ARTÍCULO

Amplificación de la región 5´UTR-C del genoma de los cuatro serotipos de Virus Dengue.

Daria Elena Camacho[1], Elizabeth Ferrer[1], Juana Ledia Triana-Alonso[1], Ana Celia Ferreras[1], Héctor Graterol[2], Guillermo Comach[1], Francisco Triana-Alonso†[1].

[1] Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED), Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

[2] Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología, Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Correspondencia: Daria Camacho-García.
E-mail: darycamacho@yahoo.com

Recibido: Mayo 2012 **Aprobado**: Julio 2012

RESUMEN

Las infecciones por virus Dengue (DENV) representan la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante en términos de morbi-mortalidad. El genoma de DENV es un ARN de cadena simple con dos regiones no traducibles (UTR, *Untranslated Region*) en los extremos (5´UTR y 3´UTR) limitando un marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*). Las 5´UTR y 3´UTR son determinantes en los mecanismos de replicación y síntesis de proteínas virales, haciendo de los mismos blancos potenciales para comprobar regulación y/o inhibición de tales procesos mediante moléculas antivirales. El objetivo de la investigación fue amplificar la región 5´UTR-C (*Untranslated Region-Capsid*) del genoma de los cuatro serotipos de DENV luego de la optimización de la Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), la cual podría emplearse para evaluar procesos de traducción viral en sistemas eucariotas *in vitro* y su inhibición con potenciales antivirales. Se emplearon cepas de los distintos serotipos virales (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de los cebadores y de las enzimas *Taq* polimerasa y Transcriptasa Reversa. Los resultados indicaron que la mejor reacción se obtuvo con concentraciones de cebadores de 0,5 µmol/L (DENV-1 y DENV-3), 1 µmol/L (DENV-2) y 0,75 µmol/L (DENV-4). Las enzimas empleadas mostraron alta eficiencia a la mínima cantidad evaluada (1,25 U). De acuerdo a las condiciones especificadas, se obtuvieron productos de la región 5´UTR-C con una reacción de RT-PCR robusta y confiable para la amplificación de estos productos.

Palabras clave: Virus dengue, dengue, RT-PCR, 5´UTR.

ABSTRACT

Amplification of the 5`UTR-C region of the genome of the four serotypes of Dengue virus.

Dengue virus infections (DENV) are the most important viral disease in terms of morbidity and mortality. The DENV genome is a single-stranded RNA with two untranslated regions (UTR) at the ends (5' UTR and 3' UTR) flanking an open reading frame (ORF). The 5' UTR and 3' UTR are important in the mechanisms of viral replication and protein synthesis, making them potential targets for regulation or inhibition of such processes by antiviral molecules. The objective of this work was to amplify the 5'UTR-C (Untranslated Region-Capsid) of the genome of the four DENV serotypes after optimizing the Reverse Transcription coupled to Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), which could be used to assess viral

translation processes in eukaryotic systems *in vitro* and its inhibition by potential antiviral molecules. Strains of different serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) were used and assays were performed with different concentrations of the primers and Taq polymerase and reverse transcriptase enzymes. The results indicated that the best response was obtained with primer concentrations of 0.5 µmol/L (DENV-1 and DENV-3), 1 µmol/L (DENV-2) and 0.75 µmol/L (DENV-4). The enzymes used showed high efficiency at the lowest quantity tested (1.25 U). According to the specified conditions, products were obtained from the 5'UTR-C with RT-PCR robust and reliable for amplification of these products.

Key words: Dengue virus, Dengue, RT-PCR, 5´UTR.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por virus Dengue (DENV) representan la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos a humanos en términos de morbi-mortalidad (1), es causada por cualquiera de los serotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Clínicamente, se presenta como dengue severo y no severo, éste último segregado en dos grupos de acuerdo a la presencia o no de signos de alarma (2). La enfermedad es endémica en más de 100 países, con 50 millones de infectados cada año y 500.000 casos severos (3).

El genoma del DENV está representado por un ARN de cadena simple, sentido positivo y aproximadamente 11 kb de longitud. Consta de una región no traducible en l extremo 5´ (5´UTR, *Untranslated Region*), un marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) y una región UTR en el extremo 3´ (3`UTR). El ORF codifica una poliproteína que es procesada co y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares para dar lugar a tres proteínas estructurales, Cápside (C), premembrana/Membrana (prM/M), Envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). La región 5´UTR tiene una longitud entre 95 y 132 nucleótidos (nt), mientras que 3´UTR tiene longitud que puede variar entre 400 y 800 nt. Ambas regiones son importantes en el proceso de replicación, debido a que contienen secuencias complementarias (CS, *Complementary Sequences*) que favorecen el estado cíclico del genoma viral y por ende el inicio de la replicación. El elemento 5´CS se ubica dentro del marco abierto de lectura, codificando parte de la proteína C, mientras que el elemento 3´CS se ubica hacia 3´UTR cerca de una estructura en asa (SL, *Stem-Loop*) (4,5). Un par adicional de secuencias complementarias denominadas 5´-3´ UAR (*Upstream AUG Region*) han sido identificadas como parte del proceso de ciclización y replicación viral (6).

El proceso de replicación es catalizado por una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), la cual reconoce de forma específica elementos tipo ARN ubicados en el extremo 5´ (7). Los elementos que regulan éste proceso, incluyen promotores que se unen a la polimerasa viral, así como potenciadores y represores que modulan el acceso de la polimerasa a los sitios de iniciación (8). Como se observa, las regiones 5´UTR y 3´UTR del genoma de los flavivirus tienen un rol determinante en la replicación y en la dirección del proceso de traducción, haciendo de las mismas blancos potenciales para el estudio de estos mecanismos, así como la realización de análisis con moléculas antivirales que podrían tener como blanco las mencionadas regiones (9).

En el caso de DENV, la falta de disponibilidad de vacunas o de drogas antivirales efectivas para la prevención o cura de las infecciones, ha generado investigaciones con el fin de evaluar la acción de posibles moléculas con actividad antiviral que actúen en las

regiones 5´UTR y 3´UTR (10-12). En este reporte, se plantea la amplificación de la región 5´UTR y parte de la secuencia que codifica la proteína C (5´UTR-C), luego de la optimización de la Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*), la cual permitirá obtener el ADN complementario de los mencionados segmentos de ARN viral del genoma de los cuatro serotipos de DENV. A partir de las secuencias de ADN obtenidas, se podrían realizar ensayos de transcripción *in vitro* con el fin de analizarlos posteriormente en un sistema de traducción *in vitro* de origen humano. Estos ensayos, serían de gran utilidad para evaluar aspectos relacionados con el mecanismo de síntesis de proteínas virales, así como su inhibición con potenciales antivirales dirigidos contra estas regiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas virales. Se emplearon cepas autóctonas y foráneas de los cuatro serotipos de DENV, aislados a partir de muestras de sueros recolectadas de pacientes con sospecha clínica de padecer la enfermedad, de acuerdo a lo previsto por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del estado Aragua (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de DENV seleccionadas para la optimización de la técnica de RT-PCR para amplificar la región 5´UTR

Serotipo viral	Código	Fecha(año)/Lugar(Municipio-Estado)
DENV-1	LAR-28974	2005/Zamora-Aragua
	LARD-1658	1997/Girardot-Aragua
	LARD-1817	1997/Carabobo
	LARD-1917	1997/Mariño-Aragua
	LARD-2212	1997/Girardot-Aragua
	LARD-4199	1999/Mariño-Aragua
	LARD-29598	2006/Urdaneta-Aragua
	VR-1254 (Hawai)	1944/Hawai
DENV-2	LARD-1304	1997/Mario Briceño-Aragua
	LARD-1699	1997/Libertador-Aragua
	LARD-1802	1997/Mario Briceño Iragorry-Aragua
	LARD-1910	1997/Mariño-Aragua
	LARD-1913	1997/Girardot-Aragua
	LARD-2252	1998/Libertador-Aragua
	1995-IQT	Iquitos/Perú
	New Guinea ”C”	1944/New Guinea

Continuación Tabla 1. Cepas de DENV seleccionadas para la optimización de la técnica de RT-PCR para amplificar la región 5´UTR

Serotipo viral	Código	Fecha(año)/Lugar(Municipio-Estado)
	H-87	1956/Filipinas
DENV-4	LARD-2253	1998/Mariño-Aragua
	LARD-2361	1998/Mariño-Aragua
	LARD-2431	1998/Sucre-Aragua
	LARD-2706	1998/Mario Briceño Iragorry-Aragua
	LARD-3485	1998/Mariño-Aragua
	LARD-4332	1999/Mario Briceño Iragorry-Aragua

Los DENV se obtuvieron mediante aislamiento en la línea celular C6/36-HT (derivada de *Aedes albopictus*) y su posterior identificación a través de inmunofluorescencia indirecta (13-14).

RT-PCR para la amplificación de la región del genoma viral correspondiente a 5´ UTR y parte del gen de la cápside

Diseño de los cebadores. Las secuencias del genoma completo de las cepas de referencia de cada uno de los serotipos virales fueron obtenidas del GenBank [DENV-1(Nº de acceso 001477.1), DENV-2(Nº de acceso: 001474.2), DENV-3 (Nº de acceso: 001475.2), DENV-4 (Nº de acceso: 002640.1)]. Cada una de las secuencias fue editada mediante el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (15). Posteriormente, haciendo uso del programa Gene Runner versión 3.05. (16) y tomando en consideración secuencias de 20 nt se escogieron los cebadores reversos para amplificar cada serotipo viral (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores directos y reversos diseñados mediante el programa Gene Runner *Versión 3.05.*

Serotipo viral	Cebadores[a]	Secuencias de los cebadores (Dirección 5´-3´)	Posición en la secuencia[b]
DENV-1	UTRD-1	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20
	UTRR-1	GAGGTATGGCTAGAAATCTT	256-275
DENV-2	UTRD-2	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20
	UTRR-2	TCTCTTCAATATCCCTGCTG	281-300
DENV-3	UTRD-3	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20
	UTRR-3	TGGAATGGCTAGAAATCTGA	255-274
DENV-4	UTRD-4	AGTTGTTAGTCTACGTGGAC	1-20
	UTRR-4	GTATCTTGATGGCCTTATTT	320-339

[a] Los nombres de los cebadores que contengan "D" indican el sentido directo del genoma, los cebadores con "R" indican la orientación complementaria en sentido reverso.
[b] Las posiciones del genoma son de acuerdo a las secuencias nucleotídicas de DENV-1(Nº de acceso 001477.1), DENV-2(Nº de acceso: 001474.2), DENV-3 (Nº de acceso: 001475.2), DENV-4 (Nº de acceso: 002640.1)] obtenidas del GenBank.

Los fragmentos a amplificar correspondieron en sus primeros 100 nt a la región 5´UTR, mientras que el resto de la secuencia perteneciente a la región C tuvo longitud variable para cada serotipo viral [175 nt (DENV-1), 200 nt (DENV-2), 174 nt (DENV-3) y 239 nt (DENV-4)]. Las características principales de los cebadores fueron ausencia de estructuras secundarias y adecuado porcentaje de G-C y A-T. El cebador directo correspondió a los primeros 20 nucleótidos de la secuencia de los DENV, la cual representa una región conservada entre los serotipos de DENV. Adicionalmente, todos los cebadores fueron comparados a través del programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool)* con las secuencias de flavivirus depositadas en el NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) lo que permitió asegurar la especificidad de los cebadores. De igual forma, una vez que se optimizaron las condiciones de la RT-PCR, cada par de cebadores se ensayó con muestras positivas a los diferentes serotipos de DENV, lo que permitió aumentar la certeza de la especificidad de los mismos. La calidad e integridad de los cebadores se analizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 20%.

Extracción del ARN viral. El ARN viral se extrajo a partir de 140 µL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos celulares de los DENV mediante el uso del kit de extracción viral de ARN QIAamp QIAGEN® (QIAGEN Inc.; California, E.U.A) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la extracción se resuspendió en 60 µL de agua estéril.

RT-PCR. Con el fin de obtener fragmentos correspondientes a la región inicial del genoma de los DENV y parte del gen que codifica la cápside (5´UTR-C), se optimizaron las condiciones de la reacción en un volumen final de 50 µL mediante la variación de la concentración de componentes de la mezcla de reacción. Las concentraciones ensayadas para cada uno de los reactivos fueron: cebadores (0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM y 1 µM), $MgCl_2$ 1 mM, desoxinucleótidos (dNTPs, *2'-desoxynucleoside 5'-triphosphate*) 0,2 mM y enzimas *Taq* polimerasa y Transcriptasa Reversa (1,25 U, 2,5 U y 5U). La mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de tiempo y temperatura en un termociclador PTC-100™ (*MJ Research*, Inc): transcripción reversa a 41 ℃ por 45 minutos, seguido de desnaturalización (95℃, 15 min) y 40 ciclos de los procesos de desnaturalización (94℃, 30 s), hibridación (55℃, 1 min) y extensión (72℃, 30 s). Adicionalmente, se realizó una extensión final a 72℃ durante 5 min. Los productos de la reacción se analizaron en geles de agarosa al 2% y fueron comparados con el marcador de tamaño molecular (100 bp DNA *Step Ladder*, Axygen). El resultado de la migración electroforética en los geles se observó en un equipo de fotodocumentación de geles (Gel Doc™ 2000 *Gel Documentation Systems*, BIORAD). El tamaño final esperado para los productos fue de 275 pb (DENV-1), 300 pb (DENV-2), 274 pb (DENV-3) y 339 pb (DENV-4).

Determinación de la concentración y pureza del ADN. La concentración del ADN [ADN] se determinó aplicando la fórmula **[ADN]=** A_{260} x D x 50µg/mL (D= factor de dilución) y la pureza calculando la relación A_{260}/ A_{280} (17).

RESULTADOS

El análisis de los cebadores diseñados para la amplificación de la región 5´UTR-C de los genomas de DENV (Tabla 2) realizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% permitió evidenciar la integridad de cada uno de los cebadores (datos no mostrados). La optimización de las concentraciones de

algunos de los reactantes de la RT-PCR permitió determinar que las concentraciones óptimas de reacción de los cebadores empleados fueron de 0,5 µM para DENV-1 y DENV-3, 1 µM para DENV-2 y 0,75 µM para DENV-4. Una vez obtenida la concentración de uso para cada par de cebadores, se determinó que la actividad de las enzimas *Taq* polimerasa y Transcriptasa Reversa fue óptima con 1,25 U por reacción.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se procedió al análisis por RT-PCR de las cepas virales de cada serotipo. De acuerdo a los resultados obtenidos para DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, la técnica permitió la amplificación de la región 5´UTR-C de todas las cepas virales elegidas, exceptuando la cepa 2706 de DENV-4, a pesar de que el ensayo se repitió en todas sus etapas para este virus. Los productos amplificados, se observaron en los geles de agarosa como bandas únicas, íntegras y nítidas, y en correspondencia al tamaño de los productos esperados para cada uno de los DENV (Figura 1).

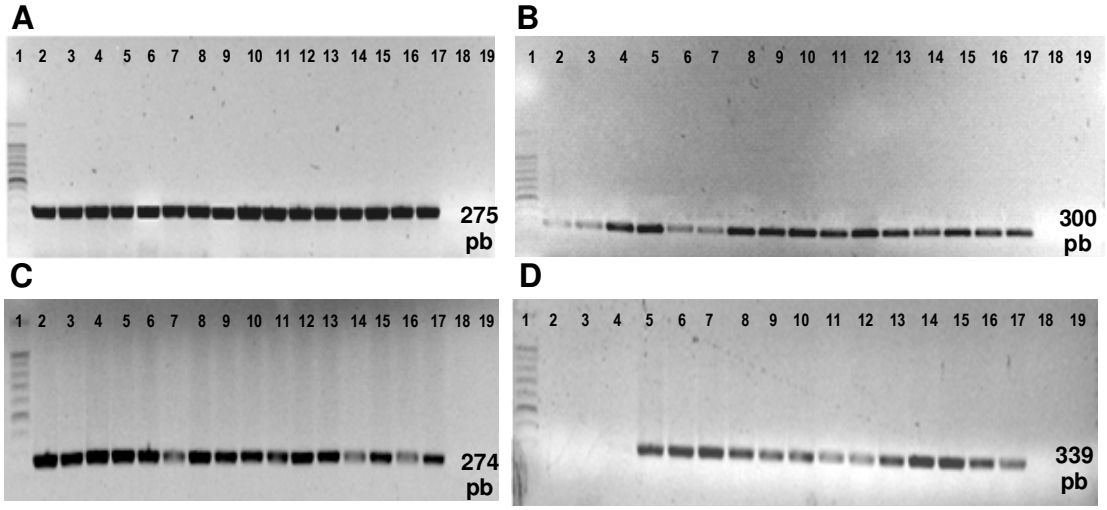

Figura 1. Electroforesis en gel de Agarosa al 2 % de los productos de ADN correspondientes a la región 5´UTR-C obtenidos a partir de de cepas de DENV. A) <u>DENV-1</u>: 1: Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen), **2-3:** *LARD-4199,**4-5:** LARD-2212, **6-7:** LARD-1817, **8-9:** LARD-1917, **10-11:** LARD-28974, **12-13:** VR-1254/Hawaii, **14-15:** LARD-29598, **16-17:**LARD-1658, **18:** Control negativo**19:** Control de mezcla de reacción. **B) <u>DENV-2</u>: 1:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen), **2-3:** New Guinea "C",**4-5:** LARD-1913, **6-7:** 1995-IQT, **8-9:** LARD-1802, **10-11:** LARD-1910, **12-13:** LARD-2252, **14-15:** LARD-1304, **16-17:** LARD-1699, **18:** Control negativo**19:** Control de mezcla de reacción. **C) <u>DENV-3</u>: 1:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen), **2-4:** LARD-17890,**5:** LARD-28926, **6-7:** LARD-23639, **8-9:** LARD-24247, **10-11:** H-87, **12-13:** LARD-15394, **14-15:** LARD-19040, **16-17:** LARD-20277, **18:** Control negativo**19:** Control de mezcla de reacción. **D) <u>DENV-4</u>: 1:** Marcador (100 pb *DNA step ladder*, Axygen), **2-4:** LARD-2706,**5-7:** LARD-2431, **8-10:** LARD-2361, **11-13:** LARD-4332, **14-15:** LARD-3485, **16-17:** LARD-2253, **18:** Control negativo**19:** Control de mezcla de reacción.

*Códigos de los DENV amplificados según el serotipo viral.

Estos productos fueron purificados, con el fin de determinar el rendimiento de los ADN obtenidos para su uso posterior. La relación A_{260}/ A_{280} de los productos mostró valores entre 1,6 y 1,8; de igual forma las concentraciones de ADN estuvieron en un rango entre 15 y 65 µg/mL lo que demostraba una adecuada pureza y rendimiento de los productos obtenidos.

DISCUSIÓN

La RT-PCR empleada en este trabajo, permitió la amplificación del ADN complementario de un segmento de ARN viral constituido por las regiones 5´UTR y parte de la cápside del genoma de los cuatro serotipos de DENV de una manera eficiente y específica. Tal, se evidenció por la presencia de bandas nítidas y reproducibles, obtenidas luego de reacciones de amplificación en las cuales se emplearon cantidades mínimas de enzimas en relación a otras RT-PCR (18-22).
En el caso de los flavivirus, y de forma particular de los DENV, la técnica de PCR ha sido de gran utilidad para la detección e identificación viral en diferentes tipos de muestras (suero, mosquitos infectados, cultivos celulares y larvas de mosquitos). Las diferencias entre las técnicas se han basado en los genes elegidos para su amplificación, y a su vez la elección de la región a amplificar se asocia a la necesidad de los laboratorios, ya que los productos de PCR pueden ser empleados para diagnosticar, secuenciar, genotipificar, clonar, entre otros (23-29). Una de las técnicas más utilizadas, fue desarrollada por Lanciotti y cols. (1992) quienes lograron amplificar productos para cada serotipo de DENV (20). Asimismo, se han optimizado técnicas para obtener otros genes, como por ejemplo el gen de la envoltura (E) cuya utilidad ha sido demostrada en el análisis de secuencias nucleotídicas (23-25). De igual forma, para la genotipificación de los serotipos de DENV se ha utilizado con gran aceptación y confiabilidad la amplificación del sitio de unión E/NS1 (26-29).

La región amplificada en este trabajo, representa la secuencia inicial del genoma de los DENV (5´UTR), e incluye la mayor parte de la región que codifica la proteína de la cápside viral. En el caso específico de 5´UTR, se ha descrito su capacidad de asociación por complementariedad con la región no traducible del extremo 3´ terminal del genoma de los DENV, específicamente en un segmento que se ubica antes del codón de inicio AUG (UAR). Esta interacción entre 5´UAR y 3´UAR, podría estar implicada en la modulación de la estructura SL ubicada a nivel de 3' durante el proceso de iniciación de la síntesis de ARN. Esta cercanía de 3´ terminal del ARN viral al segmento promotor en 5´UTR permitiría, la disponibilidad de nucleótidos del genoma viral para la síntesis a través de la RdRp (7,30). La región 5´UTR también interviene en el mecanismo de síntesis de proteínas (9, 31,32). Es por ello que las regiones terminales del genoma de los DENV (5´UTR y 3´UTR) determinarán, en gran medida, la puesta en marcha de los mecanismos de replicación viral y síntesis de proteínas para el éxito de la infección viral en las células hospedadoras.

La obtención de estos fragmentos a través de una amplificación eficiente mediante RT-PCR, asegura productos que pueden ser utilizados en ensayos relacionados con la tecnología de ADN recombinante, tal como la clonación en vectores con secuencias promotoras que permitan la generación de ARNm viral, capaz de traducirse en sistemas eucariotas *in vitro*. En el caso de este estudio, fue posible la amplificación de la región 5´UTR-C de cepas de los cuatro serotipos de DENV, lo cual favorecerá el análisis del rol de dicha región en el mecanismo de traducción viral *per se*, así como la regulación e inhibición de tal mecanismo, a través del uso de moléculas con actividad antiviral.

AGRADECIMIENTO: *A la Corporación de Salud del Estado Aragua (CORPOSALUD ARAGUA), y en especial a las Direcciones de Salud y Epidemiología, por su contribución en la captación y diagnóstico, a través del programa vigilancia epidemiológica del dengue de la mayoría de los pacientes de los cuales se aislaron los virus DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 reportados en este estudio. A todo el personal del Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales. Al Lic. Eduardo Bandeira por su contribución técnica en la ejecución de algunos experimentos y al Dr. Kevin Russell (Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales de la Marina de Estados Unidos (Naval Medical Research Center Detachment [NMRCD]) por la gentil donación de los virus DENV-1 (16007) y DENV-2 (2124IQT).*

FINANCIAMIENTO: *El financiamiento para la realización de este estudio provino del programa Misión Ciencia (Incentivo Institucional) otorgado a través del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, Proyecto: UC-200900434.*

REFERENCIAS

1. Gubler D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin Microbiol Rev 1998; 113:480–496.
2. World Health Organization. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. France; 2009.
3. World Health Organization. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N°117, March 2009. (Consulta, 06 Diciembre 2011). Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/.
4. You S, Padmanabhan R. A novel in vitro replication system for dengue virus. Initiation of ARN synthesis at the 3'-end of exogenous viral ARN templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral ARN. J of Biol and Chem 1999; 27447: 33714-33722.
5. Villordo S, Gamarnik A. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. Virus Res 2009; 139,2:230-239.
6. Alvarez D, Lodeiro M, Ludueña S, Pietrasanta I, Gamarnik, A. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. J Virol 2005b; 7911: 6631–6643.
7. Filomatori C, Lodeiro M, Alvarez D. A 5´RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. Genes Dev 2006; 20:2238-2249.
8. Sullivan ML, Ahlquist P. A brome mosaic virus intergenic RNA3 replication signal functions with viral replication protein 1a to dramatically stabilize RNA in vivo. J Virol 1999;73:2622-2632.
9. Deas T, Binduga-Gajewska I, Tilgner M, Ren P, Stein D, Moulton H, et al. Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication.J Virol 2005; 798:4599–4609.
10. Kinney R, Huang C, Rose B. Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers. J Virol 2005;798:5116-5128.
11. Holden K, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3V untranslated region and the terminal 3V stem-loop domain. Virology 2006; 329:119-133.
12. Stein D, Claite YH, Silengo S, Amantana A, Crumely S, Blouch R, et al. Treatment of AG129 mice with antisense morpholino oligomers increases survival time following challenge with dengue 2 virus. J Antimicrobial Chemoth 2008; 62:555–565.
13. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg 1982; 31:830–836.
14. Gubler D, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 1984; 33:158-165.
15. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. Nucleics Acids Symp Ser 1999; 41:95-98.

16. Spruyt M, Buquicchio F. Gene Runner Version 3.05. Hastings Software, Inc.1994.

17. Sambrook, J., Russell, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª De. Cold Spring Harbor, New York; 2001.

18. Deubel V, Laille M, Hugnot JP, Chungue E, Guesdon JL, Drouet MT, et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. J Virol Methods 1990; 30: 41–54.

19. Henchal EA, Polo S, Vorndam V,Yaemsiri C, Innis B, Hoke CH. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. Am J Trop Med Hyg 1991; 45:418–428.

20. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 545-551.

21. Tanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods 1993; 41:311–322.

22.Harris E, Roberts T, Smith L, Selle J, Kramer L, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol 1998; 36: 2634– 2639.

23. Leitmeyer K, Vaughn D, Watts D, Salas R, Villalobos I, Ramos C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999; 73:4738–4747.

24. Goncálvez A, Escalante A, Pujol F, Ludert J, Tovar D, Salas R et al. Diversity and evolution of the envelope gene of Dengue virus type 1. Virology 2002; 303:110-119.

25. Uzcátegui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jiménez M et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. J Gen Virol 2003; 84:1569-1575.

26 Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. Virology 1990; 174:479-493.

27. Méndez J, Bernal M del P, de Calvache D, Boshell J.Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus Dengue tipo 2. NOVA 2003; 1:1794-2370.

28. Domingo C, Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, Gascón J, et al. Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. J Clin Microbiol 2006; 44:1519-1529.

29. Camacho DE, Ferrer E, Rodríguez-Henríquez F, Sierra G, Bosch I, Schmidt D et al. Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007. Salus 2009; 1:73-87.

30. Álvarez D, Lodeiro M, Ludueña S, Pietrasanta I, Gamarnik A. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome J Virol 2005; 7911:6631–6643.

31. Wei Y, Qin C, Jiang T, Li X, Zhao H, Liu Z, et al. Translational regulation by the 3′ untranslated region of the dengue type 2 virus genome. Am J Trop Med Hyg 2009; 81:817-824.

32. Chiu W, Kinney R, Dreher T. Control of translation by the 5'- and 3'- terminal regions of the dengue virus genome. J Virol 2005; 79: 8303-8315.