipos, lo que aumenta la probabilidad de infecciones secuenciales y coinfecciones. El primer caso confirmado de coinfección por VDEN se reportó durante el brote de 1982 en Puerto Rico, en un paciente infectado con los serotipos VDEN-1 y VDEN-4 (4).

El 2023 fue el año con el mayor reporte de casos de Dengue en las Américas con más de 4,5 millones de enfermos, 7.665 (0,17%) casos graves y 2.363 fallecido (6). Este incremento en la transmisión fue precedido por diferentes factores como: la reducción o eliminación de las medidas de control del mosquito *Aedes* debido a COVID-19; la apertura de las fronteras de los países al disminuir el reporte de casos de COVID-19; una amplia circulación de VDEN en 2022 (2 811 452 casos reportados) por la primera introducción del genotipo Cosmopolitan de DENV-2 (7) y la co-circulación de más de un serotipo del virus en diferente países del continente (Brasil, México, Ecuador, Brasil, Costa Rica). Conjuntamente con esta situación, Naveca y colaboradores reportan la emergencia de un nuevo linaje del genotipo III de VDEN-3 (linaje Americano II del genotipo III de DENV-3) cuyo origen se asoció con la introducción de cepas asiáticas del genotipo III, posiblemente del subcontinente indio (8).

En el 2024, se registró el mayor número casos de Dengue notificado en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de enfermos y 13 millones de ellos reportados en las Américas (9).

En Cuba, en el año 2022, se reportó un incremento en la transmisión y la severidad de los casos de Dengue, probablemente asociada a la introducción del serotipo VDEN-3 que no se detectaba en el país desde el año 2018. Al concluir el año 2022, cerca del 90 % del total de muestras recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus, como parte de la red de vigilancia molecular de VDEN, se identificaron como VDEN-3. Ese mismo año, se reportó por vez primera la co-circulación de los cuatro serotipos del virus dengue.

Simultáneamente, en el continente americano y en El Caribe se notifica la introducción y circulación de un nuevo linaje del Genotipo III de VDEN-3 y el incremento en la transmisión y reporte de casos de los cuatro serotipos del virus.

Basado en el contexto epidemiológico de Cuba y la región de las Américas, se decide hacer un estudio retrospectivo con la finalidad de conocer los genotipos circulantes de VDEN-3 en el país y su patrón de dispersión. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Caracterizar filogenéticamente el virus dengue 3 identificado en Cuba en el periodo 2022-2023.

Objetivos específicos

1. Identificar los genotipos del virus dengue 3 en muestras clínicas analizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” en el periodo 2022-2023.
2. Analizar las relaciones filogenéticas y filogeográficas de los genomas completos del virus dengue 3 obtenidos de las muestras estudiadas.

CAPITULO II: Marco Teórico

II.1. Enfermedad del Dengue

La infección aguda con el VDEN ocasiona una enfermedad febril, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que abarca desde una infección asintomática hasta casos fatales, relacionados mayormente con la propia respuesta inmunológica del hospedero y otros factores. Esta enfermedad representa una de las mayores cargas sociales y económicas para las naciones, además de una gran amenaza para el panorama de salud en las Américas debido a su endemicidad, el incremento en la transmisión, circulación y confirmación de casos en las últimas décadas (10, 11). Se considera una de las enfermedades tropicales más comunes que afectan al humano. Se inicia con un estado febril inespecífico que dificulta el diagnóstico diferencial con otras arbovirosis. La fase febril dura aproximadamente entre dos y siete días, periodo en el cual los pacientes pueden presentar además, malestar general, mialgias, artralgias, dolor de cabeza, odinofagia, dolor retro-orbital, anorexia, náuseas y vómitos, que pueden acompañarse o no de exantema (12, 13).

La clasificación clínica de la enfermedad del Dengue propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se empleó hasta el 2009 y constaba de tres categorías o grupos: Fiebre Dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica de Dengue (FHD) (14) subdividida en cuatro grados de severidad. Esta clasificación dependía de los resultados del laboratorio clínico y no incluía todas las posibles manifestaciones de gravedad: afectación del sistema nervioso central (SNC) (encefalitis), del corazón (miocarditis) o del hígado (hepatitis grave). Debido a esto la organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación dirigida a identificar los signos de alarma de la enfermedad para un mejor manejo clínico del paciente, evitando casos graves y fallecidos. La nueva clasificación de la OMS que entró en vigor en 2009 integra tres categorías: Dengue sin signos de alarma, Dengue con signos de alarma y Dengue grave (15).

Según la nueva clasificación, la enfermedad puede tener dos formas de presentación clínica: Dengue y Dengue grave. Se toma como criterio de caso sospechoso de Dengue a toda persona que vive o viajó en los últimos 14 días a zonas con transmisión de virus dengue y que presenta fiebre aguda de dos a

siete días de evolución y dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas: náusea, vómitos, exantema, cefalea, dolor retro-ocular, mialgia, artralgia, petequias, prueba de torniquete positiva o leucopenia; a su vez, el paciente puede o no, presentar cualquier signo de alarma: dolor abdominal, sangrado de mucosas, alteración del estado de consciencia, trombocitopenia, manifestaciones de daño orgánico y choque por extravasación de plasma o sangrado severo (16).

La enfermedad se divide en tres fases clínicas:

Fase 1: nombrada febril, puede cursar de forma asintomática (en el 80 por ciento de los pacientes o sintomática como una enfermedad leve que comienza después de un período de incubación de dos a ocho días; puede aparecer un cuadro febril inespecífico y la forma típica se manifiesta con fiebre alta, cefalea (especialmente retro-ocular), mialgias y artralgias (68). Además, puede ocurrir inflamación de los ganglios linfáticos y erupciones en la piel, desde un rash exantemático escarlatiniforme hasta francas petequias. El 80 % de los infectados por VDEN pueden desarrollar una infección asintomática (17).

Fase 2: nombrada crítica, inicia con la desaparición de la fiebre y la aparición de los signos de alarma: dolor abdominal, vómito, sangrado de mucosas, alteración del estado de consciencia, trombocitopenia, manifestaciones de daño orgánico (hepatopatías, miocarditis, encefalopatía) y choque por extravasación de plasma o sangrado severo (normalmente asociado a hemorragias de vías digestivas (17).

Fase 3: nombrada de recuperación, comienza cuando el paciente sobrevive a la Fase 2 y puede durar desde unos días hasta varios meses, con una elevación del recuento plaquetario y de linfocitos, estabilización hemodinámica y restablecimiento del resto de las funciones del organismo (17).

II.2. Historia del Dengue en el mundo

El primer informe de Dengue aparece en una enciclopedia médica china de la Dinastía Jin (265-420 a.C.) que asocia el vuelo de insectos con agua venenosa. Se describe por primera vez, en 1635, en Martinica y Guadalupe. La enfermedad se identificó y nombró como tal en 1779, año en el cual Benjamín Rush describe

al Dengue como "fiebre rompe huesos". En el año 1780, durante una epidemia en Filadelfia, Estados Unidos, Rush realizó la primera descripción clínica de la enfermedad. Las primeras epidemias se produjeron casi simultáneamente en Asia, África y América del Norte, en 1781. El primer informe oficial registrado sobre la enfermedad de origen viral data de 1935 en las Indias Francesas Occidentales (18).

A fines del siglo XIX e inicios del XX, se notificaron diferentes epidemias en regiones tropicales y subtropicales afectando a millones de personas: Estados Unidos 1920, 1922; Australia 1925-26, 1954-55; Sudáfrica 1926-27; Grecia 1927-28; Japón 1942-45, el Caribe 1963-69 (18).

La primera cepa de VDEN-1, la Mochizuki, se aisló en 1943 en Japón. En 1977 se reportaron casos en las Américas y 1984 en África. El VDEN-2 fue notificado por primera vez en 1944 en Asia (Papúa Nueva Guinea e Indonesia), en 1953 en América (República de Trinidad y Tobago) y en 1964 en África (Nigeria). El VDEN-3 se notificó por primera vez en 1953 en Asia (Filipinas y Tailandia), en 1963 en América (Puerto Rico) y durante 1984-1985 en África (Mozambique). El VDEN-4 se informó por primera vez en Asia en 1953 y en las Américas en 1981 (19, 20).

En Jamaica se desarrollaron dos epidemias: en 1963 (VDEN-3) y en 1967 (VDEN-2) con extensión a otros países de El Caribe. Desde ese momento y hasta la fecha, la enfermedad se mantiene endémica en la región tropical del continente americano. En Jamaica, en 1977, se inicia la primera epidemia causada por el VDEN-1 en las Américas (Dengue Clásico o FD sin casos fatales) que se extendió hasta Puerto Rico, Bahamas, Cuba, República Dominicana, Guyana, Trinidad y Tobago y Venezuela (21-23).

En el año 1981 tuvo lugar la primera epidemia de Dengue Hemorrágico en las Américas. Esta vez afectó a Cuba y el agente etiológico resultó ser una cepa de origen asiático de VDEN-2, con un total de 344 203 casos, de los cuales 10 312 fueron graves y 158 fatales (el 60 % menores de 15 años) (24).

II.3. Historia del Dengue en Cuba

Desde el primer reporte clínico de la enfermedad en Cuba, han acontecido varios brotes y epidemias. La primera clasificación serotípica del virus se realizó durante el brote del año 1977, describiéndose como VDEN-1(25). En 1981 ocurrió la primera epidemia de Dengue Hemorrágico por VDEN-2. Durante el verano de 1997, en Santiago de Cuba, se notifica un pequeño brote de VDEN-2, confirmándose 3 012 casos, de los cuales 205 reunieron los criterios de DH y fallecieron 12 de ellos (24). Posteriormente, en el 2000, se desató un pequeño brote de VDEN-3 en el municipio Boyeros, en la capital del país, controlado de forma eficiente y oportuna (26). A mediados de 2001 y hasta febrero de 2002, ocurrió una gran epidemia de VDEN-3, que afectó principalmente a la provincia de La Habana, aunque ocurrieron reportes de transmisión en otras cinco provincias. En 2005, se detectó VDEN-3 en La Habana y en 2006, se detecta VDEN-4 por primera vez en el país, en la provincia de Camagüey, diseminándose posteriormente a otras provincias. Entre los años 2007-2014, se mantuvo la vigilancia y se notificaron pequeños brotes controlados de los serotipos 2, 3 y 4 del virus (27).

Entre los años 2014-2018, se detectaron los VDEN 2, 3 y 4. En 2016 se reportó transmisión de VZIK, con baja circulación de VDEN-2 y 3. El último caso de Zika se reportó en enero de 2020, con fecha de inicio de los síntomas en diciembre de 2019. De 2019 a 2021, se detectaron los VDEN-1 y 2, con un mayor número de casos de Dengue en 2019. En 2021, la transmisión de VDEN-1 predominó sobre la de VDEN-2. No se detectó transmisión de VDEN-3 y 4 entre 2019 y 2021. En 2015 se reportó un pequeño brote de Chikungunya en el oriente de Cuba (27, 28).

A finales de 2021, coincidiendo con la apertura de las fronteras cubanas en la etapa post COVID-19, se incrementaron los casos de Dengue. A principios de 2022 se identificaron los virus VDEN-1 y VDEN-2, mientras que el VDEN-3 se reportó a finales de abril en La Habana y posteriormente, en la provincia de Camagüey. Para la semana epidemiológica (SE) 27, el VDEN-3 era el serotipo predominante confirmado en las muestras recibidas de todo el país como parte de la vigilancia molecular de dengue. La infección viral se asoció con casos de

Dengue con signos de alarma y Dengue grave, tanto en niños como en adultos (28).

Sumado al contexto sanitario desencadenado en este espacio temporal, Cuba, reporta por vez primera la co-circulación de los cuatro serotipos del virus dengue en el año 2022, situación propiciada por la apertura de las fronteras del territorio luego de la pandemia de COVID-19. El aumento de la transmisión del dengue en Cuba en 2022, estuvo asociado probablemente a la introducción del serotipo 3, ya que el 90 % de las muestras recibidas a través de la vigilancia molecular del dengue, se identificaron como VDEN-3. También se observó un aumento en la gravedad de la enfermedad.

En 2023, Martínez y colaboradores estudiaron a 306 niños hospitalizados en el Centro de Referencia de La Habana para pacientes pediátricos con Dengue (Hospital Pediátrico Docente del Cerro). De ellos, el 62,7 % clasificaron como Dengue con signos de alarma, mientras que el 37,6 % como Dengue grave con choque hipovolémico. No se reportaron fallecimientos. Se confirmó la infección por VDEN-3 en varios pacientes. No se habían reportado en el país casos de niños con Dengue grave en condiciones epidémicas desde la epidemia cubana de Dengue Hemorrágico de 1981. Aunque el aumento en la transmisión de dengue y la gravedad de la enfermedad aparentemente se asociaron con la circulación de VDEN-3, no se puede excluir que otros factores como la infección secundaria por VDEN, la secuencia de la infección viral y el intervalo entre infecciones, así como los antecedentes genéticos del individuo, pudieran estar involucrados (29).

II.4. Origen del virus dengue, clasificación taxonómica, estructura viral y genoma

El virus emergió hace unos mil años en primates no humanos (VDEN selvático) en África y Asia, pero la transmisión entre humanos quedó establecida hace tan solo unos cientos de años. Malasia se considera una zona donde todos los serotipos del VDEN evolucionaron de forma independiente a partir de un linaje ancestral salvaje (30).

El complejo del virus dengue incluye cuatro serotipos con propiedades antigénicas diferentes (VDEN1-4). Se trata de un arbovirus perteneciente a la

familia *Flaviviridae*, género *Orthoflavivirus* (31). La partícula viral es de aproximadamente 40-50 nm y su nucleocápside (NC) presenta simetría icosaédrica. Las proteínas de envoltura (E) y membrana (prM/M) forman la cubierta glicoproteica. El genoma viral está compuesto por una simple cadena de ácido ribonucleico de polaridad positiva (ARNsc+), que presenta un único marco abierto de lectura (ORF, del inglés Open Reading Frame) flanqueado por regiones no codificantes (UTR). El ORF codifica para una poliproteína, que posteriormente es escindida por proteasas para dar lugar a las diez proteínas virales; de ellas tres son proteínas estructurales (Cápside (C), prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS: non structural, del inglés) conocidas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS2B y NS5 (32). Los genes que codifican para dichas proteínas se encuentran organizados del siguiente modo: 5' – C – prM – E – NS1 – NS2A – NS2B– NS3 – NS4A/2K – NS4B – NS5 – 3' (33).

II.4.1. Proteínas estructurales

La proteína C tiene un peso aproximado de 11 kDa; posee una estructura secundaria con cuatro α -hélices que realizan diferentes funciones. Dos de sus α -hélices poseen características hidrofóbicas y se encargan del anclaje a la membrana del retículo endoplasmático. Una hélice de carácter básico formando la nucleocápside se localiza en la cara citoplasmática de la partícula viral anclada al ARN genómico recién sintetizado. La última hélice, que posee también características hidrofóbicas, promueve la estabilización de la nucleocápside y el reclutamiento de gotas lipídicas del citoplasma, favoreciendo la formación de la partícula viral (34).

La proteína prM, con un peso molecular de 26 kDa, está presente en viriones inmaduros y se procesa durante la exportación de los viriones vía trans-Golgi por la proteasa celular furina, generando el péptido pr y la proteína M; conllevando la consecuente maduración del virión (35).

La proteína E es una glicoproteína con peso molecular de 60 kDa; se encuentra en la superficie del virus formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Es el principal antígeno viral que estimula la respuesta inmune del hospedero e induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Es la única proteína responsable de los eventos asociados a la entrada de la partícula viral,

que involucra el reconocimiento de los receptores celulares y la fusión de las membranas celular y viral en el endosoma (proteína de fusión viral clase II). La glicosilación de esta proteína en la posición 153 se conserva en muchos flavivirus, mientras que en la posición 67 es única para los virus del dengue (36). Estos sitios de N-glicosilación son críticos para la biosíntesis y ensamblaje de la proteína E en la partícula viral; están implicados en la producción de partículas infecciosas y en la infectividad viral, y parecen mediar la unión de la proteína E a los receptores celulares mediante la interacción con lectinas y otras moléculas expresadas en la superficie de las células hospederas (37).

II.4.2. Proteínas no estructurales

La NS1 es una glicoproteína que se encuentra unida al complejo de replicación viral en el retículo endoplasmático, en la superficie celular y en forma extracelular. Presenta determinantes antigénicos específicos de serotipo y de grupo. Su forma extracelular induce respuestas inmunes humorales fuertes y a pesar de no generar anticuerpos neutralizantes, genera respuesta humoral prolongada e inmunidad celular mediada, principalmente, por la actividad de linfocitos TH1 y TH2 los cuales inducen en su mayoría anticuerpos IgG clase I, asociados a la activación del complemento. Independientemente del tipo de respuesta inmune que genera, NS1 induce la secreción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-10 (38).

La NS2 se conforma con dos proteínas NS2A y NS2B; puede encontrarse atravesando la membrana y se localiza en posibles sitios de replicación del ARN. Se conoce que la proteína participa en el ensamblaje del virión. NS2A presenta epítopos de células T y en el serotipo VDEN-2 actúa como antagonista del interferón (INF) mediante la inhibición de la señal que estimula su producción. La proteína NS2B se asocia a la membrana y constituye un cofactor requerido para la función serina-proteasa de NS3 al formar el complejo con NS2B-NS3 (39, 40).

La NS3 es la segunda proteína más grande del virus (70 kD), altamente conservada entre los flavivirus (67%), su estructura se divide en tres dominios y es un componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. Es una proteína multifuncional, con actividad serina-proteasa, helicasa y nucleótido-trifosfatasa que presenta epítopos de linfocitos T citotóxicos inductores de

apoptosis (muerte celular programada). Algunas mutaciones en esta proteína pueden disminuir sus funciones (41, 42).

La proteína NS4 da origen a dos proteínas relativamente pequeñas: NS4A y NS4B. La NS4A es una proteína asociada a membrana con cuatro hélices transmembrana y una región citosólica N-terminal; y participa en la replicación del ARN anclando a membranas celulares componentes de la replicasa. NS4B es una proteína integral que posee cinco dominios transmembrana, se localiza en sitios de replicación del ARN y puede aparecer dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo (43). NS4B antagoniza la acción antiviral del INF- β (44).

La NS5 es la más grande y conservada de las proteínas no estructurales de los flavivirus, con una homología aminoacídica del 70% entre los cuatro serotipos. Es una proteína básica que funciona como ARN polimerasa ARN dependiente (ARNpARNd) y metiltransferasa (metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral). Induce la transcripción y traducción de la IL-8, lo cual favorece la diseminación viral. También puede inhibir la respuesta inmune del INF, mediante la interacción con el transductor de señales y activador de la transcripción 2 (STAT2) o por modulación del empalme del ARN dentro de la célula hospedera (31, 45, 46).

II.5. Ciclo replicativo

La etapa de adhesión entre la partícula viral y las células humanas, está mediada por la interacción entre la proteína E, receptores de la superficie celular y otros factores de unión. En el caso particular del VDENV se describen como receptores celulares los glucosaminoglucanos, lectinas tipo C como DC-SIGN, receptores de manosa, receptores de fosfatidilserina y proteínas de la inmunoglobulina-mucina de linfocitos T (47-49). El reconocimiento de estos receptores y correceptores sugiere que la unión virus-célula hospedera se puede realizar en diversas combinaciones, en dependencia del tipo de células que se infecta (tropismo celular). Una vez unido, el virión entra en la célula por endocitosis mediada por clatrina y se transporta a endosomas tempranos o intermedios. En los endosomas, el medio ácido induce cambios conformacionales fusogénicos en las glicoproteínas de fusión de la envoltura lipídica del virión con la membrana

del organelo. Subsecuente se produce la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular. El desensamblaje de la cápside que es un proceso poco conocido, termina con la liberación del genoma viral en el citoplasma y la traducción a proteínas en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso (RER). Dada su naturaleza monocistrónica el genoma se traduce como una poliproteína procesada por la proteasa viral NS3 y las proteasas del hospedero (algunas aún desconocidas), para generar las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Estas últimas cumplen funciones durante la replicación viral y modulan la respuesta innata de la célula hospedera (49-51).

La replicación del genoma viral se desarrolla en invaginaciones de la membrana del RER que el propio virus induce, conocidas como paquetes vesiculares (VP) (39). Dentro de los VP se encuentran las proteínas NS3 y NS5 formando un complejo. La proteína NS3 posee una función catalítica como proteasa y presenta también funciones de helicasa. La NS5 es la ARNpARNd y tiene actividad metiltransferasa (39, 50-52). La NS1 se ubica hacia el otro lado del lumen del RER y se asocia a los VP, presumiblemente cumpliendo funciones de andamiaje para el complejo replicativo (39, 52, 53). Las proteínas NS4A y NS4B ubicadas en la membrana del RER son responsables de inducir la curvatura de la membrana(39, 43). Una vez que el genoma se replica a través de intermediarios de replicación de ARN de doble cadena, el proceso de ensamblaje comienza con la asociación de dímeros de la proteína C con el ARN viral progenie, seguido de la gemación de membranas del RER que contienen el complejo prM-E. Durante el ensamblaje y la liberación de las nuevas partículas, las proteínas del hospedero regulan el tráfico intracelular y el procesamiento y la adición de azúcares a la glicoproteína E (39, 54).

Los viriones inmaduros se transportan por medio de la vía secretora clásica o constitutiva, a través del aparato de Golgi, hacia el espacio extracelular. El último paso en la maduración del virión es un reordenamiento de prM-E debido al pH ácido del Golgi y a la acción de una proteasa propia del Golgi, llamada furina. Las partículas virales se liberan de la célula mediante exocitosis, proceso por el cual adquieren la envoltura a partir de la membrana de la célula hospedera (51, 54, 55).

II.6. Diversidad genética de los VDEN

Los cuatro serotipos del virus comparten aproximadamente un 65% de similitud en la secuencia aminoacídica. Cada serotipo consta de varios genotipos que son: grupo de aislados que no tienen más de un 6% de divergencia en su secuencia de nucleótidos en una región dada del genoma (19).

La ARNpARNd codificada por la proteína NS5 del VDEN posee baja fidelidad debido a la carencia de actividad correctora de errores e induce una mutación por cada ciclo replicativo. Este alto nivel de mutaciones le confiere al virus una elevada diversidad genética que explica la existencia de los genotipos en los cuatro serotipos del complejo viral (56). La carencia de la actividad correctora de errores de la ARNpARNd provoca la acumulación de genomas virales genéticamente distintos, organizados alrededor de una secuencia consenso en cada hospedero. Las cuasiespecies o variantes intrahospedero, interactúan colectivamente, a nivel funcional, lo cual hace posible la adaptación de la población viral (56).

Los serotipos del complejo dengue se clasificaron en varios genotipos a fines de la década del 90 del siglo pasado y principios del 2000, basándose en la diversidad genómica del complejo viral y empleando secuencias genéticas parciales del genoma: VDEN-1 (I,II, III, IV, V); VDEN-2 (Asiático 1, Asiático 2, Cosmopolita, Americano, Asiático/Americano y Selvático); VDEN-3 (I,II, III, IV, V) y VDEN-4 (I,II, III, IV) (12, 20, 57).

En 2024, Hill y colaboradores introdujeron un nuevo sistema mucho más dinámico para la clasificación genotípica del VDEN. Cada serotipo se representa con números arábigos del 1 al 4, seguido del genotipo en números romanos del I al VI separados estos últimos de los linajes mayores por un guion bajo y por un punto y seguido los linajes menores. Los linajes mayores se designan usando letras del alfabeto romano y responden a escalas regionales (A, B, C). Los linajes menores se identifican con números arábigos y proporcionan una escala más resolutive similar a lo descrito para SARS-CoV-2 (ejemplo: 3III_B.3)(58).

II.7. Transmisión de los VDEN

El virus se transmite por la picada de la hembra infectada del mosquito del género *Aedes* cuyo origen es africano, fundamentalmente *A. aegypti*. *A. albopictus* es un vector limitado a algunas áreas geográficas.

Se reportan dos ciclos de transmisión bien definidos para los virus del dengue. El primero se conoce como ciclo de transmisión selvático y ocurre entre los reservorios naturales del virus, los primates no humanos y los vectores. El segundo se denomina ciclo de transmisión urbana y ocurre debido a un proceso de domesticación del vector en el ambiente intradomiciliario, lo cual favorece el estrecho contacto del virus con el hospedero accidental, el hombre. Ambos ciclos difieren ecológica y evolutivamente. Los ciclos urbanos ocurren en países donde los principales vectores pueden ser *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (59, 60). Debido a la expansión y adaptación del vector fue posible la propagación del virus desde la jungla hasta las zonas periurbanas y urbanas (61). Otros factores favorecen también la transmisión: la migración, el comercio y la facilidad de transportarse de un continente a otro a través de vuelos transcontinentales en tan solo en cuestión de horas o días. Estos factores potencializan la distribución del vector o el humano infectados con el virus en regiones no endémicas, lo que ayuda a la aparición y circulación del agente viral en dichos territorios (61).

La transmisión vertical del mosquito hembra a su descendencia, es esencial en el mantenimiento de ambos ciclos, urbano y selvático, especialmente mientras dura la estación de sequía o los períodos interepidémicos (59). Hasta el momento no se reportan otras rutas de transmisión como transfusiones de sangre, trasplante de órganos y transmisión perinatal. No existe evidencia de que pueda transmitirse por vía sexual como ocurre durante la infección con el VZIK (62, 63).

II.8. Inmunopatogenia de la infección por VDEN

La patogénesis de la infección por VDEN depende de la compleja interacción de factores dependientes del virus y del hospedero. Los factores virales son aquellos asociados al tropismo celular (afinidad del virus por determinado tipo celular), la capacidad replicativa del virus y la alteración de la bioquímica y la función celular. Los factores dependientes del hospedero median la respuesta

inmunológica, determinan si el virus es eliminado de forma rápida y eficientemente, favoreciendo un curso clínico de la enfermedad leve o grave. La respuesta inmunológica inducida por el propio hospedero determina la gravedad de la enfermedad (18, 64).

Las células diana de esta infección son las propias del sistema inmune: los monocitos y otras células de origen retículo-endotelial. El virus también posee tropismo por las células dendríticas (CD) epidérmicas, dérmicas y las plasmocitoides que son los blancos iniciales en la infección (18).

Cuando un mosquito *Aedes* infectado con el VDEN introduce su saliva dentro de la piel del humano, el virus puede infectar los queratinocitos epidérmicos, los fibroblastos de las capas subcutáneas y las células de Langerhans. Los queratinocitos humanos desempeñan un papel importante en el control de la infección inicial a través de la interacción con receptores de genes inducibles por ácido retinoico. La infección de los fibroblastos primarios de la piel se asocia con la regulación de la expresión de ARN mensajero, y potencia la transcripción de RIG-1 y MDA5, los cuales son reconocidos en la respuesta inmune innata que se origina a raíz de la infección por virus con genoma ARN. A esto sigue la potenciación de la expresión de INF α y β . Los INF tipo I y II pueden suprimir la carga viral de las células infectadas. Las células de la piel, que están infectadas, pueden presentar vacuolización citoplasmática y edema en el estrato granuloso (64).

Después de la replicación en células del tejido local y en la región de los nódulos linfáticos, el VDEN se disemina por vía sanguínea hacia las células mononucleares del bazo y el hígado, como primeras dianas permisivas para la multiplicación viral. El virus posee tropismo por células del sistema nervioso y puede causar degeneración neuronal e infiltración celular a ese nivel (64).

La infección primaria puede cursar de forma asintomática, transcurrir como una enfermedad febril leve y en pocas ocasiones, provocar la muerte. Una segunda infección por el virus representa un alto riesgo de desarrollar la FHD debido al fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADE): fenómeno en el que los anticuerpos específicos pueden incrementar o amplificar la replicación viral. La infección con un serotipo de dengue induce una inmunidad homotípica

de por vida y provoca también la formación de anticuerpos heterotípicos que reaccionan cruzadamente, a corto plazo, con el resto de los serotipos. La proteína de envoltura tiene en su superficie epítopes antigénicos de diferente especificidad que inducen la formación de anticuerpos específicos y de reactividad cruzada entre varios serotipos del género *Flavivirus*. Las células del sistema inmunológico y las células endoteliales (CE) que recubren los vasos sanguíneos, desempeñan un papel vital en el tropismo y la patogénesis del VDEN (16).

En respuesta a la infección por VDEN el sistema inmune produce diversas citocinas proinflamatorias relacionadas con la patogenia de la enfermedad. La proteína viral NS1 se reconoce por los receptores tipo toll (TLR2 y TLR6) que contribuyen a la expresión de citocinas proinflamatorias (65). Los macrófagos se convierten en uno de los principales productores de interleuquinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) y TNF- α que se relaciona con las manifestaciones hemorrágicas, al favorecer la trombocitopenia y la disfunción endotelial (16).

Las células dendríticas presentan los antígenos a los linfocitos TCD4, activándolos. Estos comienzan a cooperar con los linfocitos B produciendo anticuerpos. La respuesta de anticuerpos constituye un elemento crítico en la patogenia de la enfermedad, ya que los anticuerpos producidos contra un serotipo no son necesariamente, neutralizantes contra otro. Esto se debe a diferencias entre los epítopes del dominio III de la proteína E (66). Los anticuerpos no neutralizantes favorecen la entrada de los virus a las células mononucleares, amplificando la infección (67).

La acción de los anticuerpos heterólogos provoca la activación de la vía clásica del complemento, con el aumento de las anafilotoxinas C3a y C5a, que constituyen mediadores importantes del aumento de la permeabilidad vascular (68). Por otra parte, estos anticuerpos están implicados en la aparición de los eventos hemorrágicos, pues existe reactividad cruzada contra las plaquetas, las células endoteliales y las proteínas plasmáticas relacionadas con la cascada de la coagulación (69).

El virus es capaz de infectar directamente las células progenitoras sanguíneas en la médula ósea, suprimiendo la hematopoyesis y la formación de anticuerpos

que reconocen por reacción cruzada estructuras de las plaquetas. Esto contribuye a la trombocitopenia característica de esta enfermedad (70). Dichos eventos inducen apoptosis provocando disfunción endotelial y aumento de la permeabilidad vascular, lo que facilita la ocurrencia de hemorragias (71). La necrosis de los hepatocitos, secundaria a la infiltración de este órgano por células del sistema inmune como linfocitos T citotóxicos y NK, termina siendo inevitable, y como consecuencia de la misma, se elevan los niveles de aminotransferasas y disminuye la capacidad de producir factores de la coagulación y proteínas plasmáticas en el hígado que estimulan el sangrado (17, 72).

II.9. Métodos de diagnóstico de VDEN

Los métodos de diagnóstico para el VDEN se clasifican en directos e indirectos. Los primeros identifican las partículas virales completas, las proteínas que actúan como antígenos o el ácido nucleico viral y los segundos, determinan la respuesta inmune del hospedero al virus, ya sea humoral (IgM o IgG) o celular. Otra forma de clasificar los métodos diagnóstico se basa en el fundamento de las técnicas: de aislamiento viral, inmunológicas y moleculares (73).

Para el diagnóstico virológico de la infección por el VDEN, se utilizan como muestras el suero, el plasma, la sangre total, el líquido cefalorraquídeo (pacientes con infección presuntiva y con manifestaciones clínicas en el sistema nervioso central, como encefalopatía y meningitis aséptica), así como los tejidos del hígado, riñón, bazo y pulmón, útiles para diagnóstico *post mortem* (73).

II.9.1 Técnicas de aislamiento e identificación de VDEN

Existen varios sistemas de aislamiento viral: la inoculación intracerebral en ratones lactantes de uno a tres días de edad, los cultivos de células (primario, diploide y de línea), la inoculación intratorácica de mosquitos adultos y el uso de cultivos de células de mosquitos (73).

La inoculación de ratones lactantes por vía intracerebral, a pesar de ser uno de los sistemas biológicos más empleados en el aislamiento del virus, presenta baja sensibilidad comparada con otros métodos. La inoculación en mosquitos por vía intratorácica es la técnica de mayor sensibilidad para el aislamiento del VDEN (73).

Para el aislamiento en cultivos celulares, se pueden emplear líneas de mamíferos: la Vero (riñón de mono verde africano), BHK-21 (riñón de hámster recién nacido), LLCMK2 (riñón de mono). Las líneas celulares obtenidas de mosquitos son las más sensibles y de amplio uso: AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*), Tra-284 (*Toxorhynchites amboinensis*), C6/36 (*Aedes albopictus*), AP64 y CLA-1 (clonos de una línea celular de *Aedes pseudoscutellaris*), NIV-AA-706 (obtenida de larvas de *Aedes aegypti*). La sublínea celular C6/36HT (alta temperatura, del inglés high temperature) se adaptó a crecer a 33° C y muestra una gran sensibilidad a los VDENV (73, 74).

El aislamiento viral en cultivos celulares no se utiliza para el diagnóstico habitual, ni es un requisito para la confirmación del diagnóstico de VDENV, debido a la complejidad técnica, los costos y la bioseguridad necesarias para su realización. Sin embargo, resulta importante para realizar estudios posteriores de caracterización fenotípica y genotípica de VDENV. Los aislamientos obtenidos a través de esta técnica puedan servir como referencia y controles para las pruebas serológicas y moleculares (73).

II.9.2. Técnicas serológicas para el diagnóstico de VDENV

Los métodos de diagnóstico serológico se basan en la detección de la respuesta inmune contra los antígenos del virus que produce la infección. La sensibilidad de los métodos serológicos depende sobre todo, de la dinámica temporal de la producción de anticuerpos (73, 75). Pueden realizarse mediante pruebas de inmunocaptura enzimática de la inmunoglobulina M (MAC-ELISA) e inmunoglobulina indirecta G (ELISA); por inhibición de la hemaglutinación (IH); por fijación de complemento (FC); por neutralización en cultivo de células mediante reducción de placas (PRNT) y por la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural del dengue NS1 (NS1-ELISA) (73).

Existen diferentes ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA), del inglés enzyme linked immunosorbent assay, para la detección de anticuerpos IgM e IgG. Estos sistemas son económicos, rápidos, fáciles de ejecutar, sensibles y específicos. La sensibilidad del ELISA de captura de IgM se encuentra entre 90 y 97%, comparado con la sensibilidad de la IH. En menos del 2% de los casos se observan reacciones falso-positivas (76).

Durante una infección primaria por dengue, el sistema inmunológico del hospedero produce anticuerpos IgM entre cinco y seis días posteriores al inicio de los síntomas, y anticuerpos IgG entre los siete y diez días. Durante la infección secundaria, los niveles de anticuerpos IgM son más bajos y en algunos casos están ausentes, y los niveles de anticuerpos IgG altos son detectables incluso, desde el primer o segundo día del inicio de los síntomas, y se mantienen elevados entre dos y tres meses posteriores. Los títulos altos de anticuerpos IgG, son un criterio de infección secundaria (76, 77).

El método de ELISA de inhibición (MEI) permite la detección y titulación de las inmunoglobulinas totales contra el VDEN. El empleo de sueros pares permite clasificar el caso como primario o secundario.

La detección de anticuerpos neutralizantes mediante la técnica PRNT, se considera la prueba de oro para el diagnóstico serológico de las infecciones arbovirales (79). Al igual que otras pruebas de neutralización, se basa en la capacidad de los anticuerpos séricos para neutralizar al virus en cultivos celulares. Es la prueba serológica más específica entre los flavivirus y serotipo-específica para los VDEN. Este método correlaciona los niveles de anticuerpos del suero frente a la infección (77, 78).

La inhibición de la hemaglutinación (IH) y la fijación del complemento (FC) no permiten la determinación de anticuerpos específicos contra los antígenos del serotipo infectante (42, 77).

II.9.3. Técnicas moleculares de diagnóstico de VDEN

Las técnicas moleculares posibilitan la detección directa del genoma viral en poco tiempo y son más sensibles y específicas comparadas con otros tipos de técnicas de cultivo de células y serológicas. Constituyen una herramienta de gran importancia para la vigilancia epidemiológica, específicamente para la tipificación y la determinación de los genotipos y linajes circulantes, ya que las técnicas moleculares pueden ser más confiables que las basadas en anticuerpos que pueden presentar reacciones cruzadas con otros serotipos (73, 79-81).

La PCR con transcripción reversa (RT-PCR del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) convencional constituye un método sensible,

específico y muy rápido para el diagnóstico del VDEN. Puede detectar el ARN viral en muestras de suero, cultivos celulares infectados, mosquitos, larvas infectadas, así como muestras de tejidos frescos de fallecidos y fijados en formalina e incluidos en parafina (79).

La RT-PCR consiste en una transcripción reversa inicial, en la que el ARN viral, mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, se convierte en ADN copia, y a partir de éste se realiza una PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) convencional en la que se amplifica una región conservada del genoma del virus del dengue. La RT-PCR es la técnica molecular que más se utiliza en los estudios de detección del virus en cualquiera de sus serotipos circulantes (81-83).

Existen dos tipos de RT-PCR: la RT-PCR a punto final o cualitativa, utilizada para la serotipificación y la RT-PCR en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR), empleada para la serotipificación y para la evaluación de la carga viral (73, 81).

La qRT-PCR combina los principios de una PCR convencional con el uso de marcadores fluorescentes que permiten la detección de la amplificación en tiempo real. En el caso del VDEN, esta técnica comparte los primeros pasos de una RT-PCR convencional: extracción de ARN y transcripción reversa, pero la lectura es diferente, pues no necesita visualización en un gel, sino que se observan las curvas de amplificación en el equipo y se obtiene un resultado cuantitativo (87). En esta técnica se emplean cebadores específicos para cada serotipo del VDEN y fluorocromos o sondas tipo TaqMan, que emiten fluorescencia a medida que se amplifica el genoma viral presente en la muestra. Por esta razón, la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN copia inicial de la muestra. Esta prueba puede ser de tipo singleplex, en la que se detecta un solo serotipo o multiplex, en la que se identifican los cuatro serotipos (83-85).

La qRT-PCR no sólo es más rápida que la convencional, sino que presenta mayor sensibilidad y permite la cuantificación de los ácidos nucleicos amplificados convirtiéndose en una herramienta muy útil para la determinación del papel de la viremia en la patogénesis del VDEN (86).

II.10. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis filogenético de secuencias de VDEN

II.10.1. Secuenciación de Sanger

Desde la década del 90 del siglo pasado, se introduce la primera generación de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos denominada Sanger. La secuenciación se considera la prueba de oro para la detección de variantes en el ADN. Esta técnica consiste en hacer muchas copias de una región blanco del ADN. Su principio se basa en el proceso de replicación del ADN. Para ello se necesita: una ADN polimerasa; un cebador que actúa como iniciador (fragmento de ADN monocatenario complementario a una región del ADN molde que se desea secuenciar); los cuatro nucleótidos del ADN, en forma de dinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) y el molde de ADN a secuenciar. La reacción de secuencia contiene también, terminadores de cadena de los cuatro nucleótidos, en forma de dideoxinucleótidos, (ddATP, ddTTP, ddCTT, ddGTP) marcados con sondas diferentes. Estos terminadores difieren de los nucleótidos normales porque no poseen grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar. En el nucleótido normal el grupo hidroxilo actúa como gancho para la unión de un nuevo nucleótido en la cadena que se extiende. Una vez unido un dideoxi la síntesis de la cadena termina (87).

La mezcla de reacción de secuencia anteriormente descrita, se calienta para lograr la desnaturalización del ADN, posteriormente se enfría para lograr la unión de los cebadores y una vez unidos, se eleva la temperatura para que la ADN polimerasa pueda sintetizar el ADN. La enzima añadirá nucleótidos hasta que se incorpore de forma aleatoria un terminador de cadena. Este proceso se repetirá múltiples veces y, finalmente, se obtendrán fragmentos de diferentes longitudes, que se solapan, posibilitando obtener secuencias de mayor tamaño (87).

Una vez concluida la reacción de secuencia, los fragmentos obtenidos pasan por una electroforesis capilar en gel. Los de menor tamaño pasan primero y al atravesar todo el capilar son impactados por un láser lo que permite la detección de la sonda asociada(87).

II.10.2. Secuenciación de nueva generación

Se desarrollaron también otras técnicas moleculares como la secuenciación de nueva generación (SNG) (del inglés Next Generation Sequencing), la cual permite secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base (88). Conceptualmente, la secuenciación de nueva generación es como hacer un número muy grande de pequeñas reacciones de secuenciación de Sanger en paralelo (87).

Existe una variedad de técnicas de SNG que hacen posible realizar muchas reacciones de secuenciación al mismo tiempo (altamente paralelas) a microescala (las reacciones son diminutas y se pueden hacer muchas a la vez en un chip) y de forma muy rápida (como las reacciones ocurren en paralelo, los resultados están listos mucho más rápido) con un costo más barato por base, obteniendo lecturas con fragmentos de entre 50 a 700 nucleótidos de longitud (88).

La capacidad de secuenciar genomas completos de forma rutinaria abre nuevas posibilidades en la investigación y en aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, en la medicina personalizada se puede aplicar un tratamiento médico a la medida de las necesidades de un individuo, con base en las variantes genéticas de su genoma (88, 89).

Para la comprensión del proceso y resultados de esta técnica es necesario tener en cuenta dos conceptos fundamentales: cobertura (porcentaje de bases del genoma de referencia que están siendo secuenciadas una cantidad de veces determinada) y profundidad (el número promedio de veces que cada base en el genoma es secuenciada en los fragmentos de ADN) (89).

Dentro de los métodos de SNG se encuentran la secuenciación Illumina (segunda generación) y la secuenciación por Nanoporos (tercera generación). En la primera, la amplificación de los fragmentos de ADN para la generación de grupos (clúster o grupos del mismo fragmento) se realiza mediante PCR en puente, y la detección de bases en la secuenciación se hace a través de etiquetas fluorescentes (89). La segunda, es uno de los métodos de

secuenciación de tercera generación, más usados actualmente en la secuenciación de campo, por su fácil manejo y rápida obtención de datos, aunque su tasa de error es superior a la de los métodos de primera y segunda generación. En esta técnica la secuenciación de ADN se obtiene a medida que una copia única del ADN, pasa a través de los Nanoporos insertados en una membrana artificial, rodeada de una solución de iones. Este sistema se conecta a una fuente de voltaje que genera un flujo constante de corriente, a medida que el ADN se en el poro, lo que genera una variación de potencial, que posteriormente se convertirá en bases nitrogenadas, obteniendo de esta forma la secuencia del genoma. Este enfoque ofrece un proceso rápido y de bajo costo para estudiar genomas largos (89).

II.10.2. Edición de secuencias y análisis filogenético

La noción básica de la reconstrucción filogenética es la idea intuitiva de todos los naturalistas desde los tiempos de Aristóteles y antecede a todo proceso de clasificación biológica: que el grado de similitud entre dos *taxas* nos habla de sus relaciones evolutivas (90).

La estructura jerárquica de la vida fue propuesta originalmente por Darwin (1859) utilizando un árbol filogenético hipotético. El análisis filogenético de los productos de la evolución es de fundamental importancia en la teoría de Darwin, porque constituye un esquema magnificado de los procesos que ocurren dentro de las poblaciones (90).

A partir de Darwin y Haeckel, un gran número de evolucionistas propusieron filogenias para muchos grupos biológicos. Sin embargo, estas filogenias fueron construidas sin reglas, ni principios, y básicamente se elaboraron según las ideas intuitivas que estos investigadores tenían sobre un grupo de organismos. Por esta razón, a lo largo del siglo XX la reconstrucción de filogenias progresivamente cayó en desprestigio, y las filogenias producidas fueron tomadas solamente como bonitas historias y metáforas para ilustrar libros infantiles y museos, pero no dignas de un interés científico formal (91).

A partir de los años cincuenta, diferentes investigadores intentaron dar reglas formales que permitieran, por un lado, la reconstrucción filogenética y, por otro, unir la taxonomía/sistemática con la biología evolutiva (90, 91).

Desde entonces y hasta la actualidad, la filogenia, como parte inherente de la ciencia, avanza de forma exponencial debido al surgimiento y desarrollo de programas bioinformáticos con lenguaje de líneas de comando para la edición de secuencias y el análisis filogenético (programas MAFFT, R, IQ-TREE y otros que pueden ser corridos en plataforma Windows como Mega, AliView, Sequencher, Fig-TREE, así como sitios Web (NGPhylogeny.fr)).

Con estas herramientas potentes es posible obtener relaciones filogenéticas y filogeográficas, y detectar la aparición de nuevos genotipos y linajes dentro de las poblaciones virales, fundamentalmente en el caso de los virus de ARN, como el VDEN, que tienen una elevada tasa de mutación por la carencia de actividad correctora de errores de la ARN polimerasa ARN dependiente. Esto es sumamente importante porque posibilita la detección de nuevas recombinaciones y con ello, nuevos genotipos y linajes (92).

CAPITULO III: Materiales y métodos

III.1. Diseño de estudio, universo y muestra

Se realizó un estudio retrospectivo con la finalidad de identificar la circulación de los genotipos de VDENV-3, a partir de genomas de los virus obtenidos de muestras clínicas, como parte de la vigilancia del Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus (LNR) del Departamento de Virología, del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR) del IPK (Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, IPK).

III.1.1. Universo

Quedó constituido por todas las muestras clínicas recibidas en el LNR de Arbovirus, desde la red de laboratorios y hospitales de Cuba, como parte de la vigilancia molecular que se desarrolló en el país entre 2022 y 2023.

III.1.2. Criterios de inclusión

Muestras con valor de Ct en el RT-PCR para VDEN inferior o igual al ciclo 28 ($Ct \leq 28$) que contaran con una metadata robusta y con un volumen de muestra suficiente para realizar nuevamente la extracción del material genético viral.

III.1.3. Criterio de exclusión

Todas las muestras con valor de Ct en el RT-PCR para VDEN superior al ciclo 28 ($Ct > 28$), que no contaran con una metadata robusta o con un volumen de muestra suficiente para realizar nuevamente la extracción del material genético viral.

III.1.4 Criterio para suspensión y terminación del estudio

El estudio solo sería suspendido bajo condiciones de carencia de reactivos.

III.1.5. Tamaño muestral

Estuvo condicionado por el número de muestras recibidas en el LNR de Arbovirus, en el periodo en estudio, que cumplieron con los criterios de inclusión.

III.1.6. Casos confirmados

Aquellos pacientes que cumplieran con los criterios de caso sospechoso, a los que se les confirmara la infección por el VDENV-3, mediante la detección de ARN viral por RT-PCR en tiempo real, en cualquiera de las muestras clínicas.

III.1.7. Muestras

Se emplearon 75 muestras positivas a VDENV-3, confirmadas por RT-PCR, que cumplieron los criterios de inclusión.

III.1.8. Aspectos éticos de la investigación

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios éticos expresados en la Declaración de Helsinki (93) y las normas de CIOMS (94). Está incluido en el Proyecto Sectorial “Fortalecimiento de la estrategia de gestión integrada para el enfrentamiento de los arbovirus dengue, Zika y Chikungunya en Cuba” (No.2505001) del LNR de Arbovirus del IPK, aprobado por el Comité de Ética del IPK (CEI-IPK-30-18), al cual se le atribuirán los resultados obtenidos en el estudio.

Este estudio no implica riesgos para los participantes y no se recoge consentimiento informado, pues solo se analizan los resultados de las muestras que se envían al LNR de Arbovirus como parte de la vigilancia molecular, sin identificación. Los investigadores involucrados en el estudio mantienen el compromiso ético de confidencialidad de los resultados y solo los investigadores a cargo tendrán acceso a las bases de datos confeccionadas al efecto.

El LNR de Arbovirus es el designado por el Ministerio de Salud Pública (Minsap) para la vigilancia genómica de Arbovirus en Cuba y tiene experiencia en este campo.

III.1.9. Publicación de resultados o usos para propósitos pedagógicos

Los resultados finales del estudio se divulgarán mediante informes al Minsap, serán presentados en eventos científicos nacionales e internacionales y se realizarán publicaciones, siempre manteniendo la confidencialidad de los datos de los pacientes.

III.1.10. Almacenamiento de datos

Los datos de las muestras clínicas recibidas en el LNR de Arbovirus de los pacientes sospechosos, se registraron y almacenaron en una base de datos en Excel, teniendo en cuenta: número de entrada al laboratorio, nombre y apellidos del paciente, edad sexo, provincia de origen, fecha de entrada, la definición de caso. Los datos de identificación de los pacientes no serán utilizados en el estudio.

III.2. Técnicas y procedimientos

III.2.1. Tipos de muestras clínicas empleadas para el estudio

Las muestras clínicas colectadas para casos sospechosos fueron 1 mL de suero. Las mismas se recogieron en tubos plásticos estériles de 1,5 mL y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

III.2.2. Extracción del ARN viral y mezcla para la RT-PCR en tiempo real

La extracción del material genético (ARN) se realizó empleando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN de Alemania. El ARN purificado se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento.

Para la mezcla de la reacción del RT-PCR en tiempo real se empleó el estuche comercial Quantinova (QIAGEN, Alemania) en un área de trabajo limpia, utilizando cabina de flujo de aire horizontal (AIRTECH, California, EE. UU). Se preparó una mezcla de reacción de PCR en un volumen final de 15 µL de reacción, compuesta por agua libre de ARNsas, cebadores, sondas (para cada uno de los serotipos de VDENV) y mezclas de enzimas. Posteriormente, fue dispensada en placas de 96 pocillos Micro Amp Fast Optical 96-well reaction Plate with Barcode (0,1 mL), (Applied Biosystems (ABI), Estados Unidos). Las placas se transportaron hacia el área de amplificación en condiciones de refrigeración y cubiertas con papel aluminio para evitar la degradación de las sondas por la incidencia de la luz.

En el área de amplificación se añadió en cada pocillo 5 µL del ARN previamente purificado de cada una de las muestras clínicas, en una cabina de trabajo UVP (DBA Analytik Jena, California, Estados Unidos), utilizando puntas con barreras libres de nucleasas. Se adicionaron en pocillos independientes 5 µL del ARN

purificado de los controles positivos y negativos. Por último, las placas se sellaron con película adhesiva para evitar la evaporación de la mezcla de reacción.

III.2.3. Controles de la RT-PCR

Como control positivo para la RT-PCR en tiempo real se empleó una mezcla de ARN de antígenos virales de VDENV-1-4, previamente confirmados como positivos con un $Ct \leq 20$ y conservados a -20°C en el LNR Arbovirus. Como control negativo se empleó ARN de una muestra negativa y como control de mezcla de reacción se empleó agua de calidad biología molecular. En cada caso se utilizaron 5 μL .

III.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa o Reverso Transcripción (RT-PCR)

La amplificación y detección del genoma viral se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, empleando el sistema propuesto por la OPS y la OMS para la Red de Laboratorios de Diagnóstico de Arbovirus (RELDA), de la cual, el LNR de Arbovirus del IPK es centro colaborador desde 2005. El sistema utiliza sondas de hidrólisis o TaqMan®. Se emplearon los cebadores propuestos por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos (CDC, sigla en inglés) para el diagnóstico molecular de VDEN. Los cebadores amplifican las siguientes regiones de genoma viral: VDEN-1 (NS5), VDEN-2 (Env), VDEN-3 y 4 (PrM) (83, 92).

Los ciclos de la RT-PCR, (Sequence Detection Software (Versión 1.4.1, IVD)), fueron los siguientes:

Tabla 1. Ciclos de la RT-PCR de Diagnóstico de VDEN

Etapa	No. Ciclos	Temperatura	Tiempo
Reverso Transcripción	1	50°C	30 min
Inactivación de la transcriptasa Inversa	1	95°C	2 min
Amplificación	45 ciclos		
	Desnaturalización Elongación	95°C 60°C	15 seg 1 min

Fuente: (Sequence Detection Software (Versión 1.4.1, IVD)) fuente (83, 92).

La detección de la fluorescencia se cuantificó durante la amplificación en tiempo real. Se emplearon cuatro canales de lectura FAM (VDEN-1 y Control Interno), HEX (VDEN-2), Texas Red (VDEN-3) y Cys (VDEN-4) (83).

Una vez concluida la corrida del RT-PCR en tiempo real, los datos se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideraron positivas aquellas muestras cuya línea umbral (Ct), estuvo igual o por debajo del ciclo 38, y negativas aquellas muestras cuyo Ct se encontró por encima del ciclo 38 (83).

III.2.5. Selección de muestras para secuenciación

Para la secuenciación se emplearon las 75 muestras positivas a VDEN-3 que cumplían con los criterios de inclusión descritos en el acápite III.1.2:

III.2.5.1. Secuenciación de gen de la envoltura de VDEN-3 mediante el método Sanger

Se generaron secuencias del gen de la envoltura de cuatro muestras clínicas confirmadas como VDEN-3, colectadas en el período de mayor transmisión (SE 31-38). El ARN se extrajo del suero utilizando el estuche comercial QIAGEN (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, Alemania). Se utilizó el protocolo ViGenDA para la secuenciación de nucleótidos de VDEN, desarrollado por Santiago y colaboradores en 2019 (95). La RT-PCR de la región E se realizó con el sistema SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR (ThermoFisher, EUA), empleando los cebadores para VDEN-3 propuestos por Santiago y colaboradores en 2019 (95) (PCR-F: TAG CCC TAT TTC TTG CCC ATT AC y PCR-R: AGT TCA TTG GCT ATT TGC TTC CA). El producto de la RT-PCR a punto final se purificó mediante el estuche comercial QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemania).

Para la reacción de secuenciación se empleó 1 µL de cada uno de los ocho cebadores de secuencia (aproximadamente 1400 pb) (D3SEQ1: AGG CAC TTC CTT GAC CCA GAA; D3SEQ2: TGG CAA GGG AAG CTT GGT AA; D3SEQ3: AAC AGG AAG GAG CTT CTT GTG ACA; D3SEQ4: GAG CCT GTC AAT ATT GAG GCT GA; D3SEQ5: TGT CAT GGA TGG GGT GAC CA; D3SEQ6: TCC CTC TAT TGG TTC CAG GCA; D3SEQ7: CTT GCG ATC CAA GGA CAA CTA

CT; D3SEQ8: GCG TTG TCT CCA ATT CCA ATY ACT) (95), 8 µL de la mezcla de reacción de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminator CycleSequencing (DTCS) Quick Start Kit (BeckmanCoulter, EUA), 5 µL de ADN purificado y 6 µL de H₂O, hasta completar 20 µL de reacción. Para esta reacción se realizaron 50 ciclos: 96°C por 30s, 50°C durante 20s y 60°C por 4 min.

El producto de la secuenciación de ADN se purificó de acuerdo al protocolo propuesto por Santiago y colaboradores en 2019 (95) empleando el estuche comercial DTCS Quick Star Master Mix (Beckman Coulter, EUA) y se montó en el secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQTM8800 (Genome Lab Beckman Coulter, GeXP, EUA). Las secuencias obtenidas se ensamblaron y alinearon en el programa Sequencher v4.10.1 (EUA), seguidamente se compararon con secuencias cubanas de VDEN-3 colectadas en años anteriores y con otras secuencias depositadas en GenBank, incluyendo secuencias de Genotipo I (GI), Genotipo II (GII), Genotipo III-Americano-I (GIIAI) y Genotipo III-Americano-II (GIIAII). Las secuencias se analizaron en la plataforma Flavivirus Typing Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/flaviv>).

Las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión (acápite III.1.2), se secuenciaron empleando el protocolo de secuenciación de genoma completo para VDEN descrito por Adelino y colaboradores en 2021. Se utilizó la tecnología de Nanopore haciendo uso del secuenciador MinION Mk1C, versión off line (Oxford Nanopore Technologie, MinION, Reino Unido) (96). Se emplearon los cebadores específicos diseñados por el Centro Conjunto Reino Unido-Brasil para el descubrimiento, diagnóstico, genómica y epidemiología de los Arbovirus (CADDE) (<https://www.caddecentre.org/>) (96). Los cebadores fueron reconstituidos con agua según la concentración de fabricación, se preparó una solución madre 1:100 de cada cebador para una concentración final de trabajo de 10 µM/µL (96) (Tabla 2).

Se prepararon dos mezclas (A y B) de cebadores. La mezcla A se conformó por 10 µL de cada cebador Fw (forward) y Rv (reverse) con numeración impar. La mezcla B se preparó con 10 µL de cada uno de los cebadores Fw y Rv identificados con números pares (96).

Una vez preparadas las mezclas de cebadores el ARN viral se sometió a síntesis de ADNc utilizando el estuche ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis (Biolabs, Nueva Inglaterra), los reactivos se muestran en la Tabla 3. Se empleó el ciclaje mostrado en la Tabla 4.

Tabla 2. Cebadores de secuencia para VDEN-3 (96)

VDEN3 Mezcla A	Secuencia
VDEN3-1-F	TCAATATGCTGAAACGCGTGAGA
VDEN3-1-R	GCCTCGGTCTTCTGAAGCTCTA
VDEN3-3-F	ACCAATAGAGGGAAAAGTGGTGC
VDEN3-3-R	TGGCCTCGAACATCTTCCCAAT
VDEN3-5-F	GGCAAAAATAGTGACAGCTGAAACA
VDEN3-5-R	TCTCCATGTTATTTGCCCTGAGAGA
VDEN3-7-F	GCCAGTCTTCGAGCATGAGGAA
VDEN3-7-R	TTCCCAGGCTCTACGGCAATAA
VDEN3-9-F	GCAACAAAATCTGAACACACAGGA
VDEN3-9-R	CCCTCCTCATGAGTTCCACGAA
VDEN3-11-F	GGAAAGACTTCAATAGGACTCATTGTG
VDEN3-11-R	CAGGTGATCCTTCCCAGAGTGT
VDEN3-13-F	AGTGGAAGAAAGCAGAACTATAAGAGT
VDEN3-13-R	TGGAGTTCACGTTCTCTGTCCA
VDEN3-15-F	TGGACATCATATCTAGGAAAGACCAAAG
VDEN3-15-R	AGGTTGCTCTGGAAGTGAGACC
VDEN3 Mezcla B	Secuencia
VDEN3-2-F	GGGAGTAGGAAACAGAGATTTTGTGG
VDEN3-2-R	GAGTATTGTCCCATGCTGCGTT
VDEN3-4-F	GCTGAACCTCCTTTTGGGGAAA
VDEN3-4-R	TTCCACCTCCCACACATTCCAT
VDEN3-6-F	AGGTGGACAACCTTCACAATGGG
VDEN3-6-R	CTCAGCCTCTTCCTCCCATGTT
VDEN3-8-F	AAAGACTGGAACCAAACCTGGGC
VDEN3-8-R	TGCCTGAATTCCATGAGCGTTC
VDEN3-10-F	AGACCATGCTCACTGGACAGAA
VDEN3-10-R	TATGCGAGTTGGTTGTCTTGGG
VDEN3-12-F	GTGGATGGGATAATGACAATAGACCT
VDEN3-12-R	GGTGCTCAATCACAGTTGGCAT

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Tabla 3. Reactivos para la síntesis del ADNc (92).

Reactivo	Cantidad (μL)	Concentración final
Plantilla de ARN	7,0	-
Hexámeros aleatorios	1,0	2,5 μM

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Tabla 4. Ciclaje para la generación del ADNc (96).

Número de ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo
1	25	5 minutos
1	48	15 minutos
1	80	5 minutos

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Una vez concluida la RT-PCR, el producto final de la amplificación se incubó en un bloque térmico a 65°C durante 5 minutos; posteriormente se colocó en hielo para prevenir la formación de estructuras secundarias (96). Para la amplificación del producto de RT-PCR se emplearon los reactivos descritos en la Tabla 5 y el ciclaje que muestra la Tabla 6.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación del producto de RT-PCR de VDEN-3 (800-900pb) (96).

Componentes	Cantidad (μL)	Componentes	Cantidad (μL)
Agua libre de nucleasas	16,11	Agua libre de nucleasas	16,11
Tampón de reacción Q5 (5x)	5	Tampón de reacción Q5(5x)	5
dNTP (10 mM)	0,5	dNTP (10 mM)	0,5
Cebadores para mezcla A 10uM	0,64	Cebadores para mezcla B 10 μM	0,64
Q5 ADN polimerasa	0,25	Q5 ADN polimerasa	0,25

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Tabla 6. Ciclaje para la reacción de amplificación (96).

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclo
Desnaturalización inicial	98°C	1 minuto	1
Desnaturalización	98°C	30 segundos	35
Hibridación y extensión	65°C	5 minutos	
Extensión final	4°C	∞	1

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Los productos de PCR se purificaron utilizando 1x AMPure XP Beads (Beckman Coulter, California, EAU) y se cuantificaron utilizando el estuche Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA) en un fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific, EUA) (Tabla 7). Este estuche contiene un tampón (Working Solution) y dos estándares (Standard1 and Standard 2) (96).

Tabla 7. Reactivos para la cuantificación del ADN (96).

	Cantidad en µl	Cantidad de tampón µl
Estándar 1	10	190
Estándar 2	10	190
ADN	1	199

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Finalizada la cuantificación y normalización del ADN se procedió a la preparación de la librería. Fue necesario reparar los extremos de los ADN empleando una enzima de restricción y logrando que todos los fragmentos quedaran de igual longitud. (Tabla 8), Se purificaron los ADN empleando perlas magnéticas y etanol al 80% (96).

Tabla 8. Reactivos para la reparación de los extremos del ADN (96).

Componentes	Cantidad (µl)
Amplicones normalizados (mezclas A y B)	20
Ultra II End Prep Reaction Buffer	2,8
Ultra II End Prep Enzyme Mix	1,2
Total	24

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Posterior a la purificación, se adicionaron los marcadores (Código de barras nativo NB01-NB24) utilizando los estuches Ligation Sequencing y Native Barcoding (NBD104, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Inglaterra) (Tabla 9) y adaptadores (Tabla 10) (secuencias que funcionan como guías para ubicar las hebras de ADN cerca de las porinas que forman el poro) y se purificó el producto después de cada procedimiento con perlas magnéticas y etanol 80% (96).

Tabla 9. Marcadores para secuencia (96).

Componente	Cantidad (µl)
Amplicones de la reparación del ADN (Paso 2.1)	10
Código de barras nativo NB01-NB24	2,5
Blunt TA (Ligasa)	12,5
Volumen total	25

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Tabla 10. Adaptadores para secuenciación (96).

Componente	Cantidad (µL)
Muestra combinada con código de barras (del paso 4)	45
Mezcla de adaptadores (AMII)	5
Blunt TA (Ligasa)	50
Volumen total	100

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Terminada la preparación de la librería se procedió al cebado y carga de la celda de flujo empleando los reactivos descritos en la Tabla 11.

Tabla 11. Reactivos para cargar la librería en la celda de flujo (96).

Componente	Cantidad (µL)
Sequencing Buffer (SQB)	37,5
LB (perlas de Carga)	25,5
Librería de ADN (30 ng)	12
Volumen total	75

Fuente: (Adelino y colaboradores, 2021)

Una vez preparada la celda de flujo con la muestra, se inició la secuenciación nucleotídica. La recopilación de datos se realizó entre seis y ocho horas. Los ficheros de señales eléctricas sin procesar se convirtieron en secuencias de bases (proceso conocido como llamado de bases) utilizando la herramienta Guppy (<https://nanoporetech.com/es/document/Guppy-protocol>). Las secuencias consenso se generaron mediante ensamblaje de *nov*o utilizando la plataforma web Genoma Detective (<https://www.genomedetective.com>) (97, 98).

III.2.6. Análisis filogenético

Para contextualizar el genotipo III de DENV-3 a nivel global, construimos árboles filogenéticos. Para ello, recuperamos secuencias genómicas relacionadas de DENV-3 de GISAID (n=1923), que incluían datos publicados recientemente de viajeros que regresaron de Cuba (99). El alineamiento de la secuencia se realizó utilizando MAFFT (100) y las alineaciones se editaron en el paquete AliView.exe (101). Se realizaron análisis filogenéticos mediante mapas de verosimilitud en IQ-TREE 2, bajo el modelo de sustitución HKY+G4, para confirmar la presencia de señales filogenéticas (102). Las señales temporales se evaluaron utilizando TempEst y se infirieron árboles filogenéticos a escala temporal con el paquete BEAST v1.10.4 (103, 104). Empleamos una rigurosa selección de modelos mediante muestreo de rutas y procedimientos de “trampolín” (Stepping-Stone) para determinar el modelo de reloj molecular más adecuado. Se seleccionó el modelo relajado no correlacionado, que incorpora el modelo SRD06 basado en codones de sustitución de nucleótidos y el modelo coalescente bayesiano no paramétrico Skyline. Para modelar la difusión filogenética de los clados de transmisión detectados, aplicamos un modelo flexible de difusión de camino aleatorio relajado, que considera la variación específica de rama en las tasas de dispersión, utilizando una distribución de Cauchy y una ventana de fluctuación de 0,01 (105). Se asignaron coordenadas geográficas a cada secuencia. Los análisis MCMC (Markov Chain of Monte Carlo) se ejecutaron por duplicado utilizando BEAST v1.10.4, con 50 millones de interacciones y tomando muestras cada 10 000 pasos, y la convergencia se evaluó mediante el programa Tracer. Para el análisis de la distribución posterior de los árboles y la selección del árbol de mayor credibilidad (del inglés Maximum Clade Credibility, MCC), se empleó el programa TreeAnnotator tras descartar, como filtrado (burn-in), el 10% inicial de los datos (98). Los patrones espaciotemporales integrados en los árboles se visualizaron utilizando el paquete R «seraphim» v1.0. (105).

III.2.7. Equipos y materiales

- Refrigerador de 4 °C y Congelador -20 °C y -70 °C
- Centrífuga
- Microcentrífuga Eppendorf
- Gabinete de Bioseguridad Clase II
- Cristalería
- Micropipetas graduadas
- Material gastable
- Computadora e impresora
- Material de oficina
- QIAcube HT
- Cabina de Flujo de Aire horizontal (AIRTECH)
- Puntas con barreras libres de nucleasas
- Secuenciador MK1-C
- Qubit
- Placas de 96 pocillos.
- LightCycler de 96
- Estación de trabajo
- Gradillas refrigeradas
- Solución de limpieza RNAasa-DNAasa
- Celdas de Flujo R.9 (Oxford Nanopore)
- Gradillas magnéticas para placas y viales de 1,5 µL
- Cinta selladora de placas de 96
- Guantes
- Enzimas
- Perlas magnéticas
- Adaptadores
- Marcadores
- Termociclador

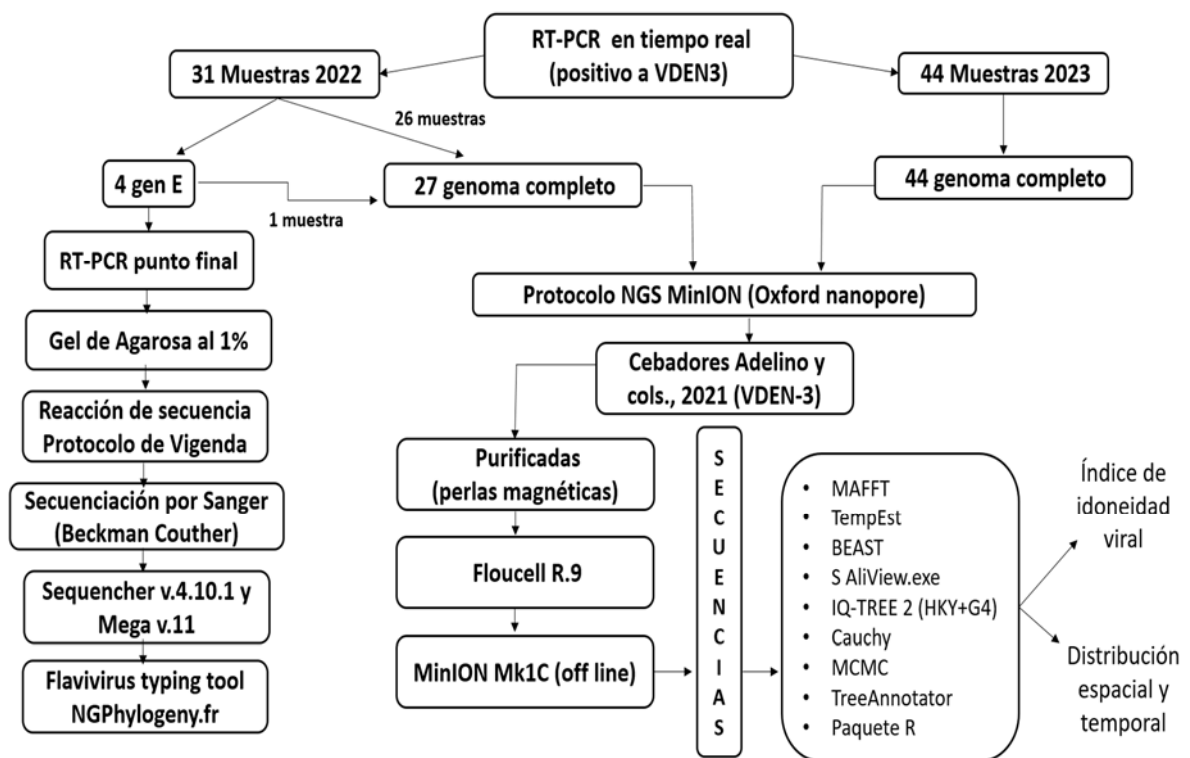


Figura 1. Flujograma de trabajo

CAPITULO IV. Resultados y Discusión

En los últimos años se observa una tendencia al incremento del número de casos de Dengue en la región de las Américas, reportándose al cierre de 2024 aproximadamente 14 millones de casos sospechosos (9). También destaca la aparición de nuevos linajes que remplazaron a los que previamente se establecieron, ratificando la importancia de mantener un estricto control y monitoreo de la circulación de los diferentes serotipos, genotipos y linajes. Los cambios de linaje se deben, en gran medida, a eventos estocásticos espontáneos e impulsados por la selección natural, que conducen a cuellos de botella en las diferentes poblaciones o cuasiespecies y dan lugar a la evolución de variantes con mayor capacidad de adaptación (106).

Desde la primera introducción del VDEN en Cuba y hasta la fecha, ocurrieron varios brotes y epidemias, todos en un contexto epidemiológico e inmunológico diferente (107, 108). En el año 1981, con la introducción de VDEN-2 en Cuba y luego de una epidemia de VDEN-1 en 1977, tuvo lugar la mayor epidemia de Dengue Hemorrágico (24). Los estudios realizados en Cuba por Guzmán y colaboradores (73), plantean que la secuencia de infección de VDEN-1-VDEN-2 tuvo consecuencias severas para la evolución del cuadro clínico de los casos reportados durante la epidemia de 1981, donde ocurrieron 158 muertes, 101 de ellas en niños y más de 10 000 casos graves y muy graves (73).

Entre los años 2000 y 2002, se reportó la introducción del serotipo 3 del virus dengue, antecedido por un pequeño brote de VDEN-2 en 1997. La cifra de casos de FHD notificados fue relativamente inferior a las reportadas durante la epidemia de 1981 (107).

El contexto epidemiológico de la última década en Cuba es complejo. En el año 2015 se reportó el primer brote controlado del virus Chikungunya en la provincia de Santiago de Cuba; entre 2016 y 2020, una epidemia de virus Zika afectó al país con 2 633 casos confirmados (109). En el año 2019, se detectó la circulación del VDEN-1, que no se reportaba desde la epidemia de 1977. Durante los años 2019, 2020 y 2021 solo se detectaron por RT-PCR los serotipos 1 y 2 del virus

dengue. Entre 2020 y 2021, ocurrió la pandemia de COVID-19, que implicó una reducción drástica del movimiento poblacional debido al aislamiento, y por tanto, una disminución del diagnóstico de casos de dengue, aunque se mantuvo la vigilancia de esta enfermedad.

Al finalizar el año 2022, más del 90% del total de casos confirmados por RT-PCR con infección de VDEN, se correspondían al serotipo 3 (LNR de Arbovirus, 2022, IPK), datos que coinciden con los publicados en Nicaragua, donde reportan que entre los años 2004 y 2022, el VDEN-3 fue el serotipo con más probabilidades de causar infecciones sintomáticas y graves en comparación con los VDEN-1 y VDEN-2, en un escenario inmunológico con antecedentes previos de circulación de otros serotipos (110).

La circulación de los cuatro serotipos del complejo del VDEN, se reportó igualmente en varios países del continente americano como Brasil, Colombia, Puerto Rico, México, Nicaragua y El Salvador (110). En Cuba, a mediados del año 2022, comienzan a observarse casos de Dengue con signos de alarma y Dengue grave en adultos y niños, llegando a alcanzar cifras considerables que no se reportaban en niños desde la epidemia de 1981.

Esta investigación se desarrolló debido al escenario epidemiológico que presentaba el continente americano en los años 2022 y 2023, donde varios países de la región reportaban la circulación de, al menos, dos serotipos de dengue, así como un aumento en la severidad del cuadro clínico de los casos con infección confirmada por RT-PCR para el serotipo de 3 (9), y como parte de la vigilancia molecular y genómica de los arbovirus en Cuba.

El resultado derivó en la obtención de 75 genomas (cuatro parciales del gen de la envoltura y 71 completos), todos autóctonos e identificados, mediante diferentes herramientas, como pertenecientes al genotipo III del VDEN-3. Este hallazgo coincide con el genotipo que circuló en las Américas desde el año 1994 y hasta el 2022 (111-113).

IV.1. Secuenciación parcial del genoma viral por el método de Sanger (gen que codifica para proteína de envoltura)

Se generaron cuatro secuencias del gen de la envoltura con una longitud de 1 230 nucleótidos que quedaron clasificadas como genotipo III del VDEN-3. En un

primer momento, solo fue posible clasificar hasta genotipo, ya que en las bases de datos GenBank y GISAID no estaban disponibles secuencias de VDEN-3 de la región de las Américas, correspondientes al mismo período. Las secuencias nucleotídicas quedaron clasificadas como genotipo III, similar al que circulaba en las Américas (linaje Americano I). Según la inferencia filogenética, el ancestro común más cercano correspondió con secuencias de la India de los años 2018 al 2021.

Al notificarse internacionalmente un nuevo linaje (3III_B.3) de este genotipo, y a punto de partida de las secuencias generadas por estudios realizados en Puerto Rico, Brasil, Níger y en el estado de Florida, EUA, se realizó un nuevo análisis de las secuencias cubanas (8, 114) y se reclasificaron como linaje 3III_C (Linaje Americano I).

IV.1.1. Análisis filogenético de los genomas parciales del gen de envoltura

Para determinar las relaciones filogenéticas, se emplearon secuencias de referencia de la plataforma GenBank de los genotipos I y II, así como secuencias de los linajes 3III_C y 3III_B.3. Las cuatro secuencias cubanas se agruparon en un clado monofilético junto a las secuencias de EUA, Puerto Rico y Níger, de 2022 y con secuencias de Jamaica (2016 y 2019) e India (2018, 2019, 2021 y 2022). Es de destacar que algunas secuencias de EUA y la de Níger, provenían de viajeros procedentes de Cuba (114, 115) (Figura 2).

Con las secuencias parciales del gen de la envoltura, se identificó el genotipo y el linaje del VDEN-3 que predominó en Cuba durante los años 2022 y 2023. Este resultado coincide con los reportes de la región de las Américas del mismo período; muestra la validez de la vigilancia genómica desarrollada en Cuba y ratifica la veracidad del sistema de nomenclatura dinámica para el VDEN propuesta en 2024 (62).

Estos resultados, además, son similares a los generados por Naveca y colaboradores en Brasil (8), quienes detectaron que en 2023 circuló el genotipo III del VDEN-3 en la región norte de ese país, asociada con una nueva introducción de este genotipo desde el subcontinente indio hasta las Américas.

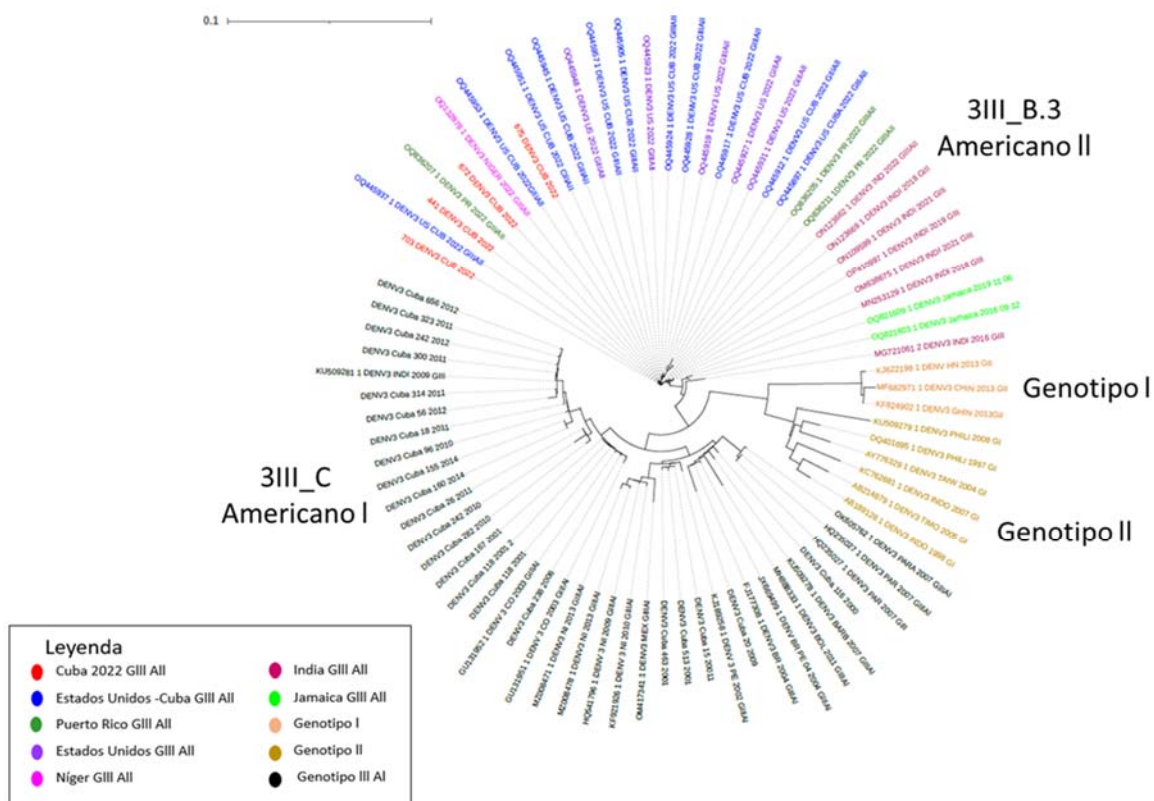


Figura 2. Construcción filogenética de Máxima Verosimilitud del gen de la envoltura de VDEN-3, realizada en la plataforma [NGphylogeny.fr](https://ngphylogeny.fr/), para la cual se tomaron secuencias de referencia de VDEN-3 de la base de datos [GenBank](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), identificadas por número de acceso, serotipo, país, año y genotipo. También se utilizaron secuencias cubanas del 2000 al 2022. Las de 2022 se representan en color rojo por número de muestra, serotipo de VDEN, país y año. Las secuencias cubanas restantes aparecen en color negro, identificadas por serotipo, país, número de muestra y año. Las secuencias naranja pertenecen al GI, las marrón claro al GII, las negras al GIIIAI (linaje 3III_C) y el resto a GIIIAII (Cuba, Cubano-Americano, EUA, Puerto Rico, Níger, India y Jamaica) (linaje 3III_B.3).

IV.2. Secuenciación del genoma viral completo mediante la tecnología Nanopore

Con la finalidad de ratificar los resultados descritos en el acápite IV.1 se realizó un estudio del genoma completo a partir de la introducción en el IPK de la tecnología Oxford Nanopore, en octubre de 2023.

Se secuenciaron 71 muestras, seleccionadas previamente mediante muestreo por conveniencia entre las colectadas en Cuba entre los años 2022 y 2023 para obtener una visión más global y concisa sobre el panorama epidemiológico-molecular del VDEN-3. (8, 114).

Las muestras se sometieron nuevamente, al análisis mediante RT-PCR para corroborar la positividad. Todas resultaron ser positivas y mostraron valores de Ct entre 15-30, siendo el valor promedio de 22.

Se generaron genomas completos de todas las muestras positivas, 27 correspondientes al año 2022 y 44 al año 2023, distribuidas entre las provincias de Artemisa, Camagüey, Ciego de Ávila, Cienfuegos, Granma, Holguín, Guantánamo, La Habana, Las Tunas, Matanzas, Pinar del Río, Sancti Spíritus, Santiago de Cuba y Villa Clara (Figura 3).

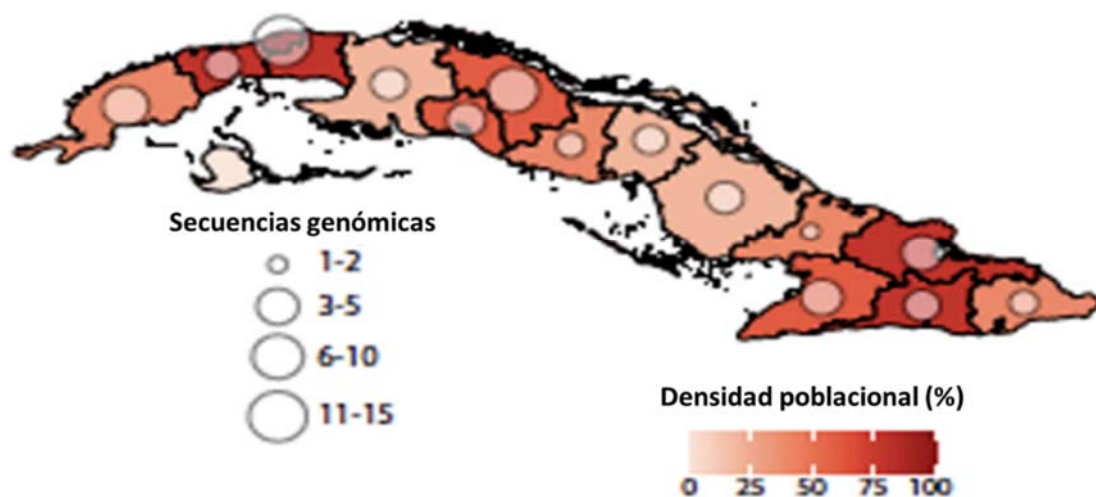


Figura 3. Proporción de secuencias generadas por provincia. El tamaño de los círculos, representa el número de secuencias y la intensidad del color rojo hace referencia a la densidad poblacional en cada provincia.

La edad de los pacientes osciló entre los 3 y los 85 años (mediana=38), con un 49% de hombres (n=35) y un 51% de mujeres (n=36), sin diferencias

significativas entre el número de secuencias generadas para cada uno de los géneros. Todos los casos fueron autóctonos, con un 93% clasificado como Dengue sin signos de alarma y un 7% como Dengue Grave.

Un estudio realizado en Florida en 2023 por Jones y colaboradores, evidenció que el 7% del total de casos notificados de Dengue, correspondía a casos autóctonos y el 93% a viajeros, la mayoría procedentes de Cuba. El serotipo más frecuente fue el 3, representando el 64% del total de casos, seguido por los serotipos 2, 1 y 4 con una positividad del 10%, 7% y 5%, respectivamente. La proporción de hombres y mujeres no mostró diferencias significativas (51% hombres y 49% mujeres) (114). Estos datos se asemejan a los reportados por el LNR de Arbovirus en Cuba durante el año 2022.

La frecuencia de vuelos internacionales potencia la diseminación de los agentes infecciosos, generando la aparición de brotes de una enfermedad determinada, en regiones no endémicas. La proximidad geográfica que existe entre algunos territorios también favorece la propagación (116).

IV.2.1 Construcción filogenética a partir del genoma completo

Para la construcción filogenética se emplearon 983 secuencias genómicas del VDEN-3 depositadas en [GISAID](#) y 93 secuencias cubanas (22 correspondientes al período del 2001 al 2014 y las 71 generadas en este estudio, comprendidas entre los años 2022 y 2023) (Figura 3).

Con el empleo del sistema dinámico de clasificación de linajes del VDEN, propuesto en 2024 por Hill y colaboradores (58), se comprobó que, tanto las 22 secuencias cubanas del periodo 2001 al 2014, como los 71 genomas del VDEN-3 generados en este estudio, pertenecían al genotipo III, indicando una transmisión local sostenida. Las secuencias cubanas autóctonas se agruparon en dos clados diferentes, el clado I correspondiente al linaje 3III_C o linaje Americano I, más antiguo (2001 al 2014) y el clado II, que representa el linaje 3III_B.3 o linaje Americano II reportado recientemente en las Américas (2022 al 2023) (Figura 4).

El análisis filogenético corroboró que las 22 secuencias parciales cubanas del 2001 al 2014 pertenecen al linaje 3III_C, mientras que de las 71 secuencias de

genoma completo comprendidas entre los años 2022 y 2023, 70 corresponden al nuevo linaje 3III_B.3 y una al linaje 3III_C.

El análisis filogenético también reveló que el serotipo 3 del Dengue, fue introducido en el país múltiples veces, primero desde el continente asiático y luego desde el continente americano. Los datos que aporta esta construcción filogenética sugieren, además, que el linaje 3III_C fue reemplazado por el linaje 3III_B.3 en el año 2020.

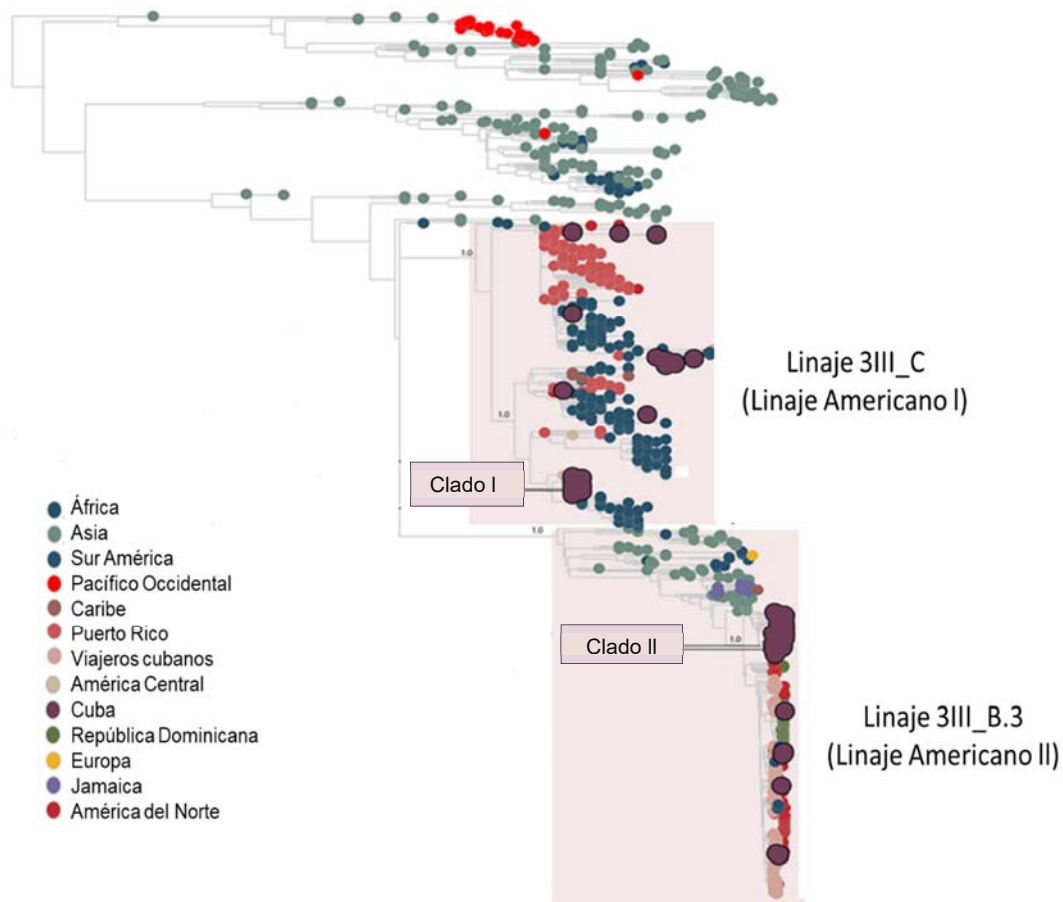


Figura 4. Filogenia de Máxima Verosimilitud del genoma completo del VDEN-3. Se emplearon las secuencias genómicas completas de Cuba (n=71) generadas en este estudio, combinadas con las secuencias disponibles públicamente (n=983) del GenBank, recolectadas hasta el 20 de mayo de 2024. Los colores indican la ubicación geográfica del muestreo. El apoyo a la estructura ramificada se muestra mediante valores de bootstrap en nodos clave.

Resultados similares se observaron en Brasil, en 2023, donde los genomas secuenciados se agruparon en un nuevo clado junto a secuencias de Asia,

independientes a su vez de las secuencias colectadas hasta 2022, que se correspondían con el linaje 3III_C establecido en el continente. Naveca y colaboradores demostraron que se trataba de la introducción de un nuevo linaje del genotipo III y no del resurgimiento del linaje 3III_C.

El remplazo de serotipos, genotipos y linajes, es un fenómeno bien documentado, en el cual influyen varios eventos de presión selectiva. Muchos territorios a nivel mundial reportan el incremento de casos clínicos de Dengue grave tras la introducción de una nueva variante (117, 118).

En Myanmar, entre los años 2017 y 2019, Soe y colaboradores, plantean que el cambio de genotipo/recambio de serotipo confiere ventaja para una transmisión mejorada, que a su vez conduce a brotes más grandes. También exponen que la expansión de un genotipo en un área geográfica determinada puede ser consecuencia de la introducción de una nueva cepa de virus dengue y su evolución a nivel local (119).

En Perú, Paraguay, Nicaragua, Sri Lanka y Malasia se documentó que el remplazo de linajes, coincide con el desarrollo de importantes epidemias, influenciado, posiblemente, por la diversidad de serotipos y linajes que circularon en el pasado, resultando en el aumento de casos sintomáticos e incluso en la aparición de casos graves(113, 120-123).

En 2018, Pollett y colaboradores presumen que las introducciones repetidas del VDEN en diversas regiones geográficas, espaciadas temporalmente, limitan la persistencia de un único linaje de dengue, ya que en la mayoría de las ocasiones terminan desplazando la circulación de los linajes previamente establecidos dentro de los genotipos e incluso entre serotipos (124). Estos autores expresan que la circulación de varios serotipos y genotipos es posible, y que los genotipos de nueva introducción pueden causar cuellos de botella, desplazando a los genotipos y linajes establecidos como dominantes, impulsando la diversidad de genotipos y linajes distribuidos de forma espacial y temporal en los diferentes continentes (124).

IV.1.2.2 índice de idoneidad viral y análisis espacio-temporal

Se estimaron los índices de idoneidad viral de mosquitos basados en datos climáticos, lo que indicó una marcada estacionalidad (Figura 5), en consonancia con hallazgos descritos previamente en El Caribe (125). Las variaciones climáticas son ampliamente reconocidas como un factor clave que influye en la actividad epidémica y la propagación geográfica de los virus transmitidos por el *Aedes*, debido al impacto en la dinámica de la población de mosquitos y en el período de incubación viral extrínseca (126).

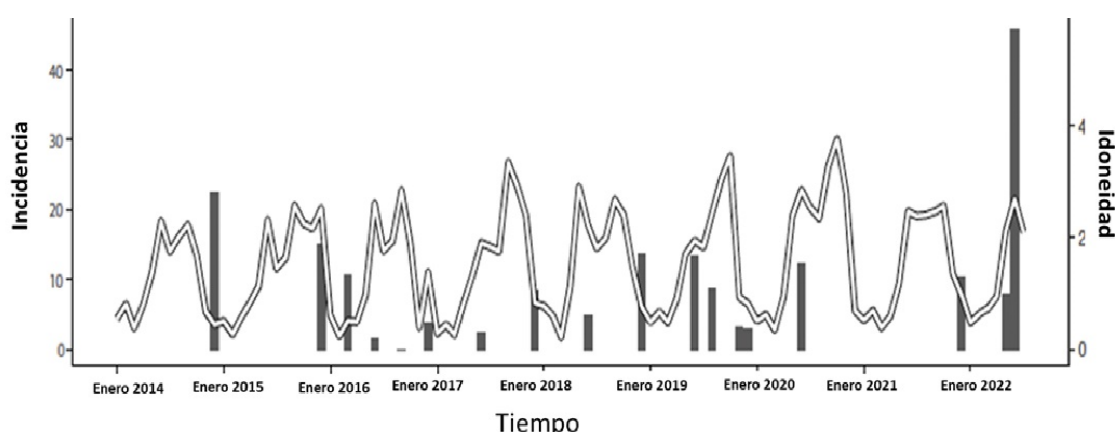


Figura 5. Serie temporal de casos notificados semanalmente (2014-2022) (barras negras) normalizados por cada 100 000 personas (127) y media diaria de idoneidad viral del mosquito (índice P – líneas blancas).

El análisis espacio-temporal confirmó la circulación del genotipo III del VDENV-3 en las regiones occidental, central y oriental de Cuba (Figura 6). Las estimaciones retrospectivas de idoneidad entre los años 1979 y 2022, revelaron patrones espacio-temporales claves (Figura 6b). El análisis a largo plazo mostró un período anual de alto riesgo entre los meses de mayo a noviembre (Figuras 6a, 6b), en los cuales la idoneidad viral es mayor; y esto coincide justamente con el período lluvioso, en el que se favorecen las condiciones para la proliferación del vector y, por consiguiente, el aumento en el número de casos notificados. Históricamente en Cuba las epidemias de arbovirus se desarrollan en este margen de tiempo (128). En mayo de 2024 se reportaron los primeros casos de Fiebre de Oropouche en Cuba (129) y en julio de 2025, se notificaron los primeros casos de VCHIK, epidemia que transcurre actualmente (130).

Entre los años 2015 y 2022, la idoneidad fue máxima en la Isla de la Juventud, Camagüey y Las Tunas, y mínima en Villa Clara, Sancti Spíritus, Santiago de Cuba y Guantánamo (Figura 6c). La idoneidad durante la temporada de mayo a noviembre alcanzó su punto máximo en el occidente y centro de la isla, particularmente en la capital (Figura 6d), mientras que la idoneidad fuera de temporada, entre diciembre y abril, fue mayor en el oriente del país; en estos últimos meses, las temperaturas son superiores en las provincias más orientales, lo que pudiera estar explicando dichos patrones (Figura 6e).

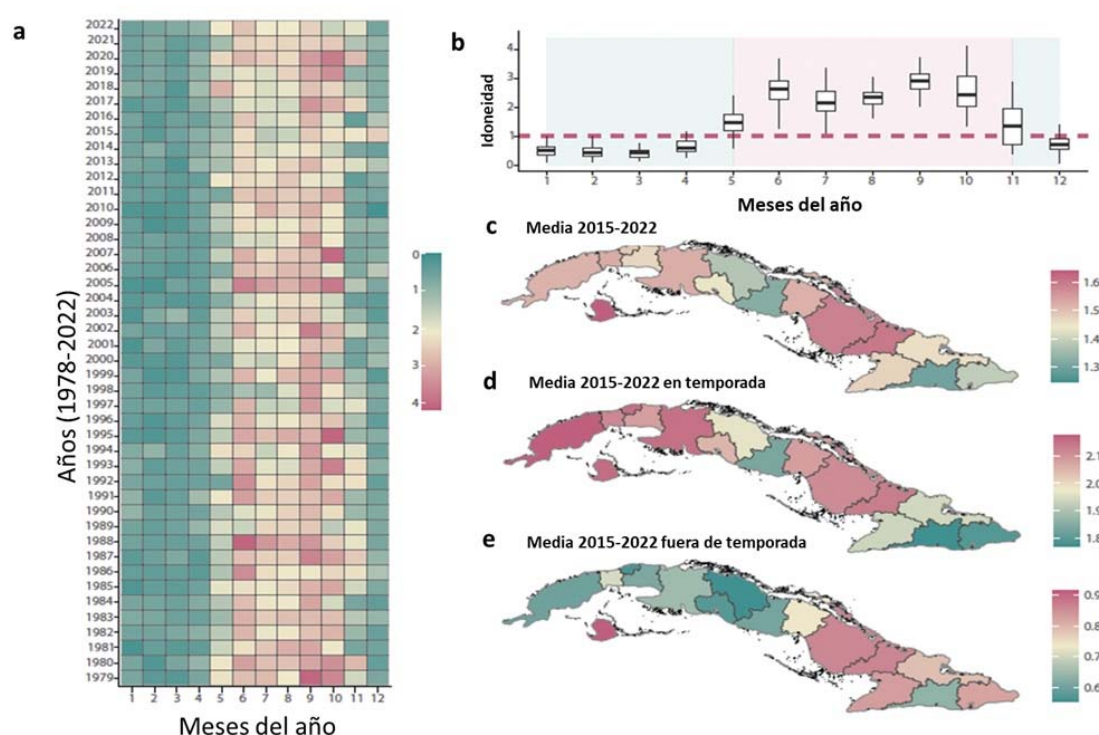


Figura 6. Tendencias de la temperatura en Cuba entre 1979 y 2022.

En un estudio realizado en cuatro archipiélagos del Atlántico (Madeira, Islas Canarias, Cabo Verde y Sao Tomé y Príncipe) se sugiere que el aumento de la distancia desde el ecuador (desplazamiento hacia regiones subtropicales y no tropicales), puede estar vinculado a una reducción global en la idoneidad de la transmisión. En dicho estudio se indicó que la idoneidad máxima es mucho más probable entre los meses de junio y octubre para los archipiélagos con una estacionalidad fuerte (Cabo Verde, Madeira y Canarias) y para el archipiélago con estacionalidad débil (Sao Tomé y Príncipe) entre los meses de octubre y enero (131).

IV. 1.2.3 Análisis filogeográfico de los genomas completos del VDEN-3

Se emplearon los metadatos de las secuencias (provincia y fecha de colecta de las muestras) para comprender la diseminación geográfica del VDEN-3.

Con la finalidad de garantizar que las estimaciones fueran lo más correctas posibles, se mapearon inicialmente los movimientos virales de las secuencias del clado I (2000-2002), mostrando la dinámica de diseminación cronológica y espacial dentro de La Habana. Se sugiere que la entrada del VDEN-3 ocurrió a finales de marzo del año 2000 (95% HPD: 24 de abril de 1999-28 de diciembre de 2000), seguido de un pequeño brote de VDEN-3 y VDEN-4 en septiembre de 2000 en La Habana que se controló rápidamente. La figura 7a muestra el análisis espacio-temporal del clado I del VDEN-3 y evidencia que el virus se propagó desde el centro hacia el sureste y el noreste, lo que indica transmisión intraprovincial.

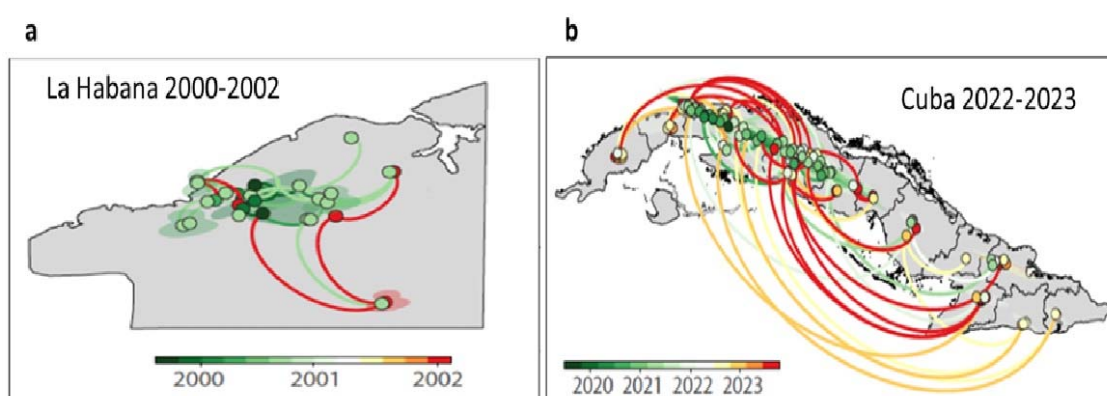


Figura 7. Reconstrucción espacio-temporal de la propagación de DENV3-III de los clados I y II en Cuba. Los círculos representan nodos de la filogenia de máxima credibilidad del clado, coloreados según su tiempo de ocurrencia inferido (escala mostrada). Las áreas sombreadas representan el intervalo de densidad superior al 80% y representan la incertidumbre de las estimaciones filogeográficas para cada nodo. Las líneas curvas sólidas denotan los vínculos entre los nodos y la direccionalidad del movimiento.

La figura 7b refleja el análisis espacio-temporal del clado II que incluye los genomas completos generados en el estudio y muestra los movimientos virales entre las provincias del país, sugiriendo un origen medio a principios de julio de 2019 (95% HPD: 28 de agosto de 2018-5 de enero de 2021), dato que coincide

con la fecha de entrada sugerida por Naveca y colaboradores para el linaje 3III_B.3 en Brasil (8). Aunque no se detectaron casos humanos de VDEN-3 entre 2019 y 2021, Marquetti y colaboradores identificaron el VDEN-3 mediante RT-PCR en larvas de *Aedes albopictus* en La Habana, en 2019 (132). Este clado se propagó desde las provincias del norte a las del sur, particularmente a finales del 2022 e inicios del 2023.

Con el cese de las medidas de confinamiento establecidas durante la pandemia de COVID-19, aumentó la movilidad de la población humana hacia todas las provincias y municipios (con un origen principalmente en la capital del país) y por consiguiente, se elevó la circulación de diferentes patógenos, lo que unido a los altos niveles de infestación del vector *Aedes aegypti*, provocó un incremento de la circulación de los virus dengue, particularmente el VDEN-3.

Las epidemias de VDEN en las regiones tropicales y subtropicales aparecen con una frecuencia entre 2 y 5 años, y están influenciadas fuertemente por las estaciones climáticas. El aumento en la duración interanual de la transmisión del virus, se ve influenciado por factores humanos, vectoriales y climáticos. La movilidad humana, la migración, la facilidad de viajar entre continentes en cuestión de horas, son factores que potencian la diseminación viral de forma acelerada. El constante empeño del ser humano por colonizar zonas selváticas, aumenta la exposición a eventos zoonóticos entre el vector y los humanos. La unión de estos elementos provoca el surgimiento de nuevos patrones de transmisión ya sean no endémicos, endémicos o hiperendémicos (133).

Resultados similares se observaron en Colombia cuando estudiaron los efectos de la movilidad humana estacional, del hábitat del *Aedes aegypti*, y la gravedad de la epidemia del virus Zika ocurrida entre 2015 y 2016. En dicho estudio se plantea que la movilidad del hospedero es un factor determinante en la propagación del virus y que el aumento de casos se detectó durante la temporada de turismo. El incremento de viajeros y la movilidad hacia áreas sin transmisión previa del virus, generó que se estableciera en un plazo mucho más corto y que se expandiera a un área geográfica mayor (126).

Discusión general

Los análisis filogenéticos son una herramienta fundamental en virología para investigar la evolución de rasgos clave, como la virulencia, y el impacto de las presiones selectivas ejercidas sobre las cuasiespecies virales en determinada población hospedera. Las poblaciones virales están sujetas a un proceso de selección natural que favorece a las variantes con mayor eficacia replicativa y capacidad de transmisión. Sin embargo, cuando un virus requiere adaptarse a dos o más especies para completar su ciclo de vida, como ocurre en los arbovirus que circulan entre un vector y un hospedero humano, se restringe la acumulación de mutaciones y, en consecuencia, se modula el ritmo evolutivo (134, 135).

La determinación de las inferencias filogenéticas, así como el análisis de los parámetros dinámicos de propagación del VDEN durante epidemias o brotes, permite realizar estimaciones sobre el tiempo aproximado de la introducción de un nuevo serotipo, genotipo o linaje; determinar si se trata de introducciones independientes y también inferir el tiempo de circulación críptica en determinada población de vectores, hasta que el virus se establece como serotipo, genotipo o linaje dominante (124).

Desde la reintroducción del VDEN-3 en el continente Americano en el año 1994 (113) y hasta el año 2021, solo se notificaba la circulación del linaje 3III_C (linaje Americano I). Investigaciones recientes realizadas en Brasil, Cuba, EEUU y Puerto Rico, mostraron la existencia y circulación de un nuevo linaje del VDEN-3 (3III_B.3) a partir del año 2022, agrupadas en un clado monofilético cuyo ancestro común más próximo parece ser el subcontinente indio (8, 114).

El aumento en el reporte de casos de Dengue con signos de alarma y Dengue grave durante la epidemia que ocurrió en Cuba entre los años 2022 y 2023, pudo estar asociado a factores virales o a factores del hospedero o a ambos, como fue descrito por Kourí y colaboradores en 1987 (136). La circulación simultánea de los cuatro serotipos del complejo dengue aumenta la posibilidad de que se desarrollen infecciones secundarias y hasta terciarias en un mismo hospedero, favoreciendo diferentes secuencias de infección, algunas más asociadas al desarrollo de la FHD. La inmunidad anti-VDEN preexistente puede aumentar la gravedad de la infección secundaria y terciaria mediante la amplificación viral

dependiente de anticuerpos (ADE) (125). La tasa de mutación viral y la evolución impulsan el aumento de la virulencia y la aparición de nuevos linajes (125).

Según los datos reportados por la vigilancia de laboratorio en Cuba, el serotipo 1 no circulaba desde 1977 y entra nuevamente al país en 2019, circulando hasta el 2022. El serotipo 2 se mantiene circulando desde su entrada y el serotipo 4 circuló desde el 2006 hasta el 2016, reintroduciéndose nuevamente en 2022 hasta hoy (datos no publicados del LNR Arbovirus del IPK).

La infección secundaria se confirma como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. No obstante, otros factores de riesgo como el intervalo entre las infecciones, la edad, las enfermedades crónicas, la secuencia de infección viral y la asociación del segundo serotipo a determinados genotipos, se identifican como de relativa importancia (107).

Aunque los cuatro serotipos de dengue se asocian con el desarrollo de FHD, los VDEN-2 y VDEN-3 se detectan en un mayor porcentaje, en pacientes con FHD en el curso de una infección secundaria (137). Las secuencias de infección VDEN-1/VDEN-3 y VDEN-2/VDEN-3 se relacionaron con casos de FHD durante la epidemia cubana entre 2001 y 2002. La secuencia de infección VDEN-3/VDEN-2, así como las dos anteriormente mencionadas, se asoció a casos de FHD en las epidemias de El Salvador 2000, y Brasil 2001 (138).

En un estudio realizado en Cuba en 2013, Rodríguez y colaboradores describieron que las variaciones genéticas de los diferentes serotipos no se asociaron de forma consistente con los diferentes cuadros clínicos. No obstante, postularon que la introducción repetida de nuevos serotipos o genotipos, que conduzcan al reemplazo de los establecidos previamente durante un período interepidémico, y los eventos de extinción y transmisión sostenida del virus, se pueden relacionar directamente con variaciones en los patrones de gravedad de brotes y epidemias (112).

En el 2023 Brasil reportó la introducción del nuevo linaje de dengue 3 III_B.3, asociado a la aparición de casos graves. Naveca y colaboradores plantearon que la circulación previa de otros serotipos del VDEN incrementa la probabilidad de aparición de casos graves debido a la acumulación de individuos con riesgo de

desarrollar una infección secundaria, similar a lo ocurrido en Cuba en 2022 y 2023 (8).

En Bangladesh, en 2023, Rummana y colaboradores analizaron genéticamente el virus dengue en casos graves y casos sin complicaciones. Este estudio tenía como antecedentes la co-circulación de tres serotipos durante el año 2018, siendo el VDEN-2 el serotipo dominante. En el año 2019, el VDEN-2 fue remplazado totalmente por la circulación de VDEN-1 (8.1%) y del VDEN-3 (91,9%), y durante los años siguientes hasta 2022, el VDEN-3 fue el serotipo dominante. En el estudio se identificó que el genotipo presente entre 2017 y 2022 era el I, introducido en el país desde 2013. Estos investigadores plantean que es posible que la gravedad de la enfermedad esté dada justamente por la reactividad cruzada que existe entre los serotipos del complejo dengue, ya que el desarrollo de Dengue grave está estrechamente relacionado con infecciones secundarias (139).

Varios estudios plantean que la presencia de mutaciones individuales en los flavivirus influye directamente en la interacción virus-célula, dotándolos de mayor o menor nivel de virulencia entre las diferentes cepas dentro de una familia viral. Las variaciones genéticas en las proteínas virales pueden ser silentes o no, y estar directamente relacionadas con los cambios funcionales de dichas proteínas (140).

Debemos tener en cuenta los elementos antes abordados, dejando claro que el desarrollo de la gravedad clínica en el Dengue no se debe solo a un único elemento. Es necesario observar todo el panorama con un enfoque multidisciplinario, con el objetivo de que todas las teorías e hipótesis converjan en una respuesta que haga posible esclarecer las interrogantes sobre el aumento de la transmisión y patogenicidad viral durante una epidemia. Kourí y colaboradores, luego de la epidemia de 1981, publicaron que la asociación de diferentes factores como los antecedentes genéticos del individuo, las comorbilidades, la infección secundaria, la cepa viral y el contexto epidemiológico, determinan en gran medida el curso de la enfermedad por dengue (136).

Como toda investigación, nuestro estudio tiene limitaciones, entre ellas que las muestras seleccionadas se limitaron a un periodo específico de la epidemia, y que no se estudiaron los antecedentes de Dengue en los pacientes incluidos en el mismo. Aunque en el estudio no nos trazamos como objetivo determinar las implicaciones de los posibles cambios aminoacídicos presentes en las secuencias analizadas, es una línea de investigación que continúa y dará la posibilidad de realizar un análisis más detallado, de la modelación de las proteínas para identificar la posición exacta de los cambios, y determinar su papel en la estructura y funcionalidad de las mismas.

No podemos obviar que Cuba constituye uno de los destinos turísticos de relevancia en la región de El Caribe. Semejante condición le confiere una mayor vulnerabilidad y riesgo de importación de los virus. Al ser una isla pequeña, comparada con países cuya extensión geográfica es mayor, se acelera la transmisión de nuevos serotipos, una vez introducidos en el país, lo cual aumenta la probabilidad de divergencia genética.

El incremento global de las migraciones y viajes, el cambio climático, el crecimiento de la población, la urbanización no controlada ni planificada y la aplicación de medidas de control vectorial poco efectivas son responsables de la introducción y transmisión de serotipos y sus consecuencias tanto a nivel local, regional como global, por lo que informar el serotipo y el cambio genotípico a principios de cada año, puede ayudar a predecir la severidad de la transmisión la epidemia y de la enfermedad (61).

La introducción en Cuba del serotipo 3 del virus dengue después de varios años de ausencia; el surgimiento del nuevo linaje 3III_B.3 con la posible presencia de mutaciones específicas que confieran mayor virulencia intrínseca, mayor eficiencia replicativa, y por ende, mayor carga viral; la inmunidad previa del hospedero al VDEN con la posibilidad de desarrollo de casos de infección secundaria por VDEN-3 en individuos con antecedentes de una infección primaria por VDEN o incluso por VZIK y la posible capacidad de evasión de la respuesta inmunológica, son factores a considerar como desencadenantes del aumento en la transmisión y la aparición del Dengue grave, en los casos

confirmados durante la epidemia del VDENV-3 ocurrida entre los años 2022 y 2023 (107, 124, 125, 134 y 135).

El fortalecimiento de la vigilancia genómica y el estudio integrado de los factores que pueden contribuir al incremento de la transmisión viral y la severidad de la enfermedad, son fundamentales al concebir estrategias integrales para el manejo oportuno de brotes y epidemias e incidir en el tratamiento adecuado de los pacientes.

CAPITULO V. Conclusiones

- ✓ Se identificó la circulación en el país de un nuevo linaje del genotipo III (3III_B.3) del virus dengue 3, causante de la epidemia de 2022-2023, y probablemente asociado al desarrollo de casos graves en niños y adultos.
- ✓ Se determinó que el linaje 3III_B.3 desplazó al 3III_C en el año 2020 y que su diseminación ocurrió del occidente al oriente del país y que la idoneidad máxima se relacionó con patrones espacio-temporales claves de mayor y menor transmisión en el país.

CAPITULO VI. Recomendaciones

- ✓ Extender el estudio a los restantes serotipos del complejo dengue y al resto de los arbovirus identificados en el país durante los últimos años.
- ✓ Realizar el análisis de las mutaciones presentes en el genoma y su repercusión en la estructura y funcionalidad de las proteínas virales que puedan explicar una mejor adaptación, evolución, transmisión, virulencia y patogenicidad del virus dengue 3 en Cuba.

CAPITULO VII. Referencias Bibliográficas

1. Bacallao GC, Quintana O. Dengue. Revisión bibliográfica. Acta Med Centro[Internet]. 2013[citado 16 jul 2025];7(1): 96-108.Disponible en: <https://revactamedicacentro.sld.cu/index.php/amc/article/view/106>
2. Tsuda Y, Maekawa Y, Ogawa K, Itokawa K, Komagata O, Sasaki T, et al. Biting density and distribution of *Aedes albopictus* during the September 2014 outbreak of dengue fever in Yoyogi Park and the vicinity of Tokyo Metropolis, Japan. Jpn J Infect Dis. 2016;69(1):1-5. Disponible en: <https://doi.org/10.7883/yoken.jjid.2014.576>
3. Sirisena P, Mahilkar S, Sharma C, Jain J, Sunil S. Concurrent dengue infections: Epidemiology & clinical implications. Indian J Med Res. 2021;154(5):669-79. Disponible en: https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_1219_18
4. 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. Nat Commu. 2024;15(1):3508. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47774-8>
5. Logiudice J, Alberti M, Ciccarone A, Rossi B, Tiecco G, De Francesco MA, Quiros-Roldan E. Introduction of Vector-Borne Infections in Europe: Emerging and Re-Emerging Viral Pathogens with Potential Impact on One Health. Pathogens. 2025;14(1):63. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pathogens14010063>
6. Organización panamericana de la Salud. Actualización Epidemiológica - Aumento de casos de dengue en la Región de las Américas[Internet]. Washington, D.C: OPS; 2024[citado 16 jul 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-aumento-casos-dengue-region-americas-29-marzo-2024>
7. García MP, Padilla C, Figueroa D, Manrique C, Cabezas C. Emergencia del genotipo Cosmopolitan del virus dengue serotipo 2 (DENV2) en Madre de Dios, Perú, 2019. Rev Peru Med Exp Salud Pública[Internet]. 2022[citado 16 jul 2025];39(1):126-8. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/10861>
8. Naveca FG, Santiago GA, Maito RM, Meneses CAR, do Nascimento VA, de Souza VC, et al. Reemergence of dengue virus serotype 3, Brazil, 2023. Emerg Infect Dis. 2023;29(7):1482-4. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid2907.230595>
9. Organización panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológico-Aumento de Casos de Dengue na Região das Américas[Internet]. Washington, D.C: OPS; 2024[citado 16 jun 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/pt/documentos/alerta-epidemiologico-aumento-casos-dengue-na-regiao-das-americas-16-fevereiro-2024>

10. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(12):6986-91. Disponible en: [https://doi.org/ 10.1073/pnas.0832193100](https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100)
11. Paulino-Ramírez R, Mueses Jiménez SP, Peguero AG, Sánchez Morfe N. Travel surveillance uncovers dengue virus dynamics and introductions in the Caribbean. *Nat Commun*. 2024; 15(1): 3508. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47774-8>
12. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: a minireview. *Viruses*. 2020;12(8):829. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v12080829>
13. Celli FF. Basic standards in handling patients with dengue fever, hemorrhagic dengue and dengue shock. *Acta Cient Venez*. 1998;49(suppl 1):18-24.
14. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644-52. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)
15. Horstick O, Martinez E, Guzman MG, Martin JLS, Ranzinger SR. WHO dengue case classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathog Glob Health*. 2015;109(1):19-25. Disponible en: <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000003>
16. Imad HA, Phumratanaprapin W, Phonrat B, Chotivanich K, Charunwatthana P, Muangnoicharoen S, et al. Cytokine expression in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients with bleeding and severe hepatitis. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;102(5):943-50. Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0487>
17. Wellekens K, Betraíns A, De Munter P, Peetermans W. Dengue: current state one year before WHO 2010–2020 goals. *Acta Clin Belg*. 2022;77(2):436-44. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17843286.2020.1837576>
18. Guzman MG, Berrio LA, Álvarez Valdés ÁM, Álvarez Vera M, Gil AB, Ferrer DB. *Dengue*. Médicas EC, editor 2014.
19. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003;3(1):19-28. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00004-2)
20. Villabona-Arenas CJ, Zannotto PMdA. Worldwide spread of dengue virus type 1. *PloS one*. 2013;8(5):e62649. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062649>
21. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3): 480-96. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.480>
22. Brady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MU, Messina JP, Reiner RC, Jr., et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasit Vectors*. 2014;7:338. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-338>

23. Bureau PAS. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control: Pan American Health Organization; 1994.
24. Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. Bull Pan Am Health Organ. 1986; 20 (1): 24-30
25. Díaz G, Rodríguez-Roche R, Guzmán MG. Relación genética del virus dengue 1 aislado en Cuba durante la epidemia de 1977. Rev Cubana Med Trop[Internet]. 2016[citado 16 jun 2025];68(1). Disponible en: <https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/124>
26. Rodríguez-Roche R, López Matilla L, Álvarez Vera M, Morier Díaz L, Guzmán Tirado M. Propiedades biológicas de cepas de dengue virus-3 aisladas durante la epidemia ocurrida en La Habana, 2001-2002. Rev Cubana Med Trop[Internet]. 2012[citado 16 jun 2025];64(2):187-98. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000200008&lng=es
27. Guzmán MG, Vázquez S, Álvarez M, Pelegrino JL, Amores DR, Martínez PA, et al. Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba, 1970-2017. Rev Cubana Med Trop[Internet]. 2019[citado 16 jun 2025]; 71(1):1-31. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602019000100008&lng=es
28. Pérez MM Alvarez M, Pérez L, Benítez AJ, Serrano S, García I, et al. Emergence of a New Lineage of Dengue 3 Virus in Cuba. CurrTrop Med Rep. 2025; 12(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40475-025-00343-5>
29. Martinez E, Consuegra A, Capiro I, Ramos R, Rodríguez A, Guzmán M. Severe dengue epidemic in children without fatalities. Clin Res Infect Dis. 2023;7(1):1061. Disponible en: <https://doi.org/10.47739/2379-0636/1061>
30. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. J Virol. 2000;74(7):3227-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3227-3234.2000>
31. International Committee on Taxonomy of Viruses. History of the taxon: species: Orthoflavivirus dengue (2024 Release, MSL #40) 2024 [Available from: ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403081&taxon_name=Orthoflavivirus]
32. Lindenbach B, Murray C, Thiel H, Rice C. Flaviviridae. 1, 712–746. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.-
33. Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. Viruses. 2011;3(9):1739-56. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v3091739>

34. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infect[Internet]. 2011[citado 16 jun 2025];15(1):33-43. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100006&lng=en
35. Pan P, Zhang Q, Liu W, Wang W, Lao Z, Zhang W, et al. Dengue virus M protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce vascular leakage in mice. J Virol. 2019;93(21): e00996-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JVI.00996-19>
36. Heinz FX, Allison SL. Flavivirus structure and membrane fusion. Adv Virus Res. 2003;59:63-97. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59003-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59003-0)
37. Contreras M, Guillén AV, Rincón MA, Moreira R, Callejas D. Aspectos genéticos del virus del dengue. QhaliKay[Internet]. 2021[citado 16 jul 2025];5(2):79-88. Disponible en: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/QhaliKay/article/view/3496>
38. Cervera HS, CristanchoSK. Proteína NS1: blanco terapéutico para infecciones por Dengue y Zika[Tesis de grado; Internet]. Colombia: Universidad El Bosque; 2020[citado 16 jun 2025]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12495/6389>
39. Diosa-Toro M, Prasanth KR, Bradrick SS, Garcia Blanco MA. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. Virol J. 2020;17(1):60. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>
40. Nie Y, Deng D, Mou L, Long Q, Chen J, Wu J. Dengue virus 2 NS2B targets MAVS and IKK ϵ to evade the antiviral innate immune response. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2023;33(5):600-6. Disponible en: <https://doi.org/10.4014/jmb.2210.10006>
41. Adler NS, Cababie LA, Sarto C, Cavasotto CN, Gebhard LG, Estrin DA, et al. Insights into the product release mechanism of dengue virus NS3 helicase. Nucleic Acids Res. 2022;50(12):6968-79. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac473>
42. Lindenbach B, Murray C, Thiel H, Rice C. Flaviviridae. En: Knipe DM, Howley PM, editores. Fields Virology. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 712-46.
43. Li Q, Kang C. Dengue virus NS4B protein as a target for developing antivirals. Front Cell Infect Microbiol. 2022; 12:959727. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.959727>
44. Dalrymple NA, Cimica V, Mackow ER. Dengue virus NS proteins inhibit RIG-I/MAVS signaling by blocking TBK1/IRF3 phosphorylation: dengue virus serotype 1 NS4A is a unique interferon-regulating virulence determinant. MBio. 2015;6(3):e00553-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mbio.00553-15>
45. Driggs YC, Penas LMA, Pupo FJB. Importance of preventing dengue. Rev cubana med[Internet]. 2021[citado 16 ag 2025];60(3):1-14. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232021000300018&lng=es

46. msdmanuals.com. Dengue[Internet]; 2023 [actualizado 2025; acceso 16 ag 2025]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/arbovirus-arenavirus-y-filovirus/dengue>
47. Izaguirre G. The proteolytic regulation of virus cell entry by furin and other proprotein convertases. *Viruses*. 2019;11(9):837. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v11090837>
48. Castillo-Macías A, Salinas-Carmona M, Torres-López E. Immunology of viral infections with a high impact in Mexico: Dengue, Chikungunya, and Zika. *Medicina Universitaria*. 2017;19(77):198-207. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2017.09.001>
49. Heinz FX, Stiasny K. Proteolytic activation of flavivirus envelope proteins[Internet]. En: Böttcher-Friebertshäuser E, Garten W, Dieter H, editores. *Activation of viruses by host proteases*; 2018. p.109-32. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75474-1_6
50. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(16):2773-86. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
51. Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr Opin Virol*. 2014;9:134-42. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.020>
52. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS₁: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J*. 2016; 13:131. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
53. Watterson D, Modhiran N, Young PR. The many faces of the flavivirus NS₁ protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res*. 2016;130:7-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.014>
54. Liang PC, Chen KY, Huang CH, Chang K, Lu PL, Yeh ML, et al. Viral Interference Between Dengue Virus and Hepatitis C Virus Infections. *Open Forum Infect Dis*. 2020;7(8):ofaa272. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa272>
55. Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res*. 2016;134:244-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>
56. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997;230(2):244-51. Disponible en: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8504>

57. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):523-40. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>
58. Hill V, Cleemput S, Fonseca V, Tegally H, Brito AF, Gifford R, et al. A new lineage nomenclature to aid genomic surveillance of dengue virus. *medRxiv.* 2024. 17:2024.05.16.24307504. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/2024.05.16.24307504>
59. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2643-9>
60. Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Front Immunol.* 2014;5:290. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00290>
61. Egid BR, Coulibaly M, Dadzie SK, Kamgang B, McCall PJ, Sedda L, et al. Review of the ecology and behaviour of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Western Africa and implications for vector control. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis.* 2022;2:100074. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100074>
62. Chen LH, Wilson ME. Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 2016;2:15. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40794-016-0032-y>
63. Molton JS, Low I, Choy MMJ, Aw PPK, Hibberd ML, Tambyah PA, Wilder-Smith A. Dengue virus not detected in human semen. *Journal of travel medicine.* 2018;25(1): tay023. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jtm/tay023>
64. Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. Insight into the tropism of dengue virus in humans. *Viruses.* 2019;11(12):1136. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v11121136>
65. Cáceres BA, Castellanos JE, Rodríguez MH. Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. *Acta Biol Colomb.* 2019.;24(3):439-51. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/abc.v24n3.79410>
66. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. En: Pan American Health Organization. *Dengue in the Caribbean.* Washington DC, 1977;40-3 (PAHO Scientific Publication;375).
67. Khanam A, Gutiérrez-Barbosa H, Lyke KE, Chua JV. Immune-mediated pathogenesis in dengue virus infection. *Viruses.* 2022;14(11):2575. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v14112575>

68. Kraivong R, Punyadee N, Liszewski MK, Atkinson JP, Avirutnan P. Dengue and the lectin pathway of the complement system. *Viruses*. 2021;13(7):1219. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v13071219>
69. Ali MG, Zhang Z, Gao Q, Pan M, Rowan EG, Zhang J. Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunol Res*. 2020;68:325-39. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09159-z>
70. Castilho BM, Silva MT, Freitas AR, Fulone I, Lopes LC. Factors associated with thrombocytopenia in patients with dengue fever: a retrospective cohort study. *BMJ open*. 2020;10(9):e035120. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035120>
71. Chao C-H, Wu W-C, Lai Y-C, Tsai P-J, Perng G-C, Lin Y-S, Yeh T-M. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS pathog*. 2019;15(4):e1007625. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007625>
72. Leowattana W, Leowattana T. Dengue hemorrhagic fever and the liver. *World J HEpatol*. 2021;13(12):1968-76. Disponible en: <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i12.1968>
73. Guzmán MG, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop*[Internet]. 2002[citado 19 ag 2025];54:180-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602002000300003&lng=es
74. Sudeep A, Parashar D, Jadi RS, Basu A, Mokashi C, Arankalle VA, Mishra AC. Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009;45(9):491-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9218-1>
75. Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardosa MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(Suppl 12):S30-S7. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
76. Guzmán MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*[Internet]. 2002[citado 19 ag 2025];2(1):33-42. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(01\)00171-2/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(01)00171-2/abstract)
77. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):480-96. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.480>
78. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanaroop S, Vaughn DW, et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance.

Am J Trop Med Hyg. 2009;81(5):825-33. Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0625>

79. Domingo C, Niedrig M, Teichmann A, Kaiser M, Rumer L, Jarman RG, Donoso-Mantke O. 2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections. PLoS neglected tropical diseases. 2010;4(10):e833. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000833>

80. Usme-Ciro JA, Gómez-Castañeda AM, Gallego-Gómez JC. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. Salud, Barranquilla[Internet]. 2012[citado 23 ag 2025];28(1):1-15. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522012000100002&lng=en

81. Pérez CR, Martínez M, Ojeda RFO. PCR como técnica molecular más utilizada en el diagnóstico del virus del dengue. Revisión sistemática: PCR as the most widely used molecular technique in the diagnosis of dengue virus. Systematic review. LATAM. 2023;4(1):249. Disponible en: <https://doi.org/10.56712/latam.v4i1.498>

82. Grobusch M, Niedrig M, Göbels K, Klipstein-Grobusch K, Teichmann D. Evaluation of the use of RT-PCR for the early diagnosis of dengue fever. Clin Microbiol Infect. 2006;12(4):395-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01353.x>

83. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(7):e2311. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002311>

84. Songjaeng A, Thiemmea S, Mairiang D, Punyadee N, Kongmanas K, Hansuealueang P, et al. Development of a singleplex real-time reverse transcriptase PCR assay for pan-dengue virus detection and quantification. Viruses. 2022;14(6):1271. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v14061271>

85. Chien L-J, Liao T-L, Shu P-Y, Huang J-H, Gubler DJ, Chang G-JJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. J clin Microbiol. 2006;44(4):1295-304. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>

86. Gurukumar K, Priyadarshini D, Patil J, Bhagat A, Singh A, Shah P, Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. Virol J. 2009;6:1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-10>

87. Ongay L, Códiz G. Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena Sanger. Mens Bioquím[Internet]. 2021[citado 23 ag 2025];45(2021):23-34. Disponible en: <http://bq.facmed.unam.mx/tab>

88. Batovska J, Lynch SE, Rodoni BC, Sawbridge TI, Cogan NO. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. J Virol Methods. 2017;249:79-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.019>

89. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Milena Gómez A, Perdomo S, García-Robles R. DNA next-generation sequencing (NGS): Present and future in clinical practice. *Universitas Medica*. 2020;61(2):49-63. Disponible en: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs>
90. De Luna E. Bases filosóficas de los análisis cladísticos para la investigación taxonómica. *Act Bot Mex*. 1995; (33):63-79. Disponible en: <https://doi.org/10.21829/abm33.1995.754>
91. Eguiarte LE, Souza V, Nuñez-Farfán J, Hernández-Baños B. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. 1997; 60(1997):169-81. Disponible en: <https://doi.org/10.17129/botsoci.1528>
92. Shukla MK, Barde PV, Singh N. Utility of CDC DENV 1–4 real-time RT-PCR assay for the diagnosis of dengue. *Dengue*. 2018;40:15.
93. Barrios Osuna I, Anido Escobar V, Morera Pérez M. Declaración de Helsinki: cambios y exégesis. *Rev Cuba Salud Pública*. 2016;42(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662016000100014&lng=es
94. Normas éticas de CIOMS para investigación biomédica. *Rev méd Chile*. 2001;129(6):695. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872001000600019>
95. Santiago GA, González GL, Cruz-López F, Muñoz-Jordan JL. Development of a Standardized Sanger-Based Method for Partial Sequencing and Genotyping of Dengue Viruses. *J Clin Microbiol*. 2019;57(4): e01957. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.01957-18>
96. Adelino TÉR, Giovanetti M, Fonseca V, Xavier J, de Abreu ÁS, do Nascimento VA, et al. Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil. *Nat Commun*. 2021;12(1):2296. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22607-0>
97. Nascimento FF, Reis Md, Yang Z. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nat Ecol Evol*. 2017;1(10):1446-54. Disponible en: : <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0280-x>
98. Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Comput Biol*. 2019;15(4):e1006650. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
99. 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. *Nat Commun*. 2024; 15(1): 3508. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47774-8>

100. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(14):3059-66. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
101. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics.* 2014;30(22):3276-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
102. Nguyen L-T, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268-74. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
103. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2016;2(1):vew007. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>
104. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey016. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
105. Dellicour S, Rose R, Faria NR, Lemey P, Pybus OG. SERAPHIM: studying environmental rasters and phylogenetically informed movements. *Bioinformatics.* 2016;32(20):3204-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw384>
106. Nei M. Bottlenecks, genetic polymorphism and speciation. *Genetics.* 2005;170(1):1-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/genetics/170.1.1>
107. Álvarez M, Pavón-Oro A, Vázquez S, Morier L, Álvarez ÁM, Guzmán MG. Secuencias de infección viral asociadas a la fiebre del dengue durante la epidemia de dengue 3 en la ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev Cubana Med Trop*[Internet]. 2008[citado 25 ag 2025];60(1):26-30. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000100003&lng=es
108. Díaz Gutierrez G, Rodríguez-Roche R, Guzmán Tirado MG. Relación genética del virus dengue 1 aislado en Cuba durante la epidemia de 1977. *Rev Cubana Med Trop*[Internet]. 2016[citado 25 ag 2025];68(1):30-9. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602016000100003&lng=es
109. PAHO. Zika: Análisis por país 2016-2020 [Disponible en: <https://www.paho.org/es/arbo-portal/zika-datos-analisis/zika-analisis-por-pais>].
110. PAHO. Datos—Serotipos de dengue por país. 2023 [Disponible en: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/517-dengue-serotypes-en.html>]
111. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):800-9. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid0907.030038>

112. Rodríguez-Roche R, Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:690835. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/690835>
113. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R, Kourí G, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Rev Panam Salud Publica*[Internet]. 1997[citado 25 ag 2025];1(3):193-9. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/9111>
114. Jones FK MA, Santiago GA, Rysava K, Zimler RA, Heberlein LA, et al. Introduction and Spread of Dengue Virus 3, Florida, USA, May 2022–April 2023. *Emerg Infect Dis*. 2024;30 Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid3002.231615:376-9>
115. Lagare A, Faye M, Fintan G, Fall G, Ousmane H, Ibrahim ET, et al. First introduction of dengue virus type 3 in Niger, 2022. *IJID Reg*. 2023;7:230-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijregi.2023.04.001>
116. Arulmukavarathan A, Gilio LS, Hedrich N, Nicholas N, Reuland NI, Sheikh AR, et al. Dengue in France in 2024 - A year of record numbers of imported and autochthonous cases. *New Microbes New Infect*. 2024;62:101553. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2024.101553>
117. Gräf T, Ferreira CDN, de Lima GB, de Lima RE, Machado LC, Campos TdL, et al. Multiple introductions and country-wide spread of DENV-2 genotype II (Cosmopolitan) in Brazil. *Virus Evol*. 2023;9(2):vead059. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ve/vead059>
118. Ahamed SF, Rosario V, Britto C, Dias M, Nayak K, Chandele A, et al. Emergence of new genotypes and lineages of dengue viruses during the 2012–15 epidemics in southern India. *Int J Infect Dis*. 2019;84:S34-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.014>
119. Soe AM, Ngwe Tun MM, Nabeshima T, Myat TW, Htun MM, Lin H, et al. Emergence of a Novel Dengue Virus 3 (DENV-3) Genotype-I Coincident with Increased DENV-3 Cases in Yangon, Myanmar between 2017 and 2019. *Viruses*. 2021;13(6):1152. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v13061152>
120. García MP, Padilla C, Figueroa D, Manrique C, Cabezas C. Emergence of the Cosmopolitan genotype of dengue virus serotype 2 (DENV2) in Madre de Dios, Peru, 2019. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2022;39(1):126-8. Disponible en: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2022.391.10861>
121. Aldama AF, Montiel-Jarolín D, Real R. Mortalidad en pacientes con dengue en la epidemia 2012-2013. *Rev Nac (Itauguá)*. 2015;7:17-23. Disponible en: <https://doi.org/10.18004/rdn2015.0007.01.017-023>
122. Sirisena PDNN, Noordeen F. Evolution of dengue in Sri Lanka—changes in the virus, vector, and climate. *Int J Infect Dis*. 2014;19:6-12. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.10.012>

123. Cheah WK, Ng KS, Marzilawati AR, Lum LC. A review of dengue research in malaysia. *Med J Malaysia*[Internet]. 2014[citado 25 ag 2025];69 (Supl A):59-67. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25417953/>
124. Pollett S, Melendrez MC, Maljkovic Berry I, Duchêne S, Salje H, Cummings DAT, Jarman RG. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infect Genet Evol.* 2018;62:279-95. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.032>
125. Ministerio de Salud Pública. Actualización sobre situación epidemiológica y programas priorizados. [consultado el 15 de enero de 2025] 2022.
126. Lieberthal B, Allan B, De Urioste-Stone S, Mackay A, Soliman A, Wang S, Gardner AM. The effects of seasonal human mobility and *Aedes aegypti* habitat suitability on Zika virus epidemic severity in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2024;18(11):e0012571. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012571>
127. Organización Panamericana de la Salud. Monitoreo del dengue 2025. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/informe-situacion-no-37-situacion-epidemiologica-dengue-americas-semana-epidemiologica>
128. Rodriguez-Roche R, Blanc H, Bordería AV, Díaz G, Henningsson R, Gonzalez D, et al. Increasing Clinical Severity during a Dengue Virus Type 3 Cuban Epidemic: Deep Sequencing of Evolving Viral Populations. *J Virol.* 2016;90(9):4320-33. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JVI.02647-15>
129. Benitez AJ, Alvarez M, Perez L, Gravier R, Serrano S, Hernandez DM, et al. Oropouche Fever, Cuba, May 2024. *Emerg Infect Dis.* 2024;30(10):2155-9. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid3010.240900>
130. Vega DAP. Capacidad diagnóstica de las arbovirosis en Cuba y respuesta sanitaria. *Rev Conex Cienc, Neuroarte y Bienest*[Internet]. 2025[citado 3 sept 2025];1(1):10. Disponible en: <https://editorial.mielisy.org/index.php/RCCNB/article/view/e0010>
131. Geraldés MA, Giovanetti M, Cunha MV, Lourenço J. The Seasonality and Spatial Landscape of the Historical Climate-Based Suitability of *Aedes-Borne* Viruses in Four Atlantic Archipelagos. *Viruses.* 2025;17(6): 799. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v17060799>
132. Marquetti MdC, Cuesta IP, Castillo MP, Mendizábal ME, Chamizo K, Molina R, et al. Diversidad de culícidos y riesgo entomoepidemiológico, con énfasis en arbovirosis y malaria en La Habana, Cuba. *Anales de la ACC*[Internet]. 2021[citado 3 sept 2025];11. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-01062021000200021&lng=es&tlng=es
133. Paz-Bailey G, Adams LE, Deen J, Anderson KB, Katzelnick LC. Dengue. *Lancet.* 2024;403(10427):667-82. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02576-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02576-X)

134. Wolf JM, de Souza AP, de Schardosim RF, Pille A, Maccari JG, Mutlaq MP, Nasi LA. Molecular evolution of dengue virus: Bayesian approach considering 1,581 whole genome sequences from January 1944 to July 2022. *Arch Virol.* 2023; 168(8): 202. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05833-3>
135. Shakya M, Ahmed SA, Davenport KW, Flynn MC, Lo C-C, Chain PSG. Standardized phylogenetic and molecular evolutionary analysis applied to species across the microbial tree of life. *Sci Rep.* 2020;10(1):1723. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58356-1>
136. Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):821-3. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90042-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90042-3)
137. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(5):566-72. Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.566>
138. Peláez O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):719-22. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid1004.030271>
139. Rahim R, Hasan A, Phadungsombat 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). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v15051144>
140. Dolan PT, Taguwa S, Rangel MA, Acevedo A, Hagai T, Andino R, Frydman J. Principles of dengue virus evolvability derived from genotype-fitness maps in human and mosquito cells. *Elife.* 2021;10: e61921. Disponible en: <https://doi.org/10.7554/eLife.61921>

CAPITULO VIII. Anexos

Anexo 1. Modelo 84-43 para la recolección de datos de pacientes que solicitan estudios microbiológicos.

1-Nombre(es)		Primer Apellido:		Segundo Apellido:		2-Carne de Identidad:		No.	
3-Dirección Particular:		4-Municipio:		5-Provincia:		6-Hist. Clínica:			
7-Edad:	8-Sexo: Masc. ☐ Fem. ☐	9-Ocupación		10-Color de la piel: Blanca ☐ Negra ☐ Amarilla ☐ Mestiza ☐		11-Días de ingreso			
12-Centro que Remite:		13-Sala	14-Municipio:		15-Provincia:		16-Fecha: Día Mes Año		
17-Diagnóstico Clínico:					18-Tipo de Muestra colectada:			19-APP:	
20-Fecha de comienzo de los Síntomas: Día Mes Año 21-GENERALES: Fiebre ☐ Mialgia ☐ Cefalea ☐ Linfadenopatía ☐ Malestar General ☐ Vómitos ☐ Rash ☐ Petequias ☐ Diarreas ☐ Artralgia ☐ Esplenomegalia ☐ Anorexia ☐ Ictero ☐ Hepatomegalia ☐ Astenia ☐ Escalofríos ☐ Sangramiento ☐ Dolor abdominal ☐ Aumento de volumen de parótida ☐ IRA: Tos ☐ Disnea ☐ Expectoración ☐ Laringitis ☐ Faringitis ☐ Rinorrea ☐ Otitis ☐ Coqueluche ☐ Amigdalitis ☐ Laringotraqueobronquitis ☐ Estornudos ☐ Vacunación anti-Influenza ☐ SNC: Desorientación ☐ Rigidez nuchal ☐ Convulsiones ☐ Pérdida de conciencia ☐ Trastornos de conducta ☐ Dificultad en la marcha ☐ ITS: Secreción Genital ☐ Lesión Genital ☐ SEPSIS URINARIA: Disuria ☐ Otros: _____					Suero ☐ Sangre ☐ LCR ☐ Humor acuoso ☐ Orina ☐ Líquido amniótico ☐ Gargarismo ☐ Esputo ☐ Heces ☐ Exudado ☐ Cual _____ Tejido ☐ Cual _____ **Lámina de: _____ Cepa _____ de: _____ Fecha colecta muestra: Día Mes Año 22-Estudio solicitado: Diagnóstico ☐ Referencia ☐ 23-SUEROS PAREADOS Fecha de colecta: 1er Suero Día Mes Año 2do Suero Día Mes Año Confirmatorio ☐ (Dengue) Referencia ☐			Enfermedad similar en la familia o comunidad: SI ☐ NO ☐ Historia de viajes al exterior: SI ☐ NO ☐ País: _____ Fecha llegada al país: Día Mes Año Tratamiento Previo: SI ☐ NO ☐ Cual(es): _____ Antecedente de vacunación PRS SI ☐ NO ☐ Fecha: Día Mes Año	
24- Nombre del Facultativo:									
25- RESULTADOS									

Anexo 2. Datos de los genomas completos de VDENV-3 cubanos generados en el estudio, correspondientes a los años 2022-2023.

No. Muestra	Ci	Edad	Sexo	Clasificacion de Dengue	Provincia	Fecha de colecta	Profd de Covertura	Covertura	Lineaje	No. Accoe GenBank
D3-147	26	10	M	Dengue sin signos de alarma	Matanzas	2022-07-03	5772.6	92,2	DENV-3 Genotype III	PQ553469
D3-181	26	26	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-07-03	6102,4	94,6	DENV-3 Genotype III	PQ553470
D3-234	24	13	F	Dengue sin signos de alarma	Matanzas	2022-07-10	3656,6	92	DENV-3 Genotype III	PQ553471
D3-280	21	19	F	Dengue sin signos de alarma	Guantanamo	2022-07-10	2509,4	93	DENV-3 Genotype III	PQ553472
D3-297	25	45	F	Dengue sin signos de alarma	Cienfuegos	2022-07-10	5426,6	91,4	DENV-3 Genotype III	PQ553473
D3-318	27	23	M	Dengue grave	Matanzas	2022-07-17	4435,0	84,2	DENV-3 Genotype III	PQ553474
D3-344	26	26	F	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2022-07-17	8245,2	94,7	DENV-3 Genotype III	PQ553475
D3-350	27	7	F	Dengue grave	Santiago de Cuba	2022-07-17	2588,2	84,7	DENV-3 Genotype III	PQ553476
D3-415	20	22	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-07-24	3508,5	95,2	DENV-3 Genotype III	PQ553477
D3-419	20	36	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-07-24	1734,8	94,7	DENV-3 Genotype III	PQ553478
D3-502	20	50	M	Dengue sin signos de alarma	Santiago de Cuba	2022-08-14	1995,0	99,3	DENV-3 Genotype III	PQ553479
D3-530	20	33	F	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-08-14	4531,8	97,4	DENV-3 Genotype III	PQ553480
D3-538	22	52	F	Dengue grave	Las Tunas	2022-08-14	4764,1	87	DENV-3 Genotype III	PQ553481
D3-629	21	57	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-08-28	8082,4	94	DENV-3 Genotype III	PQ553482
D3-643	25	78	M	Dengue grave	Villa Clara	2022-09-04	4782,5	94	DENV-3 Genotype III	PQ553483
D3-703	16	19	F	Dengue sin signos de alarma	Artemisa	2022-09-18	6298,6	97,8	DENV-3 Genotype III	PQ553484
D3-705	24	19	F	Dengue sin signos de alarma	Artemisa	2022-09-18	7720,6	93	DENV-3 Genotype III	PQ553485
D3-1033	24	29	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-10-09	5688,9	92	DENV-3 Genotype III	PQ553486
D3-1144	26	39	M	Dengue grave	Guantanamo	2022-10-30	9415,7	94,6	DENV-3 Genotype III	PQ553487
D3-1166	21	26	F	Dengue sin signos de alarma	Sancti Spiritus	2022-11-06	5212,5	91,7	DENV-3 Genotype III	PQ553488
D3-1191	27	29	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-11-13	7167,9	84,5	DENV-3 Genotype III	PQ553489
D3-1206	25	38	M	Dengue sin signos de alarma	Granma	2022-11-13	5936,4	89	DENV-3 Genotype III	PQ553490
D3-1255	24	23	M	Dengue sin signos de alarma	Santiago de Cuba	2022-11-13	5821,3	90	DENV-3 Genotype III	PQ553491
D3-1261	17	29	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-11-13	3952,3	97	DENV-3 Genotype III	PQ553492
D3-1099	28	32	F	Dengue sin signos de alarma	Ciego de Avila	2022-10-23	8085,5	82,2	DENV-3 Genotype III	PQ553493
D3-1052	29	17	F	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2022-10-16	6222,4	70	DENV-3 Genotype III	PQ553494
D3-1390	28	53	F	Dengue sin signos de alarma	Camaguey	2023-10-15	5880,1	82,9	DENV-3 Genotype III	PQ553495
D3-1299	23	24	M	Dengue sin signos de alarma	Granma	2023-10-01	5975,9	91,3	DENV-3 Genotype III	PQ553496
D3-1333	28	29	F	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-10-08	4898,0	84,5	DENV-3 Genotype III	PQ553497
D3-29	21	63	M	Dengue sin signos de alarma	Camaguey	2023-01-22	3814,2	92	DENV-3 Genotype III	PQ553498
D3-101	17	85	M	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2023-02-12	5836,4	99	DENV-3 Genotype III	PQ553499
D3-116	20	33	M	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-02-12	6793,5	92,2	DENV-3 Genotype III	PQ553500
D3-121	20	25	M	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-02-12	6753,3	94,5	DENV-3 Genotype III	PQ553501
D3-123	20	56	M	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-02-12	5231,7	95	DENV-3 Genotype III	PQ553502
D3-124	17	50	F	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-02-12	8440,2	96	DENV-3 Genotype III	PQ553503
D3-138	18	49	F	Dengue sin signos de alarma	Artemisa	2023-02-19	5088,2	96	DENV-3 Genotype III	PQ553504
D3-252	21	45	M	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2023-03-12	6467,9	93	DENV-3 Genotype III	PQ553505
D3-671	28	38	F	Dengue sin signos de alarma	Holguin	2023-05-28	3419,1	86,7	DENV-3 Genotype III	PQ553506
D3-688	15	35	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2023-06-04	5885,2	98,3	DENV-3 Genotype III	PQ553507
D3-792	16	17	F	Dengue sin signos de alarma	Cienfuegos	2023-07-02	4780,6	94	DENV-3 Genotype III	PQ553508
D3-793	17	47	M	Dengue sin signos de alarma	Cienfuegos	2023-07-02	3869,6	95,2	DENV-3 Genotype III	PQ553509
D3-835	15	23	M	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2023-07-09	3278,5	97,2	DENV-3 Genotype III	PQ553510
D3-836	22	26	M	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2023-07-09	4725,2	94	DENV-3 Genotype III	PQ553511
D3-838	21	53	F	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2023-07-09	4645,8	94	DENV-3 Genotype III	PQ553512
D3-852	19	18	F	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-07-09	2037,1	98	DENV-3 Genotype III	PQ553513
D3-863	16	41	F	Dengue sin signos de alarma	Camaguey	2023-07-09	2981,2	95,7	DENV-3 Genotype III	PQ553514
D3-953	18	37	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2023-07-30	2651,7	99,8	DENV-3 Genotype III	PQ553515
D3-1002	26	20	M	Dengue sin signos de alarma	Holguin	2023-08-13	2359,0	95,1	DENV-3 Genotype III	PQ553516
D3-1006	28	73	F	Dengue sin signos de alarma	Holguin	2023-08-13	2648,4	81,7	DENV-3 Genotype III	PQ553517
D3-1107	18	70	F	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-09-03	2487,1	96,4	DENV-3 Genotype III	PQ553518
D3-1108	16	60	F	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-09-03	2554,0	96	DENV-3 Genotype III	PQ553519
D3-1119	21	28	F	Dengue sin signos de alarma	Ciego de Avila	2023-09-03	4180,9	95	DENV-3 Genotype III	PQ553520
D3-1120	21	16	M	Dengue sin signos de alarma	Ciego de Avila	2023-09-03	3480,0	92	DENV-3 Genotype III	PQ553521
D3-1140	27	3	M	Dengue sin signos de alarma	Sancti Spiritus	2023-09-10	2602,6	84,9	DENV-3 Genotype III	PQ553522
D3-1141	23	50	F	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2023-09-10	5184,5	92,8	DENV-3 Genotype III	PQ553523
D3-1151	23	33	M	Dengue sin signos de alarma	Granma	2023-09-10	2576,1	93,2	DENV-3 Genotype III	PQ553524
D3-1208	21	42	M	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-09-17	3948,7	95	DENV-3 Genotype III	PQ553525
D3-1215	23	72	F	Dengue sin signos de alarma	Granma	2023-09-17	5928,5	93	DENV-3 Genotype III	PQ553526
D3-1263	24	45	F	Dengue sin signos de alarma	Villa Clara	2023-09-24	4947,0	94	DENV-3 Genotype III	PQ553527
D3-1273	15	81	F	Dengue sin signos de alarma	Holguin	2023-09-24	2829,4	98	DENV-3 Genotype III	PQ553528
D3-1274	18	49	F	Dengue sin signos de alarma	Holguin	2023-09-24	3460,0	95,6	DENV-3 Genotype III	PQ553529
D3-1286	20	36	F	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2023-10-01	3817,7	94,7	DENV-3 Genotype III	PQ553530
D3-1290	24	39	F	Dengue sin signos de alarma	Holguin	2023-10-01	5871,0	95	DENV-3 Genotype III	PQ553531
D3-1304	17	28	M	Dengue sin signos de alarma	Granma	2023-10-01	3253,6	95	DENV-3 Genotype III	PQ553532
D3-1321	22	16	F	Dengue sin signos de alarma	Santiago de Cuba	2023-10-08	2997,6	95	DENV-3 Genotype III	PQ553533
D3-1330	28	18	M	Dengue sin signos de alarma	Pinar del Rio	2023-10-08	2626,4	82,5	DENV-3 Genotype III	PQ553534
D3-1350	25	18	F	Dengue sin signos de alarma	Artemisa	2023-10-08	4321,5	94	DENV-3 Genotype III	PQ553535
D3-1354	22	45	F	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2023-10-15	2707,1	93	DENV-3 Genotype III	PQ553536
D3-1364	24	25	M	Dengue sin signos de alarma	La Habana	2023-10-15	3446,0	91,1	DENV-3 Genotype III	PQ553537
D3-1372	28	51	M	Dengue sin signos de alarma	Matanzas	2023-10-15	3743,1	83,6	DENV-3 Genotype III	PQ553538
D3-1388	28	32	F	Dengue sin signos de alarma	Granma	2023-10-15	9836,4	81,8	DENV-3 Genotype III	PQ553539