

197
201



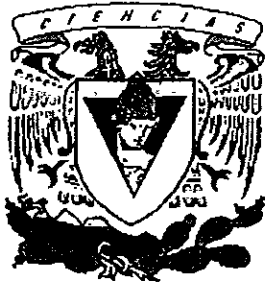
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**"Análisis Filogenético de la Proteína
No Estructural 3 (NS3 y/o p80) de
la Familia Flaviviridae (Flavivirus,
Hepatitis C y Pestivirus)."**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
María Concepción Rojas García



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Dirigida por:

Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz

1998



TESIS CON
FALLA DE CRICEN

26 17 05



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Análisis filogenético de la proteína no estructural 3 (NS3 y/o p80) de la familia Flaviviridae (Flavivirus, Hepatitis C y Pestivirus)

realizado por Rojas García María Concepción

con número de cuenta 9052221-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Blanca Haydée Ruiz Ordaz

Dra. Blanca Haydée Ruiz Ordaz

Director de Tesis

Propietario

M. en IBB. Saúl Cano Colín

Propietario

M. en IBB. Gustavo Jesús Ortega Lule

Propietario

M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzun

Suplente

M. en C. Rosa Elena Sarmiento Silva

Suplente

Saúl Cano Colín
Gustavo Jesús Ortega Lule
Juan Carlos Gaytán Oyarzun
Rosa Elena Sarmiento Silva

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Alejandro Martínez Mena

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA



Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de
la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz en el
Departamento de Biología Molecular del
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México

A los que me dieron la vida y han ayudado a mantenerme en ella.

A todos los que estuvieron presentes de alguna forma mientras llevé a cabo este trabajo.

A todos aquellos que me hicieron comentarios, críticas y aportaciones para enriquecer mi trabajo.

A todos los que me brindaron su cariño, apoyo, confianza y paciencia.

A todos los que estuvieron presentes cuando los necesité.

Por todo lo compartido...

GRACIAS

A Mafe por todo lo que me entrega
diariamente...

RESUMEN

La familia *Flaviviridae* consta de tres géneros: Los Flavivirus que tienen como hospederos a vertebrados, Pestivirus que infectan a animales de importancia económica y el virus de la Hepatitis C que se presenta en el chimpancé y en humano. Todos son virus envueltos de cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, con un marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína que es procesada postraduccionalmente en 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales, entre ellas NS3, la cual se encuentra conservada en toda la familia e interviene en procesos de replicación y procesamiento del precursor poliproteínico, presentando actividad de serín proteasa, helicasa y trifosfatasa. Por análisis bioquímicos y de secuencias se detectó que 2 de sus 3 dominios se encuentran presentes en toda la familia: el de helicasa y el de serín proteasa. A partir de alineamientos, análisis de secuencias y construcción de dendrogramas llevados a cabo a partir de una base de datos (104 secuencias), se pudo seguir la filogenia de la proteína en la familia, encontrándose que el género más antiguo es el de los Pestivirus, seguido de los virus que causan la Hepatitis C (proponiendo 7 tipos de acuerdo a la frecuencia de aparición-desaparición de aminoácidos. Estos dos géneros no son transmitidos por vectores. Finalmente, como grupo más reciente encontramos el género de los Flavivirus en el cual se observa la presencia de dos vectores de transmisión (garrapata y mosquito), como un rasgo adquirido que le proporciona una mayor distribución, haciéndolo el género más diversificado.

INTRODUCCION

Los virus son partículas infecciosas, constituidas por una molécula de ADN o ARN, encerrada por una capsida generalmente de tipo proteico; ésta asociada a ácidos nucleicos forma la nucleocápside; además de la nucleocápside podemos encontrar virus envueltos, esta envoltura está constituida por una bicapa lipídica asociada a glicoproteínas. (White y Fenner, 1994).

Todos los genomas virales son haploides esto es, que contienen sólo una copia de cada gen, excepto los retrovirus, los cuales son diploides. El ADN o ARN viral puede ser de doble cadena (*d*) o de cadena simple (*s*).

Los virus con genoma de ADN están constituidos por una cadena simple, excepto los Parvovirus que tienen doble cadena; esta puede ser lineal o circular; aunque los virus ADNs lineares pueden adoptar configuraciones circulares necesarias para su duplicación.

El tamaño del genoma de virus ADN puede ser muy variable con rangos desde 3.2 pares de kilobases en el caso de Hepadnavirus, hasta 200 pares de kilobases para Poxivirus. Pueden tener desde 4 hasta 200 genes. Entre los virus de este tipo podemos mencionar a Adenovirus, Herpesvirus, Retrovirus, Coronavirus, Poxivirus, etc.

Entre los virus RNA se pueden distinguir tres clases: los virus que utilizan su genoma como mensajero (+RNA), tal es el caso de los Picornavirus, Calicivirus, Togavirus, Coronavirus, Flavivirus y Retrovirus; los que tienen como genoma una molécula de RNA complementario (o negativa) (-RNA), tales como Paramyxovirus, Rhabdovirus, Filovirus, Orthomyxovirus, Arenavirus y Bunyavirus, y los que tienen genomas de doble cadena de RNA (dsRNA) como

los Rotavirus, Reovirus y Orbivirus. Los virus más abundantes de RNA son los de cadena sencilla con polaridad positiva (Gorbalenya, 1995).

El tamaño de los genomas de virus de RNAs varía desde 1.7 a 21 pares kilobases, mientras que para los virus de doble cadena va de 18 a 27 pares de kilobases.

Clasificación de virus

Existen diferentes criterios para la clasificación de los virus, entre los cuales se contempla su morfología (tamaño, forma, presencia o ausencia de envoltura, simetría y estructura de la cápside); propiedades fisicoquímicas (tamaño del genoma, estabilidad del pH, sentido o polaridad, número y tamaño del segmentos, secuencias de nucleótidos, segmentos repetidos, contenidos de G-C, etc.); proteínas (número, tamaño y función de proteínas estructurales y no estructurales, secuencias, glicosilación, fosforilación, mapeaje de epítopes, etc.); contenido de lípidos; carbohidratos (contenidos, número de marcos abiertos de lectura, sitio de ensamblaje, etc.); propiedades antigénicas (tomada de centros de referencia), y por sus propiedades biológicas (hospedero, modo de transmisión, distribución geográfica, patogeneicidad, tropismos, etc.) (Murphy, *et al.*, 1995).

Uno de los criterios que se utilizan para el agrupamiento en familias y géneros están dados por las bases moleculares como son el uso de anticuerpos monoclonales, péptidos sintetizados y mapeaje de epítopes. Actualmente la secuenciación genómica o secuenciación parcial es una herramienta para la identificación y diagnóstico de actividades (Murphy, *et al.*, 1995). Por medio de la comparación de secuencias de proteínas pueden distinguirse nuevas familias y nuevos géneros e inferir funciones a partir de la identificación de dominios, a partir de los cuales se construyen los alineamientos múltiples de secuencias, los que pueden ser analizados posteriormente (Koonin y Dolja, 1993).

Existen diferentes programas que realizan los alineamientos a partir de una base de datos entre los cuales se encuentran CLUSTALW, TREEALIN, MACAW, FASTP, entre otros.

Una parte importante en el análisis de secuencias es la construcción e interpretación de árboles filogenéticos son diagramas que representan la descendencia evolutiva.

Existen diferentes tipos de árboles filogenéticos denominados dendrogramas, cladogramas, filogramas, etc. Un dendrograma es un diagrama ramificado que agrupa bajo algún criterio específico (Wiley, 1981).

Generalidades de la familia Flaviviridae

La familia *Flaviviridae* consta de tres géneros: Flavivirus, Pestivirus y el virus de la Hepatitis C (Francki *et al.*, 1991), son virus envueltos de cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, posee un marco abierto de lectura de más de 10,000 bases que codifica para una poliproteína, la cual es procesada postraduccionalmente en cada una de las diferentes proteínas virales. Las proteínas estructurales se encuentran localizadas hacia la región 5', mientras que las no estructurales en el extremo 3' (Murphy *et al.*, 1995) (figura 1). Se ha propuesto que la unión y entrada de los virus a la célula hospedera se lleve a cabo a través de endocitosis mediada por un receptor. La fusión de la membrana viral con la membrana celular le permite al virus internalizarse, desnudarse y liberar la nucleocápside al citoplasma, en donde ocurre la duplicación viral (Gould y Buckley, 1989).

Las proteínas estructurales análogas entre cada género carecen de similitud de secuencia, sin embargo, en las proteínas no estructurales ha sido posible detectar la presencia de dominios conservados entre los tres géneros (Miller y Purcell, 1990), encontrándose firmas estructurales a las que se les han asociado funciones específicas tales como helicasa (Blok *et al.*, 1992) y

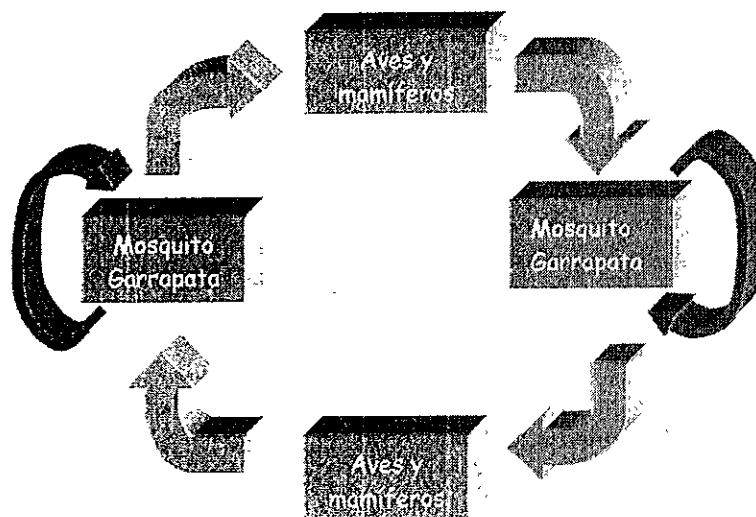
serin proteasa (Lobigs, 1993) para NS3; polimerasa (Bruenn, 1991) y metil transferasa (Koonin y Dolja, 1993) en el caso de NS5.

Género Flavivirus

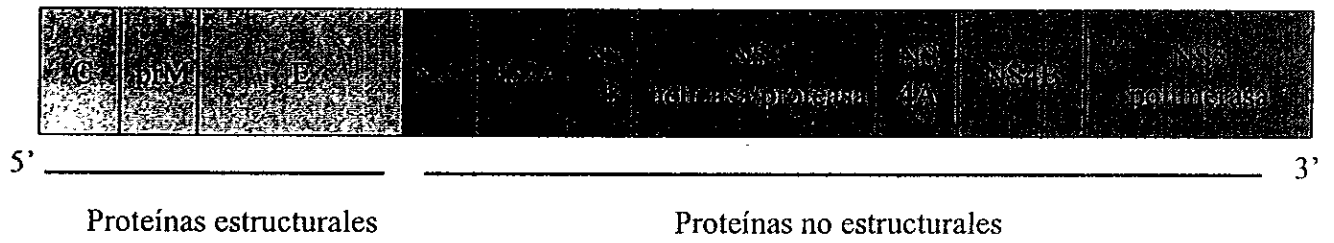
Los flavivirus tienen un genoma de aproximadamente 11 Kb, que presenta una estructura cap tipo I en el extremo 5' seguida de una secuencia dinucleotídica conservada y carecen de cadena poly A en el extremo 3'. El genoma contiene un marco de lectura abierto de más de 10,000 bases que codifica un precursor poliproteínico de aproximadamente 3,391 aminoácidos que es procesado postrasduccionalmente en 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (Rice, *et al.*, 1985) (Figura 1).

La mayor parte de los virus pertenecientes a este género se transmiten mediante vectores artrópodos hematófagos como el mosquito (*Aedes spp.*) y la garrapata (*Ixodes spp.*) sin embargo, existen algunos grupos en los que aún no está definido o no se conoce el modo de transmisión. Los virus tienen como hospederos a vertebrados tales como las aves y mamíferos entre los cuales están los gatos, perros, vacas, caballos, monos y el hombre (Fields, *et al.*, 1995).

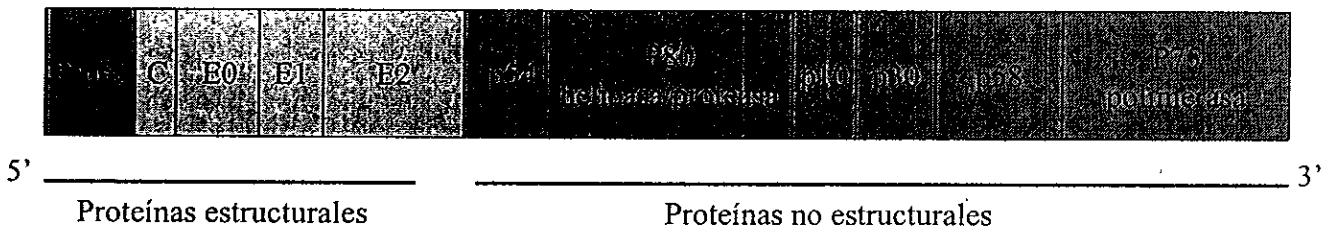
Ciclo infeccioso en Flavivirus



Flavivirus



Pestivirus



Hepatitis C

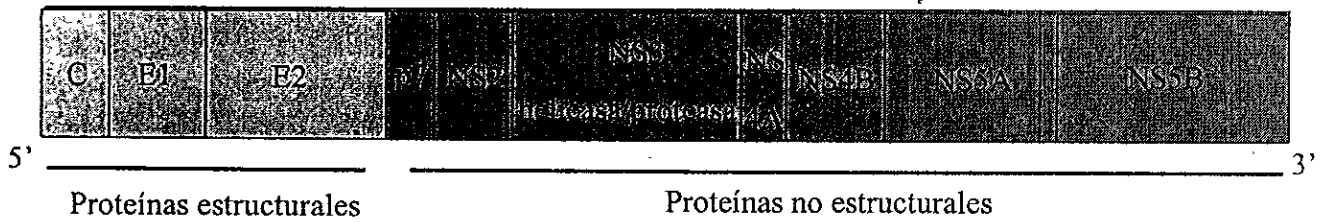


Fig. 1. Comparación de la organización de la poliproteína entre los géneros de la familia *Flaviviridae* (Murphy *et al.*, 1995)

GRUPO	MIEMBROS TIPO
Encefalitis transmitida por garrapata (12,G)	Encefalitis de Europa Central (TBE-W) Encefalitis del Lejano Oeste (TBE-FE)
Río Bravo (6,G)	Río Bravo
Tyuleniy (3,G)	Tyuleniy
Encefalitis Japonesa(10,M)	Encefalitis Japonesa (JE) Kunjin (KUN) Encefalitis del Valle de Murray (MVE) Encefalitis de San Luis (SLE) Virus del Oeste del Nilo (WN)
Ntaya (5,M)	Ntaya
Uganda S (4,M)	Uganda S
Dengue (4,M)	Dengue tipo 1 (DEN 1) Dengue tipo 2 (DEN 2) Dengue tipo 3 (DEN 3) Dengue tipo 4 (DEN 4)
Fiebre Amarilla (M)	Fiebre Amarilla (YF)
Modoc (5,D)	Modoc

Cuadro 1. La clasificación serológica de los Flavivirus. El número y la letra que se encuentran en el paréntesis corresponden al número de miembros que se encuentran organizados en cada grupo (Calisher *et al.*, 1989) y al tipo de vector respectivamente; M: mosquito, G: garrapata, D: desconocido.

Dentro del género flavivirus se encuentran más de 68 miembros divididos en grupos de acuerdo a sus características serológicas; 13 de ellos, causan enfermedades en humanos que van desde un cuadro febril, hasta fiebres hemorrágicas, síndrome de choque y encefalitis. La clasificación serológica se muestra en el cuadro 1.

Características del género Pestivirus

El genoma de los Pestivirus tiene un tamaño de aproximadamente 12.5 Kb con un marco de lectura abierto de aproximadamente 11, 964 bases que codifican para una poliproteína de 4,000 aminoácidos, que es procesada en 4 proteínas estructurales y 5 no estructurales, las cuales se encuentran en el genoma (Figura 1). La proteína p80 es homóloga a NS3, ya que contiene los dominios de helicasa y de serín proteasa (Wiskerchen y Collet, 1991). Este género no presenta región de poly A en el extremo 3', pero puede encontrarse una región de poly C.

Los virus de este género tienen como hospederos a todos los integrantes del grupo *Artiodactyla*, actualmente estos se han aislado en 50 especies de rumiantes (cebra, jirafa, búfalo, etc.) (Hamblin y Hedger, 1979). Sus principales hospederos son los animales domésticos como el cerdo, la vaca y el borrego; que son de gran importancia económica para el hombre.

En el grupo de los pestivirus no se han detectado vectores, su forma de transmisión es indirecta, a través de diversos agentes (heces fecales, orina, secreciones nasales, etc) (Ver esquema del ciclo infectivo). Dentro de este género se incluyen los tres grupos que se encuentran representados en el cuadro 2 (Wengler *et al.*, 1995).

Ciclo infeccioso de Pestivirus



Grupo	Miembro tipo
Diarrea viral bovina	Virus de la diarrea bovina (VDB)
Fiebre Clásica porcina	Virus de la fiebre clásica porcina o cólera del cerdo (VCP)
Enfermedad del borrego	Enfermedad del borrego (VEO)

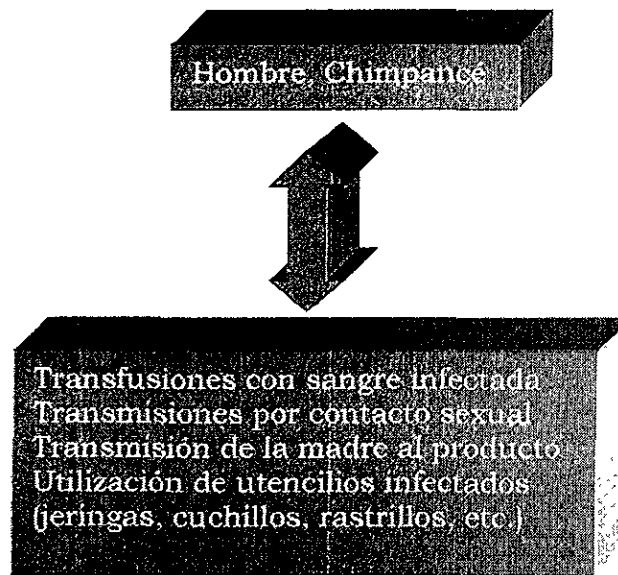
Cuadro 2. En este cuadro se encuentran contenidos los grupos del género Pestivirus aceptados actualmente en base a estudios serológicos (Wengler *et al.*, 1995).

Características del virus de Hepatitis C

El virus de la hepatitis C tiene un genoma menor que el de los otros 2 géneros (9.5 Kb); su región 5' no traducible es de 341 a 344 bases, siendo la región más conservada de su genoma. En su extremo 3' presenta una región de poly A. El RNA genómico tiene un tamaño de 9379 nucleótidos, con un marco abierto de lectura, que codifica para un precursor poliproteínico de 3011 aminoácidos que es procesado postraduccionalmente originando 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (Figura 1)(Grakoui, *et al.*, 1993).

El virus de la Hepatitis C no tiene vectores, se transmite principalmente por transfusión con sangre contaminada, secreciones o contacto sexual. Se han reportado casos de transmisión vertical aunque no se conoce en qué momento puede ocurrir la infección. Sus principales hospederos son el chimpancé y el humano. Se tiene como único grupo y miembro tipo al Hepatitis C (Murphy *et al.*, 1995).

Ciclo infeccioso del virus de Hepatitis C



Las infecciones por hepatitis C son generalmente crónicas, aunque pueden variar, desde un cuadro asintomático, hasta hepatitis crónica activa que puede progresar a cirrosis asociada al desarrollo de carcinoma hepatocelular y a hepatitis fulminante (Shimotohno, 1993).

La gran variabilidad de este virus no ha permitido unificar criterios para su clasificación, y para esto se han utilizado características como la forma de transmisión, manifestaciones clínicas, respuesta a algún tratamiento, o bien, regiones geográficas. En recientes estudios y análisis de secuencias de las proteínas E1 y NS5 en aislados de Hepatitis C, se han encontrado diferencias, con las cuales Simmonds y col., (1993) han propuesto una nomenclatura de "tipos" (correspondientes a las principales ramas de su árbol filogenético) y "subtipos" (correspondientes a las secuencias de aminoácidos más relacionadas de acuerdo a sus análisis). Los tipos son numerados del 1 en adelante, mientras que los subtipos se designan en orden alfabético de acuerdo a como se van encontrando (a, b,c, etc.), de este modo se han establecido 6 grandes grupos y se reconocen aproximadamente 40 subtipos; aunque con

base en nuevos aislados se han propuesto 11 tipos (también llamados genotipos) y más de 40 subtipos, no bien definidos, que se encontraban incluidos en los 6 tipos preestablecidos por Simmonds (Tokita, *et al.*, 1996). Los problemas de nomenclatura para el virus de Hepatitis C no se han podido resolver, ya que no se ha establecido alguna característica específica que permita unificar criterios.

Hasta el momento, no se ha definido ninguna asociación del genotipo con el patrón de infección, pero se ha reportado que en Europa y Estados Unidos de América los genotipos más frecuentes son 1a, 1b, 2a, 2b y 3a, aunque esta distribución puede ser muy variable (McOmish, *et al.*, 1994). En las regiones de Japón, Taiwan y algunas zonas de China se encuentran más frecuentemente los genotipos 1b, 2 y 2b. En Tailandia, Singapur, Bangladesh y algunas regiones de la India predomina el tipo 3; en Egipto, El Oriente Medio y Africa Central predomina el tipo 4; en Africa del Sur se encuentra el tipo 5. El tipo 6a se detectó originalmente en Hong Kong. Nuevos genotipos se han detectado en Vietnam (7,8 y 9) y Tailandia (10 y 11), (Tokita, *et al.*, 1996).

Aunque se conoce poco de la función de las proteínas NS3 y NS5, se sabe que están asociadas con actividades claves en la expresión y duplicación del genoma viral.

La proteína NS3 es la segunda proteína más grande, se encuentra conservada en todos los miembros de la familia *Flaviviridae* (Mandl, *et al.*, 1989) y es de gran importancia, ya que interviene en los procesos de duplicación y procesamiento del precursor poliproteínico. De acuerdo a comparaciones en sus secuencias y análisis bioquímicos se ha concluido que puede ser trifuncional, es decir, se le asignaron las funciones de serín proteasa (Lobigs, 1993), helicasa (Blok, *et al.*, 1992) y de RNA trifosfatasa (Wengler y Wengler, 1993) aunque esta última, no se encuentre totalmente conservada a lo largo de toda la familia (sólo la encontramos en el género de los flavivirus).

Las helicasas de RNA juegan un papel importante en procesos biológicos como el procesamiento de los mensajeros, el inicio de la traducción, el ensamblaje de los ribosomas y la duplicación de diversas familias de virus a través de la modulación de la estructura del RNA. Estas enzimas son muy diversas y se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes grupos de procariontes, eucariontes y de virus. Las helicasas se han agrupado en tres superfamilias (SF1, SF2 y SF3), siendo más abundantes las helicasas SF1 y SF2, en estas 3 superfamilias se incluyen todas las helicasas de DNA y RNA celulares y virales. La SF1 incluye a los alphavirus y la SF2 a grupos como potyvirus, así como, a los tres géneros de la familia *Flaviviridae*. En SF3 se incluyen helicasas de virus de DNA y RNA de los parvovirus, herpesvirus, y baculovirus (Koonin, *et al.*, 1993). Se ha sugerido que SF1 y SF2 pueden tener un ancestro común ya que presentan 7 firmas conservadas distribuidas a lo largo de las secuencias.

Una firma estructural y/o funcional se define como una región específica en la secuencia de aminoácidos de una proteína a la se le puede asociar alguna función de importancia biológica.

La helicasa de NS3 pertenece a la SF2 (Lain *et al.*, 1991) y presenta firmas funcionales importantes como son: GxGKT, DExH, GRxxR, que están relacionadas con el acoplamiento del ATP y desenrollamiento e hidrólisis de ATP, respectivamente (Fuller-Pace, 1994).

Las proteasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y tienen actividades catalíticas que pueden ser agrupadas en 4 clases de acuerdo con su grupo funcional en el sitio activo: Serina, Cisteína, Aspártico y las metales. Las serín proteasas requieren cuatro componentes básicos para que lleven a cabo la catálisis: un arreglo espacial idéntico, una triada catalítica, un sitio de unión a un oxianión, una zona de especificidad al sustrato y un sitio de unión no específico para sustratos polipeptídicos (Neurath, 1984).

NS3 es una serín proteasa que se agrupa en la superfamilia de la tripsina, las cuales tienen en común la triada catalítica formada por los aminoácidos: histidina (base), aspártico (ácido) y una serina (polar). La serín proteasa de NS3 juega un papel importante en la liberación de todas las proteínas no estructurales que por su especificidad en el sitio de corte, el cual da generalmente después de dos residuos básicos (Arg-Lys) rompiéndose el enlace que se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal (Bazan y Fletterick, 1989).

Planteamiento del Problema

NS3 es una proteína viral biológicamente muy importante, la cual presenta dominios funcionales de helicasa y serín proteasa, que se encuentran conservados en los tres géneros de la familia *Flaviviridae*, por lo que representa un buen marcador evolutivo para llevar a cabo análisis filogénéticos de esta familia.

Existen reportes previos de análisis evolutivos en *Flaviviridae* con otros marcadores, tales como la proteína envoltura (E, E1, NS5) (Zanotto, *et al.*, 1996), (Block *et al.*, 1992), o bien, se incluye sólo uno de los dos dominios de NS3 (Ohba, *et al.*, 1996). Sin embargo, estos análisis no se han llevado a cabo utilizando la proteína completa dentro de la familia, o con grupos comunes. En base a lo anterior en nuestro grupo, se ha buscado un parámetro común en toda la familia que permita llevar a cabo su análisis a partir de las regiones más conservadas como son las proteínas no estructurales 3 y 5 (NS3 y NS5).

En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis evolutivo a partir de alineamientos de secuencias de la proteína NS3 en los Flavivirus, Pestivirus y el virus de la Hepatitis C, relacionándola con otros grupos externos por medio del análisis de sus secuencias.

OBJETIVOS

GENERAL

Llevar a cabo el análisis filogenético de la proteína no estructural 3 (NS3 y/o p80) de la familia *Flaviviridae* (Flavivirus, Hepatitis C y Pestivirus)

PARTICULARES

Integrar una base de datos con las secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína no estructural 3 para cada uno de los diferentes géneros para llevar a cabo alineamientos.

Llevar a cabo diferentes alineamientos múltiples con las secuencias correspondientes a los tres géneros y posteriormente el análisis de las mismas..

Analizar las secuencias de la proteína NS3 y/o p80 de toda la familia (búsqueda de firmas específicas) para identificar elementos importantes de las secuencias.

Construir arboles filogenéticos para NS3 y/o p80 para cada género y posteriormente, para la familia para ser analizadas.

Llevar a cabo un análisis comparativo de los árboles filogenéticos correspondientes e identificar elementos que permitan establecer relaciones evolutivas en la familia.

MATERIALES Y METODOS

Base de datos.

La base de datos se construyó con todas las secuencias de aminoácidos (104) de la proteína NS3 de los diferentes géneros de la familia *Flaviviridae*. Estas se obtuvieron vía red utilizando los programas *Network blast* (programa de escrutinio de bases de datos a través de red) (Steph *et al.*, 1990) y *Network Entrez (ncbi)* (Benson, 1998) para proteínas con la opción "no redundante (nr)", es decir, se hizo el escrutinio contra SwissProt (SP) (Bairoch y Apweiler, 1996), GenBank (GB, GI y PID) (Burk, *et al.*, 1990) PIR (George, *et al.*, 1996), y EMBL (Kahn y Cameron, 1990).

Las secuencias se seleccionaron a partir de una región de NS3 delimitada previamente, Flavivirus (Wright, *et al.*, 1989); Hepatitis C, (Hayashi, 1993), y Pestivirus; (Meyers, G & Thield, 1995) las cuales se utilizaron como sonda para obtener todas las secuencias homólogas de cada género, a partir de todas las secuencias contenidas hasta noviembre de 1997, en las bases de datos mencionadas. Posteriormente, se llevó a cabo una selección de las mismas, es decir, se eliminaron las que estaban repetidas e incompletas para evitar referencias duplicadas quedando así una base de datos de 104 secuencias; en las que se encontraron tanto los dominios de helicasa como de serín proteasa. Las muestras quedaron distribuidas de la siguiente manera: Flavivirus 31, Hepatitis C 48 y Pestivirus 25 (Tabla 1).

Como unidades de trabajo se utilizaron tanto una computadora Silicon Graphics, Indigo XS24 4000 con 128 Mb de RAM, una computadora Pentium MMX a 166 Mhz y con 32 Mb en RAM, así como una Macintosh IIsi con 17 MB en RAM y con la versión 7.1 de sistema operativo.

*Secuencias que integran la base de datos de NS3
para la familia Flaviviridae*

Virus	Aislado	Nombre	Referencia	Referencias Cruzadas
D2 (V)	Puerto Rico PR159/S1	POLG_DEN2P	Hahn <i>et al.</i> , 1988	SP: P12823 GB: M19197 PIR: GNWVDP GI: 323516
D2 (IIIb)	Jamaica	POLG_DEN2J	Deubel <i>et al.</i> , 1986	EB: DENJAMA PIR: GNVVVJA GI: 323651
D2 (I)	Nueva Guinea C	POLG_DEN2N	Irie <i>et al.</i> , 1989	EB: DEN2CG3 GI: 323448
D2 (IIIa)	16681-PDK53	POLG_DEN27	Blok <i>et al.</i> , 1992	PIR: GNWV26 GP: DENCMEMSA
D2 (IIIa)	Thailandia 1964-16681	POLG_DEN26	Blok <i>et al.</i> , 1989	EB: DENENVD PIR: GNVV16 GP: DENCMEMSE
D2	Tonga 1994	POLG_DEN2T	Chen y Maguire, 1990	GB: X54319 SP: FLD2ENVG PIR: S11482 GI: 59303
D4		POLG_DEN4	Zhao <i>et al.</i> , 1986	SP: P09866 GB: M14931 GI: 323658 EB: DENSTRA
D3	H87	POLG_DEN3	Osatomi y Suniyoshi, 1990	SP: P277915 GB: M93130 PIR: GNWVD3 GI: 323468
D1	Singapore (S275/90)	POLG_DEN1S	Fu, 1992	GI: 464427 SP: P33478 PIR: A42581 GB: M87512
D1	NAURU ISLAND, WESTERN PACIFIC	DBU88535	Puri <i>et al.</i> , 1997	PID: g1854037 GI: 1854036
D1	NAURU ISLAND, Western Pacific 45°Z5	DBU88536	McKee <i>et al.</i> , 1997	PID: g1854039 GI: 1854038
D1	NAURU ISLAND, WESTERN PACIFIC 45A Z5-PDK27	DBU88537	McKee <i>et al.</i> , 1997	PID: g1854041 GI: 1854040
EJ		JEVCMNAA	Nitayaphan <i>et al.</i> , 1990	PID: g331333 GI: 331331
EJ	SA14	JEU14163	Ni <i>et al.</i> , 1994	PID: g537635 GI: 537634
EJ	SA-14-2-8	JEU15763	Ni <i>et al.</i> , 1995	PID: g687315 GI: 687314
EJ	SA-14	POLG_JAEV1	Nitayaphan <i>et al.</i> , 1990	EB: JEVCMNAA GB: M55506 GI: 331331 PIR: GNWVJS
EJ	SA(V)	POLG_JAEV5	Aihara <i>et al.</i> , 1990	GB: M130891
EJ		JEVSAA	Aihara, S. y col., 1990	PID: g221959 GI: 221958
EJ	P3	JEU47032	Ni y Barrett, 1996	PID: g1488041 GI: 1488030
EJ	JAOARS982	POLG_JAEVJ	Sumiyoshi <i>et al.</i> , 1987	SP: P08769 PIR: GNWVJE

(...continuación)

				GB:	M16574
BVM		GNWVMV	Dalgarno <i>et al.</i> , 1986		
KUNJIN	MRM61C	POLG_KUNJM	Coia <i>et al.</i> , 1988	GB:	130494
				PIR:	GNWVKV
				DDBJ:	D00246
WN		POLG_WNV	Castle <i>et al.</i> , 1985	GB:	M10103
				PIR:	GNWVMV
				SP:	P06935
FA	17D	POLG_YCFV1	Rice <i>et al.</i> , 1985	SP:	P03314
				PIR:	GNWVY
				EB:	X03700
				GI:	130529
FA	17D-204	POLG_YCFV2	Dupuy <i>et al.</i> , 1989	SP:	P19901
				PIR:	GNWVYP
				GI:	130530
				EB:	X15052
ETG	Western	POLG_TBEVV	Mandl <i>et al.</i> , 1988	SP:	P14336
				GB:	M21498
				PIR:	GNWVNE
ETG	Sofjin	POLG_TBEVS	Pfemev <i>et al.</i> , 1986	GB:	130520
				EB:	X07755
				PIR:	GNWVTE
ETG	263	TEV127491	Wallner <i>et al.</i> , 1995	PID:	g1065399
				GI:	1065398
ETG		POLG_TBEVH	Wallner <i>et al.</i> , 1995	PID:	g1709707
LOUPING	PS	LIVGEN	Gritsun <i>et al.</i> , 1997	PID:	g2058338
				GI:	2058337
PANGAT		POLG_LANVT	Mandl <i>et al.</i> , 1991	SP:	P29837
				GB:	M73835
				PIR:	A41704
				GI:	266825
VCP	GPE	HCVPOLYP2	Ishikawa, 1995	GI:	1000674
				PID:	g1000675
VCP	ALD	HCVPOLYP1	Ishikawa, 1995	PID:	g1000699
				GI:	1000698
VCP	Riems, C	HCU45477	Mueller <i>et al.</i> , 1996	PID:	g1181834
				GI:	1181833
VCP	CAP	HCVCOMSEQ	Tratschin <i>et al.</i> , 1996	PID:	g1225978
				GI:	1225977
VCP	Brescia	POLG_HCVB	Moormann <i>et al.</i> , 1990	PID:	g130457
				GB:	M31768
				GI:	325461
VCP	890	BVU18059	Ridipanth y Bolin, 1995	PID:	g802377
				GI:	018059
VCP	Glentorf	HCU45478	Mueller <i>et al.</i> , 1996	PID:	g1181836
				GI:	1181835
VCP		S57437	Ruggli <i>et al.</i> , 1995	PID:	g1360874
				PIR:	857437
VCP		A1679	Meyers <i>et al.</i> , 1990	PID:	g514199
				GI:	514198
VCP	Alfort A19	PTU90951	Smodack <i>et al.</i> , 1997	PID:	g1906630
				GI:	1906629
VCP	Steiermark	HCU21329	Meyers y Thiel, 1995	PID:	g710407
				GI:	710406
VCP	VR531 ATCC	HCU21328	Meyers y Thiel, 1995	PID:	g699585
				GI:	699584
VCP	B5b	HCVPOLYPR	Moormann <i>et al.</i> , 1996	PID:	1220146
				GI:	1220145
VCP		BVDNCP1	Meyers <i>et al.</i> , 1991	PID:	g854624
				GI:	323220
VCP	Alfort	POLG_HCVA	Meyers <i>et al.</i> , 1989	PID:	g130456
VDB	SD-1	POLG_BVDVS	Deng y Brock, 1992	GB:	M96751

(...continuación)

				GI: 289508
VDB	NADL	POLG_BVDVN	Colett <i>et al.</i> , 1988	PID: g1346739
VDB		A22708	Vandenbergh <i>et al.</i> , 1992	PID: g1334797
VDB	CpBVDV D19	BVU03912	Tautz <i>et al.</i> , 1994	GI: 904266 PID: g487967
				GI: 487966
VDB	NADL	POLG_BVDVN	Colett <i>et al.</i> , 1988	PID: g1346739
VDB	CP7	BVU63479	Meyers <i>et al.</i> , 1996	PID: g1518836 GI: 158835
VDB		GNWVBV	Colett <i>et al.</i> , 1988	PID: g74502
VDB	CP7	BVU63512	Tautz <i>et al.</i> , 1996	PID: g1628571 GI: 1628570
VDB	Osloss	BVDPP	De Moorlooze <i>et al.</i> , 1993	PID: g323230 GI: 323229
VEF	BD31	BDU70263	Ridpath <i>et al.</i> , 1996	PID: g17934398
VHC	T33	HPCKRNA	Choo, 1993	PID: g1150328 GI: 1150327
VHC	HD-1	HCU45476	Mueller <i>et al.</i> , 1996	PID: g1181832 GI: 1181831
VHC	NZL1	HPCEGS	Okamoto <i>et al.</i> , 1993	PID: g1183029 GI: 1183028
VHC	BEBE1	D50409	Nakao <i>et al.</i> , 1996	GI: g1483142 PID: d50409
VHC		592428	Houghton <i>et al.</i> , 1989	PID: g592428 GI: 592427
VHC	K3a	HPCK3A	Yamada <i>et al.</i> , 1994	PID: g558521 GI: 558520
VHC		911718	Okamoto y Nakamura, 1995	PID: g911718
VHC	I	POLG_HCV1	Choo <i>et al.</i> , 1991	PID: g130455
VHC	H	POLG_HCVH	Inchausti <i>et al.</i> , 1991	PID: g130461
VHC	Taiwan	POLG_HCVTW	Chen <i>et al.</i> , 1992	PID: g266821
VHC		911720	Okamoto y Nakamura, 1995	PID: g911720
VHC	HC-G9	HPCCGS	Okamoto, 1993	PID: g464178
VHC		S40770	Okamoto, 1992	PID: g432138
VHC		S18030	Honda <i>et al.</i> , 1993	PID: g77093
VHC		HPCKP	Sasaki, 1995	PID: g560789 GI: 560788
VHC	HCV-L2	HCU01214	Cho <i>et al.</i> , 1993	PID: g437108 GI: 437107
VHC		HCU16362	Cho, 1994	PID: g567060 GI: 567059
VHC	1B-1(#1090)	D85516	Sugiyama, 1996	PID: g1944376 GI: 1944375
VHC	λ Gt10	HPCT2	Hijikata <i>et al.</i> , 1995	PID: g496367 GI: 496366
VHC	λ Gt11	HPCPNS234	Kato <i>et al.</i> , 1990	PID: g471115 GI: 436216
VHC	HC18	POLG_HCV18	Okamoto <i>et al.</i> , 1992	PID: g130468 GI: P26661
VHC	BK	POLG_HCVBK	Takamizawa <i>et al.</i> , 1991	PID: g130458 GI: P26663
VHC	HCV-IL	HPCKBB	Hirovata <i>et al.</i> , 1991	PID: g469213 GI: 469212
VHC	HCV-N	S62220	Hayashi <i>et al.</i> , 1993	PID: g385584 GI: 385583
VHC	JK046	HPCK046E2	Okamoto, 1995	PID: g1183031
VHC	HCV-N	HPVHCVN	Zheng, 1994.	PID: g1405417 GI: 960359
VHC	TK	HPCKG	Chamaya, 1995	PID: g1435035 GI: 676877
VHC	1b	D89872	Tanaka, 1996	PID: g1749762

VHC	HCV-1b HPC-K1-R1	HPCK1R1	Enamoto, 1995	PID: g1814085 GI: 1030705
VHC	HCV-1b HPC-K1-R2	HPCK1R2	Enamoto, 1995	PID: g1814086 GI: 1030705
VHC	HCV-1b HPC-K1-R3	HPCK1R3	Enamoto, 1995	PID: g1814087 GI: 1030705
VHC	HCV-1b HPC-K1-S1	HPCK1S1	Enamoto, 1995	PID: g1814088 GI: 1030702
VHC	HCV-1b HPC-K1-S2	HPCK1S2	Enamoto, 1995	PID: g1814089 GI: 1030704
VHC	HCV-1b HPC-K1-S3	HPCK1S3	Enamoto, 1995	PID: g1814090 GI: 1030703
VHC		HCVGENS1	Seeling <i>et al.</i> , 1995	PID: g633202 GI: 276518
VHC		593530	Houghton <i>et al.</i> , 1990	PID: g593530 GI: 110074
VHC		592429	Houghton <i>et al.</i> , 1989	PID: g592429 GI: 111055
VHC	HC-J6	POLG_HCVJ6	Okamoto <i>et al.</i> , 1991	PID: g130466 GI: P26660 PIR: D00944
VHC		HPCJ483	Okamoto <i>et al.</i> , 1992	PID: g221605 GI: 221604
VHC		HPCJ491	Okamoto <i>et al.</i> , 1992	PID: g221607 GI: 221606
VHC		HPCJ491	Tanaka <i>et al.</i> , 1992	PID: g221615 GI: 221614
VHC		HPCUNKCDS	Cho, 1993	PID: g306287 GI: 308662
VHC		HPCRONYR	Chou <i>et al.</i> , 1990	PID: g328676 GI: 328675
VHC	JK049	HPCJK049E1	Okamoto, 1995	GI: 1183032 PID: g1183033
VHC	MKC1A	HPCRCR1	Seikiy-Honda, 1995	GI: 1212741 PID: g1212742
VHC	HC-C2	HPCRNA	Wang <i>et al.</i> , 1993	PID: g471117 GI: 471116
VHC	HC-J7	POLG_HCVJ7	Tanaka <i>et al.</i> , 1992	PIR: A45572 GI: 221613 PID: 1904413 DD: 111168
VHC	Japanese	POLG_HCVJA	Kato <i>et al.</i> , 1990	PID: g130469 GI: 221610 221611

Tabla 1. Relación de referencias cruzadas para las secuencias incluidas en la base de datos de NS3 para la familia Flaviviridae. Se utilizaron 104 secuencias tomadas de 6 bases de datos diferentes. PIR: Protein Identification Resource, SP: SwissProt, PID, EB: European Molecular Biology Laboratory Database, DD, DDBJ y GI: GeneBank Identification.

Edición de secuencias

A partir de la región que codifica para NS3 en Flavivirus, Pestivirus y Hepatitis C, se delimitó tanto el extremo amino como carboxilo terminales de cada una de las proteínas (Flavivirus: 1474-2092 (Wright *et al.*, 1989); Hepatitis C: 1027-1657 (Hagashi, 1993) y Pestivirus: 1638-2315 (Meyers y Thield, 1995)) ya que la proteína presenta diferentes longitudes, dependiendo del género al que pertenece, eliminándose el resto de las secuencias.

Alineamientos múltiples de secuencias.

Una vez editadas las secuencias se llevó a cabo el alineamiento múltiple a máxima parsimonia en cada género. Debido a las diferencias en longitud de la proteína NS3 en la familia, se seleccionaron las siguientes 5 secuencias al azar, buscando que estuvieran representados los 3 géneros: POLG_BVDVS (pestivirus), POLG_HCVJA, POLG_HCVJT (Hepatitis C), POLG_DEN2T y POLG_DEN2P (flavivirus), para poder alinear las regiones funcionales presentes. Posteriormente se insertó el grupo total en las secuencias anteriores, para llevar a cabo el alineamiento múltiple utilizando el programa *Clustalw versión 1.70* (Thompson J.D. y col., 1994), para lo cual se incorporaron huecos en diferentes sitios, verificando que las firmas importantes de nuestra proteína se conservaran .

Análisis de las secuencias e identificación de firmas.

Con el objeto de identificar elementos importantes en las secuencias (repeticiones, similitudes, etc.) que nos permiten definir grupos, se llevaron a cabo diferentes análisis de las secuencias, es decir, se buscaron firmas funcionales y/o estructurales (análisis de regresión, frecuencia de aparición) (Chin-Yih *et al.*, 1992) tanto para Pestivirus como para Hepatitis C, no así para Flavivirus ya que en este género se tienen bien definidos los serocomplejos (Murphy *et al.*, 1995).

Una firma funcional, se define como una región de las secuencias de aminoácidos a las que se les ha asignado propiedades biológicas específicas (Doolittle, 1986).

Para llevar a cabo el análisis firmas estructurales, se buscaron posiciones de aminoácidos en los cuales la ausencia o presencia de éstos, distinguen grupos filogenéticamente relacionados.

Contrucción de dendrogramas.

Con el objeto de establecer relaciones filogenéticas de la proteína NS3 en los 3 géneros de la familia *Flaviviridae*, se construyeron diferentes árboles filogenéticos, a partir de las regiones que codifican para dicha proteína; en cada género. Este análisis se llevó a cabo a máxima parsimonia con ayuda del programa *CLUSTALW (versión 1.70)* utilizando las variables recomendadas por el autor para este tipo de secuencias. Se obtuvo, inicialmente un dendrograma para cada uno de los géneros y posteriormante otro para la familia. Cada uno de los dendogramas se dibujaron mediante los programas *Phylowin versión 1.2 (Galtier y Gouy, 1996)* y *Treeview 1.5 (Page, 1997)*. Con *Phylowin* se calcularon 500 pasos de bootstrap (referir glosario) por el método Neighbor Joining con corrección de Poisson. Posteriormente, se llevaron a cabo cálculos comparativos de bootstrap mediante el programa *clustalw*.

Defnición de grupo externo para el dendrograma.

Por las características estructurales de la proteína NS3 y/o p80 y con el objeto de distinguir las relaciones ancestrales de la proteína se buscó en la bibliografía un grupo que no perteneciera a la familia *Flaviviridae* pero que reuniera las características necesarias para poderlo comparar, es decir, que tuviera los dominios presentes en esta proteína (helicasa y de serín proteasa), y que, además ambos fueran homólogos a los que encontramos en la proteína NS3 de la familia.

RESULTADOS

A partir de las secuencias obtenidas en nuestra base de datos se llevaron a cabo diferentes alineamientos multiples para cada género y posteriormente uno para toda la familia, tomando como base las firmas funcionales y/o estructurales de NS3. Por la extensión de los alineamientos se decidió omitirlos y presentar un concentrado de las regiones en las que se encuentran los dominios funcionales de esta proteína (cuadro 3).

	1	2	3	[#]	[1']	[2']	[2']	[3']						
	↓	↓	[↓]											
POLG_BVDVS	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
GNWVBV	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVDNCP1	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
POLG_BVDVN	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
A22708	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVDPP	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVU03912	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVU63479	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVU63512	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVDVDIP	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BVU18059	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
BDU70263	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCU21329	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
POLG_HCVA	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
A16790	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCVPOLYP2	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCVPOLYP1	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
S57437	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
PTU90951	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCS//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
POLG_HCVB	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCU45478	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCVCOMSEQ	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCU21328	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCVPOLYPR	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	FLDE	YHCA//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
HCU45477	VDHVT	//KTD	SG//LKG	WSGL//	--RVK	VG//	ATG	GAKTT//	ICDE	CHST//	MTAT	PA//	AQRR	GRV
POLG_HCVJA	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
POLG_HCVJT	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCHCP0	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCPP	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCK1R3	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCK1S3	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
POLG_HCVBK	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCRNA	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	MCDE	CHSI//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
POLG_HCVTW	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	MCDE	CHSI//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCK1S1	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	MCDE	CHSI//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCK1R1	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCT2	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCFPB	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
D89872	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCPNS234	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	MCDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
D85516	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCJRNA	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	MCDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
S6220	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCK1R2	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKSN//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCK1S2	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKSN//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCJTV	VYHGA	//DQD	LV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCJ483	VYHGA	//DL	DLV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT
HPCJ491	VYHGA	//DL	DLV//LKG	SSGG//	IFRA	AVC//	PTGS	GKST//	ICDE	CHST//	ATAT	PP//	AQRR	GRT

HCU45476 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKTT//ICDECHST//ATATPP//SQRRGRT
 S18030 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//AAATPP//SQRRGRT
 HCU01214 VFHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//MCDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 HPCUNKCD S VFHGA//DQDLV//LKGSSGG//ILPAAVC//PTGSGKST//MCDECHST//STATPP//SQRRGRT
 HCU16362 VFHGA//DQDLV//LKGSSGG//ILPAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//STATPP//SQRRGRT
 HPVHCVN VFHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//SQRRGRT
 592428 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 592429 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 HPCPOLYP VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 593530 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 POLG_HCV1 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 POLG_HCVH VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//LFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//TQRRGRT
 S40770 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHSV//ATATPP//TQRRGRT
 HPCCGS VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHST//ATATPP//SQRRGRT
 HPCJK046E2 VYHGA//DQDMV//LKGSSGG//LFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAV//ATATPP//SQRRGRT
 POLG_HCVJ6 VYHGA//EGDLV//LKGSSGG//VFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAV//ATATPP//SQRRGRT
 911718 VYHGA//EGDLV//LKGSSGG//VFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHSV//ATATPP//SQRRGRT
 D50409 VFHGA//EGDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHSV//ATATPP//SQRRGRT
 POLG_HCVJ8 VYHGA//EGDLV//LKGSSGG//LFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHSV//ATATPP//SQRRGRT
 911720 VYHGA//EGDLV//LKGSSGG//LFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAQ//ATATPP//SQRRGRT
 HPCFG VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAQ//ATATPP//SQRRGRT
 HPCVENS1 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAQ//ATATPP//SQRRGRT
 HPCEGS VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAQ//ATATPP//SQRRGRT
 HPCK3A VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGKST//ICDECHAQ//ATATPP//SQRRGRT
 HPCJK049E1 VYHGA//DQDLV//LKGSSGG//IFRAAVC//PTGSGEST//FLDEYHCA//ATATPP//SQRRGRT
 POLG_DEN2T MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN2P MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN2J MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN2N MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN27 MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN26 MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN3 MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTR//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 DBU88536 MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTR//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 DBU88535 MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTR//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 DBU88537 MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTR//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN1S MWHVT//KKDLI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTR//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_DEN4 MWHVT//RNDMI//P-GTSGS//LYNGVV//HPGAGKTK//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 GNWVMV LWHTT//KEDRV//I-GTSGS//LYNGVI//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_JAEV1 LWHTT//REDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 JEU14163 LWHTT//REDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 JEVCMNA LWHTT//REDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_JAEV5 LWHTT//REDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 JEU15763 LWHTT//REDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_JAEVJ LWHTT//KEDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 JEU47032 LWHTT//KEDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 JEVSA LWHTT//KEDRI//R-GTSGS//LYNGVE//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_WNV LWHTT//KEDRL//T-GTSGS//LYNGVI//HPGAGKTR//IMDEAHFT//MTATPP//AQRGRI
 POLG_KUNJM LWHTT//KEDRL//T-GTSGS//LYNGVI//HPGAGKTR//VMDEAHFT//MTATPP//AQRGRT
 POLG_TBEVH MWHVT//REDVV//K-GTSGS//LYNGLK//HPGAGKTH//IMDEAHWT//MTATPP//AQRGRV
 TEV127491 MWHVT//REDVV//K-GTSGS//LYNGLK//HPGAGKTH//IMDEAHWT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_TBEVW MWHVT//REDVV//K-GTSGS//LYNGLK//HPGAGKTH//IMDEAHWT//MTATPP//AQRGRV
 LIVGEN MWHVT//KEDVV//K-GTSGS//LYNGPK//HPGAGKTH//IMDEAHWT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_TBEVS MWHVT//KEDVV//K-GTSGS//LYNGLK//HPGAGKTH//IMDEAHWT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_LANVT MWHVT//REDVV//K-GTSGS//LYNGLK//HPGAGKTH//IMDEAHWT//MTATPP//AQRGRV
 POLG_YEFV1 MWHVT//KEDLV//S-GTSGS//LYNGIL//HPGAGKTR//IMDEAHFL//MTATPP//AQRGRI
 POLG_YEFV2 MWHVT//KEDLV//S-GTSGS//LYNGIL//HPGAGKTR//IMDEAHFL//MTATPP//AQRGRI
 . * .// * // * ** // // // * . * // // * . * // // . ** // . ****

1 2 3 (#) [1'] [2'] [2'] [3']

Cuadro 3. Se muestra un concentrado del alineamiento global de la familia *Flaviviridae*. Se indican también los aminoácidos que forman las regiones importantes de los dominios de serin proteasa y de helicasa de la proteína no estructural 3 (NS3) de la familia *Flaviviridae*. Los números 1,2,3 corresponden a la triada catalítica (H,D,S); #, 1' indica el sitio de unión de ATP; 2' (la caja DexH) relacionada con el desenrollamiento de la cadena de ARN e hidrólisis de ATP; 3' hidrólisis de ATP.

Las secuencias de *Flaviviridae* muestran un 4.64% de identidad y 8.09 % de similitud entre los tres géneros (flavivirus, pestivirus y hepatitis C), siendo las regiones más conservadas aquellas que corresponden a los dominios de serín proteasa y helicasa, los gaps que se encuentran a lo largo de los alineamientos se deben a las diferentes longitudes de las secuencias en los distintos géneros. Sin embargo, (como se observa más adelante) para cada género en particular los porcentajes de similitud son más elevados.

Posteriormente y con el objeto de establecer relaciones filogenéticas dentro de la familia *Flaviviridae*, se construyeron diferentes dendrogramas (para cada género y para toda la familia) utilizando como marcador evolutivo la proteína no estructural 3 (NS3). En el dendrograma de la familia completa, obtuvimos dos grandes ramas: una que corresponde a los flavivirus y otra que origina a pestivirus y hepatitis C (Figura 2).

El diseño de los árboles filogenéticos se llevó a cabo con *Treeview* y *Phylowin*, sin observarse alguna diferencia en la estructuración de los mismos, la evaluación de los árboles se efectuó, calculando el valor de bootstrap para 500 réplicas.

En el género *Flavivirus* encontramos un 30.62% de identidad y un 47.04% de similitud entre las secuencias, lo cual muestra que NS3 a pesar de presentar dominios muy conservados contiene diferentes regiones variables. Estas regiones se encuentran afectando los porcentajes de similitud en todo el grupo. Las diferencias entre las secuencias nos reflejan la diversidad dada por los serocomplejos (conjunto de virus agrupados por su reconocimiento a anticuerpos específicos) que se encuentran incluidos en este género. En el árbol filogenético (fig. 3) de los flavivirus se localizan 2 grandes ramas, la primera en aparecer agrupa a los virus transmitidos por garrapata en donde encontramos encefalitis transmitida por garrapata (TBE), el virus Langat (LANVT), y el virus "enfermedad Louping" (LIVGEN). La otra rama agrupa a los flavivirus transmitidos por mosquito en la cual están incluidas la fiebre

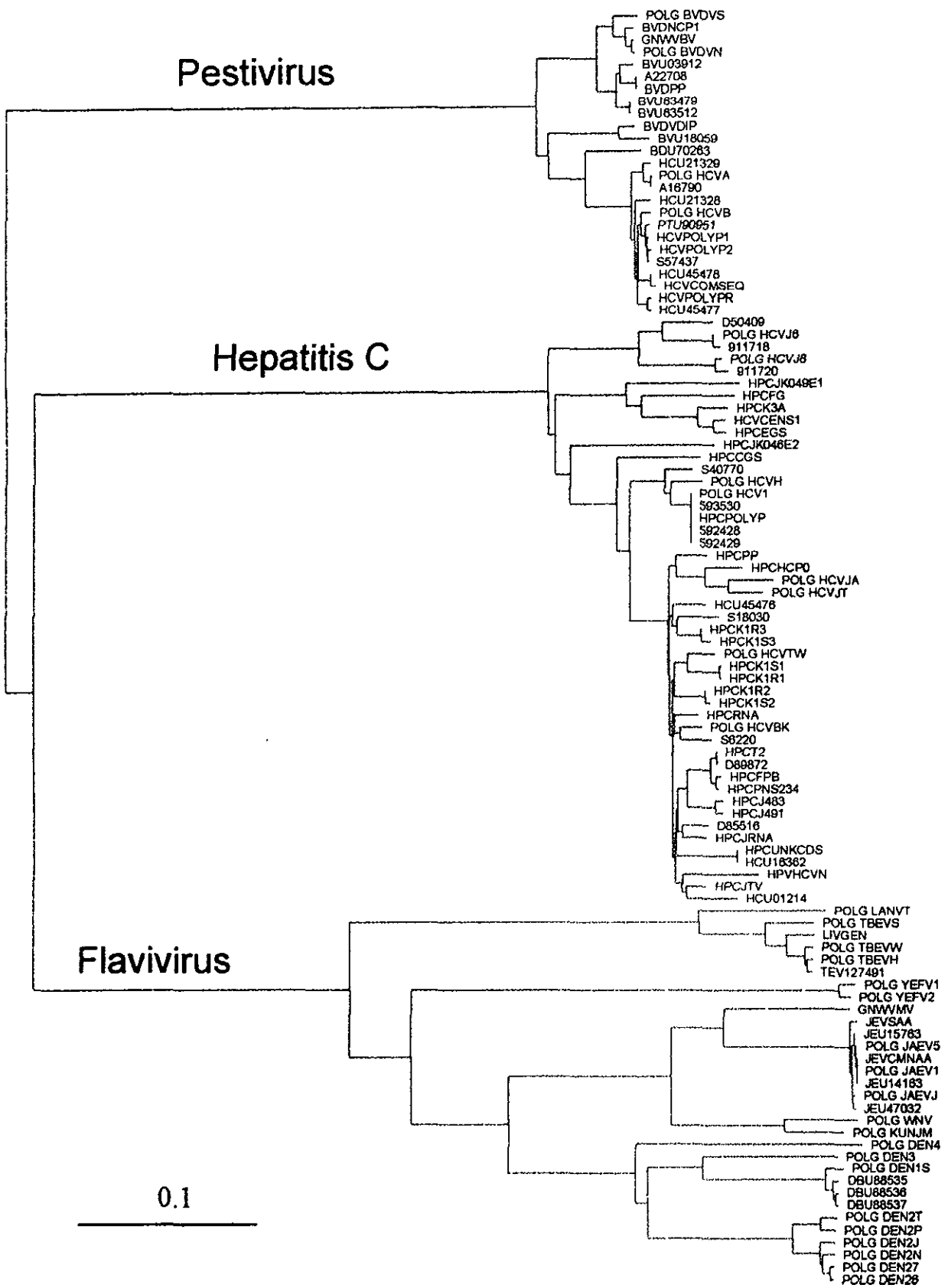


Figura 2. Familia Flaviviridae

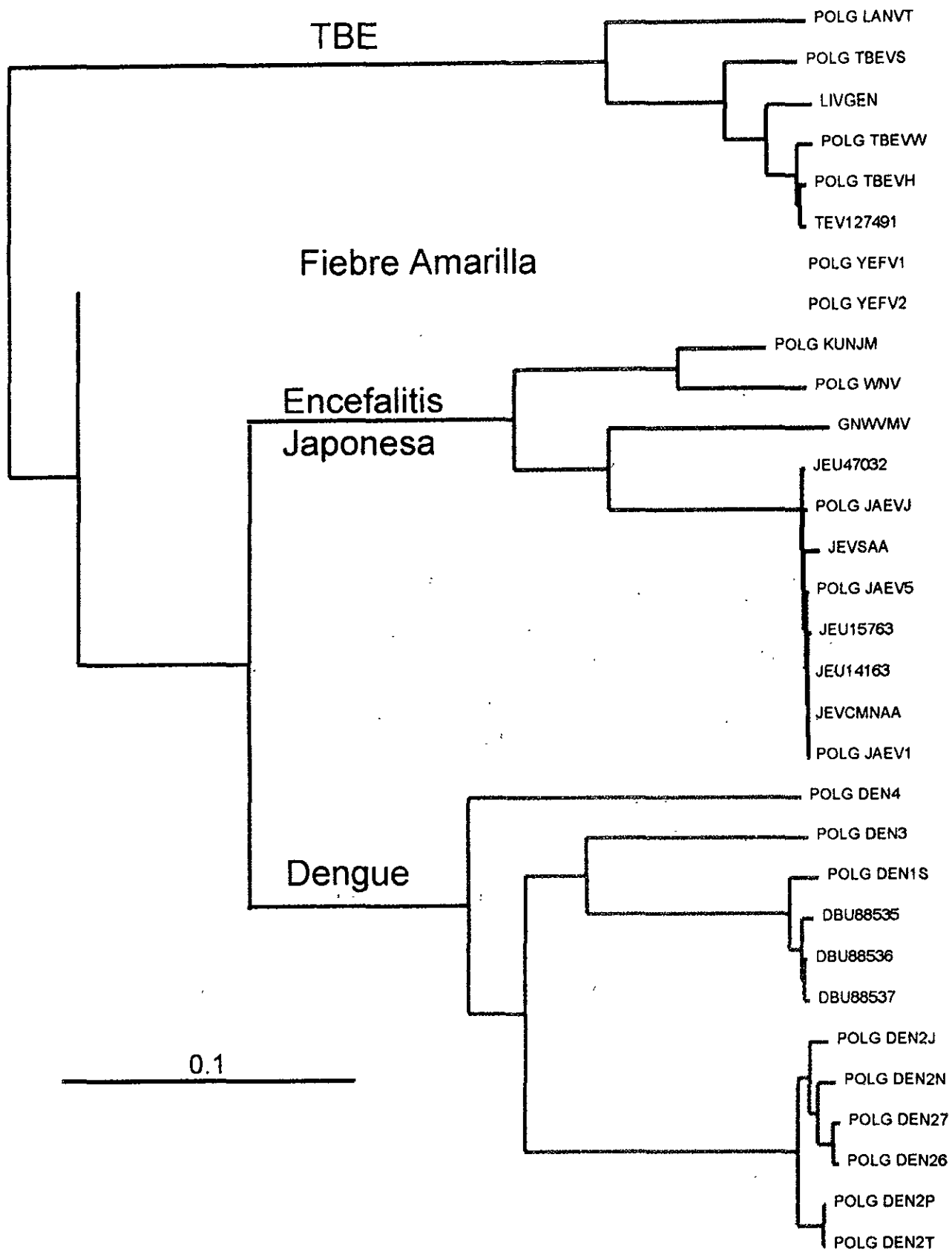


Figura 3. Género Flavivirus

amarilla (YF), encefalitis japonesa (JE) y dengue (DEN 1, DEN 2, DEN 3 Y DEN 4). De los cuales en el dengue se observa que el primero en divergir fue el DEN 4, a partir del cual surge una rama del que se origina el DEN 3, posteriormente el DEN 1, y finalmente el DEN 2, nuestros resultados concuerdan con análisis previos en los que se utilizan otras proteínas como son E, (Zanatto, P., *et al.*, 1996) NS1 y NS5 (Block, *et al.*, 1992).

Por otra parte, al alinear las secuencias del virus de la hepatitis C obtuvimos un 52.42% de identidad y 69.68% de similitud el cual es superior al género de los Flavivirus. Debido a la falta de uniformidad de criterios de agrupación, se decidió llevar a cabo un análisis de las secuencias para identificar elementos únicos que nos permitieran diferenciar grupos dentro del género, denominado "análisis de firma", obteniéndose siete grupos (ver cuadro 4 a, b, c, d, e, f, g) en los cuales se muestran cada uno de los aminoácidos con posiciones únicas dentro de la secuencia que se presentan como características que distinguen a cada tipo (genotipo) que estamos proponiendo.

En el cuadro 4 (a, b, c, d, e, f, g) se muestran las posiciones de aminoácidos y sus porcentajes de aparición que caracterizan a cada grupo propuesto. En el árbol filogenético obtenido (Figura 4) podemos observar que los subgrupos I, II, y III Simmonds (Simmonds *et al.*, 1993) los reporta como genotipo 1; que el grupo IV corresponde al genotipo genotipo 10 de Tokita (Tokita *et al.*, 1996), el grupo V corresponde al genotipo 3 de Simmonds, el grupo VI corresponde al genotipo 11 de Tokita y el grupo VII corresponde al grupo 2 de Simmonds.

Análisis de firmas para Hepatitis C

Posición	39	60	63	90	146	173	191	382	385
Grupos	A	T	I	S	A	N	V	L	T
I	0,90	1,00	1,00	0,90	0,90	0,90	0,70	1,00	1,00
II	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
III	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VII	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Cuadro 4a. Se muestran los aminoácidos, sus posiciones unicas para "tipo I" y porcentaje de aparición en las secuencias que lo integran.

Posición	41	70	296	342	357	381	533	554
Grupos	S	I	S	N	A	S	S	D
II	1,00	0,90	0,93	0,97	0,51	0,76	0,72	0,86
I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
III	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VII	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Cuadro 4b. Posiciones unicas en "tipo II" y porcentajes de la frecuencia de aparición en el total de las secuencias.

Posición	121	146	174	266	318	381	448	469	593	603
Grupos	N	M	L	H	I	V	S	H	A	G
III	1,00	1,0	1,00	1,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
II	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VII	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Cuadro 4c. Se indican las posiciones unicas de aminoácidos, características del tipo III, así mismo, el porcentaje en que se presenta el aminoácido en el total de secuencias que integran a este tipo.

Posición	27	81	109	152	171	173	314	336	338	341	342	346	384	387	456	477	487
Grupos	E	M	Q	L	C	A	C	Q	T	P	L	V	T	L	A	Q	T
IV	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
II	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
III	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VII	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	493	496	533	629													
	A	T	A	I													
	1.00	1.00	1.00	1.00													
	0.00	0.00	0.00	0.00													
	0.00	0.00	0.00	0.00													
	0.00	0.00	0.00	0.00													
	0.00	0.00	0.00	0.00													
	0.00	0.00	0.00	0.00													
	0.00	0.00	0.00	0.00													

Cuadro 4d. Se indican las 22 posiciones unicas de los aminoácidos característicos para el "tipo IV", así como su porcentaje de aparición en las secuencias.

Posición	22	39	66	68	71	94	109	122
Grupos	V	G	A	H	L	E	D	T
V	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00	0.75	0.75	1.00
I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
II	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
III	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
IV	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VII	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 4e. Se muestran las 8 posiciones unicas de los aminoácidos que lo distinguen como "tipo V"

(...continuación)

Posición	27	89	101	142	176	178	188	195	202	241	242	256	381	388	414	471
Grupos																
	I	V	I	I	V	E	S	Y	R	G	G	K	S	L	H	S
VI	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
II	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
III	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
IV	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VII	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	505	532	571	619												
	G	A	L	T												
	1.00	1.00	1.00	1.00												
	0.00	0.00	0.00	0.00												
	0.00	0.00	0.00	0.00												
	0.00	0.00	0.00	0.00												
	0.00	0.00	0.00	0.00												
	0.00	0.00	0.00	0.00												

Cuadro 4f. Se muestran los aminoácidos y sus posiciones características dentro de las secuencias, así como sus porcentajes de aparición entre las secuencias del tipo "VII".

Posición	15	18	20	26	32	46	48	51	60	66	67	76	77	78	79	90	106
Grupos	A	V	M	T	I	S	S	L	N	S	R	S	A	E	G	T	V
VII	0.60	1.00	0.60	0.60	0.60	0.60	1.00	1.00	1.00	0.60	0.60	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
II	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
III	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
IV	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	113	114	117	139	144	157	164	175	177	178	228	242	259	276	310	322	379
	N	K	A	R	R	S	S	D	V	T	N	D	A	V	T	H	A
	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.60	1.00	1.00	0.60	0.00	1.00	0.60	0.80	1.00	1.00	0.60	1.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	434	446	448	477	481	516	557	574	580	592	603	605	623	629			
	V	T	Q	S	A	F	A	V	T	V	S	T	Q	M			
	0.60	1.00	1.00	0.60	0.60	1.00	0.80	1.00	0.80	0.60	0.60	1.00	1.00	1.00			
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			

Cuadro 4g. Se indican las 46 posiciones de aminoácidos característicos para el "tipo VII", así como sus porcentajes de aparición en las secuencias que integran este tipo.

Al alinear las secuencias correspondientes a los Pestivirus se obtuvo un 77.74% de identidad y un 90.79% de similitud, el cual corresponde al porcentaje más alto de todos los géneros, es decir, es el género menos diversificado, y esto se encuentra reflejado en su dendrograma (Figura 5). En el cual se pueden distinguir 4 ramas, aunque 2 no están claramente definidas,

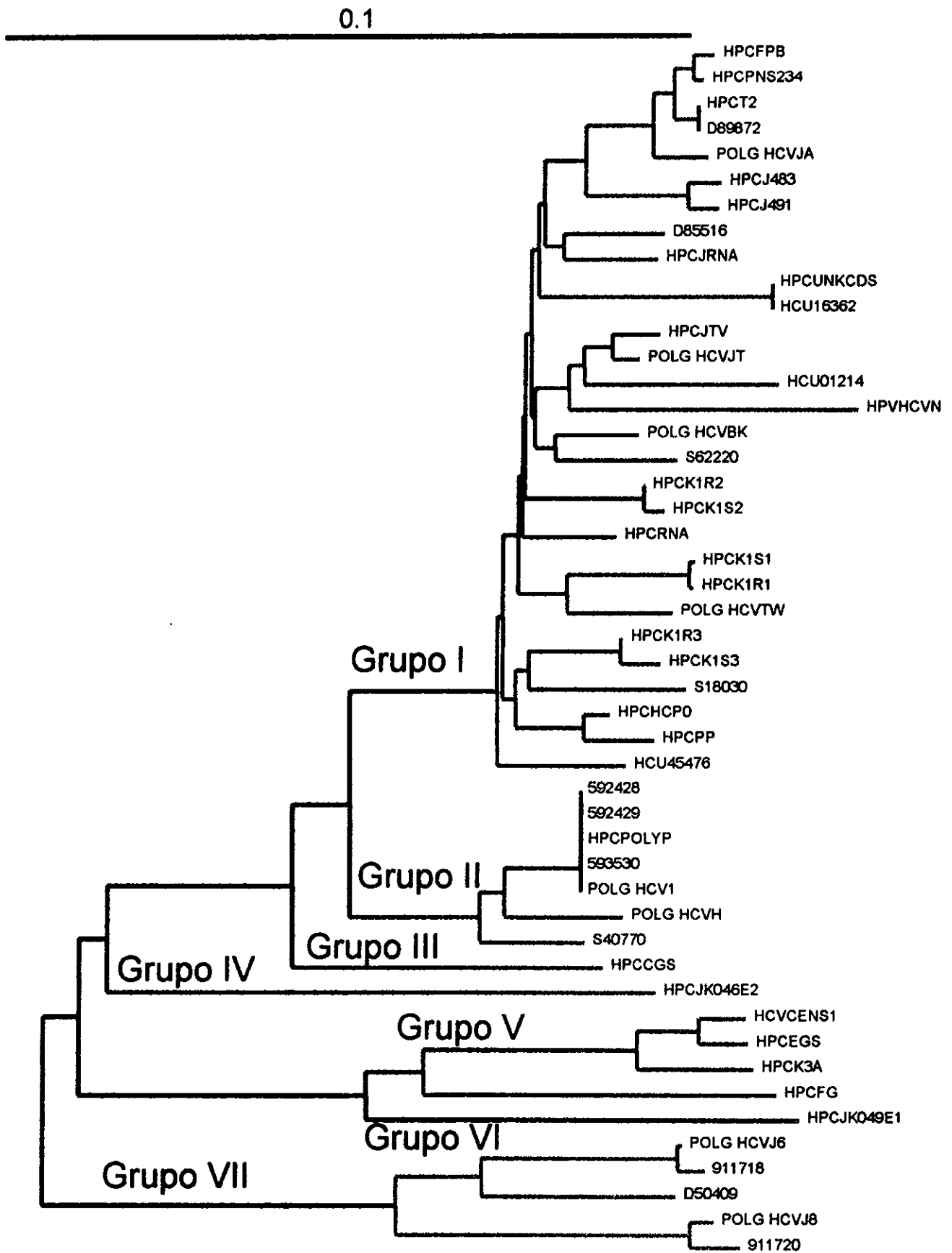


Figura 4. Género Hepatitis C

por lo cual se procedió nuevamente llevar a cabo el análisis de firma de este grupo, quedando de la forma en que se muestran en el Cuadro 5.

En este análisis se puede observar que están presentes los 3 subgrupos de los pestivirus: el virus del cólera porcina (VCP), el virus de la enfermedad ovina (VEO) y un tercer grupo, el virus de la diarrea bovina (VDB) aunque este último se encuentra dividido en dos subgrupos (VDB y VDBm). Se observa que (VDBm) comparte aminoácidos tanto con el grupo de los porcinos como con el grupo de los bovinos podríamos proponer que se trate de un virus que puede infectar tanto a bovinos como a porcinos.

El VDBm comparte 25 aminoácidos con el grupo de los porcinos (VCP), 5 con el grupo de los ovinos (VEO) y tiene 31 aminoácidos propios. Lo cual explica la división de la rama original (VDB) que se ve afectada por los aminoácidos que comparte con la rama del virus del cólera porcino.

Análisis de secuencias para el género Pestivirus

Posición	40	45	53	136	153	154	157	170	188	189	219	253	283	306	319	344	402
Grupo	H	M	L	D	Q	M/T	A	E	R	S	V	L	I	V/G	S	P/T	G
VDBm	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5/5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	5/5	0,50	5/5	0,50
VEO	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
VCP	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VDB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Posición	405	429	447	473	491	595	610	631	634	657	661	670	688	691	692	705	707
Grupo	F	S	S	I	V	M	T	S	V	H	D	D	S	Y	D		
VDBm	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VEO	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VCP	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VDB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Posición	708	709	710	715	717												
Grupo	A	L	L	Q	V												
VDBm	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00												
VEO	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00												
VCP	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00												
VDB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00												

Cuadro 5. Se muestran las posiciones de aminoácidos y el porcentajes de aparición en las secuencias, en las cuales se observa como lo comparten con otros subgrupos (VDBm: virus de la diarrea bovina en transición, VEO: virus de la enfermedad de los ovinos, VCP: virus del cólera porcina y VDB: virus de la diarrea bovina.

- Aminoácidos únicos. VDBm (21)
- Aminoácidos compartidos con ovinos. VDBm vs VEO (7)
- Aminoácidos compartidos con porcinos. VDBm vs VCP (3)
- Aminoácidos compartidos con ovinos y porcinos. VDBm vs VCP (8)

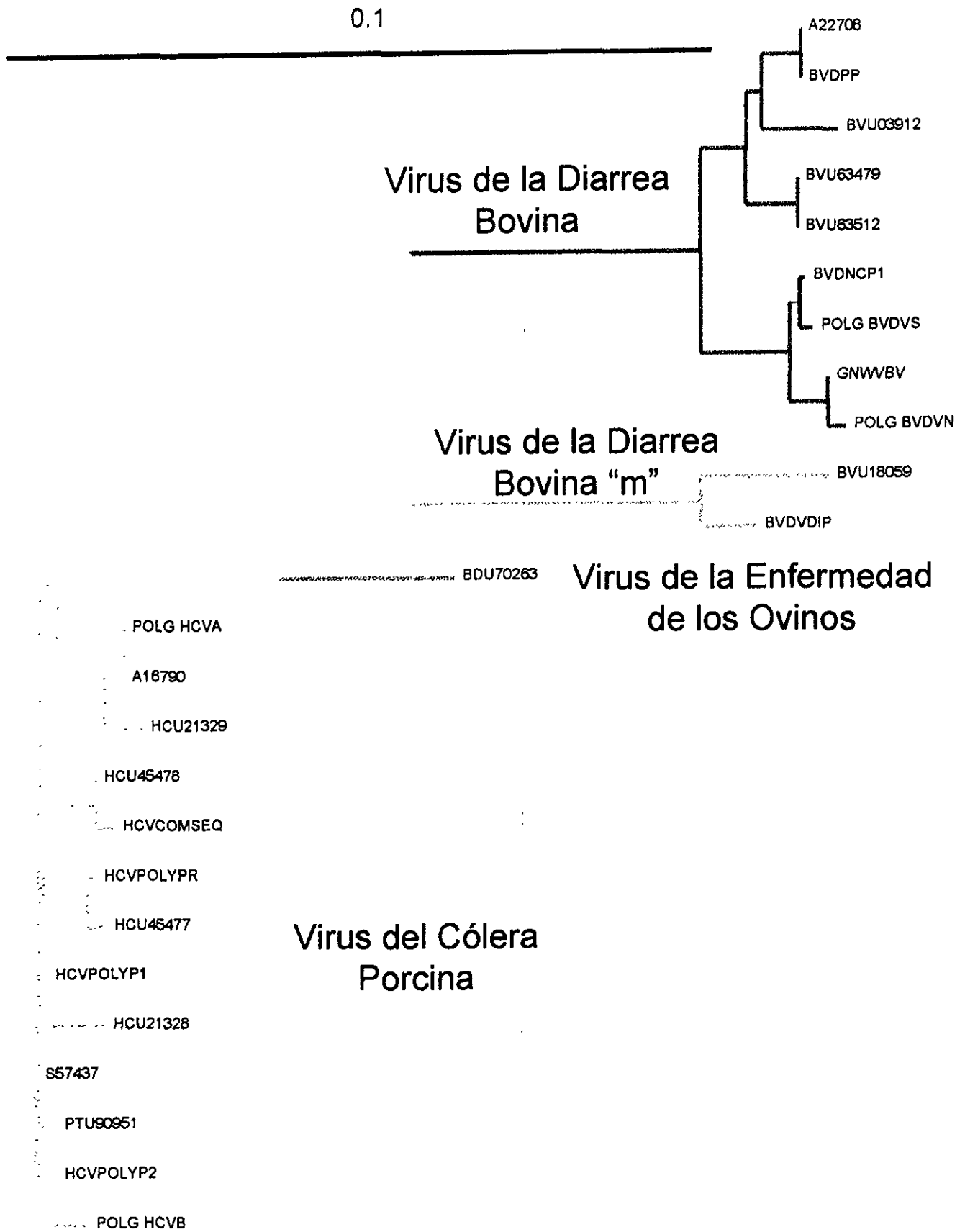


Figura 5. Género Pestivirus

Por otro lado, a partir del dendrograma inicial, y para la optimización del mismo, se procedió a la búsqueda de un grupo externo que tuviera los dominios homólogos a los que presenta NS3, de los cuales tuvimos los candidatos presentados en la figura 6.

Potyvirus



Arterivirus



Figura 6. Se encuentran representados los grupos con dominios semejantes a los que se encuentran en la familia *Flaviviridae*, los cuales son los candidatos para grupo externo en el dendrograma de familia. Los Arterivirus por presentar una serín proteasa y los Potyvirus por presentar una serín proteasa y una helicasa del tipo 2.

De los grupos anteriores, los Arterivirus presentan una serín proteasa y una helicasa, sin embargo, la helicasa pertenece a la SF1, la cual tiene firmas muy diferentes a las de la superfamilia 2 a la cual pertenece la helicasa de NS3.

Otro de los candidatos fue el grupo de los Potyvirus, que presenta los 2 dominios de helicasa de tipo 2 y serín proteasa que son semejantes a los dominios de NS3, sin embargo, se encuentran separados por 2 proteínas intermedias, por lo que se debería insertar un hueco muy largo para poder alinear las firmas de los dominios de Potyvirus con las firmas de los dominios de NS3 de *Flaviviridae*, lo cual nos generaría una elevación en la distancia evolutiva entre los integrantes de la familia. Finalmente, se utilizó como grupo

externo la secuencia más diferente a toda la familia (BDU70263) perteneciente al virus de borregos del género de pestivirus, sin observarse cambios significativos con respecto al árbol sin raíz.

DISCUSION DE RESULTADOS

En este trabajo se llevó a cabo un análisis de las relaciones filogenéticas existentes en la familia *Flaviviridae* utilizando como marcador evolutivo la proteína no estructural 3 (NS3), esta proteína tiene funciones de proteasa y de helicasa, además de encontrarse altamente conservada dentro de la familia.

La familia *Flaviviridae* se agrupa en base a su estructura genómica, sin embargo, se han llevado a cabo análisis filogenéticos utilizando diferentes marcadores como la proteína E (Zanotto, *et al.*, 1996) NS1 y NS5 (Block, *et al.*, 1992), e incluso alguna región de la NS3 (Ohba, *et al.*, 1996), pero no incluyendo toda la proteína. Se procedió a la búsqueda, colección y alineamiento de las secuencias que cumplieran con las características establecidas anteriormente, teniéndose así un total de 104 secuencias. Con estas secuencias se construyeron los dendrogramas correspondientes (uno para cada género y otro para toda la familia). En el dendrograma de toda la familia aparece como primer grupo los pestivirus con gran semejanza entre sus secuencias dentro del género, sin vector y diversificado para infectar a artirodáctilos, específicamente. Después, aparece el género de hepatitis C, sin vector y que infecta a primates; finalmente los flavivirus en los que encontramos un serocomplejo en el cual no se conoce vector y finalmente con la aparición de vector: primero garrapata y por último, el mosquito.

De los alineamientos obtenidos para el género de los Pestivirus tenemos el porcentaje más alto de similitud de todos los géneros (77.7%). Se encuentran zonas altamente conservadas e incluso regiones idénticas en todas las secuencias, lo que nos está indicando el bajo grado de diversificación, ya que sólo cuenta con tres subgrupos reportados (el de los cerdos, el de los borregos y el de las vacas). Sin embargo, al desarrollar los dendrogramas encontramos las 3 ramas reportadas en la literatura, pero la rama que corresponde a la

enfermedad de los bovinos, se encuentra subdividida; por lo que se procedió a hacer el análisis de las secuencia. Al llevar a cabo el análisis de secuencias, observamos que una de las subramas del dendrograma de los Pestivirus (Figura 4) corresponde al grupo de los bovinos y que éstos tienen gran similitud con las secuencias de los virus que infectan a los porcinos, por lo tanto, se trata de un grupo en transición evolutiva entre los bovinos y los porcinos.

En el género de la hepatitis C hay una gran variación entre sus secuencias, ya que encontramos firmas para 7 tipos diferentes, lo cual le dio a nuestro árbol una agrupación diferente a la previamente reportada por otros autores (cuadro 6).

En este trabajo (1998)	Otros
I, II, III	1 de Simmonds, 1993
IV	10 de Tokita, 1996
V	3 de Simmonds, 1993
VI	11 de Tokita, 1996
VII	2 de Simmonds, 1993

En el cuadro 6. Tipos de Hepatitis C obtenidos como resultado del análisis de firmas, así como su correspondencia con otros autores.

El grupo III se distingue de los demás, ya que es el único que incluye aislados de Europa y E.U.A., los demás son propios de regiones de Asia y Africa.

El género de los Flavivirus presentó el menor porcentaje de similitud e identidad, por lo tanto es el más diversificado de los tres. Este género cuenta con 9 serocomplejos de los cuales se encuentran representados 5 en este dendrograma. Una característica importante durante la evolución, es la adquisición de vector, ya que en los géneros anteriores no se tiene un vector y las formas de adquisición del virus principalmente, son mediante transfusión

sanguínea (Hepatitis C), o por secreciones (Pestivirus). En este género tenemos presentes 2 diferentes vectores: la garrapata, que caracteriza nuestra primera rama (TBEVH, LIVGEN, LANVT, etc); y posteriormente la aparición del segundo vector: el mosquito, el cual es alado lo que implica que tenga una mayor dispersión y por lo tanto una mayor área de dispersión del virus, lo que podría representar una ventaja para virus.

Se ha propuesto un antecesor común (Figura 6) para los virus de RNA de cadena positiva; se propone que todos estos virus parten de un arreglo común en la estructura del genoma (Koonin y Dolja, 1993).

En la evolución de los virus se propone la participación de procesos tales, como: duplicación de genes, captura de nuevos genes (de células), recombinación con otros virus, delección e inserción de dominios accesorios sin aparente cambio de genes no estructurales, entre otros. Se sabe poco de la forma de su evolución de los virus, sin embargo se ha propuesto que de acuerdo a la teoría modular, hay ancestros con una cierta combinación de dominios semejantes estructurales y funcionales (llamados también elementos genéticos intercambiables o módulos), de los que se originaron grupos que, al tener adaptaciones, adquisiciones o especializaciones de elementos genéticos intercambiables, cada uno con funciones biológicas particulares, se dio origen a combinaciones óptimas de módulos, por lo cual los grupos estrechamente relacionados tendrán un arreglo modular semejante (Bonstein, 1980). De este modo, se han propuesto ancestros hipotéticos para los diferentes tipos de virus.

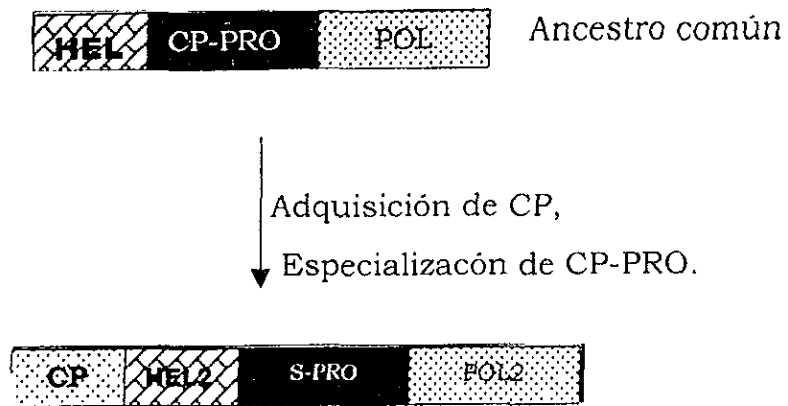


Figura 7. En esta figura se muestra el ancestro viral hipotético, así como los procesos que debieron ocurrir para llegar a tener el genoma actual. Se observa que el ancestro haber tenido tres genes uno que codifica para una helicasa, una proteasa sisteínica y una polimerasa. En el transcurso de la evolución se adquieren las proteínas de la capsida (PC) y una helicasa del tipo 2 (HEL2), así como, la especialización de la proteasa cisteínica por una serín proteasa .

El ancestro que se propone para la familia *Flaviviridae* debió contar con genes que codificaran para una helicasa, una cisteín proteasa y una RNA polimerasa; el cual en el transcurso del tiempo debió tener modificaciones como: la adquisición de proteínas de la cápside y especialización tanto a una helicasa de tipo 2 como a una serín proteasa (Koonin *et al.*, 1993).

Si comparamos el árbol filogenético correspondiente a la familia *Flaviviridae* (Figura 1) con otros arboles específicos de helicasas de la SF2 y proteasas serínicas (Koonin *et al.*, 1993), observaremos que tienen el mismo patrón de distribución filogenética que los que obtuvimos como resultado del análisis filogenético con NS3; sin embargo, a diferencia de los árboles que se llevan a cabo con sólo uno de los dominios, éste tiene mucha mayor consistencia ya que, por ejemplo, al hacer el análisis con el dominio de helicasa 2, se han obtenido arboles que agrupan a la familia de forma diferente y quizá errónea, proponiendo que el género que divergió primero fue

el de los Flavivirus, seguido de Pestivirus y finalmente aparece el de Hepatitis C con una rama nueva correspondiente a Hepatitis G (grupo que se está proponiendo como candidato a formar parte de la familia *Flaviviridae*). Además se relaciona estrechamente a la familia con el grupo Potyvirus, por tener este una helicasa del mismo tipo. Sin embargo, por las razones anteriormente mencionadas, no se puede relacionar toda la proteína NS3 con este grupo de virus, a pesar de que probablemente el virus de la familia *Flaviviridae* o uno muy parecido provenga de plantas o bien que ambos se relacionen sólo por haberse originado de un mismo ancestro.

CONCLUSIONES

- En la familia *Flaviviridae* el grupo más ancestral es el género *Pestivirus*.
- La adquisición de vector es un rasgo adquirido, que no se encuentra presente tanto en *Pestivirus* como en el virus de la Hepatitis C.
- El vector garrapata apareció antes que el vector mosco.
- La teoría modular propone que la evolución de los virus supone la duplicación de genes, captura, recombinación con otros virus, delección e inserción de dominios accesorios.
- El ancestro que se propone para la familia *Flaviviridae* debió contar con genes que codificaran para una helicasa, una proteasa cisteínica y una RNA polimerasa.
- Debieron de haberse presentado en el transcurso de la evolución, además de tener modificaciones como: la adquisición de proteínas de la cápside y especialización de la helicasa de tipo 2 y de una serín proteasa.
- El grupo más relacionado con la familia *Flaviviridae* son los *Potyvirus*, los cuales presentan dominios semejantes, por lo que podríamos proponer un mismo ancestro, o bien que la familia *Flaviviridae* pudiese originarse a partir de los *Potyvirus*.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se llevó a cabo un análisis filogenético con las secuencias completas de la proteína NS3, la cual es biológicamente importante en procesos de la duplicación.

A partir de este análisis detectaron firmas específicas para 7 tipos de HepatitisC , ya que no había un patrón de clasificación establecido. Además se logró detectar un grupo de transición en el género Pestivirus.

Dada la importancia descrita anteriormente es conveniente llevar a cabo experimentos como:

- Relacionar las firmas estructurales encontradas en secuencias de Hepatitis C con funciones específicas.
- Verificar la existencia y la dirección una transición entre el grupo de Bovinos y Porcinos en el género Pestivirus.
- Llevar a cabo un análisis filogenético de estructura tridimensional de NS3, relacionándola con su función.

GLOSARIO

Arbol filogenético. Es un diagrama ramificado que que representa las líneas genealógicas y la secuencia de eventos históricos que unen organismos individuales, poblaciones o taxa.

Bootstrop. Método estadístico que se utiliza para evaluar la fidelidad de las ramas de un árbol filogenético.

CLUSTALW. Programa de alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos y nucleótidos, entre los datos que proporciona esta un dendrograma analizando con máxima parsimonia y una matriz de mutaciones.

Dendrograma. Diagrama ramificado que contiene entidades agrupadas por algún criterio.

Firma estructural y/o funcional. se define como una región específica en la secuencia de aminoácidos de una proteína a la se le puede asociar alguna función de importancia biológica.

NetworkENTREZ. Programa que a través de una red ethernet,explora las bases de datos para obtener secuencias aisladas o familias de secuencias relacionadas, incluyendo referencias y referencias cruzadas con otras bases de datos.

NeworkBLAST. Algoritmo cuya función es escudriñar una base de datos a través de una red de ethernet, presenta la particularidad de explorar de forma no redundante 8 bases de datos de las proteínas y 8 de aminoácidos.

Parsimonia. Hipótesis que propone el menos número de cambios evolutivos para la inferencia de relaciones filogenéticas.

PIR. (Protein Identification Resource). Base de datos especializadas en estructura primaria de proteína, presenta la característica de tener a las proteínas en forma jerárquica.

PHYLO_WIN. En un programa que se utiliza como una herramienta gráfica en alineamientos de secuencias y filogenia molecular.

SwissProt. Base de datos de estructuras primarias de proteínas del EMBL.

Treeview. Es un programa para desplegar e imprimir árboles filogenéticos. El programa reconoce archivos del tipo NEXUS y PHYLIP en el cual, está incluido CLUSTALW. Es compatible para Macintosh y Microsoft Windows PCs.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

1. -Aihara, S., Rao, C., Yu, Y. X., Lee, T., Watanabe, K., Komiya, T., Sumiyoshi, H., Hashimoto, H. y A. Nomoto (1990). Identification of mutations occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process. *Unpublished*
2. -Altschul, S. F. , Warren G., Webb M., Eugene W., Myers, y D. J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:401-410.
3. -Balroch, A. y R. Apweiler (1996). The Swiss-Prot protein sequence data bank and its new supplement trEMBL. *Nucleic. Acids Res.* 24, 21-25.
4. -Bazan, J. F. y R. J. Fletterick (1989). Detection of a trypsin-like serin protease domain in Flaviviruses and Pestiviruses. *Virology.* 171:637-639.
5. Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., y B. F. F. Ouellette (1998). GenBank. *Nucl. Acids Res.* 26(1):1-7 (1998)
6. -Blok, J., McWilliam, S. M., Butler, H. C., Gibbs, A. J., Weiller, G., Herring, B. L., Hemsley, A. C., Aaskov, J. G., Yoksan, S. y N. Bhamarapravati (1992). Comparison of a dengue-2 virus and its candidate vaccine derivative: sequence relationships with the flaviviruses and other viruses. *Virology* 187 (2), 573-590.
7. -Bruenn, J. A. (1991). Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 19:(2) 217-226.
8. -Calisher C. H, Karabatsos N. y J. M. Dalrymple (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* 70:37-43 (1989).
9. -Castle, E., Leidner, U., Nowak, T., Wengler, G. y G. Wengler (1985). Primary structure of the West Nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology* 149 (1), 10-26.
10. -Cola, G., Parker, M. D., Speight, G., Byrne, M. E. y E.G. Westaway (1988). Nucleotide and complete amino acid sequences of Kunjin virus: definitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 1), 1-21.
11. -Colett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. y A. F. Purchio (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165 (1), 191-199.
12. -Chayama, K. Direct Submission. Submitted (18-FEB-1995)
13. -Chambers T. J., Hahn C. S., Galler R. y C. M. Rice (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Virology.* 44:649-688.
14. -Chen, W. B. (1990). Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein gene of a dengue-2 virus isolated during an epidemic of benign dengue fever in Tonga in 1974. *Nucleic Acids Res* 18(19) 5889-5895.
15. -Chen, P. J., Lin, M. H., Tai, K. F., Liu, P. C., Lin, C. J. y D. S. Chen (1992). The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA *Virology* 188 (1), 102-113.
16. -Chi-Yih Ou, Carol A. Ciesielski, Gerald Myers, Claudiu I. Banda, Chi-Cheng Luo, Bette T. M. Korber, James I. Mullins, Gerald Schochetman, Ruth L. Berkelman, A. Nikki Economou, John J. Witte, Lawrence J. Furman, Glen A Satten, Kersti A. MacInnes, James W. Curran y J. W. Harold (1992). Molecular Epidemiology of HIV Transmission in a Dental Practice. *Science* (256), 1165-1169.
17. -Cho, J. M. Molecular cloning of Hepatitis C virus genome from chronic patients in Korea. *Submitted* (27-OCT-1993).
18. -Cho, J. M (1992). Hepatitis C virus. *Unpublished.*
19. -Cho, J. M (1993). Molecular cloning of Hepatitis C virus genome from a single Japanese patient. *Unpublished.*
20. -Choo, Q. L., Richman, K. y J. Han (1992). The nucleotide sequence of the Hepatitis C viral genome. *Unpublished.*
21. -Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G. y M. Houghton (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (6), 2451-2455.

22. -Dalgarno, L., Trent, D. W., Strauss, J. H. y C.M Rice (1986). Partial nucleotide sequence of the Murray Valley encephalitis virus genome. Comparison of the encoded polypeptides with yellow fever virus structural and non-structural proteins. *J. Mol. Biol.* 187 (3), 309-323.
23. -De Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., Renard A. y J.A. Martial (1993). Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 7), 1433-1438.
24. Deng, R. y K. V. Brock (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* 191, 867-869.
25. -Deubel, V., Kinney, R. M. y D. W. Trent (1986). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology* 165 (1), 234-244.
26. -Doolittle R. F. (1986). A primer on how to analyze derived amino acid sequences. In *Of URFs and ORFs.*, University Science Books, Mill Valley, California.
27. -Dupuy, A., Despres, P., Cahour, A., Girard, M. y M. Bouloy (1989). Nucleotide sequence comparison of the genome of two 17D-204 yellow fever vaccines. *Nucleic Acids Res.* 17 (10), 3989.
28. -Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F. y C. Sato (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* 96 (1), 224-230.
29. -Francki R. I. B., Fauquet C. M., Knudson D. L. y F. Brown (1991). Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 126 (suppl 2):223.
30. -Fu, J., Tan, B. H., Yap, E. H., Chan, Y. C. y Y. H. Tan (1992). Full-length cDNA sequence of dengue type 1 virus (Singapore strain S275/90). *Virology* 188 (2), 953-958.
31. -Fuller-Pace, F. V. (1994). RNA helicases: modulators of RNA structure. *Cell Biology*; 4:271-4.
32. -Galtier, N., Gouy, M. y C. Gautier (1996). SeaView and PhyloWin, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, (12)543-548.
33. -George, D.G., Barker W. C., Mewes, H.W. Pfiffer, F. y Tsugita (1996). The Pir-International Protein Sequence Database. *Nucleic. Acids Res.* 24, 17-20.
34. -Gorbalenya, A. E. (1995). Origin of RNA viral genomes; approaching the problem by comparative sequence analysis In *Molecular Basis of Virus Evolution*, Gibbs, A., Calisher, C.H. and Garcia-Arenal F. Eds. Cambridge University Press, pp 49-65.
35. -Gorbalenya, A. E. y E. V. Koonin (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Op. Struct. Biol.* 3:419-29.
36. -Gorbalenya, A. E. et. al. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4713-4730.
37. Gould E. A., Buckley A., Groeger B. K., Cane P. A. y L. Doenhoff (1989). Immune enhancement of yellow fever virus neurovirulence for mice: studies of mechanisms involved. *J. Gen. Virol.* 70:1605-1608.
38. -Grakoui A., Wychowski C., Lin C., Feinstone S. M. y C. M. Rice (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 67:1385-1395.
39. Gritsun, T. S., Venugopal, K., Zanutto, P. M., Mikhailov, M. V., Sall, A. A., Polkinghorne, I., Frolova, T. V., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A. y E. A. Gould (1997). Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia (Vasilchenko strain) and United Kingdom (Louping ill): analysis and significance of the 5' and 3' UTR. *Virus Res.* 49, 27-39.
40. -Hahn, Y. S., Galler, R., Hunkapiller, T., Dalrymple, J. M., Strauss, J. H. y E. G Strauss (1988). Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. *Virology* 162 (1), 167-180.
41. -Hamblin, C. y R. S. Hedger (1979). The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in Africa wildlife. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2, 295-303.
42. -Hayashi, N., Higashi, H., Kaminaka, K., Sigimoto, H., Esumi, M., Komatsu, K., Hayashi, K., Sugitani, M., Susuki, K. y O. Tadao (1993). Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. *J. Hepatol* 17 suppl. 3 S94-S107.

43. **Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K. y K. Shimotohno (1993).** Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (22), 10773-10777.
44. **-Hirowatari, Y., Hijikata, M. y A. K. Shimotohno (1995)** novel method for analysis of viral proteinase activity encoded by hepatitis C virus in cultured cells. *Anal. Biochem.* 225 (1), 113-120.
45. **-Honda, M., Kaneko, S., Unoura, M., Kobayashi, K. y S. Murakami (1993).** Sequence analysis of putative structural regions of hepatitis C virus isolated from 5 Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Arch. Virol.* 128 (1-2), 163-169.
46. **-Houghton, M., Choo, Q. K. y G. Kuo.** Patent: WO 8904669-A ? 01-JUN-1989.
47. **-Houghton, M., Choo, Q. L. y G. Kuo.** NANBV diagnostics and vaccines. Patent: EP 0388232-A1 ? 19-SEP-1990;
48. **-Inchauspe, G., Zebedee, S., Lee, D. H., Sugitani, M., Nasoff, M. y A. M. Prince (1991).** Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (22), 10292-10296.
49. **-Irie, K., Mohan, P. M., Sasaguri, Y., Putnak, R. y R. Padmanabhan (1989).** Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene* 75 (2), 197-211.
50. **-Ishikawa, K., Nagai, H., Katayama, K., Tsutsui, M., Tanabayashi, K., Takeuchi, K., Hishiyama, M., Saitoh, A., Takagi, M., Gotoh, K., Muramatsu, M. y A. Yamada (1995).** Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. *Arch. Virol.* 140 (8), 1385-1391.
51. **-Kahn, P. y G. Cameron (1990).** EMNL data library. Methods.
52. **-Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. y K. Shimotohno (1991).** Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (24), 9524-9528.
53. **-Kilbourne, E.D. (1991).** New viruses and new diseases: mutation, evolution and ecology. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 518-524.
54. **-Koonin, E. V., y V. V. Dolja (1993).** Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28;375-430.
55. **-Lain, S., Martín, M.T., Riechmann, J.L., y J.A. García (1991).** Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 65;1-6.
56. **-Lobigs, M. (1993).** Flavivirus pre-membrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6218-6227 (1993).
57. **-Mandl, C. W., Heinz, F. X. y C. Kunz (1989).** Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural protein with other flaviviruses. *Virology*, 173:291-301.
58. **-Mandl, C.W., Heinz, F.X. y C. Kunz (1988).** Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* 166 (1), 197-205.
59. **-Mandl, C. W., Iacono-Connors, L., Wallner, G., Holzmann, H., Kunz, C. y F. X. Heinz (1991).** Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence tick-borne flaviviruses Langat TP21 and Yelantsev. *Virology* 185 (2), 891-895.
60. **-McEntyre, J. (1998).** Linking up with Entrez. *Trends Genet*, 14 (1): 39-40.
61. **-McKee, K. T. Jr., Bancroft, W. H., Eckels, K. H., Redfield, R. R., Summers, P. L. y P. K. Russell (1987).** Lack of attenuation of a candidate dengue 1 vaccine (45AZ5) in human volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 (2), 435-442.
62. **-McOmish, F. Yap P. L., Dow B. C., Follet E. A. C., Seed C. Jeller A. J, Cobain T. J, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lal C, Leong S, Medgyesi G. A., Hejjas M, Kiyokawa H, Fukada K, Cuypers T, Saeed AA, Alrasheed AM, Lin M. y P. Simmonds (1994).** Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors-an international collaborative survey. *J Clin Microbiol*;32:884-892.
63. **-Meyers, G., Rumenapf, T. y H.J. Thiel (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171 (2), 555-567.
64. **-Meyers, G., Rumenapf, T. y H.J. Thiel.** Hog cholera virus vaccine and diagnostic. Patent: EP 0389034-A 26-SEP-1990
65. **-Meyers, G. y H. J. Thiel (1995).** Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J. Virol.* 69(6), 3683-3689.

66. **-Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E. J. y H. J. Thiel (1991).** Viral cytopathogenicity correlated with integration of Ubiquitin-Coding sequences. *Virology* 180, 602-616.
67. **-Meyers, G., Rumenapf, T. y H. J. Thiel (1992).** Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology*, 191 (2), 867-869
68. **-Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. y B. M. Kuemmerer (1996).** Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol* 70 (12), 8606-8613.
69. **-Miller R. H. y R. H. Purcell (1990).** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl Acad Sci. USA*;87:2057-2061 .
70. **-Moormann, R. J. M., Van G., Miedema, G. K. W., Hulst, M. M. y P.A. Van Rijn (1996).** Infectious RNA Transcribed from an Engineered Full-Length cDNA Template of the Genome of a Pestivirus. *J. Virol.* 70, 763-770.
71. **-Moormann, R. J. M., Warmerdam, P. A., Van Der Meer, B., Schaaper, W. M., Wensvoort, G. y M. M. Hulst (1991).** Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope 1 protein E1. *Virology* 177 (1), 184-198.
72. **-Mueller, H. M., Pfaff, E., Heller, A. E., Goeser, T. y Theilmann, L.** Complete sequence of a German isolate of hepatitis C virus (HCV) derived from a serum of a patient after liver transplantation due to HCV induced hepatocellular carcinoma. *Submitted (11-JAN-1996).*
73. **-Mueller, H. M., Thiel, H.-J. y E. Pfaff (1996).** Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of hog cholera virus strain 'Glentorf' and vaccine strain 'Riems': Characterization of viral glycoproteins. *Unpublished.*
74. **-Muramatsu, M. y A. Yamada (1995).** Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. *Arch. Virol* 140 (8), 1385-1391.
75. **-Murphy, F.A., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial S. A., Jarvis A. W., Martelli G.P., Mayo M.A. y M.D. Summers (eds) (1995).** *Flaviviridae* In Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. *Edit. Springer-Verlag Wien New York, pp 416.*
76. **Nakao, H., Okamoto, H., Tokita, H., Inoue, T., Iizuka, H., Pozzato, G. y S. Mishiro (1996).** Full-length genomic sequence of a hepatitis C virus genotype 2 isolate (BEBE1) and the 2c-specific PCR primers *Arch. Virol.* 141 (3-4), 701-704.
77. **-Ni, H. y D.A. Barrett (1996).** Molecular differences between wild-type Japanese encephalitis virus strains of high and low mouse *neuroinvasiveness* *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 7), 1449-1455.
78. **-Ni, H., Chang, G. J., Xie, H., Trent, D. W. y A. D. Barrett (1995).** Molecular basis of attenuation of neurovirulence of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 2), 409-413
79. **-Nitayaphan, S., Grant, J. A., Chang, G.-J. J. y W. D. Trent (1990).** Nucleotide sequence of the virulent SA-14 stain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2. *Virology* 177, 541-552.
80. **-Ohba, K., Masashi Mizokami, Johnson Y.N. Lau, Etsuro Orito, Kazuho Ikee y T. Gojobori (1996).** Evolutionary relationship of hepatitis C, pesti-, flavi-, plantviruses, and newly discovered GB hepatitis agents. *FEBS Letters* 378; 232-234 1996.
81. **-Okamoto, H.** Direct Submission. Submitted (27-SEP-1993)
82. **-Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Yotsumoto, S., Tanaka, T., Yoshizawa, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y. y M. Mayumi (1990).** The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *J. Exp. Med.* 60, 167-177.
83. **-Okamoto, H. y T. Nakamura.** Non-A, non-B, hepatitis virus genome, polynucleotides, polypeptides, antigen, antibody and detection systems *Patent: US 5428145-A ? 27-JUN-1995.*
84. **-Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S., Yoshizawa, H., Iizuka, H., Tanaka, T., Muchmore, E. E., Peterson, D. A., Ito, Y. y S. Mishiro (1992).** Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190 (2), 894-899.
85. **-Okamoto, H., Kojima, M., Sakamoto, M., Iizuka, H., Hadiwandowo, S., Suwignyo, S., Miyakawa, Y. y M. Mayumi (1994).** The entire nucleotide sequence and classification of a hepatitis C virus isolate of a novel genotype from an Indonesian patient with chronic liver disease *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 3), 629-635.
86. **-Okamoto, H., Kurai, K., Okada, S., Yamamoto, K., Iizuka, H., Tanaka, T., Fukuda, S., Tsuda, F. S. Mishiro (1992).** Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188 (1), 331-341 (1992).

87. **-Okamoto,H., Okada,S., Sugiyama,Y., Kurai,K., Iizuka,H., Machida,A., Miyakawa,Y. and Mayumi,M.** Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 11), 2697-2704 (1991).
88. **-Osatomi,K. y H. Sumiyoshi (1990).** Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology* 176 (2), 643-647.
89. **Page, R. D. M. (1997).** Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
90. **-Pletnev, A. G., Yamshchikov,V. F. y V. M. Blinov (1990).** Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 174 (1), 250-263.
91. **-Puri, B., Nelson, W. M., Henchal, E. A., Hoke, C. H., Eckels, K. H. Dubois, D. R., Porter, K. R. y C. G. Hayes (1997).** Molecular analysis of dengue virus attenuation after serial passage in primary dog kidney cells. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 9), 2287-2291.
92. **-Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L. y J. H. Strauss (1985).** Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229 (4715), 726-733.
93. **-Ridpath, J. F. y S. R. Bolin (1995).** The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212 (1), 39-46.
94. **-Ridpath, J. F., Bolin, S. R., Evermann, J. F., Landgraf, J. G. y M. L. Frey (1996).** The complete genomic sequence of the pestivirus border disease virus: comparison to genomic sequences of other pestiviruses. *Unpublished.*
95. **-Ruggli, N., Hofmann, M. A. y J. D. Tratschin.** Direct Submission. Submitted (??-JUN-1995)
96. **-Sakamoto, M.** Unpublished (1996).
97. **-Schreier, M. Roggendorf, G. Driesel, M. Höhne y S. Viazov (1995).** Genotypes of hepatitis C virus isolates from different parts of the world. En Imported Virus Infections. *Springer Medicina. pp 185-194.* Tino F. Schwarz & Günter Siegl (eds). *Springer Wien New York.*
98. **-Seelig,R., Weber,P., Seeling,H.P., Ledger,N., Bottner,C. y M. Renz.** Hepatitis C virus type V genome isolated from a patient in Germany. Unpublished. Direct Submission. Submitted (17-JAN-1995)
99. **-Seki, M. y Y. Honda (1995).** Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: in vitro translation assay. *J. Biochem.* 118 (6), 1199-1204.
100. **-Seki, M., Honda, Y., Kondo, J., Fukuda, K., Ohta, K., Sugimoto, J. y E. Yamada (1995).** Effective production of the hepatitis C virus core antigen having high purity in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 38 (3), 229-241.
101. **-Shimotohno K. (1993).** Hepatocellular carcinoma in Japan and its linkage to infection with hepatitis C virus. *Virology* 4:305-312.
102. **-Simmonds,P Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F. Irvine B, Bell E, Yap PL, Kolberg J., M. S. Urdea (1993).** Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol*;74:2391-2399.
103. **Smondack,S., Bakkali-Kassimi,L., Gonzague,M. y C. Cruciere.** Direct Submission Submitted (26-FEB-1997).
104. **-Sugiyama,K..** Direct Submission Submitted (22-MAY-1996)
105. **-Sumiyoshi,H., Hashimoto,H. y A. Nomoto (1991).** Identification of mutations that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process. *Virus Genes* 5 (2), 95-109.
106. **-Sumiyoshi,H., Mori,C., Fuke,I., Morita,K., Kuhara,S., Kondou,J., Kikuchi,Y., Nagamatu,H. y A. Igarashi (1987).** Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology* 161 (2), 497-510.
107. **-Takamizawa,A., Mori,C., Fuke,I., Manabe,S., Murakami,S., Fujita,J., Onishi,E., Andoh,T., Yoshida,I. y H. Okayama (1991).** Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 65 (3), 1105-1113.
108. **-Tanaka,T.** Direct Submission Submitted (14-DEC-1996).
109. **-Tanaka,T., Kato,N., Nakagawa,M., Ootsuyama,Y., Cho,M.J., Nakazawa,T., Hijikata,M., Ishimura,Y. y K. Shimotohno (1992).** Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single

- Japanese carrier: sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Res.* 23 (1-2), 39-53.
110. **-Tanaka, T., Kato, N., Nakagawa, M., Ootsuyama, Y., Cho, M. J., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ishimura, Y. y K. Shimotohno (1992).** Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier: sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Res.* 23 (1-2), 39-53.
 111. **Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E. J. y H. J. Thiel (1996).** Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27 nucleotide Insertion. *J. Virol.* 70 (11), 7851-7858.
 112. **-Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E. J. y G. Meyers (1994).** Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* 68, 3289-3297.
 113. **-Thompson J. D., Higgins, D. G. y T. J. Gibson (1997).** CLUSTALW; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence weighting, positions specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research.* 22:4673-4680.
 114. **-Tokita H, Okamoto H, Hisao I, Junichi K., Fumio T., Laurentius A. L., Yuza M. y M. Makoto (1996).** Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indosia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10 a) and eleventh (11a) genetic groups. *J. Gen. Virol.*;77:293-301.
 115. **-Tokita, H., Okamoto, H., Iizuka, H., Kishimoto, J., Tsuda, F., Lesmana, L. A., Miyakawa, Y. y M. Mayumi (1996).** Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 2), 293-301.
 116. **-Tratschin, J. D.** Direct Submission Submitted (08-MAR-1996)
 117. **-Vandenbergh, D., Lecomte, C., Chappuis, G. E. y J. J. Pin.** Procedure to detect a bovine viral diarrhoea virus infection, nucleotide sequence coding for a protein induced by infection with this virus and recombinant proteins and antigens resulting from same Patent: EP 0518756-A 16-DEC-1992.
 118. **-Wallner, G., Mandl, C. W., Ecker, M., Holzmann, H., Stiasny, K., Kunz, C. y F. X. Heinz.** Direct Submission. Submitted. 1995.
 119. **-Wallner, G., Mandl, C. W., Kunz, C. y F. X. Heinz (1995).** The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 213 (1), 169-178.
 120. **-Wang, Y., Okamoto, H., Tsuda, F., Nagayama, R., Tao, Q. M. S. Mishiuro (1993).** Prevalence, genotypes, and an isolate (HC-C2) of hepatitis C virus in Chinese patients with liver disease. *J. Med. Virol.* 40 (3), 254-260.
 121. **-Wengler G., y G. Wengler (1993).** The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*;197:265-273.
 122. **-Wengler G. Bradley, D. W., Collett, M. S. Heinz, F. X. Schlesinger, R. W. y J. H. Strauss (1995).** Flaviviridae. In *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 415-427. Edited by Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo & Summers. Vienna & New York, 1995: Springer-Verlag, .
 123. **-Wensvoort, G. y M. M. Hulst (1990).** Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177 (1), 184-198.
 124. **-White, D. O. y F. J. Fenner (1994).** Structure and Composition of Viruses En *Medical Virology*. 4^a. Ed. E. U. A. pp 4-15.
 125. **-Wiley, E. O. (1991).** Phylogenetic Trees En *The Theoria and Practice of Phylogenetic Systematics*. Wiley-Liss. E. U. A. pp 93-114.
 126. **-Wiskerchen, M. y M. S. Collet (1991).** Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*;184:341-350.
 127. **-Wright, P. J. Cauchi, M. R. y M. L. Neg (1989).** Definition of the carboxy termini of the glycoproteins specified by dengue virus type 2. *Virology*;171 (1), 61-67.
 128. **-Yamada, N., Tanihara, K., Mizokami, M., Ohba, K., Takada, A., Tsutsumi, M. y T. Date (1994).** Full-length sequence of the genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 11), 3279-3284.
 129. **-Zanotto, Paolo M. de A. Gould, E. A. Goa, G. F. y E. C. Holmes (1996)** Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;93:548-553.
 130. **-Zhao, B., Mackow, E., Buckler-White, A., Markoff, L., Chanock, R. M., Lai, C. J. y Y. Makino (1986).** Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis of genes coding for structural proteins. *Virology* 155 (1), 77-88.