

Dueñas Carrera, Santiago*
 Acosta Rivero, Nelson*
 Morales Grillo, Juan*
 García Ferrera, Waldo O.**

Biología molecular del virus de la hepatitis c

Hepatitis c virus molecular biology

Fecha de aceptación: enero 2018

Resumen

El virus de la hepatitis c (vhc) es un virus de ARN de cadena simple, de polaridad positiva, que se clasifica dentro del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. Los aislamientos del vhC pueden separarse en, al menos, seis tipos principales, subdivididos en más de 50 subtipos. En esta revisión se describen las características del genoma y de las proteínas, la heterogeneidad y el ciclo del vhC.

Palabras clave: virus de hepatitis c, biología molecular, heterogeneidad viral.

Abstract

HCV is a simple chain RNA virus, positive polarity, classified within *Hepacivirus* genus, *Flaviviridae* family. Isolates of HCV can be separated into at least six main types, subdivided into more than 50 subtypes. This review describes the characteristics of the genome and proteins, heterogeneity and the cycle of HCV.

Keywords: hepatitis c virus, molecular biology, viral heterogeneity.

Biología molecular del virus de la hepatitis c

Características del genoma y de las proteínas virales

El vhC es un virus de ARN de cadena simple, de polaridad positiva, que se clasifica dentro del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*.¹ En el virión, la cadena simple de ARN está protegida por una cápsida proteica, que a su vez está cubierta por una envoltura, como demuestra el hecho de ser sensible al cloroformo.² La envoltura viral está compuesta por elementos virales y del hospedero.

Se ha demostrado la presencia de partículas icosahédricas de 50-75 nm, aproximadamente, y otras más pequeñas de 30-35 nm o 45-55 nm en estudios de microscopía electrónica de partículas de vhC en suero, extracto de hígado o en líneas de células B o T humanas, infectadas de manera ineficiente con suero de vhC *in vitro*.^{3,5} Los análisis demostraron que la densidad de los viriones del vhC puede variar considerablemente desde 1.03 a 1.20 g/mL.⁴

El genoma del vhC consta de aproximadamente 9.6 kb. Los primeros 341 nucleótidos (nt) constituyen la región 5' no traducida que forma estructuras secundarias y terciarias estables. Este fragmento es muy conservado, muestra más

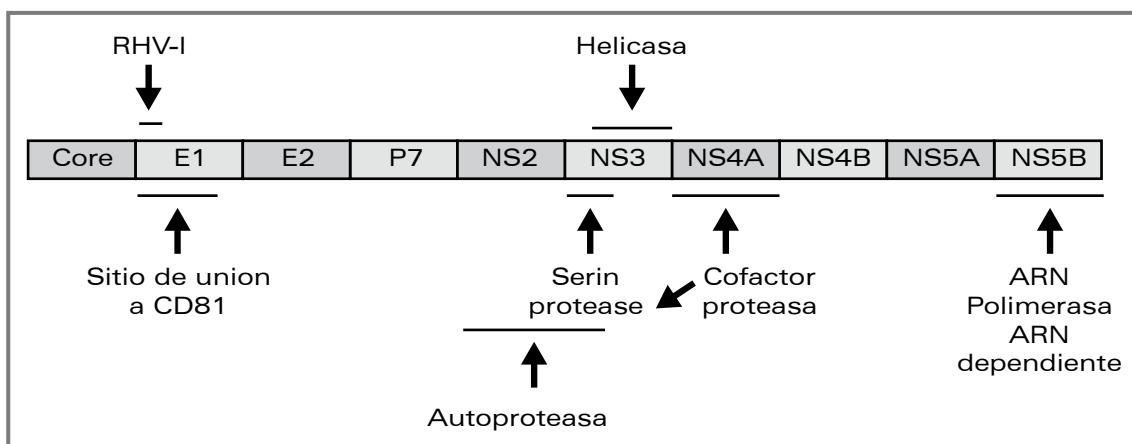
de 90% de identidad de secuencia nucleotídica entre 81 aislamientos diferentes.⁶ Esta región contiene múltiples codones AUG antes del sitio de inicio de la traducción, así como regiones que intervienen en la replicación y en la traducción. Tal es el caso de los elementos que funcionan como sitio interno de entrada al ribosoma y que, por tanto, diferencian la traducción del genoma viral de la que tiene lugar para los ARNm celulares.⁷ El sitio interno de entrada al ribosoma elimina la necesidad de una estructura 5'cap o de un extremo 5' libre en el mensajero de traducción. El sitio interno de entrada al ribosoma comprende los nt del 44 al 354 del genoma viral, solapándose con los primeros 13 nt de la región codificante. A continuación de la región 5' no traducida, el genoma del vhC contiene un marco abierto de lectura que codifica una poliproteína de aproximadamente 3 mil aminoácidos (aa). Este precursor proteico es procesado cotradicionalmente y postraduccionalmente por una combinación de proteasas virales y del hospedero,⁸ rindiendo al menos 10 proteínas individuales (figura 1). Del extremo N-terminal al C-terminal se ubican las proteínas: C, E1, E2, p7 (proteínas estructurales), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (proteínas no estructurales).⁹

*Departamento de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba

**Jefe del Departamento de Gastroenterología, Sección Hepatología, Hospital Universitario Calixto García, La Habana, Cuba

Correspondencia: Dr. Waldo O. García Ferrera
 Departamento de Gastroenterología, Hospital Universitario Calixto García, La Habana, Cuba.
 Dirección electrónica: waldogferrera63@yahoo.com

Figura 1
Representación esquemática de la poliproteína del vhc



La glicoproteína E1 forma parte de la envoltura del virión y consta de 192 aa (del 192 al 383) con una talla de 32-35 kDa. Posee un péptido señal, seguido de una secuencia de corte en su extremo aminoterminal. Su extremo carboxílico es hidrofóbico y tiene dos secuencias homólogas a segmentos transmembránicos, dentro de los cuales están incluidos cinco motivos de glicosilación, de los cuales sólo cuatro son utilizados.²⁴

La segunda glicoproteína (gp72), también llamada E2/NS1, parece intervenir en la interacción inicial del virus con la célula hospedera. Asimismo, esta proteína ha evidenciado su capacidad para interactuar con la proteína quinasa dependiente del ARN de doble cadena, por lo cual ha sido asociada con los mecanismos de resistencia al interferón. Este antígeno viral contiene 10 sitios de glicosilación y se presenta en dos formas fundamentales: una variante que abarca desde el aa 384 al 809, y otra que comprende la región del 384 al 746.²⁵ Esto se debe a que la proteína presenta dos tipos de procesamiento. Puede mantenerse intacta o es posible que sufra un corte por una peptidasa entre los aa 746 y 747, que da lugar a una E2 truncada y a una proteína denominada p7.⁹ El polipéptido p7 tiene una masa molecular aproximada de 7 kDa y consiste principalmente de aa hidrofóbicos. Esta proteína forma un canal iónico sensible a la amantadina, que podría jugar un papel importante en la replicación viral. Al parecer, la distribución de esta proteína se regula de forma compleja, lo cual sugiere que tenga múltiples funciones en el ciclo de vida del VHC, tanto intracelularmente como en el virión.²⁶

Las proteínas de las envolturas E1 y E2 interactúan de manera no covalente entre ellas para formar heterodímeros que se localizan en el retículo endoplasmático de la célula infectada, debido a la presencia de dominios transmembránnas en estos antígenos. Ambas proteínas de la envoltura se caracterizan por una marcada variabilidad, incluso dentro de un mismo individuo. En la proteína E2 se han descrito dos regiones hipervariables (RHV-I y RHV-II). La primera, de 30 aa, ha sido evidenciada en todos los aislamientos virales y comienza justo con el inicio de la proteína (aa 384). La segunda RHV, ha sido descrita sólo en los aislamientos de genotipo 1b y abarca 7 aa (aa 454-460).²⁷ Adicionalmente, la glicoproteína

E1 posee una región con variabilidad moderada que abarca los aa 215-255.

La ns2 es una proteína integral de membrana de 23 kDa, de carácter hidrofóbico.¹¹ Esta proteína contiene un posible dominio de proteasa del tipo cisteína,²⁸ que junto a un tercio de la ns3, ubicado hacia la región N-terminal, forma una proteasa estimulada por Zn responsable del corte entre la ns2 y la ns3, por lo que se le considera autocatalítica. La ns3, por su parte, es una proteína de 70 kDa y codifica tres actividades enzimáticas, una proteasa del tipo serina²⁹ y una combinación NTPasa/helicasa. Se ha demostrado la formación de complejos heterodiméricos ns2/ns3 *in vivo*.³⁰ Además de ser una proteína multifuncional, la proteína ns3 afecta varias funciones celulares.²⁵ El polipéptido hidrofóbico ns4A, de 8 kDa aproximadamente, es necesario para el corte por parte de ns3. La ns4A puede mediar la asociación de ns3 con la membrana del retículo endoplasmático, lo que puede ser importante para la función de la proteasa.¹⁸ La ns4B es una proteína de 27 kDa poco conocida, aunque parece formar parte del complejo de replicación viral.¹⁸

En la ns5A se ha localizado una región relacionada con la sensibilidad del subtipo 1b del VHC al tratamiento con interferón.³¹ Por otra parte, esta proteína es capaz de reprimir a la proteína quinasa inducida por interferón, activada por ARN de doble cadena, por interacción directa con el dominio catalítico. Por estos datos, la proteína ns5A parece intervenir en el mecanismo que confiere resistencia al efecto antiviral del interferón en las células infectadas. Se ha encontrado, además, que esta proteína sufre fosforilación en residuos de serina en su región central. Esto ocurre cuando la proteína ns5A es expresada como parte de una poliproteína ns3-ns5, lo que sugiere que se produce la formación de un complejo ns3-ns5A responsable de la fosforilación diferencial de ns5A. Este proceso de fosforilación es dependiente y dirigido por ns4A.³² Se ha reportado que cuando se eliminan porciones de la región N-terminal de la ns5A, dicha proteína funciona como un activador transcripcional potente, siendo ésta una actividad potencial de la proteína ns5A.²⁵ La ns5A interactúa con varias proteínas celulares e interviene en la replicación del VHC.

Por su parte, la ns5B contiene un motivo característico de las polimerasas que usan moldes de ARN. Está

demostrado que esta proteína tiene una localización perinuclear.³³ Su interacción con membranas sugiere que la replicación debe ocurrir asociada a las membranas del retículo endoplasmático alrededor del núcleo.³³ Los trifosfatos de ribavirina no tienen efecto sobre su actividad polimerasa, por lo que el efecto terapéutico observado en los pacientes no está relacionado con la inhibición de la polimerasa viral.³² Proteínas asociadas a membranas de vesículas humanas (VAP-A y VAP-B) parecen ser factores hospederos esenciales en la replicación del VHC, mediante la unión tanto de NS5A como de NS5B.³⁴ Recientemente se ha sugerido que la proteína NS5B podría tener un rol adicional en la patogénesis del VHC, al relacionarse con un retardo en el progreso del ciclo celular de hepatocitos a través de la inducción de interferón beta.³⁵

Al final de la molécula de ARN del VHC se localiza la región 3' no codificante que incluye una porción de 40 nt poco conservada, una cola de poli U de longitud heterogénea, y una secuencia altamente conservada de 98 nt que forma estructuras secundarias y terciarias estables y que parece jugar un papel importante en la replicación viral.³⁶

Heterogeneidad viral

La comparación de secuencias nucleotídicas de diferentes aislamientos en todo el mundo indica que el VHC es muy heterogéneo. Los aislamientos del VHC pueden separarse en, al menos, seis tipos principales, subdivididos en más de 50 subtipos.³⁷ Los subtipos se designan por un número arábigo que corresponde al del tipo principal dentro del cual se clasifica, seguido por una letra minúscula en orden según el descubrimiento (por ejemplo, 1a, 1b, 2a, 2b, etc.). La prevalencia de estos genotipos varía marcadamente en las diferentes partes del mundo. Los subtipos 1a y 1b abarcan 70% de los casos de infección por el VHC. Esta heterogeneidad tiene una connotación especial en el desarrollo de vacunas, ya que dificulta la obtención de un producto de este tipo que brinde una protección global. La heterogeneidad y la existencia de diferentes genotipos también complica el tratamiento terapéutico y el diagnóstico molecular.³⁸

La causa de esta heterogeneidad viene dada por la alta tasa de error de la ARN polimerasa dependiente del ARN y a la carencia de mecanismos de corrección durante la síntesis del ARN viral. El VHC tiene una capacidad de mutar que ha sido estimada entre 10^{-3} y 10^{-4} sustituciones por sitio de genoma por año.³⁹ Este valor es suficientemente alto como para que en un individuo infectado coexista una población relacionada de diferentes genomas del virus, de los cuales uno se hace predominante bajo la presión del sistema inmune. Este fenómeno es conocido como dinámica de "cuasiespecies" y constituye un mecanismo rápido y eficiente para el escape del virus a la respuesta inmune del organismo.^{10,40} La distribución de "cuasiespecies" parece fluctuar a lo largo de la infección.³² Existen los denominados "puntos calientes" o zonas donde ocurren mutaciones con mayor frecuencia, principalmente ubicados en la región N-terminal de la proteína E2, concentrados en las dos regiones hipervariables descritas antes. Las mutaciones en estas dos regiones provocan con una alta frecuencia cambios de aminoácidos,³² con la consiguiente implicación para el reconocimiento antigénico por parte del sistema inmune hospedero.

Ciclo viral

Los hepatocitos son el blanco principal de la infección y la replicación del VHC. Este virus además de infectar los hepatocitos, es capaz de infectar células sanguíneas, como las células mononucleares de sangre periférica y los polimorfonucleares.⁴¹ La infección de células mononucleares de sangre periférica y de linfocitos T infiltrados en el hígado parece caracterizar la infección crónica, mientras que es rara en portadores sanos de anticuerpos del virus y en formas autorresueltas.⁴² La unión del virus a la célula hospedera requiere la interacción de la proteína E2 o el complejo E1/E2 con un complejo de receptores que está presente en la superficie celular. Hasta ahora no se ha identificado el complejo receptor celular del VHC. Sin embargo, parece que la molécula CD81 participa en esa interacción, como lo indica su unión a partículas virales.⁴³ Alternativamente, la asociación de partículas del VHC con β-lipoproteínas e inmunoglobulinas podría indicar que la entrada del VHC a la célula podría estar mediada por los correspondientes receptores de estas moléculas.⁴⁴

La fusión de la envoltura viral con la membrana celular ocurre en el compartimiento endocítico y está relacionada con el pH bajo (microambiente ácido) que provoca cambios en las proteínas E1 y E2 del VHC, exponiendo el péptido de fusión. Despues de la entrada a la célula, el ARN viral es liberado de la nucleocápsida en el citoplasma.⁴⁵ Posteriormente, el genoma viral es traducido a partir del sitio interno de entrada al ribosoma, y la poliproteína viral es procesada proteolíticamente en las proteínas virales individuales. La mayoría de estas proteínas, si no todas, forman un complejo multiproteico muy ordenado y fuertemente asociado con las membranas intracelulares. Dentro de este complejo, la cadena positiva de ARN es copiada a un intermediario de cadena negativa, que a su vez sirve de molde para la síntesis de un exceso de la progenie de cadena positiva. El principal componente en la replicación lo constituye la NS5B, la ARN polimerasa ARN dependiente, que produce la nueva cadena de ARN mediante el mecanismo de síntesis *de novo*, o sea, sin necesidad de un cebador inicial, aunque las regiones no codificantes pudieran funcionar también para proporcionar el cebador. La cadena positiva, sintetizada por esta vía, puede ser usada tanto para la síntesis de nuevas cadenas negativas, para la traducción o para la encapsidación en partículas virales.³⁶ El autoensamblaje de las proteínas estructurales ocurre en el lumen del retículo endoplasmático, del cual adquiere parte de los componentes de la envoltura del virus. Durante este proceso ocurre la formación de multímeros intermedios de la cápsida y de heterodímeros de la E1 y la E2.⁴⁶ Finalmente, el virus parece ser exportado de la célula por la vía secretora constitutiva a través del complejo de Golgi.³⁶

El nivel de viremia promedio en los pacientes infectados crónicamente es de alrededor de 3.5 millones de copias/mL,⁴⁷ independientemente del genotipo viral.³⁸ Los niveles de ARN viral tienen poca fluctuación y su cinética ha sido relacionada con la cinética de la proteína de la cápsida en el suero de los individuos crónicos no tratados con antivirales. Los cálculos muestran un mínimo de producción viral y clarificación diaria de aproximadamente 10^{11} a 10^{13} viriones en individuos crónicos no tratados. El virus libre tiene un tiempo de vida medio de 1.5 a 4.6 horas, mostrando un recambio de 97 a 99% por día. En cambio, el virus dentro de la célula tiene un tiempo de vida media que oscila entre 1.7 y más de 70

días, y muestra un recambio diario de 1 a 33%.³⁸ La existencia de células infectadas en estado de latencia, en las cuales el periodo no productivo es considerablemente más largo que el ciclo productivo de la infección, es un factor importante en la infección por el VHC.³⁸

Conclusiones

El virus de la hepatitis C establece una compleja interacción con el organismo hospedero a través de las proteínas virales. La heterogeneidad viral, la modificación de funciones celulares por parte de las proteínas virales, incluyendo la acción sobre células del sistema inmune, constituyen los principales mecanismos empleados por el virus de la hepatitis C para lograr su persistencia en el organismo hospedero.

Referencias

1. Mayo, M.A. y Pringle, C.R., "Virus taxonomy 1997", *J Gen Virol*, 1998, 79: 649-657.
2. Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kimimura, T., Alter, H.J., London, W.T. y Purcell, R.H., "Inactivation of hepatitis C virus and non-a, non-b hepatitis by chloroform", *Infect Immunol*, 1993, 41: 816-821.
3. Takahashi, K., Kishimoto, S., Yoshizawa, H., Okamoto, H., Yoshikawa, A. y Mishiro, S., "p26 protein and 33 nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts", *Virology*, 1992, 191: 431-434.
4. Prince, A.M., Huima-Byron, T., Parker, T.S. y Levine, D.M., "Visualization of Hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins", *J Virol Hepatitis*, 1996, 3: 11-17.
5. Shimizu, Y.K., Feinstones, S.M., Kohara, M., Purcell, R.H. y Yoshikura, H., "Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy", *Hepatology*, 1996, 23: 205-209.
6. Bukh, J., Purcell, R.H. y Miller, R.H., "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus", *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 (11): 4942-4946.
7. Honda, M., Ping, L.-H., Rijnbrand, R.C.A., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D.T. y Lemon, S.M., "Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA", *Virology*, 1996, 22: 31-42.
8. Manabe, S., Fuke, I., Tanishita, O., Kaji, C., Gomi, Y., Yoshida, S., Mori, C., Takamizawa, A., Yosida, I. y Okayama, H., "Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by ns3", *Virology*, 1994, 198 (2): 636-644.
9. Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Ando, K.Y., Yoshida, I. y Okayama, H., "Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolate from human carriers", *J Virol*, 1991, 65: 1105-1113.
10. Bukh, J., Miller, R.H. y Purcell, R.H., "Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes", *Semin Liver Dis*, 1995, 15 (1): 41-63.
11. Santolini, E., Migliaccio, G. y La Monica, N., "Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein", *J Virol*, 1994, 68: 3631-3641.
12. Lo, S.-Y., Masiarz, F., Hwang, S.B., Lai, M.M.C. y Ou, J.-H., "Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products", *Virology*, 1995, 213: 455-461.
13. Acosta-Rivero, N., Álvarez-Obregón, J.C., Musacchio, A., Falcon, V., Dueñas-Carrera, S., Marante, J., Menéndez, I. y Morales, J., "In vitro self-assembled HCV core virus-like particles induce a strong antibody immune response in sheep", *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290 (1): 300-304.
14. Acosta-Rivero, N., Rodríguez, A., Musacchio, A., Falcón, V., Suárez, V.M., Martínez, G., Guerra, I., Paz-Lago, D., Morera, Y., De la Rosa, M.C., Morales-Grillo, J. y Dueñas-Carrera, S., "In vitro assembly into virus-like particles is an intrinsic quality of *Pichia pastoris* derived HCV core protein", *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325 (1): 68-74.
15. Acosta-Rivero, N., Rodríguez, A., Mussachio, A., Poutu, J., Falcón, V., Torres, D., Aguilar, J.C., Linares, M., Alonso, M., Pérez, A., Menéndez, I., Morales-Grillo, J., Márquez, G. y Dueñas-Carrera, S., "A c-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids", *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334 (3): 901-906.
16. Chang, S.C., Yen, J.-H., Kang, H.-Y., Jang, M.-H. y Chang, M.-F., "Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus", *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205 (2): 1284-1290.
17. Hwang, S.B., Lo, S.-Y., Ou, J.-H. y Lai, M.M.C., "Detection of cellular proteins and viral core protein interacting with the 5' untranslated region of hepatitis C virus RNA", *J Biomed Sci*, 1995, 2: 227-236.
18. Reed, K.E. y Rince, M.C., "Molecular characterization of hepatitis C virus in hepatitis C virus", en H.W. Reesink (ed.), *Curr Stud Hematol Blood Transf*, Basilea, Karger, 1998, 2: 1-37.
19. Acosta-Rivero, N., Rodríguez, A., Musacchio, A., Falcón, V., Suárez, V.M., Chávez, L., Morales-Grillo, J., Dueñas-Carrera, S., "Nucleic acid binding properties and intermediates of HCV core protein multimerization in *Pichia pastoris*", *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323 (3): 926-931.
20. Matsumoto, M., Hwang, S.B., Jeng, K.-S., Zhu, N. y Lai, M.M.C., "Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C core protein", *Virology*, 1996, 218: 43-51.
21. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T. y Koike, K., "The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice", *Nat Med*, 1998; 4: 1065-1067.
22. Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. y Shimotohno, K., "Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-κappa B activation", *J Virol*, 1999, 73: 4713-4720.
23. Kittlesen, D.J., Chianese-Bullock, K.A., Yao, Z.Q., Braciale, T.J. y Hahn, Y.S., "Interaction between complement receptor gc1qr and hepatitis C virus core protein inhibits

- τ-lymphocyte proliferation", *J Clin Invest*, 2000, 106: 1239-1249.
24. Fournillier, A., Cahour, A., Escriou, N., Girard, M. y Wychocki, C., "Processing of the e1 glycoprotein of hepatitis c virus expressed in mammalian cells", *J Gen Virol*, 1996, 77: 1055-1064.
25. Kato, N., "Molecular virology of hepatitis c virus", *Acta Med Okayama*, 2001, 55 (3): 133-159.
26. Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D. y Harris, M., "Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis c virus p7 protein to distinct intracellular membranes", *J Virol*, 2005, 79 (24): 15525-15536.
27. Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dona, C., Weiner, A.J., Lau, J.Y., Choo, Q.-L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M. y Abrignani, S. "A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis c virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells", *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1759-1763.
28. Gorbunya, A.E. y Snijder, E.J., "Viral cysteine proteinases", *Persp Drug Discov Des*, 1996, 6: 64-86.
29. Steinkühler, C., Tomei, L., De Francesco, R., "In vitro activity of hepatitis c virus ns3 purified from recombinant baculovirus-infected sf9 cells", *J Biol Chem*, 1996, 271: 6367-6373.
30. Kiiver, K., Merits, A., Ustav, M. y Zusinaitė, E., "Complex formation between hepatitis c virus ns2 and ns3 proteins", *Virus Res*, 2006, 117 (2): 264-272.
31. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kuroaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F. y Sato, C., "Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis 1b", *J Clin Invest*, 1995; 96: 224-230.
32. Kato, N. "Genome of human hepatitis c virus (hcv): gene organization, sequence diversity, and variation", *Microb Comp Genomics*, 2000, 5 (3): 129-151.
33. Hwang, S.B., Park, K.-J., Kim, Y.-S., Syng, Y.C., Lai, M.M.C., "Hepatitis c virus ns5B protein is a membrane associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization", *Virology*, 1997, 227: 439-446.
34. Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M.M., Miyamura, T., Moriishi, K. y Matsuura, Y., "Human VAP-B is involved in hepatitis c virus replication through interaction with ns5A and ns5B", *J Virol*, 2005; 79 (21): 13473-13482.
35. Naka, K., Dansako, H., Kobayashi, N., Ikeda, M. y Kato, N., "Hepatitis c virus ns5B delays cell cycle progression by inducing interferon-beta via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes", *Virology*, 2006; 346 (2): 348-362.
36. Bartenschlager, R. y Lohmann, V., "Replication of the hepatitis c virus", *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2000, 14 (2): 241-254.
37. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H.J., Viazov, S., Weiner, A.J. y Widell, A., "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis c virus genotypes", *Hepatology*, 2005, 42 (4): 962-973.
38. Zeuzem, S., "The kinetics of hepatitis c virus infection", *Clin Liver Dis*, 2001, 5 (4): 917-930.
39. Abe, K., Inchauspe, G. y Fijisawa, K., "Genomic characterization and mutation rate of hepatitis c virus in patients who contracted hepatitis during an epidemic of NANBH in Japan", *J Gen Virol*, 1992, 73: 2725-2729.
40. Alfonso, V., Mbayed, V.A., Sookoian, S. y Campos, R.H., "Intra-host evolutionary dynamics of hepatitis c virus e2 in treated patients", *J Gen Virol*, 2005, 86: 2781-2786.
41. Lamelin, J.P., Zoulim, F. y Trépo, C., "Lymphotropism of hepatitis b and c viruses: an update and a newcomer", *Int J Clin Lab Res*, 1995, 25: 1-6.
42. Zignego, A.L., De Carli, M., Monti, M., Careccia, G., La Villa, G., Giannini, C., D'Elios, M.M., Del Prete, G. y Gentilini, P., "Hepatitis c virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients", *J Med Virol*, 1995, 47: 58-64.
43. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. y Abrignani, S., "Binding of hepatitis c virus to cd81", *Science*, 1998, 282: 938-941.
44. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. y Zhang, Q.X., "Hepatitis c virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor", *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (22): 12766-12771.
45. Lindenbach, B.D. y Rice, C.M., "Unravelling hepatitis c virus replication from genome to function", *Nature*, 2005, 436: 933-938.
46. Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A. y Roingeard, P., "Hepatitis c virus-like particle morphogenesis", *J Virol*, 2002, 76 (8): 4073-4079.
47. McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S. y Albrecht, J.K., "Interferon alfa 2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis c", *N Engl J Med*, 1998, 339: 1485-1492.