

Replicones subgenómicos del virus de la hepatitis C (VHC): nuevas expectativas para la profilaxis y el tratamiento de la hepatitis C

F. Puig-Basagoiti y Juan Carlos Sáiz

Hepatología. Institut de Malalties Digestives. IDIBAPS. Hospital Clínic. Barcelona.

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) afecta a unos 200 millones de personas en todo el mundo. En alrededor del 80% de los casos no se logra superar la infección, de modo que ésta persiste dando lugar a hepatitis crónica que, con el transcurrir de los años, puede llegar a originar cirrosis y/o hepatocarcinoma en un número considerable de pacientes¹⁻³.

Hasta el año pasado, el único fármaco legalmente autorizado en nuestro país para el tratamiento de la hepatitis C crónica era el interferón (IFN), cuya eficacia es muy inferior a la deseable⁴. El porcentaje de curación no sobrepasa el 20-30% de los pacientes tratados, siendo sensiblemente inferior en los pacientes infectados con el VHC de genotipo 1b⁴, el más frecuente en nuestro país⁵. En la actualidad, y a pesar de que las proporciones de curación han mejorado ostensiblemente con la introducción de la terapia combinada con ribavirina, así como con las nuevas formulaciones y pautas de administración del tratamiento, aún se está lejos de disponer de una terapia completamente eficaz⁶. Si a todo ello añadimos los efectos secundarios que en algunos casos presentan estas terapias, así como sus elevados costes económicos, es fácil entender que se siga poniendo mucho empeño en el diseño de nuevas alternativas terapéuticas más eficaces y en la determinación de posibles factores capaces de predecir el tipo de respuesta que se va a obtener en cada uno de los pacientes⁷.

Durante el proceso de edición del artículo se han obtenido nuevas construcciones con el genoma completo del VHC (incluyendo los genes correspondientes a las proteínas estructurales) y un marcador de selección, que son capaces de replicar *in vitro*, si bien aún no existen evidencias de la producción de virus usando dichas construcciones.

Correspondencia: Dr. J.C. Sáiz.
Unidad de Hepatología. Hospital Clínic.
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
Correo electrónico: jcsaiz@medicina.ub.es

Recibido el 3-9-01; aceptado para su publicación el 3-9-01.

(*Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 506-510)

Desgraciadamente, la falta de un cultivo celular o de modelos animales capaces de mantener la replicación del VHC y que, por tanto, permitan el estudio de sus mecanismos de infección, replicación y patogenicidad, dificulta enormemente el desarrollo de nuevas alternativas para la profilaxis y el tratamiento de la hepatitis C.

El VHC es el único componente del género *hepacivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*⁸. Su material genético está constituido por un ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y polaridad positiva, de unos 9.600 nucleótidos, que codifica una única poliproteína de, aproximadamente, 3.000 aminoácidos (fig.1). El ARN del VHC presenta una única pauta de lectura abierta (ORF), en cuyos extremos 3' y 5' se localizan dos regiones que no son traducidas (NTR). La poliproteína viral es procesada por proteasas, tanto celulares como del propio virus, obteniéndose 10 productos diferentes: el core (C), las proteínas E1 y E2 de la envuelta, el péptido p7 y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. (Para una revisión sobre la biología molecular del VHC véanse los trabajos de Forns y Bukh⁹ y Reed y Rice¹⁰.)

Una de las características propias de los virus ARN, de los que forma parte el VHC, es la ausencia de capacidad correctora de su ARN polimerasa dependiente de ARN, lo que origina la producción continua de variantes virales, y dota al VHC de la estructura característica de una cuasiespecie¹¹. (Domingo¹², Domingo et al¹³ y Forns et al¹⁴ realizan revisiones sobre la estructura de cuasiespecies y sus implicaciones en las infecciones virales.) A lo largo de la historia, la heterogeneidad genética generada durante la replicación del VHC ha dado lugar a la aparición de 6 genotipos y numerosos subtipos, los cuales presentan distintas características evolutivas, patogénicas y de respuesta al tratamiento⁹.

Como ya se ha esbozado anteriormente, uno de los principales inconvenientes para el estudio y control de las infecciones producidas por el VHC es la falta de un sistema *in vitro* o *in vivo* capaz de mantener la replicación del virus. Aunque se ha descrito la detección de replicación del

VHC en varios sistemas celulares, tanto de origen humano como no humano, en ningún caso dicha replicación ha sido suficiente como para poder llevar a cabo estudios concluyentes¹⁵. Como consecuencia de ello, la mayoría del ciclo biológico del VHC sigue siendo completamente desconocida.

Dada la larga duración que normalmente presentan las enfermedades causadas por la infección con el VHC, así como el desconocimiento que se suele tener sobre el momento exacto de la infección, y a pesar de los numerosos estudios realizados con muestras obtenidas de pacientes con hepatitis C, pocos son los conocimientos que se tienen en la actualidad sobre los mecanismos propios del virus y/o del hospedador implicados en la patogenia y el tratamiento de dichas infecciones.

Hasta la fecha, el chimpancé es el único modelo animal capaz de ser infectado por el VHC y desarrollar infecciones persistentes, aun en presencia de una respuesta inmune humoral y celular parecida a la desarrollada en humanos. Además, los chimpancés presentan manifestaciones clínicas e histopatológicas que también se asemejan a las que aparecen en humanos. Sin embargo, a pesar de su enorme utilidad, este modelo animal presenta varios inconvenientes, como su elevado coste económico y la escasez de laboratorios acondicionados para su mantenimiento y manipulación, que hacen que la búsqueda de nuevos modelos alternativos para el estudio de las infecciones originadas por el VHC sea una prioridad absoluta en este campo.

Con la excepción de los chimpancés, la infección con el VHC no se ha podido establecer en ningún otro primate, y los resultados obtenidos con otros modelos animales distintos al ya citado han sido contradictorios, sin que hasta la fecha existan evidencias claras de que puedan ser infectados con el VHC¹⁶. Obviamente, uno de los modelos animales ideales sería el murino; sin embargo, el VHC no infecta a los ratones. De cualquier modo, durante los últimos años se han llevado a cabo diversos intentos tanto para obtener ratones transgénicos, como modelos murinos en los que se realiza un xenotrasplante de células hepáticas humanas o de chimpancé, que permitirían el estudio de los efectos patogénicos de algunas de las proteínas virales, pero, de nuevo, los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación han sido contradictorios o son muy preliminares como para aventurar el futuro de estas técnicas¹⁶.

La obtención de clones infecciosos del VHC por parte de dos grupos de investigación abrió grandes expectativas^{17,18}. Los clones infecciosos consisten en copias de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del ARN completo del virus. Estos ADNc, al ser transcritos *in vitro*, dan lugar a moléculas completas del ARN del VHC que, cuando se inoculan directamente en el hígado de chimpancés, provocan una infección similar a la obtenida cuando se inyecta directamente el virus. La disponibilidad de estos clones infecciosos ha permitido mejorar nuestros conocimientos sobre algunos de los mecanismos moleculares implicados en la infección con el VHC. Sin embargo, la necesidad de inocular chimpancés representa

una gran limitación, tal y como se ha expuesto anteriormente. Los intentos fallidos para lograr una replicación capaz de producir virus infecciosos *in vitro*, utilizando estos clones, pueden haberse debido tanto a una posible toxicidad de las proteínas estructurales del virus, cuando éstas son producidas en cantidades elevadas, como a algún problema específico de las líneas celulares en las que se han intentado dichos experimentos¹⁵.

Los resultados relativamente insatisfactorios alcanzados hasta la fecha con los clones infecciosos han llevado al desarrollo de estrategias alternativas, incluyendo la obtención de replicones subgenómicos. Éstos son fragmentos del genoma que, aun careciendo de parte de la información contenida en el ARN del virus, mantienen todos los genes necesarios para autorreplicarse, es decir, los de las proteínas y los de los elementos genómicos propios del virus que son necesarios para la replicación y traducción. De este modo, son capaces de producir nuevas moléculas subgenómicas que, a su vez, pueden continuar replicándose, aunque no son capaces de originar virus completos infecciosos.

Los replicones subgenómicos del VHC que se han obtenido de forma reciente^{19,20} son capaces de replicarse en líneas celulares de hepatoma humano (HuH7) de uso habitual en los laboratorios, lo que abre grandes expectativas para la obtención de un sistema *in vitro* de replicación completa del VHC. Además, este tipo de ARN subgenómico puede generarse en cantidades prácticamente ilimitadas y en él se pueden introducir modificaciones para el análisis genético de diversas funciones esenciales del ciclo biológico del virus.

Para la obtención del primer replicón subgenómico del VHC, el grupo de R. Barstenschlager (Institute for Virology, Johannes-Gutenberg University Mainz, Alemania) utilizó como material de partida el ARN total obtenido del explante de un paciente con hepatitis C crónica sometido a trasplante hepático¹⁹. La estrategia seguida consistió en la obtención, mediante retrotranscripción (RT) del ARN y posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de 2 clones moleculares de ADNc que se solapaban, y que contenían la secuencia consenso completa del ORF del VHC. Estos dos clones fueron posteriormente ensamblados en una única molécula a la que se añadieron, por separado, las dos regiones no codificantes de los extremos 5' y 3'. El ADNc obtenido se introdujo en un vector de expresión (pCR2.1) que contenía el promotor de T7 para, tras su linearización, poder ser transcrito *in vitro*. A pesar de esta compleja estrategia, tras realizar los primeros experimentos no se logró detectar replicación viral en las líneas celulares transfectadas en las que se habían introducido los replicones. Estos resultados desalentadores se achacaron a diversas causas, tales como: a) errores en la secuencia del replicón, de manera que durante el proceso de clonación se hubieran introducido mutaciones que lo hacían inviable; b) baja efectividad de transfección; c) citopatogenicidad propia de los productos víricos sobre las células empleadas, y d) baja permisividad o baja capacidad de replicación en las líneas celulares utilizadas. En vista de los resultados obtenidos, se decidió manipular

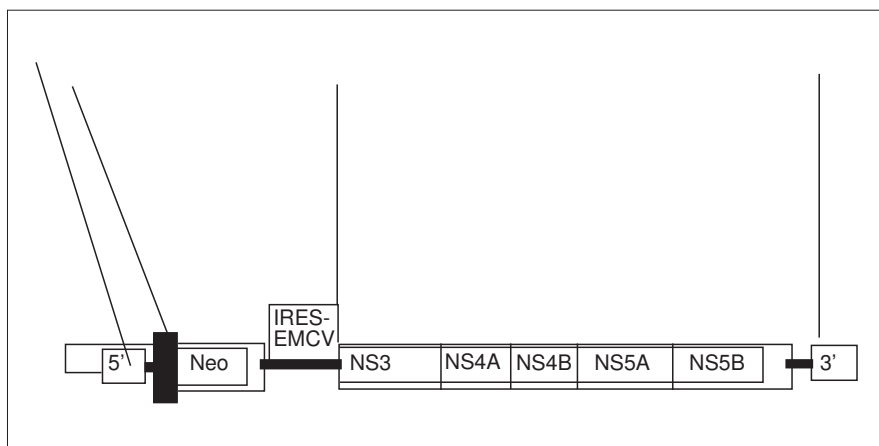


Fig. 1. Representación esquemática del genoma del virus de la hepatitis C (VHC) y del diseño de los replicones subgenómicos en los que se ha sustituido la región correspondiente a las proteínas estructurales por un gen de resistencia a antibióticos y por el IRES (sitio interno de entrada del ribosoma) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV).

los replicones para introducir en ellos un gen de resistencia a un fármaco (en este caso la neomicina, G418) y eliminar la región que codifica los genes estructurales. De esta manera, tras transfectar células HuH7 con estos replicones subgenómicos, y en presencia del fármaco en el medio de cultivo, sólo crecerían aquellas células en las que el replicón del VHC se estuviera replicando de forma eficaz y, por tanto, estuviera dotando a las células de resistencia al antibiótico. Sin embargo, esta estrategia experimental implicaba la obtención de construcciones bicistrónicas en las que, tras la región 5' no codificante del VHC (que incluye el sitio interno de entrada al ribosoma, IRES²¹), se situara el gen de resistencia a la neomicina y, a continuación, para poder dirigir la transcripción de las proteínas no estructurales del replicón, la región del IRES del virus de la encefalomiocarditis, EMCV (fig. 1).

Los IRES son segmentos de ARN con una estructura secundaria compleja y relativamente poco flexible, que dirigen la traducción de los ARN que carecen de «cap» en su extremo 5', como ocurre en el caso del VHC²². Mediante esta estrategia, es posible favorecer la traducción del ARN del virus en situaciones en las que el proceso de traducción mediado por las estructuras «cap» que se encuentran en la mayoría de los ARN mensajeros celulares está disminuido o inhibido.

El desarrollo de este tipo de construcciones bicistrónicas subgenómicas permitió obtener líneas celulares en las que la replicación de los replicones se mantenía a niveles elevados, si bien el rendimiento del proceso de obtención de este tipo de líneas celulares era muy bajo¹⁹. El análisis posterior de las secuencias de los replicones obtenidos a partir de células transfectadas en presencia de neomicina permitieron detectar la aparición de mutaciones que les conferían una eficacia de replicación claramente superior²⁰.

En la actualidad, también se han obtenido construcciones monocistrónicas en las que se ha eliminado la presencia del IRES del EMCV, y se ha sustituido el gen de resistencia a la neomicina por el de resistencia a la higromicina²³. Tras la optimización de los replicones subgenómicos del VHC, los grupos de investigación se aprestan a desarrollar diversas líneas de investigación que permitan adentrarse en los mecanismos de patogenicidad del VHC y de

su resistencia a las terapias, así como en el diseño de nuevos fármacos y estrategias de vacunación.

En la actualidad, ya se han logrado líneas celulares que son capaces de mantener la replicación *in vitro* de los replicones subgenómicos del VHC durante más de un año²⁴. Gracias a ello, ha sido posible deducir que los replicones del VHC no inducen ningún efecto citopático visible en las células en las que replican, ni alteran las propiedades de crecimiento de las mismas. Estos datos apoyan la teoría de que la mayoría del daño celular que se produce en una infección natural por VHC se debe a la acción directa del sistema inmune del propio individuo infectado. El mismo grupo ha relacionado el grado de replicación y/o traducción del replicón del VHC con el crecimiento de la célula huésped, sugiriendo que la replicación viral depende de uno o varios factores celulares que pueden variar en concentración y/o actividad a lo largo del ciclo de crecimiento celular. Asimismo, mediante inmunomicroscopia electrónica, también han observado que la mayoría de las proteínas del VHC se localizan junto con las membranas del retículo endoplásmico, lo que indica que muy probablemente éste es el lugar donde ocurre la replicación del genoma viral.

Otro de los aspectos claves de los estudios realizados hasta la fecha con los replicones del VHC ha sido la búsqueda de mutaciones adaptativas que confieran ventajas a los replicones. En este aspecto, se ha observado que, tras la adaptación de los replicones al cultivo celular, se detectaban mutaciones puntuales en prácticamente todas las proteínas no estructurales, pero no así en las regiones 5' y 3' no codificantes²⁵. En el mismo estudio se describe que la presencia de una única mutación en la región de la ARN polimerasa (NS5B) logra aumentar más de 1.000 veces el rendimiento en la obtención de colonias capaces de mantener la replicación de los replicones. Del mismo modo, la presencia de dos mutaciones en la región NS3 parece tener un efecto sinérgico con una mutación localizada en la región NS5A, de modo que también se observan valores superiores de replicación²⁶.

Finalmente, cabe destacar que todos los laboratorios implicados en estos estudios han detectado mutaciones adaptativas en la región NS5A^{20,25,26}. Aunque la función

de la proteína NS5A *in vivo* aún no se ha desvelado por completo, parece claro que desempeña un papel importante en la regulación de la replicación y que interacciona con diversas funciones celulares (Pawlotsky y Germanidis²⁷ realizan una revisión más completa sobre las funciones de la NS5A).

En 1996, Enomoto et al²⁸ describieron la presencia en la NS5A de una región, a la que denominaron región de sensibilidad al IFN (ISDR), que parecía estar directamente relacionada con la respuesta al tratamiento con IFN observada en los pacientes infectados por el VHC de genotipo 1b. Esta relación era dependiente de la secuencia de aminoácidos de dicha región. Aunque los numerosos estudios realizados hasta la fecha han dado lugar a resultados contradictorios^{7,27}, los datos obtenidos en nuestro laboratorio^{29,30} reprodujeron los resultados originales del grupo japonés. Además, también cabe destacar que un par de estudios recientes, en los que se han analizado de forma combinada la mayoría de los datos publicados hasta la fecha, confirman la relación entre la heterogeneidad genética de la NS5A y el tipo de respuesta obtenido en los tratamientos antivirales^{31,32}.

Al parecer, el mecanismo de resistencia al IFN mediado por la NS5A está relacionado, al menos parcialmente, con la inhibición de una proteincinasa celular (PKR) que interviene en la traducción de los ARN celulares³³. Además, muy recientemente, nuestro grupo ha observado que la presencia de mutaciones en la región de la NS5A que se une a la PKR celular es mayor en las cepas víricas obtenidas de pacientes con carcinoma hepatocelular que en las de los pacientes cirróticos que no han desarrollado tumor³⁴. La combinación de todos estos datos ha hecho que el estudio de los mecanismos de acción de esta proteína haya pasado a ser uno de los principales puntos de interés en nuestro campo. De cualquier modo, los datos obtenidos hasta la fecha sobre la importancia de la presencia de mutaciones en la NS5A de los replicones del VHC también han dado lugar a resultados contradictorios. Se ha descrito que replicones que carecen de la región ISDR de la NS5A continúan siendo sensibles a la acción del IFN²⁰ pero, también, que la obtención de líneas celulares resistentes a la acción de éste fármaco implica la aparición de mutaciones adaptativas que se localizan en la NS5A²³.

Por todo lo expuesto anteriormente, es de esperar que en los próximos años la manipulación de los replicones mediante la introducción de mutaciones específicas en sus secuencias, así como el análisis de las mutaciones adaptativas que adquieran los replicones en diversas condiciones de cultivo, permitan aumentar de forma considerable nuestros conocimientos sobre los mecanismos de acción del VHC.

Así pues, hasta que se obtenga un sistema con capacidad para mantener la replicación de los genomas completos del virus, la disponibilidad de replicones subgenómicos del VHC se presenta como una nueva alternativa para avanzar tanto en el estudio de diferentes aspectos del ciclo biológico del VHC, como en la búsqueda de fármacos terapéuticos específicos y de nuevas opciones para el desarrollo de vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez-Tapias JM, Barrera JM, Costa J, Ercilla MG, Pares A, Comalrena L et al. Hepatitis C virus infection in non-alcoholic chronic liver disease. *Ann Intern Med* 1990; 112: 921-924.
2. Forns X, Ampurdanés S. Clínica de las hepatitis virales: Hepatitis aguda. Hepatitis crónica. Carcinoma hepatocelular. *Enferm Infec Microbiol* 1995; 13: 71-83.
3. Forns X, Ampurdanés S, Sánchez-Tapias JM, Guilera M, Sans M, Sánchez-Fueyo A et al. Long-term follow-up of chronic hepatitis C in patients diagnosed at a tertiary-care center. *J Hepatol* 2001; 35 (2): 265-271.
4. Ampurdanés S, Forns X, Sánchez-Tapias JM. Tratamiento actual y perspectivas terapéuticas en la hepatitis crónica C. En: Soriano V, editor. Biblioteca de hepatitis. Barcelona: Permanyer, 2001. En prensa.
5. López-Labrador FX, Ampurdanés S, Forns X, Castells A, Saiz JC, Costa J et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 959-965.
6. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G et al. Randomised trial of interferon α -2b plus ribavirin for 48 weeks versus interferon α -2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352: 1426-1432.
7. Giménez-Barcons M, Tajahuerce A, Saiz JC. Valor predictivo de diversos factores virales en la respuesta al tratamiento con interferón en pacientes con hepatitis crónica C. *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 404-412.
8. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP et al. Classification and nomenclature of viruses: sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Viena: Springer-Verlag, 1995; 424-426.
9. Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* 1999; 4: 693-716.
10. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242: 55-84.
11. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
12. Domingo E. Virus en Evolución: una aproximación a la dinámica poblacional de los virus y al origen de nuevas enfermedades. Madrid: Eudema, 1994.
13. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martín-Hernández AM, Sáiz JC, Escarona C et al. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 521-527.
14. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 1999; 7: 402-410.
15. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81: 1631-1648.
16. Grakoui A, Hanson HL, Rice CM. Bad time for Bonzo? Experimental models of hepatitis C virus infection, replication, and pathogenesis. *Hepatology* 2001; 33: 489-495.
17. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997; 277: 570-574.
18. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SL, Bukh J et al. Transcript from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8738-8743.
19. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285: 110-113.
20. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-1974.
21. Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR et al. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* 1995; 14: 6010-6020.
22. Jackson RJ. A comparative view of initiation site selection mechanism. En: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, editores. Translational control. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996; 71-112.

23. Laxton C, Hobbs E, Fletcher S, Symons JA, Bartenschlager R, Graver R et al. Use of the HCV subgenomic replicon for the selection and characterization of variants with reduced susceptibility to interferon alpha-2a. *J Hepatol* 2001; 34 (Supl 1): 15.
24. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R et al. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001; 75: 1252-1264.
25. Lohmann V, Körner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001; 75: 1437-1449.
26. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001; 75: 4614-4624.
27. Pawlotsky JM, Germanidis G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepatol* 1999; 6: 343-356.
28. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 77-81.
29. Saiz JC, López-Labrador FX, Ampurdanés S, Dopazo J, Forns X, Sánchez-Tapias JM, Rodes J. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1998; 177: 839-847.
30. Puig-Basagoiti F, Saiz JC, Forns X, Ampurdanés S, Giménez-Barcons M, Franco S et al. Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2001. En prensa.
31. Witherell GW, Beineke P. Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 2001; 63: 8-16.
32. Schinkel J, Spaan WJM, Kroes ACM. Mutations in the NS5A gene and hepatitis C virus resistance to interferon: solving the controversy. *J Hepatol* 2001; 34 (Supl 1): 117.
33. Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; 230: 217-227.
34. Giménez-Barcons M, Franco S, Suárez Y, Forns X, Ampurdanés S, Puig-Basagoiti F et al. High amino acid variability within the NS5A of Hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b related cirrhosis. *Hepatology* 2001; 34: 158-167.