

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS C

Dr. Félix Toro

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina,
Instituto de Inmunología

RESUMEN

El Virus de la Hepatitis C (VHC) representa un nuevo miembro de la familia Flaviviridae cuya caracterización molecular ha sido llevada a cabo en los últimos cinco años. La partícula viral consiste de una envoltura de naturaleza lipoproteica, derivada de la membrana de la célula hospedera, que contiene los dos principales polipéptidos estructurales designados como E1 y E2. La envoltura rodea la nucleocápside, estructura constituida principalmente por una proteína básica que está en estrecha interacción con el genoma viral representado por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva con una longitud aproximada de 9.600 nucleótidos. La organización genómica del VHC es similar a la de Pestivirus y Flavivirus, ubicándose las secuencias que codifican para las proteínas estructurales hacia el extremo 5' y las que codifican para las proteínas no estructurales hacia el extremo 3' del genoma. Ambos tipos de polipéptidos son generados a partir de una poliproteína de 3.000 aa que es procesada proteolíticamente por enzimas de origen celular y viral. Dos regiones no codogénicas se identifican hacia los extremos 5' y 3' del genoma y se caracterizan por presentar secuencias altamente conservadas que parecen ser fundamentales en el proceso replicativo del virus.

PALABRAS CLAVE: VHC, FLAVIVIRUS, GENOMA, POLIPÉPTIDOS.

SUMMARY

The Hepatitis C Virus (HCV) represents a new member of the Flaviviridae family whose molecular characterization has been carried out in the last five years. The viral particle consists of a lipoprotein envelope derived from host cell membranes which contains two structural polypeptides designated as E1 and E2. The envelope surrounds the nucleocapsid, a structure mainly formed by a basic protein that is tightly interacting with the viral genome represented by a positive-sense single stranded RNA molecule of approximately 9,600 nucleotides. The genomic organization of the HCV resembles that of Pestivirus and Flavivirus with 5' end sequences coding for structural proteins and 3' end sequences coding for non-structural proteins. Both, structural and non-structural polypeptides are generated from a polyprotein of 3,000 aminoacids which is processed by cellular and viral proteases. Two additional non-coding and highly conserved sequences are identified towards the 5' and 3' end regions of the HCV genome. These sequences seem to play an important role in the process of viral replication.

KEY WORDS: VHC, FLAVIVIRUS, GENOME, POLYPEPTIDES.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 39-52

Aceptado para su publicación agosto de 2000

INTRODUCCIÓN

En el año de 1975 se describe por primera vez un tipo de agente infeccioso no relacionado con los virus de hepatitis A y hepatitis B, el cual era responsable de un gran número de casos de hepatitis post-transfusionales (Feinstone et al., 1975). Quince años después, se logra identificar el virus causante de la hasta entonces denominada hepatitis post-transfusional NoA, NoB siendo designado dicha entidad biológica como virus de la hepatitis C (VHC). En la actualidad, está claramente establecido que el VHC representa el principal agente etiológico responsable de más del 90 % de los casos de hepatitis post-transfusionales y esporádicas a nivel mundial (Genesca et al., 1991). Su identificación, mediante técnicas de biología molecular, ha permitido no solo su caracterización estructural, sino también el desarrollo de toda una serie de ensayos inmunológicos y moleculares que actualmente son utilizados a nivel mundial para el diagnóstico y estudio de esta infección viral crónica (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989; Miyamura et al., 1990; Alter, 1992; Schiff et al., 1999).

El presente trabajo tiene como objetivo revisar aspectos fundamentales de la biología molecular del VHC, enfocándose principalmente sobre las características estructurales del virus y su modo o estrategia de replicación.

Clasificación

El análisis de las secuencias nucleotídicas de diferentes aislados virales distribuidos a nivel mundial ha permitido establecer que el VHC representa una nueva especie viral que está relacionada con los géneros *Pestivirus* y *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Miller y Purcell, 1990). Este grupo de virus se caracteriza por poseer un genoma o material genético formado por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva la cual es traducida por la maquinaria ribosomal para generar una poliproteína que contiene los distintos

polipéptidos estructurales y no estructurales que conforman el virión. El análisis comparativo de esta serie de características estructurales ha llevado a proponer una clasificación para el VHC dentro de un nuevo género, distinto a *Pestivirus* y *Flavivirus*, denominado *Hepacivirus* ó Virus relacionados con el VHC (Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). Por otro lado, el VHC parece estar mas estrechamente relacionado con el género *Pestivirus* en virtud de las similitudes entre las secuencias nucleotídicas reportadas para ambos géneros, compartiendo igualmente características estructurales y funcionales en la región 5' no traducida del genoma viral. Mas recientemente, se ha podido establecer una relación mucho mas cercana entre el VHC y el recientemente identificado grupo de virus GBV-A, GBV-B y GBV-C/Virus de hepatitis G, también conocidos como agentes (GB). Este grupo viral ha sido igualmente clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* aunque su caracterización estructural y taxonómica no ha sido aún definida por completo (Kiyosawa y Tanaka, 1999).

Características estructurales del VHC

Inicialmente, la caracterización estructural del VHC se basó en estudios de ultrafiltración realizados a partir de aislados virales provenientes de chimpancés infectados. Estos análisis establecieron un diámetro aproximado para el virión de 30 a 60 nm (He et al., 1987; Bradley et al., 1991). Así mismo, la inactivación del virus mediante tratamiento con cloroformo indica que el virión está formado por una cubierta o envoltura de naturaleza lipídica (Feinstone et al., 1983, Bradley et al., 1991). La densidad de la partícula viral, determinada por gradientes de sacarosa, es bastante baja (1,08 a 1,11 g/ml) y similar a la reportada para los *Pestivirus*. Esta baja densidad se atribuye principalmente al alto grado de glicosilación reportado para las glicoproteínas que



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

conforman la membrana externa de la envoltura viral (Miyamoto et al., 1992). El genoma del VHC está constituido por un ARN de cadena sencilla, con una longitud aproximada de 9.600 nucleótidos. Al igual que otras especies virales relacionadas, el genoma viral se mantiene en estrecha interacción con proteínas específicas que en conjunto conforman la llamada nucleocápside viral. La nucleocápside está a su vez rodeada por la envoltura viral formada por dos polipéptidos de 33 y 72 kilodaltons (KDa) de peso molecular. Así mismo, el virión contiene una serie de proteínas no estructurales involucradas en los procesos replicativos del virus (Hijikata et al., 1993a). En la figura 1 se presenta un esquema general de las características estructurales del VHC.

Organización del Genoma

Como se mencionó anteriormente, el genoma del VHC está conformado por una molécula de ARN de cadena sencilla con un tamaño estimado de 9.600 nucleótidos (Choo et al., 1989; van Doorn, 1994; Reed and Rice, 1999). El sentido o polaridad de esta molécula de ARN es positivo, es decir, el genoma sirve directamente como ARN mensajero para el proceso de traducción de las proteínas virales llevado a cabo por la maquinaria ribosomal (Choo et al., 1989; van Doorn, 1994; Reed y Rice, 1999). Estructuralmente, el genoma del VHC se organiza de manera similar a lo descrito para los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*, ubicándose las regiones codificantes para las proteínas estructurales hacia el extremo 5' del genoma y las regiones codificantes para las proteínas no estructurales hacia el extremo 3' (Choo et al., 1991; van Doorn, 1994; Reed y Rice, 1999). Adicionalmente, el genoma del VHC presenta hacia sus extremos 5' y 3' regiones no codificantes cuyas funciones comienzan a ser dilucidadas sólo recientemente. El análisis de la secuencia nucleotídica del ARN viral ha permitido establecer que este contiene

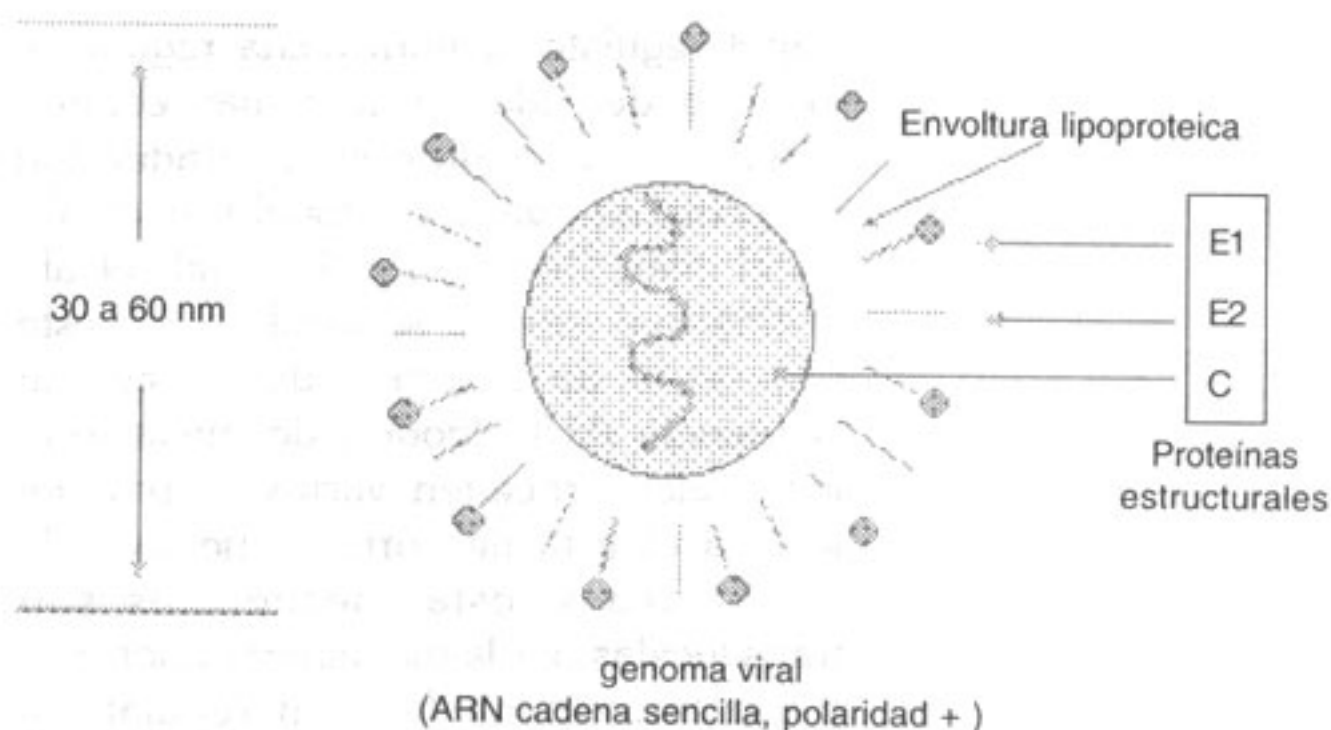


Figura 1

Diagrama esquemático de la estructura del Virus de Hepatitis C

un sólo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de unos 3010 (Choo et al., 1991) a 3033 aminoácidos (Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Se postula que dicha poliproteína es digerida proteolíticamente por enzimas celulares y virales a través de eventos poco conocidos, generándose de esta forma los diferentes polipéptidos estructurales y no estructurales que conforman el virión (Houghton et al., 1991; van Doorn, 1994; Reed y Rice, 1999). El modo de organización del VHC así como los productos virales codificados por el mismo se ilustran en la figura 2.

A continuación se discute con más detalle los aspectos estructurales y funcionales para cada una de las regiones del genoma del VHC.

región 5' no codificante

Hacia el extremo 5' del genoma del VHC y precediendo la secuencia que codifica para la poliproteína viral, se localiza una pequeña región de unos 324 a 341 nucleótidos de longitud, designada como región 5' no codificante (5' NC). El análisis comparativo de este segmento nucleotídico entre distintos aislados virales ha permitido establecer que esta representa la región más conservada en el genoma del VHC (Choo et al., 1989; Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991; Okamoto et al., 1990 a, b; Han et al., 1991). Esta característica sugiere un importante

papel regulatorio para dicha región en el ciclo de vida viral, y más específicamente en el proceso de traducción de proteínas virales (Houghton et al., 1991, van Doorn, 1994; Smith et al., 1995). Así mismo, se localizan en este segmento de 2 a 5 codones con la secuencia AUG (codón de iniciación), los cuales preceden varios marcos de lectura abierta de corta secuencia. No está claro si estas secuencias son transducidas por la maquinaria ribosomal o ejercen alguna función regulatoria como parte del ciclo replicativo natural del virus. La evidencia acumulada hasta el presente parece indicar que tales marcos de lectura no ejercen alguna función importante en dicho proceso replicativo (Smith et al., 1995).

El alto grado de conservación de la región 5' NC sugiere que dicha secuencia debe ejercer un rol importante en el ciclo de vida replicativo del virus. Este aspecto funcional ha sido dilucidado solo recientemente y parecer estar estrechamente relacionado con la estructura secundaria descrita para dicha región genómica. Análisis comparativos con regiones homólogas presentes en el género *Pestivirus* así como estudios de mapeo de sitios sensibles a la digestión con ribonucleasas, han llevado a proponer que la región 5' NC se organiza bajo la forma de una estructura del tipo tallo y lazo ("stem loop") localizada entre los nucleótidos -208 y -58 del genoma, presentando dicha región igualmente varias ramas laterales de longitud variable (Brown et al., 1992; Smith et al., 1995). Desde el punto de vista funcional, se postula que dicha estructura de tallo y lazo representa un sitio de entrada interno para el ribosoma ("Internal Ribosome Entry Site, IRES") por lo que resulta fundamental para la fase inicial del proceso de traducción de proteínas virales (Brown et al., 1992, Wang et al., 1993, 1994). Este tipo de mecanismo presenta características similares al descrito para distintos géneros virales de la familia *Picornaviridae* (Pelletier y Sonenberg, 1988; Jang et al., 1989).

De manera más específica, se postula que el proceso de traducción de proteínas se iniciaría en una secuencia AUG localizada internamente en el genoma viral, a varios nucleótidos del extremo 5' terminal, siendo controlado dicho evento por la secuencia "IRES" que se localiza en la región 5' NC (Wang et al., 1993, 1994). Dicho mecanismo tan particular difiere del modelo clásico de "scanning" o barrido ribosomal en el cual el proceso de traducción es iniciado a partir del primer codón AUG próximo al extremo 5' terminal del ARN mensajero.

Un aspecto que aún no está claro en el evento inicial de la traducción de proteínas del VHC se refiere a la posible participación de factores proteicos específicos que interaccionarían con la estructura de tallo y lazo de la región 5' NC. Algunos estudios señalan la capacidad de unión de ciertas proteínas con dicha región genómica, entre las que se incluyen, la proteína de unión a residuos de polipirimidina (PTB), la proteína heterogenea nuclear L y otra serie de polipéptidos de 25 KD de peso molecular aún no caracterizados (revisado en Reed y Rice, 1999). Queda por establecerse el papel que tales factores juegan en el control de la traducción y/o transcripción del genoma del VHC.

región 3' no codificante

Al igual que lo reportado para la región 5' terminal, hacia el extremo 3' del genoma del VHC se localiza una secuencia no codificante que, dependiendo del aislado viral analizado, presenta una longitud que varía entre los 27 y 55 nucleótidos (Choo et al., 1989; Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Se ha sugerido que dicha región contiene secuencias repetidas del nucleósido adenosina (poli rA). Tal afirmación se basa en los estudios iniciales realizados por Choo y colaboradores, los cuales reportaban la capacidad que tenía el ARN viral de unirse a columnas de Oligo dT celulosa (Choo et al., 1989). El análisis detallado



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

de este primer aislado viral (HCV-1) permitió identificar un segmento de poli(rA) en posición posterior («downstream») a una secuencia no codificante de 27 nucleótidos localizada en la región 3' del genoma (Han et al., 1991). La presencia de este segmento de poli(rA), sin embargo, no parece ser una característica común entre todos los aislados virales hasta ahora identificados. Así por ejemplo, en aislados provenientes del Japón se identifican hacia el extremo 3' secuencias hopoliméricas de poli U (Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Estudios recientemente realizados han permitido caracterizar con más detalle la región 3' no codificante del VHC llegando a proponer, inclusive, un posible papel funcional para dicha región en el ciclo replicativo viral (Han et al., 1992, Kolykhalov et al., 1996). Así, se plantea que este segmento estaría constituido por tres elementos principales representados por a) una secuencia nucleotídica de gran variabilidad entre los distintos aislados virales, b) una secuencia polipirimidínica constituida principalmente por residuos de Uridina con interposición de residuos de citosina y c) una secuencia altamente conservada de aproximadamente 98 bases específica para el VHC (Han et al., 1992, Kolykhalov et al., 1996). Se postula que esta última región genera una estructura secundaria del tipo tallo y lazo («stem loop») que probablemente resulta fundamental para el inicio del proceso de replicación viral (Kolykhalov et al., 1996).

Está claro que las regiones 5' y 3' no codificantes del genoma del VHC cumplen un rol importante en el ciclo replicativo viral. Sin embargo, se requieren de estudios más detallados para esclarecer su verdadero papel en los procesos de transcripción y traducción del VHC.

región codificante

Al igual que lo descrito para los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*, el genoma del VHC codifica para una poliproteína de

aproximadamente 3.010 a 3.033 aminoácidos que sirve de precursor a los distintos polipéptidos estructurales y no estructurales que conforman el virión. Esta poliproteína y los polipéptidos que de ella se derivan son procesados de manera co-traducciona y post-traducciona, por la acción combinada de enzimas celulares y virales. Las proteínas estructurales se localizan hacia el extremo N-terminal de la poliproteína mientras que las no estructurales hacia el extremo C-terminal (figura 2). Hasta el presente, ninguno de estos polipéptidos ha podido ser identificado y caracterizado en individuos infectados por el virus y su estudio a partir de sistemas de cultivo virales no ha sido posible. Ello ha motivado a que se empleen sistemas de expresión o traducción «in vitro» de algunos de los genes del VHC, utilizando para tal fin, secuencias clonadas del ARN viral. Mediante esta estrategia no sólo se han podido identificar y caracterizar las proteínas estructurales y no estructurales del virus, sino también se han analizado los mecanismos de generación y procesamiento de tales polipéptidos. Así por ejemplo, se sabe que en el procesamiento de las proteínas estructurales participa una enzima de origen celular denominada «peptidasa señal» o «signalasa», mientras que para la generación de los distintos polipéptidos no estructurales se requiere de la actividad combinada de al menos dos proteasas virales codificadas en la misma región no estructural del genoma viral (Matsuura et al., 1994, Reed y Rice, 1999). Así mismo, se han identificado claramente los sitios de corte para cada una de estas proteasas en la poliproteína viral (figura 2) (Hijikata et al., 1991, 1993 a y b).

El grupo de proteínas estructurales del VHC está conformado por un polipéptido de aproximadamente 22 KDa de peso molecular conocido como proteína de la nucleocápside ó «core» y dos glicoproteínas de la envoltura de 33 KDa (E1) y 72 KDa (E2) respectivamente (figura 2). Todos estos polipéptidos son

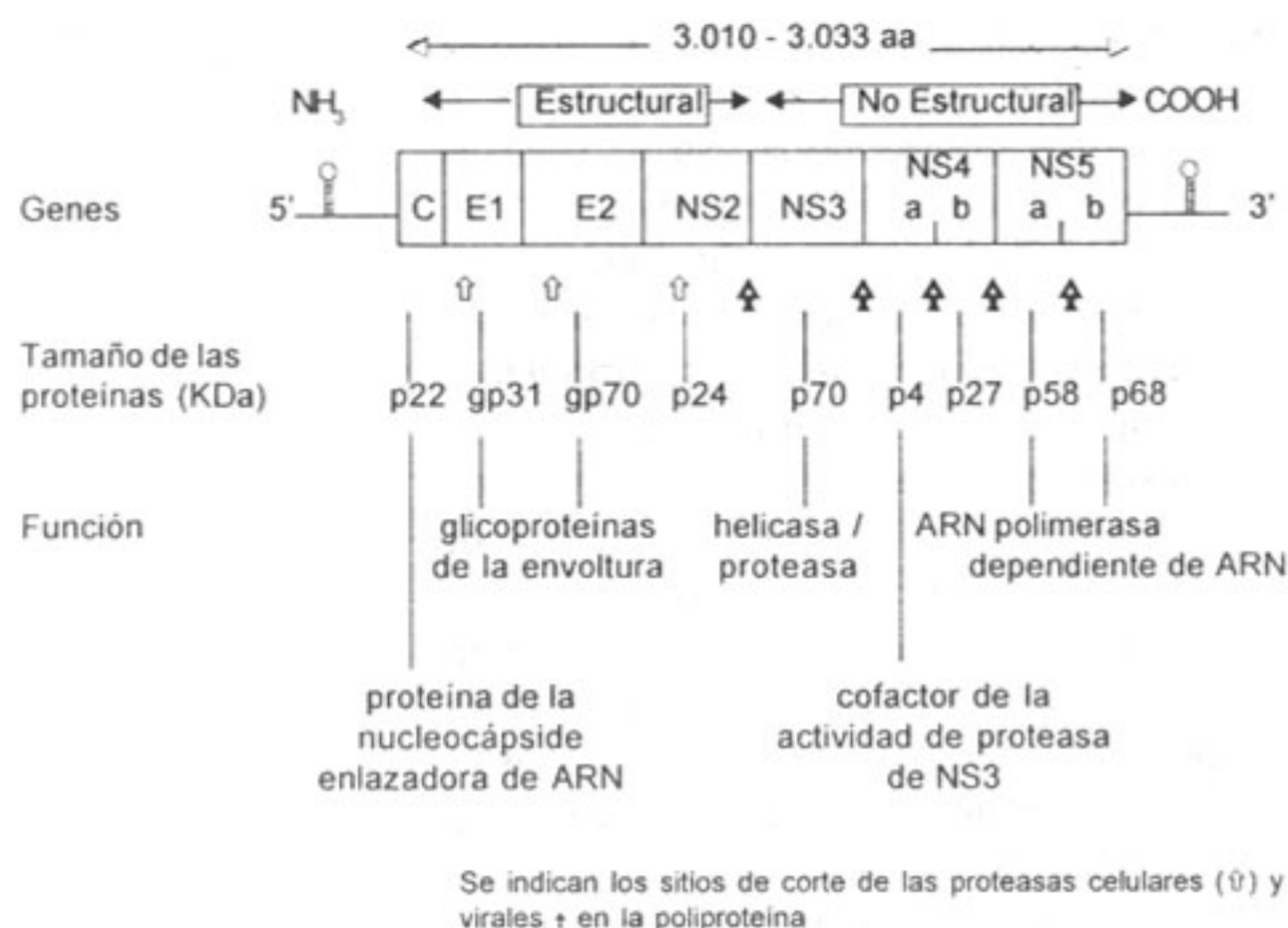


Figura 2
Organización
del genoma del Virus
de Hepatitis C

procesados a partir de la región N-terminal de la poliproteína por la acción de una enzima petidasa residente en el lumen del retículo endoplásmico (van Doorn, 1994; Matsuura et al., 1994; Reed y Rice, 1999). La proteína de la nucleocápside, p22, es un polipéptido rico en residuos de arginina y lisina los cuales representan el 23,5% del contenido total de aminoácidos. Tales residuos están localizados principalmente hacia la región N-terminal de la proteína. Esta composición característica de aminoácidos confiere a la proteína de la cápside propiedades físico-químicas que permiten su interacción con el ARN genómico, generando así la nucleocápside viral. El extremo C-terminal de la p22 se caracteriza por la presencia de dominios aminoacídicos altamente hidrofóbicos que determinan que la proteína sea expresada en el citoplasma de células transfectadas con este gen. La delección de estos dominios hidrofóbicos provoca la síntesis de una proteína truncada que es translocada al nucleo celular. Se piensa que este polipéptido truncado, de aproximadamente 16 KDa de peso molecular, podría representar al producto maduro de la cápside a nivel nuclear (Matsuura et al., 1994). Así mismo, se han identificado en dicha proteína un grupo de aminoácidos básicos con la secuencia

PRRGPR, que pudieran ejercer un papel importante en el translocamiento de este polipéptido desde el citoplasma al nucleo celular. Este mecanismo de biogénesis para la proteína de la cápside se asemeja bastante a lo reportado para otro representante del género *Flavivirus* como es el caso del virus del Oeste del Nilo ("West Nile Virus") en donde el segmento hidrofóbico C-terminal de la proteína es removido por la acción de una proteasa viral (Matsuura et al., 1994).

Se han reportado diversos papeles funcionales para la proteína de la cápside entre los que se incluyen: 1) capacidad de unión al ARN, 2) formación de complejos multiméricos con otras moléculas de la cápside y la proteína de la envoltura E1 contribuyendo esto al proceso de ensamblaje del virión, 3) asociación con la subunidad ribosomal 60 S, un evento que puede estar involucrado en el proceso de decapsidación viral, como ha sido descrito para el género *Alphavirus*, 4) asociación con complejos lipídicos y apolipoproteína II, lo cual se piensa que pudiera estar relacionado con el hecho de que la cápside induce esteatosis en ratones transgénicos y 5) interacción con el receptor de linfotóxina-b y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), dos miembros de la familia de receptores de TNF involucrados en la respuesta inmune y cuya actividad pudiera ser modulada por la infección del VHC (Reed y Rice, 1999).

El segundo grupo de proteínas estructurales del VHC corresponden a los polipéptidos de la envoltura E1 (gp31) y E2 (gp70), codificados por genes que se localizan en posición posterior ("downstream") a la región de la cápside (Figura 2). Ambas glicoproteínas están glicosiladas en aproximadamente 5 (E1) y 11 (E2) residuos de asparagina distribuidos a lo largo de la secuencia polipeptídica. Se piensa que este alto grado de glicosilación es la causa del mayor tamaño molecular reportado para ambos polipéptidos cuando son anali-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

zados electroforéticamente (Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). E1 y E2 presentan su extremo carboxilo terminal insertado en la membrana del retículo endoplásmico mientras que el resto de la cadena polipeptídica está traslocada hacia el lumen de dicho organelo. Ambas polipéptidos parecen formar complejos heterodiméricos E1-E2 a través de enlaces disulfuro e interacciones no covalentes (Reed y Rice, 1999). Estudios recientes señalan la característica que tiene el extremo C-terminal de E2 de funcionar como una señal de retención en el retículo endoplásmico. Esta señal posiblemente es enmascarada durante el proceso de ensamblaje de la partícula viral, permitiéndose así el egreso del virión a través de la vía secretoria de la célula (Cocquerel et al., 1998).

La glicoproteína E2 presenta dos características adicionales que han sido motivo de su estudio exhaustivo. Una de ellas se refiere al alto grado de variabilidad que dicho polipéptido exhibe hacia la región N-terminal, también conocida como región hipervariable 1 o HVR1 y que es responsable de la generación de mutantes de escape bajo la presión selectiva de la respuesta inmune (Ogata et al., 1991, Kurosaki et al., 1993). La otra característica de E2 se refiere a su capacidad de interaccionar con CD 81, un polipéptido perteneciente a la familia de las tetraspaninas que es expresado en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, incluyendo las células hepáticas y leucocitarias (Pileri et al., 1998). Dicha interacción podría representar un primer evento en el proceso de unión del virus con la eventual infección de la célula blanco. Este representa un fenómeno poco conocido hasta el presente que requiere de estudios adicionales a fin de esclarecer este importante aspecto en la biología del VHC.

Recientemente, se ha identificado hacia la región genómica que codifica para las proteínas estructurales del VHC, un

cuarto polipéptido de 7 KDa de peso molecular conocido como proteína p7, el cual estaría localizado específicamente entre las proteínas E2 y NS2 (Lin et al., 1994a). No se sabe con exactitud si este polipéptido representa una proteína estructural del virión o está relacionado funcionalmente con alguna proteína no estructural como NS2 por lo que su papel es aún desconocido. Por otro lado, algunas evidencias experimentales sugieren que el procesamiento proteolítico de p7 por proteasas celulares parece ser incompleto ya que el mismo ha sido identificado en asociación con la proteína E2 bajo la forma de un complejo E2-p7 (Lin et al., 1994a).

Utilizando la misma estrategia de expresión «in vitro» de segmentos clonados del genoma del VHC, se han podido identificar y estudiar las proteínas de la región no estructural del virus (figura 2). Así, dos polipéptidos de 24 y 70 KDa han sido identificados en posición posterior («downstream») a la región codogénica de E2 (gp70). Por su similitud con polipéptidos no estructurales del género *Flavivirus*, estas proteínas han sido designadas NS2 y NS3 respectivamente (van Doorn, 1994, Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). NS2 representa una proteína altamente hidrofóbica de 24 KDa de peso molecular, que ha sido localizada principalmente en la membrana celular (Choo et al., 1991). Mas recientemente se ha demostrado que NS2 es en realidad una proteína transmembranal con su porción C-terminal traslocada en el lumen de retículo endoplásmico y la región N-terminal localizada en el citosol (Santolini et al., 1995). La función de esta proteína no es del todo conocida, pero se piensa que pudiera funcionar como un «puente estructural» entre las glicoproteínas que conforman la envoltura y la nucleocápside viral durante el proceso de ensamblaje del virión (Santolini et al., 1995). Por otro lado, NS2 presenta hacia su extremo C-terminal un dominio funcional que comparte con la proteína NS3 y que

corresponde a una actividad de metaloproteínasa dependiente de Zinc (Hijikata et al., 1993 a y b, Grakoui et al., 1993b). La estructura conformacional de este dominio NS2-NS3 parece ser crítica para su actividad catalítica.

La proteína NS3 (p70) representa uno de los polipéptidos más importantes desde el punto de vista funcional para el VHC, en virtud de la serie de actividades enzimáticas que se han descrito para la misma. En primer término, esta proteína presenta la actividad de enlazadora de nucleótidos trifosfatos (NTPasa) y de ARN helicasa que se presumen están involucradas en el desenrollamiento del ARN genómico viral para su replicación y de las estructuras de ARN de doble cadena que resultan de la síntesis de la cadena complementaria al ARN genómico (van Doorn, 1994, Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). Así mismo, NS3 representa una proteasa serínica que está involucrada en el procesamiento de las proteínas no estructurales a partir del precursor poliproteico del virus (Choo et al., 1991, Hijikata et al., 1993a). En este sentido, dos actividades de proteasas claramente distinguibles desde el punto de vista estructural y funcional han sido caracterizadas para este polipéptido. La primera de ellas corresponde a la proteasa serínica localizada hacia la región N-terminal de NS3 que actúa desde el extremo C-terminal cortando en los sitios de unión para las proteínas no estructurales definidos como NS3-NS4a, NS4a-NS4b, NS4b-NS5a, NS5a-NS5b (Grakoui et al., 1993a; Bartenschlager et al., 1994; Lin et al., 1994b). La otra actividad de proteasa comprende parte del extremo C-terminal de NS2 y se expande hasta la región que contiene el dominio catalítico ubicado en la misma proteína NS3. Como se mencionó anteriormente, esta actividad catalítica parece depender de Zinc y es responsable del desdoblamiento de la porción N-terminal de NS3 (Grakoui et al., 1993b; Hijikata et al., 1993). Recientemente se ha sugerido que NS3 pudiera igualmente ejercer una

función regulatoria de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), modulando de esta forma ciertos eventos de transducción de señales intracelulares. Más específicamente, dicha proteína podría actuar como un factor inhibidor de la actividad de PKA controlando los procesos de proliferación celular (Borowski et al., 1996). Se requiere, sin embargo, de un mayor número de estudios para confirmar dicho papel funcional. En resumen, se describen para la proteína NS3 tres actividades enzimáticas: proteasa serínica dependiente de Zinc, enzima enlazadora de nucleótidos trifosfatos (NTPasa) y ARN helicasa. Una descripción de los sitios de corte para esta enzima en la poliproteína viral se señalan en la figura 2.

La región NS4 del genoma del VHC se divide en dos subregiones designadas NS4A y NS4B cuyos productos presentan un tamaño molecular de 4 y 30 KDa respectivamente. Poco es conocido acerca de las funciones de estos dos polipéptidos. NS4A es una proteína hidrofóbica de 54 aminoácidos que parece actuar como co-factor proteico para la actividad de proteasa serínica asociada a NS3, facilitando el anclaje de esta proteína a la membrana del retículo endoplasmático (Hijikata et al., 1993b). A su vez, NS4A estabiliza el producto del polipéptido NS3 e incrementa la eficiencia de corte de la enzima en los sitios NS4b/NS5a (Satoh et al., 1995). Adicionalmente, se postula que NS4A interacciona con NS5A regulando el proceso de fosforilación de esta proteína (Tanji et al. 1995). En lo que respecta al polipéptido NS4B, poco es conocido en relación a sus características funcionales pero se piensa que es una proteína hidrofóbica asociada a la membrana plasmática que pudiera formar parte del complejo de la replicasa viral (Hijikata et al., 1993b).

La región NS5 del genoma del VHC contiene la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN necesaria para la replicación viral. Esta región también ha



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

sido subdividida en las subregiones NS5A y NS5B, las cuales codifican para productos de 58 y 68 KDa de peso molecular respectivamente. Para la región NS5A se han identificado dos fosfoproteínas, p56 y p58, que muestran distinto grado de fosforilación, siendo p58 mayormente fosforilada que p56. Análisis detallados de estos productos han permitido establecer que ambas fosfoproteínas corresponden a un mismo polipéptido de 49 KDa de peso molecular, el cual es fosforilado de manera diferencial durante eventos post-traduccionales (Kaneko et al., 1994). Así mismo, la hiperfosforilación de p58 parece ser dependiente de la presencia de la proteína NS4A.

Aunque la función del producto de la región NS5A no es del todo conocida, se postula que su actividad pudiera estar modulada por eventos de hipo o hiper fosforilación de dicha proteína catalizados por una cinasa de origen celular (Kaneko et al., 1994). Adicionalmente, se ha sugerido que esta actividad de proteína cinasa pudiera estar asociada a la misma proteína NS5A aunque las evidencias que se tienen hasta el presente no son concluyentes (Reed y Rice, 1999). La proteína NS5B contiene la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN como queda evidenciado por la presencia de la secuencia motivo Gly-Asp-Asp en este polipéptido que es característica de muchas polimerasas (Grakoui et al., 1993; Argos, 1988). Otras secuencias motivo de importancia funcional para este tipo de replicasas han sido también identificados en la proteína NS5B (Argos, 1988; Beach y Bradley, 1990; Grakoui et al., 1993). Se piensa que el proceso de replicación del VHC está gobernado por un complejo proteico en el que participarían de manera coordinada los polipéptidos NS4B, NS5A y NS5B. A su vez, la asociación entre estos tres polipéptidos estaría mediada por la interacción con las proteínas

NS3 y NS4A (Hijikata et al., 1993b). Estos representan aspectos funcionales que actualmente se encuentran en etapa de investigación.

Replicación del VHC

Hasta el presente poco es conocido en relación al mecanismo de replicación del VHC. En virtud de que dicho virus es considerado un miembro de la familia *Flaviviridae*, se piensa que su replicación es llevada a cabo a través de eventos que involucran la generación de moléculas intermediarias de ARN con polaridad inversa al ARN genómico, siendo crítico en dicho proceso de replicación la actividad de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (Fong et al., 1991; van Doorn, 1994, Reed y Rice, 1999). El abordaje experimental de este aspecto de la biología molecular del VHC se ha visto parcialmente limitado, debido a la falta de sistemas de cultivo celulares que soporten de manera eficiente la replicación del virus y a los bajos niveles de ARN viral identificados tanto en el tejido hepático como en muestras de suero. Con la incorporación de metodologías altamente sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) así como variantes de la técnica de hibridación *in situ*, este problema ha sido parcialmente subsanado permitiéndose así identificar cantidades verdaderamente ínfimas de ARN viral en cualquier tipo de tejido. De esta manera, diversos estudios han reportado secuencias de ARN del VHC con polaridad inversa al ARN genómico tanto en tejido hepático como en células leucocitarias humanas sugiriendo ello la presencia de intermediarios replicativos del virus en dichos compartimientos celulares (Fong et al., 1991, Takehara et al., 1992, Müller et al., 1993, Lanford et al., 1994, Cribier et al., 1995, Corado et al., 1997, Toro et al., 1998).

Como se mencionó anteriormente, por analogía con otros miembros de la familia *Flaviviridae*, se cree que la replicación del VHC es llevada a cabo

en el citoplasma de la célula hospedera. El primer evento en el proceso de infección es la interacción del virus con la membrana plasmática, un mecanismo poco conocido hasta el presente en el que se cree participan receptores celulares que interaccionan de manera directa o indirecta con el virus. La evidencia experimental sugiere que tales receptores podrían estar representados por la molécula CD81 (Pileri et al., 1998) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Agnello et al., 1999). Una vez que el virus penetra a la célula a través de un proceso de endocitosis, el virión es decapsidado en el citoplasma liberando el ARN viral, el cual es posteriormente desenrollado por la acción de la NTPasa/helicasa y transcrito por la actividad de la replicasa viral (ARN polimerasa dependiente de ARN). Este proceso genera el ARN viral de polaridad inversa (intermediario replicativo) el cual sirve de molde para la generación de múltiples copias del ARN genómico, de nuevo, a través de la actividad de la replicasa viral. Finalmente se lleva a cabo el proceso de ensamblaje de las nuevas copias del ARN viral con las proteínas estructurales y no estructurales recién sintetizadas a nivel del retículo endoplásmico rugoso. Este proceso de síntesis, ensamblaje y secreción del virión se realiza a través de la vía secretora de la célula hospedera (Major y Feinstone, 1997; Reed y Rice, 1999). El mismo se representa esquemáticamente en la figura 3.

Variabilidad genética del VHC

Desde su aislamiento y caracterización inicial, el VHC ha sido extensamente estudiado a nivel molecular, lográndose identificar, hasta el presente diferentes aislados virales provenientes principalmente de las regiones de Norte América, Japón y Europa (Houghton et al., 1991, van Doorn, 1994, Dusheiko y Simmonds, 1994; Simmonds, 1995). La caracterización detallada de estos aislados virales, en base a ensayos de

neutralización o las propiedades citopáticas del virus, se ha visto un tanto limitada debido a la falta de un sistema de cultivo celular capaz de mantener la replicación viral. Es así como actualmente se propone un sistema de clasificación para el VHC basado en las características estructurales del virus y específicamente, en las diferencias que, a nivel de las secuencias nucleotídicas, existen entre los distintos aislados virales. Diversas estrategias metodológicas se han desarrollado para la caracterización y clasificación de estos genotipos virales. Estos procedimientos comprenden las técnicas de doble PCR, empleando oligonucleótidos tipo específicos, PCR combinada con análisis de polimorfismo en los fragmentos de restricción o RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") y secuenciación directa del genoma viral (Okamoto et al., 1992 b; Simmonds, 1993, Dusheiko y Simmonds, 1994). Con la aplicación de esta serie de estrategias metodológicas se han propuesto distintos sistemas de clasificación para los genotipos del VHC. A fin de establecer un consenso se ha llegado a proponer un sistema único de clasificación que agrupa a todas las variantes virales en 6 genotipos principales con 12 subtipos o subgenotipos (Dusheiko y Simmonds, 1994). Los tipos o genotipos principales son designados con números arábigos del 1 al 6 y los subtipos o subgenotipos con letras minúsculas, a, b, c, etc. en orden de descubrimiento. Se piensa que este representa un sistema de clasificación más coherente y uniforme, el cual se irá definiendo con mayor precisión en la medida que se obtenga mayor información sobre las secuencias nucleotídicas de los aislados virales hasta ahora identificados, así como de los que están por identificarse (Dusheiko y Simmonds, 1994).

Algunas de las variantes del VHC hasta ahora identificadas muestran un amplio patrón de distribución geográfica, como es el caso del genotipo 1, mientras que



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

otras se circunscriben exclusivamente a ciertas regiones del mundo. Así por ejemplo, en algunas regiones de Estados Unidos y Europa Occidental se reporta el predominio de los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b y 3a; en Japón de los genotipos 1b, 2a y 2b, mientras que en la región de África del Sur el genotipo 5a parece ser el predominante (Dusheiko y Simmonds, 1994)

En la actualidad, la identificación de genotipos virales y su relación con las características clínico-patológicas del individuo infectado representa una de las áreas de investigación más interesantes en la infección por el VHC. Algunos estudios sugieren la existencia de una relación entre el genotipo viral y el grado de severidad de la enfermedad hepática, así como su respuesta a tratamientos antivirales (Dusheiko y Simmonds, 1994). Así por ejemplo, un mayor número de casos de cirrosis parece asociado a la infección por el genotipo viral 1 y más específicamente el subtipo 1b. Estos hallazgos, sin embargo, deben ser considerados con precaución ya que el genotipo 1 es igualmente el que se encuentra mayormente distribuido a nivel mundial (Okamoto y Mishiro, 1994). Otro aspecto en este modelo de infección que parece estar relacionado con las características del genotipo viral se refiere a la respuesta diferencial que muestran individuos infectados frente a drogas anti-virales como el interferón alfa. Al parecer, esta respuesta no sólo es dependiente del grado de viremia del paciente sino también del genotipo viral predominante en la infección (Yoshioka et al., 1992; Gerolami et al., 1993). En los pacientes infectados con el genotipo 1 existe una respuesta al interferón alfa de corta duración, comparada con la respuesta de pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 la cual es más prolongada (Yoshioka et al., 1992; Okamoto y Mishiro, 1994; Iino et al., 1994). Esto parece indicar que entre estas tres variantes virales, el genotipo 1 resulta ser el menos sensible al

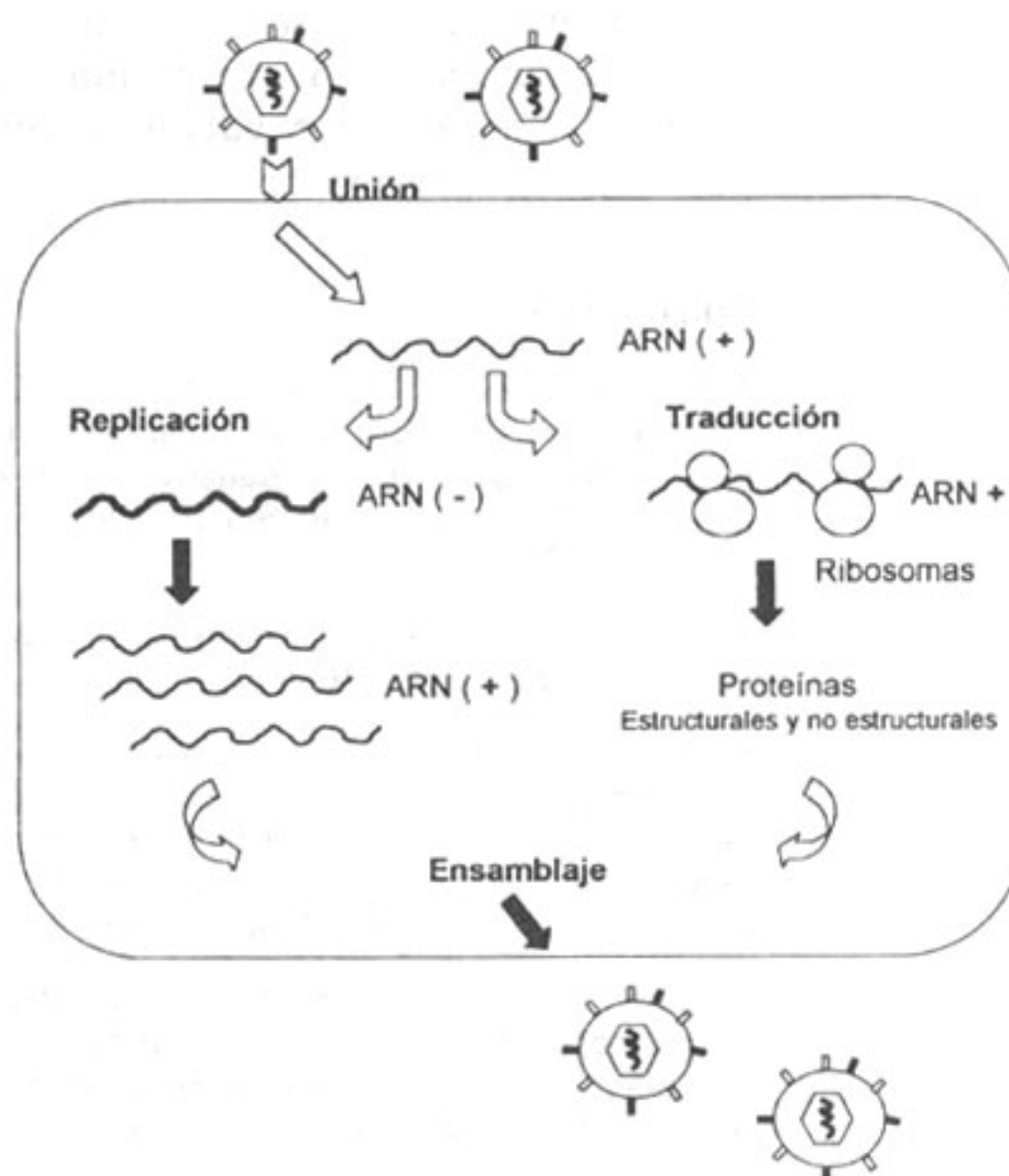


Figura 3

Diagrama que representa el modo de replicación que se propone para el VHC.

tratamiento con Interferón. Esta serie de observaciones representan aspectos muy interesantes en la biología del VHC que requieren de mayor investigación, lo cual será fundamental para el mejor entendimiento de la fisiopatología de la infección, así como para el establecimiento de estrategias terapéuticas más efectivas y seguras para el tratamiento y prevención de esta infección viral.

Consideraciones finales

Actualmente, el establecimiento de sistemas de cultivo celulares que soporten adecuadamente la replicación del VHC representa uno de los principales objetivos en el estudio de la biología molecular de este virus. Tales sistemas permitirán no solo evaluar en detalle las características funcionales de los distintos productos virales sino también analizar los mecanismos y procesos moleculares que regulan la actividad replicativa del virus. Así mismo, se podrá estudiar el efecto y mecanismo de acción de diferentes agentes anti-virales y se permitirá

evaluar, mediante ensayos de neutralización *in vitro*, la efectividad de posibles candidatos a vacunas como estrategia de prevención.

BIBLIOGRAFÍA

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. y Zhang QX.: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:12766-12771.

Argos, P.: A sequence motif in many polymerases. *Nuc. Acids. Res.* 1988; 16: 9909-9916.

Bartenschlager, R. L., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. y Jacobsen, H.: Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* 1993; 67: 3835-3844.

Bartenschlager, R. L., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. y Jacobsen, H.: Kinetic and structural analysis of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 1994; 68: 5045-5055.

Beach, M. J. y Bradley, D. W.: Putative nonstructural region of hepatitis C virus. En *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Hollinger, F. B., Lemon, S. M. and Margolis, H. S. (Editores). Baltimore. Williams and Wilkins. 1990; pp 376-381.

Borowski, P., Heiland, M., Oehlmann, K., Becker, B., Kornetzky, L., Freucht, H. y col. Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by camp-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 1996; 237: 611-618.

Bradley, D. W., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C. y Cook, E. H. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J. Med. Virol.* 1991; 34: 26-28.

Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L.-H. y Lemon, S. M. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nuc. Acids. Res.* 1992; 20: 5041-5045.

Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. y Houghton, M. Isolation of a cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244: 359-362.

Choo, Q.-L., Weiner, A.J., Overby, L.R., Kuo, G., Houghton, M., y Bradley, D.W.: Hepatitis C Virus: the major causative agent of viral non-A, non-B, hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1990; 46: 423-421.

Choo, Q.-L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Gallegos, D., Coit, D., y cols.: Genetic organization and diversity of the Hepatitis C Vi-

rus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 2451-2455.

Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychofski, C., Dubuisson, J.: A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Virol.* 1998; 72: 2183-2191.

Corado, J. Toro, F.I.; Rivera, H., Bianco N.E.; Deibis, L. J. B., De Sanctis: Impairment of NK cytotoxic activity in hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 109: 451-457.

Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A. y Keller, F.: *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 2485-2491.

Dusheiko, G. y Simmonds, P.: Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *Journal of Viral Hepatitis.* 1994; 1: 3-15.

Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. y Holland, P.V.: Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* 1975; 292: 767-770.

Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kaimura, T., Alter, H.J., London, W. T. y Purcell, R. H.: Inactivation of hepatitis B virus and Non-A, Non-B hepatitis by Chloroform. *Infect. Immun.* 1983; 41: 816-821.

Fong, T.-L., Shindo, M., Feinstone, S.M., Hoofnagle, J.H. y Di Bisceglie, A.M.: Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J. Clin. Inv.* 1991; 88: 1058-1060.

Gerolami, V., P. Halfon, M. Bourliere, H. Khiri, P. Reynier, P. P. Garnier, I. y cols.: Hepatitis C Virus Genotypes in Chronic Hepatitis and Response to Interferon- α Therapy. *J. Infect. Dis.* 1993; 168: 1328-1329.

Grakoui, A., Wychowsky, C., Lin, C., Feinstone, S. M. Y Rice, C. M.: Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 1993; 67: 1385-1395.

Han, J.H., Shyamala, V., Richman, K.H., Brauer, M.J., Irvine, B., Urdea, M.S., y col.: Characterization of the terminal region of the hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences of the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 1711-1715.

Han, J.H. y Houghton, M.: Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication. *Nuc. Acids. Res.* 1992; 20: 3520.

He, L.-F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J. y Purcell, R.H.: Determining the size of Non-A,



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

- Non-B hepatitis virus by filtration. *J. Infect. Dis.* 1987; 156: 636-640.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., y Shimothono, K.: Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 5547-5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N. Kato, N. y cols.: Two distinct proteinase activities required for the procesing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* 1993a; 67: 4665-4675.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, y cols.: Proteolytic processing and membrane association of putative non-structural proteins of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993b; 90: 107773-107777.
- Lino, S., Hino, K., Yasuda, K.: Current state of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intervirology.* 1994; 37: 87-100.
- Jang, S. K., Davies, M. V., Kaufmen, R.J., y Wimmer, E.: Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' non-translated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J. Virol.* 1989; 63: 1651-1660.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K. y Shimotohno, K.: Production of two phosphoprotein from the NS5 region of the hepatitis C viral genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205: 320-326.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., y col.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome isolated from Japanese patients with Non-A, Non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 9524-9528.
- Kiyosawa, K. y Tanaka, E.: GB Virus C/ Hepatitis G virus. *Intervirology.* 1999; 42: 185-195.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. y Rice, C. M.: Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 1996; 70: 3363-3371.
- Kuo, G., Choo, Q.-L., Alter, H.J., Gitnick, G.I., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T. et al.: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989; 244: 362-364.
- Kurosaki, M., Enomoto, N., Marumo, F. y Sato, C.: Rapid sequence variation of the hyper-variable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology.* 1993; 18: 1293-1299.
- Lanford, L. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R. y Fuerst, T. R.: Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology.* 1994; 606-614.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragal, B. M., McCourt, D. W. y Rice, C. M.: Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: Identification of p7 and two distinct E2 products with different C termini. *J. Virol.* 1994a; 68: 5063-5073.
- Lin, C., Pragal, B. M., Grakoui, A., Xu, J., y Rice, C. M.: Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: Trans-cleavage requirement and processing kinetics. *J. Virol.* 1994b; 68: 8147-8157.
- Major, M. E. y Feinstone, S. M.: The Molecular Virology of Hepatitis C Virus. *Hepatology.* 1997; 25: 1527-1538.
- Matsuura, Y., Harada T., Makimura, M., Sato, M., Aizaki, H., Suzuki, T., y col.: Characterization of HCV structural proteins expressed in various animals cells. *Intervirology.* 1994; 37:114-118.
- Miller, R.H., y Purcell, R.H.: Hepatitis C Virus share aminoacid sequence similarity with Pestivirus and Flavivirus as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 2057- 2061.
- Miyamoto, H., Okamoto, H., Sato, K., Tanaka, T., Mishiro, S.: Extraordinary low density of hepatitis C virus estimated by sucrose gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 715-718.
- Miyamura, T.; Saito, I.; Katayama, T.; Kikuchi, S.; Tateda, A.; y cols. et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: aplication to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 983-987.
- Müller, H. M., Pfaff, E., Goeser, T. Kallinowski, B., Solbach, C. y Theilmann, L.: Peripheral Blood Leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 669-676.
- Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H. Y Purcell, R. H.: Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 3392-3396.
- Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Yotsumoto, T., Tamaka, T., Yoshizawa, H. y cols.: The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn. J. Exp. Med.* 1990; 60: 215-222.
- Okamoto, H., Sugiyama, Y., Okada, S., Kurai, K., Akahane, Y., Sugai, Y. y cols.: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 673-679.
- Okamoto, H. y Mishiro, S.: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology.* 1994; 37: 68-76.
- Pelletier, J., y Sonenberg. Internal initiation of translation of eukaryotic directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature (London).* 1988; 334: 320-325.

- Pileri, P., Uematsu, Y., Compagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R. y cols. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998; 282: 938-941.
- Reed, K. E. y Rice, C. M. Overview of Hepatitis C Virus Genome Structure, Polyprotein Processing and Protein Properties. En *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Hagedorn, C.H. and Rice, C. M. editors. Springer, Berlin, 1999.
- Santolini, E., Pacini, E., Fipaldini, C., Migliaccio, G., y La Mónica, N. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* 1995; 69: 7461-7471.
- Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K. and Shimotohno, K. The N-terminal region of hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3) is essential for stable complex formation. *J. Virol.* 1995; 69: 4255-4266.
- Schiff, E. R., De Medina, M. y Khan, R. S. New perspectives in the diagnosis of Hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*. 1999; 19: 3-14.
- Simmonds, P., Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. y cols. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic of the NS-5' region. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 2391-2399.
- Simmonds, P. Variability of Hepatitis C Virus. *Hepatology*. 1995; 21: 570-583.
- Smith, D. B., Mellor, J., Jarvis, L. M., Davidson, F., Kolberg, J., Urdea, M., y col. and The International HCV Collaborative Study Group. Variation of the hepatitis C virus non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *J. Gen Virol.* 1995; 76: 1749-1761.
- Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J. y cols. Structure and Organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 1991; 65: 1105-1113.
- Takehara, T., Hayashi, N., Mita, E., Hagiwara, H., Ueda, K., Katayama, K. y cols. Detection of the minus strand of Hepatitis C Virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: Implications for Hepatitis C Virus replication in infected tissue. *Hepatology*. 1992; 15: 387-390.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, K. Phosphorylation of hepatitis C virus encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* 1995; 69: 3980-3986.
- Toro, F. I., Conesa, A., Garcia, A., Bianco, N. E., De Sanctis, J. Increased peroxide production by polymorphonuclear cells of chronic HCV-infected patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1998; 88: 169-175.
- van Doorn, L-J. Molecular Biology of the hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 1994; 43: 345-356.
- Wang, C., Sarnow, P. y Siddiqui, A. Translation of human hepatitis C virus in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* 1993; 67: 3338-3344.
- Wang, C., Sarnow, P., Siddiqui, A.: A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 1994; 68: 7301-7307.
- Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T. Itoh, Y., Takayanagi, M. y cols. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*. 1992; 16: 293-299.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Biología molecular
del virus
de Hepatitis C