

Modelos de replicación *in vitro* del virus de la hepatitis C para la búsqueda de antivirales

In vitro models of hepatitis C virus replication for antiviral research

Eliana Castro*, Lucía Cavallaro†.

Recibido: 10/01/2013 Aceptado: 11/03/2013

RESUMEN

Palabras clave: virus de la hepatitis C, HCV, replicón, seudopartículas, HCVpp, HCVcc.

El virus de la hepatitis C (HCV) es una de las principales causas de enfermedades hepáticas crónicas. Actualmente, no existe una vacuna disponible para la prevención de las infecciones por HCV y la terapia antiviral, que consiste en la administración combinada de Interferón pegilado, ribavirina y los inhibidores de proteasa telaprevir o boceprevir (recientemente aprobados), es costosa y con efectos adversos significativos. El reducido número de antivirales disponibles para HCV está relacionado en gran medida con la falta de sistemas adecuados de cultivo *in vitro* para este virus. El desarrollo de modelos *in vitro* tales como distintos sistemas de infección, replicones subgenómicos y genómicos, producción de viriones infectivos y seudopartículas de HCV son hoy en día una herramienta importante, disponible para el desarrollo de nuevas drogas antivirales como así también para el estudio de la biología y la replicación del virus.

ABSTRACT

Key words: hepatitis C virus, HCV, replicon, pseudoparticles, HCVpp, HCVcc.

Hepatitis C virus (HCV) is one of the major causes of chronic liver diseases. Currently, there is no vaccine available for prevention of HCV infections and the current treatment of chronic infections with pegylated interferon in combination with ribavirin and the protease inhibitors telaprevir or boceprevir (recently approved), is costly and has significant side effects. The reduced number of antiviral agents available against HCV is highly related to the lack of suitable *in vitro* culture models for the replication of this virus. The development of *in vitro* models such as HCV infection systems, HCV sub-genomic and genomic replicon systems, production of infectious HCV virions and HCV pseudoparticles provide an important tool for developing new antiviral drugs as well as for studying its biology and replication events.

*Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Área Farmacia y Bioquímica. Becario Postdoctoral del CONICET. Cátedra de Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

†Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Área Virología. Profesor Adjunto regular. Cátedra de Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA

Eliana Florencia Castro.

Cátedra de Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Dirección: Junín 956, 4 Piso. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. ecastro@ffyb.uba.ar

Características del virus de la hepatitis C y de sus infecciones

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (HCV) es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades hepáticas graves y es una de las causas importantes de mortalidad alrededor del mundo. Se estima que aproximadamente 150 millones de personas están persistentemente infectadas con HCV (1). Solo una fracción de los individuos que cursan la infección aguda pueden resolverla, mientras que aproximadamente el 80 % de los individuos infectados desarrollan una infección crónica (2). Estos últimos poseen un alto riesgo de desarrollar fibrosis hepática, cirrosis y/o carcinoma hepatocelular, siendo dichas complicaciones la principal causa para la indicación de trasplante hepático (3,4). Se sabe que más de 350.000 personas mueren cada año a causa de las enfermedades hepáticas relacionadas al HCV (1).

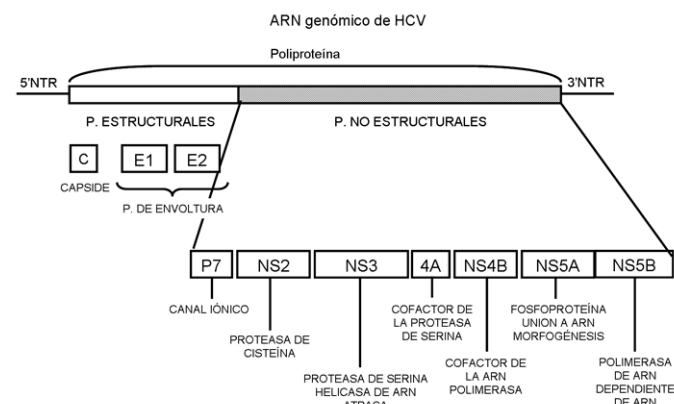
HCV es el único miembro del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*, es un virus envuelto cuyo genoma es una molécula de ARN simple cadena de polaridad positiva de aproximadamente 9.600 nucleótidos. El genoma está organizado en una región codificante flanqueada por dos regiones no traducibles en los extremos 5' y 3' (5'NTR y 3'NTR) que son importantes para la iniciación de la traducción y para la regulación de la replicación del genoma viral, respectivamente.

El ciclo de replicación de HCV es enteramente citoplasmático y ocurre principalmente en hepatocitos, aunque puede replicar también en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), pero con menor eficiencia que en hepatocitos. La entrada del virus se produce mediante la unión de las proteínas de la envoltura viral (E1 y E2) a distintas moléculas de la membrana de la célula hospedadora que permiten el acercamiento del virus a la membrana celular (Heparán sulfato y receptor de lipoproteínas de baja densidad) o que contribuyen a la entrada del virus (CD81, receptor *scavenger* clase B tipo I, Claudina-1 y ocludina). Luego, la penetración de la partícula viral al citoplasma celular ocurriría por endocitosis mediada por clatrina. Una vez que el genoma viral es liberado en el citoplasma celular, el ARN viral es traducido a través del sitio de entrada interna al ribosoma (IRES) que reside en la región 5'NTR. La traducción genera una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que es clivada co- y postraduccionalmente por las proteasas virales y celulares en al menos 10 proteínas diferentes: las proteínas estructurales (C, E1 y E2) componentes principales de la partícula viral, p7 y las proteínas no estructurales (NS) necesarias para la replicación viral (Figura 1).

Se sabe que al menos cinco proteínas NS forman parte del complejo de replicación de HCV, estructura en la cual ocurre la replicación del genoma viral (5):

✎ NS3: es una enzima que posee un dominio N-terminal con actividad de serin-proteasa y un dominio C-terminal con actividad de helicasa de ARN/NTPas.

Figura 1



Estructura genómica de HCV. El genoma de HCV consta de una molécula de ARN con un único marco de lectura abierto que codifica una poliproteína. El clivaje de la poliproteína por proteasas virales y celulares da lugar a las proteínas maduras estructurales (C, E1 y E2), p7 y no estructurales (NS2-5B). Se indican las funciones descriptas de estas proteínas. El sitio interno de entrada de ribosomas (IRES), localizado en la región no codificante en 5' (5'NTR), inicia la unión de los ribosomas y la traducción de la poliproteína.

✎ NS4A: es un cofactor de la proteasa NS3.

✎ NS4B: se postula como el principal inductor de los arreglos de membranas intracelulares que ocurren para la formación del complejo de replicación.

✎ NS5A: es una proteína fosforilada o fosfoproteína de unión a ARN que es requerida tanto para la replicación del ARN viral como para el ensamble de las partículas virales progenie.

✎ NS5B: es la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp) que cataliza la amplificación del genoma viral. La RdRp de HCV carece, al igual que las RdRps de los demás ARN virus, de capacidad de corrección de errores (o *proofreading*) y esto conduce a una alta tasa de mutación y la generación de una población viral con distribución de *cuasiespecies* en el individuo infectado.

Las nuevas cadenas de ARN (+), que se transcriben a partir de intermediarios de replicación de ARN (-), sirven como molde para la traducción o para la síntesis de más ARN (-) y, alternativamente, son utilizadas para el ensamble de nuevas partículas virales mediante un proceso asociado a gotas lipídicas (*lipids droplets*) del citosol y a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Los aislamientos de HCV pueden clasificarse en siete genotipos principales, que pueden diferir en un 30-35 % en sus secuencias nucleotídicas (6). Además de la prevalencia y la propagación mundial distinta del virus, el genotipo es un factor importante que determina la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento antiviral (7).

Prevención y tratamiento de las infecciones por HCV

En la actualidad no se dispone de una vacuna que permita la profilaxis o tratamiento de las infecciones por HCV. La única terapia antiviral aprobada para el tratamiento de las infecciones crónicas por HCV es la combinación de interferón α pegilado (PEG-IFN- α), ribavirina (RBV) y los primeros antivirales de acción directa (DAA), específicos para la NS3 de HCV, boceprevir (8) y telaprevir (9). La utilización de dichos DAA ha incrementado las tasas de éxito en los pacientes infectados con el genotipo 1 de aproximadamente un 55 % a un 75 %, bajo las condiciones estandarizadas de los ensayos clínicos (10). Sin embargo, estas drogas presentan algunos efectos adversos como sarpullidos y anemia, requieren de un régimen de tratamiento estricto y aumenta la cantidad de píldoras a administrar, pudiendo afectar la adherencia del paciente al tratamiento (11, 12). Por lo tanto, la investigación y desarrollo de nuevos antivirales para el tratamiento de las infecciones por HCV continúa siendo de permanente interés y se realizan grandes esfuerzos para desarrollar una terapia libre de IFN- α que permita eliminar o reducir los efectos adversos derivados del uso de esta citoquina (13).

El reducido número de antivirales disponibles actualmente para el tratamiento de las infecciones por HCV está relacionado también con la falta de sistemas adecuados de cultivo *in vitro* e *in vivo* para este virus. Esta revisión se focalizará en los sistemas de cultivo *in vitro* para HCV disponibles actualmente que permiten el estudio a nivel molecular del ciclo de replicación viral así como la evaluación de antivirales, y una breve enunciación de sus ventajas y desventajas.

Sistemas de cultivo *in vitro* para HCV

El requerimiento principal para la obtención de un modelo de replicación *in vitro* para HCV, al igual que para otros virus, es disponer de células susceptibles y permisivas que permitan la replicación viral. Sin embargo, el restringido rango de hospedador (hombre) y de tropismo (fundamentalmente en el hígado) de este virus y paralelamente, las dificultades para mantener y propagar *in vitro* hepatocitos normales humanos en cultivo, han limitado severamente el estudio de la replicación viral, la obtención de vacunas y el desarrollo de antivirales para HCV.

Con el objetivo de encontrar solución a estas dificultades se han abordado distintas estrategias experimentales como:

Modelos de infección directa con el suero de pacientes infectados y cultivo de hepatocitos infectados

Se han utilizado sueros de pacientes con altos títulos de virus para infectar cultivos primarios de hepatocitos huma-

nos y de chimpancé que son susceptibles a la infección por HCV (14-16), CMSP (17) y también líneas celulares de hepatoma humano (Huh7, HepG2) o hepatocitos inmortalizados (PH5CH) (18, 19), pero estas estrategias no tuvieron éxito debido a la pobre reproducibilidad, y los bajos niveles de replicación viral obtenidos. Sin embargo, a pesar de las limitaciones enunciadas, estos sistemas se utilizan actualmente. Por ejemplo, recientemente se publicó la evaluación de la actividad inhibitoria de anticuerpos policlonales de camello en el sistema de células Huh7.5 y sueros de pacientes infectados con HCV genotipo 4 (20).

Otra estrategia que ha sido utilizada fue el cultivo *in vitro* de hepatocitos infectados derivados de biopsias hepáticas obtenidas de pacientes infectados crónicamente con HCV. En este sistema, se obtuvieron partículas virales con potencial infeccioso tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, esta aproximación no progresó debido a las dificultades para obtener las muestras de biopsia y la poca reproducibilidad (18, 21).

Clones moleculares de HCV: Sistemas de genomas y mini-genomas autoreplicativos (Replicones)

La utilización de clones moleculares presenta la ventaja de una mejor estandarización y homogenización del inóculo, la síntesis de grandes cantidades de genoma viral y la posibilidad de modificar genéticamente el mismo (18). Por otro lado, la transfección de genomas virales tiende a establecer un modelo estable de replicación de HCV a largo plazo. Sin embargo, aún es dificultosa la obtención de estos modelos de replicación para varios de los genotipos y subtipos de HCV (22).

La unidad de ADN en la cual ocurre la autorreplicación del genoma viral completo o un fragmento del mismo se denomina replicón. El replicón se define por poseer los elementos de control necesarios para la replicación, un origen donde ésta se inicia y un sitio de terminación en donde se detiene. Cualquier secuencia nucleotídica unida a un origen, o más precisamente no separada del origen por un sitio de terminación, será replicada como parte de ese replicón (23). El sistema de replicón de HCV consiste en un genoma de HCV modificado y puede ser según su longitud subgenómico (conteniendo solamente las proteínas NS necesarias para la replicación del ARN) o genómico (contiene el genoma completo de HCV).

Replicones subgenómicos

Desde el primer clonado molecular del genoma de HCV hasta el establecimiento del primer sistema de cultivo robusto transcurrieron diez años. El grupo del Dr. Bartenschlager fue el primero en establecer en 1999 el sistema de replicón como sistema de cultivo *in vitro* para el estudio de la repli-

cación de HCV (24). Se generaron replicones derivados de un genoma consenso de HCV genotipo 1b (Con1) mediante el reemplazo de la región codificante de las proteínas C a NS2, por un marcador de selección como el gen de la fosfotransferasa de neomicina que confiere resistencia a la neomicina (G418) (Figura 2). El ARN sintético derivado del ADN de dicho replicón subgenómico se utilizó para transfectar células de la línea de hepatoma humano Huh7, las que fueron cultivadas en presencia de G418. Sólo las células en las que el replicón se amplifica en altos niveles pueden sobrevivir, de hecho, se obtuvieron varias colonias de células resistentes a G418 que presentaban grandes cantidades de ARN y proteínas virales.

Posteriormente, se confirmó que estos replicones de HCV eran capaces de auto-amplificarse a través de la síntesis de ARN (-) con formación de intermediarios replicativos y que podían ser propagados en cultivo de células de manera estable por muchos años (24, 25). Más tarde, se desarrolló un replicón subgenómico derivado de un clon denominado JFH-1 aislado de un paciente japonés con hepatitis C fulminante (genotipo 2a) que replica hasta 20 veces más en Huh7 que los replicones de Con1, y no requiere de mutaciones adaptativas para una eficiente replicación *in vitro* y un aumento de 58 veces en la eficiencia de formación de colonias resistentes a G418 en comparación con el genotipo 1b (26).

Durante el último año se han desarrollado replicones subgenómicos de los genotipos 3a y 4a que mostraron ser útiles

para la evaluación de la actividad antiviral de INF e inhibidores de NS3 y NS5B (27).

Los replicones subgenómicos presentan algunas limitaciones:

- ✎ baja eficiencia de formación de colonias,
- ✎ la multiplicación del replicón no genera ninguna modificación fenotípica o citopatogenia en las células, que ponga en evidencia dicha multiplicación,
- ✎ en algunos casos la replicación estable depende de la utilización de G418,
- ✎ el hecho de que el replicón solo codifique algunas de las proteínas virales no permite estudiar el ciclo de replicación completo de HCV ni identificar posibles agentes antivirales que actúen sobre etapas tempranas (adsorción, penetración, desnudamiento y traducción) ni tardías (morfogénesis y liberación) del ciclo viral.

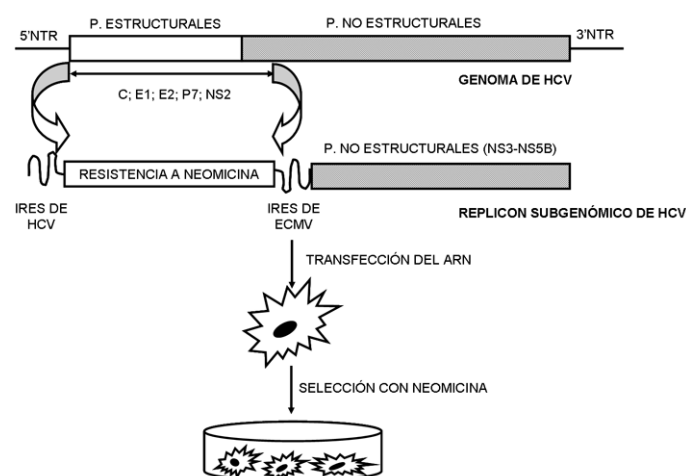
A pesar de dichas limitaciones, los replicones son aceptados ampliamente como una herramienta importante para el estudio de los mecanismos moleculares de la replicación del ARN de HCV y proveen una plataforma para la búsqueda de antivirales para HCV. De hecho, la actividad antiviral de los inhibidores de la proteasa NS3 aprobados en 2011 por la FDA para su uso en combinación con PEG-IFN- α /RBV, boceprevir y telaprevir, fueron descubiertos utilizando el sistema de replicón subgenómico desarrollado por Lohmann y col. en 1999 (24, 28-30).

En el último año se han reportado múltiples trabajos en los que se estudia la actividad antiviral de distintos compuestos sintéticos y naturales utilizando replicones subgenómicos (31-36).

Replicones de genoma completo y cultivos celulares que generan virus infectivos

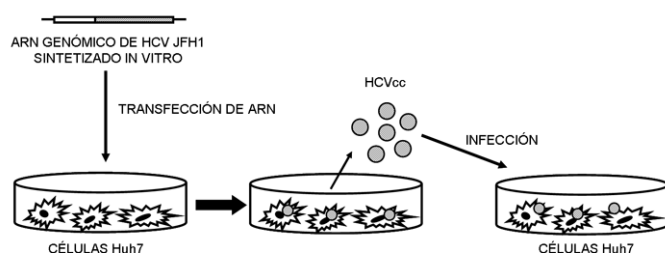
La transfección del ARN completo correspondiente a la cepa JFH-1, transcripto *in vitro*, en células Huh7 resultó en una eficiente replicación del ARN y en la producción de partículas virales infectivas que fueron capaces de transmitir la infección tanto *in vitro* (células Huh7, Huh7.5.1) (Figura 3) como *in vivo* (chimpancés) (26, 37-43). Al sistema en el cual se obtienen partículas de HCV infectivas a partir de la transfección de un cultivo celular con un replicón de genoma completo se lo denomina HCVcc (de *cell culture*, en inglés). Este sistema de cultivo es actualmente el más adecuado para ensayos de evaluación de antivirales y para el desarrollo de vacunas ya que estos replicones pueden propagarse establemente y codifican todas las enzimas virales consideradas como principales blancos para la terapia antiviral.

Figura 2



Sistema de replicón subgenómico de HCV. Se reemplazaron las secuencias de las proteínas estructurales junto con p7 y NS2 por el gen de resistencia a Neomicina bajo el control del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de HCV, y se introdujo un segundo IRES del Virus de la encefalomiocarditis (ECMV) para conducir la traducción del resto de las proteínas no estructurales de HCV (NS3-NS5). La selección de estos replicones bicistónicos en la línea celular de hepatoma Huh7 resistentes a Neomicina resultó en células con un alto nivel de replicación del ARN de HCV, con las denominadas mutaciones adaptativas para el cultivo celular, confinadas principalmente a las regiones de NS3, NS4B Y NS5A.

Figura 3



Sistema de infección JFH1. El genoma ARN completo de JFH1 clonado se transcribe *in vitro* y luego se transfectan células derivadas de Huh7. Se obtienen viriones infectivos que se liberan al sobrenadante de cultivo (HCVcc, partículas virales infectivas de HCV producidas en cultivo celular). El medio de cultivo se recolecta, se concentra y se utiliza para infectar nuevas células. Por lo tanto, este sistema reproduce el ciclo de replicación viral completo.

Luego del desarrollo de dicho sistema para el genotipo 2a, se han intentado establecer sistemas similares al replicón genómico JFH-1 para los genotipos 1a y 1b, cuyas infecciones se caracterizan por una mayor evolución a cirrosis y mayor resistencia a INF. En el primer caso, se obtuvieron virus infectivos luego de transfección de células Huh7 con el ARN sintético derivado del virus prototipo H77 (HCV 1a) que posee mutaciones adaptativas al cultivo celular en algunas proteínas NS (H77-S). Dicho sistema mostró una eficiencia de replicación genómica similar a JFH-1 pero con una menor producción de partículas virales infectivas (48). En el segundo caso, se partió de un suero con altos títulos virales del genotipo 1b, el cual era infectivo en células en cultivo y aún más apreciable era la eficiencia de infección con el virus obtenido en dichos cultivos. Sin embargo el clonado de este nuevo aislamiento denominado "Barcelona HCV1", permitió la obtención de un replicón genómico con una pobre replicación transiente en células en cultivo (49).

Como alternativa, se construyeron quimeras inter e intra genotipo basados en el replicón JFH-1 en el cual los genes estructurales (core, E1, y E2), p7 y NS2 de JFH-1 fueron reemplazados por las secuencias específicas de cada genotipo. Sin embargo, en general, se obtuvo para estos virus quiméricos una menor producción de virus infectivo (44-46). Estos sistemas tienen la limitación de que la mayoría de las proteínas NS (que son esenciales para la replicación del ARN viral) provienen de JFH-1, y por lo tanto no reflejarían las características de replicación de cada genotipo (47). Sin embargo, cobran importancia en el estudio de los mecanismos de entrada de los distintos genotipos virales a la célula hospedadora y en la evaluación de inhibidores de dicho proceso.

La infección y la replicación de HCV *in vitro* se han estudiado en cultivos de células Huh7 o cultivos derivados de ésta que se dividen activamente y de manera no sincronizada y

que no son capaces de responder mediante los mecanismos de la inmunidad innata a la presencia de ARN doble cadena intracelular (43). De acuerdo con esto, estos sistemas no reflejarían adecuadamente los eventos que ocurren durante la infección de HCV *in vivo*, ya que los hepatocitos son células diferenciadas, que naturalmente no se dividen y que son capaces de desencadenar una respuesta al ARN doble cadena. En este sentido, Sainz y Chisari (2006) (50) desarrollaron un sistema de células Huh7 arrestadas en su crecimiento las cuales se lograron infectar con virus producidos a partir del replicón JFH-1 y se obtuvo una producción viral estable por 63 días, susceptible al tratamiento con INF. Este sistema permitiría entonces el estudio de la replicación de HCV en condiciones más cercanas a las fisiológicas y que no estaría alterado por las variables inherentes a los cultivos celulares en división. Numerosos investigadores han utilizado tanto el sistema de replicones genómicos y HCVcc para la evaluación de agentes antivirales en todo el mundo (20, 51-55).

Seudopartículas de HCV (HCVpp)

Lasseudopartículas de HCV (HCVpp, del inglés *pseudoparticles*) se produjeron para estudiar las etapas tempranas del ciclo viral y se han convertido en un modelo estándar para el estudio de inhibidores de la entrada del virus a la célula. La producción de HCVpp contempla el uso de proteínas de retrovirus que confieren, como ventaja, la habilidad de los retrovirus de incorporar glicoproteínas heterólogas en su envoltura durante la brotación. Las HCVpp se obtienen mediante la transfección de células de riñón de embrión humano 293T con tres vectores: el primero codifica para las proteínas Gag-Pol de retrovirus, responsables del armado de la partícula viral en la membrana plasmática con encapsidación del ARN y finalmente la brotación de las partículas envueltas, el segundo vector codifica para el gen reportero de luciferasa o de la proteína verde fluorescente (GFP) y el tercero codifica para las glicoproteínas E1 y E2 de HCV, que serán insertadas en la envoltura de la partícula retroviral y que son necesarias para el reconocimiento de los receptores celulares (y en consecuencia determinan el tropismo viral) y para la fusión de la envoltura de lasseudopartículas con la membrana de la célula hospedadora.

Lasseudopartículas virales que se liberan de las células 293T pueden ser utilizadas para infectar células Huh7. La infectividad de las mismas se evalúa mediante la cuantificación de la expresión de luciferasa o GFP en dichas células. Por otro lado, estas HCVpp pueden ser neutralizadas con anticuerpos monoclonales anti E1 y E2 y con sueros de pacientes infectados (56, 57).

Las HCVpp basadas en retrovirus se han utilizado para estudiar la entrada viral (57-59) y la inhibición de este proceso (60); también se han utilizado modelos de HCVpp basadas en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (61-63).

Conclusión

Si bien el clonado del genoma de HCV hace 20 años atrás (64) ha permitido un rápido análisis de su organización genómica así como la caracterización bioquímica de sus proteínas, la falta de un sistema de cultivo celular en el cual el virus se amplifique eficientemente ha sido el mayor obstáculo para el estudio del ciclo de vida de HCV.

Sin embargo, el desarrollo de los distintos modelos de infección *in vitro* que están hoy disponibles, algunos de ellos revi-

sados aquí, son herramientas que han sido muy útiles para el estudio no solo del ciclo viral sino para la evaluación de numerosos compuestos antivirales.

En el futuro los avances que se obtengan en el cultivo *in vitro* de hepatocitos humanos normales impactará directamente en la posibilidad de disponer de sistemas de cultivo celular de HCV que resulten más representativos de los eventos que ocurren durante la infección natural.

AH

Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud, 2012 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/es/>
- Conry-Cantilena C., Vanraden M., Gible J., Melpolder J., Shakil A.O., Viladomiu L., Cheung L., Dibisceglie A., Hoofnagle J., Shih J.W., Kaslow R., Ness P., Alter H.J. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1691–6.
- Brown R.S. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 2005; 436: 973–8.
- Shepard C.W., Finelli L., Alter M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 558–67
- Poenisch M, Bartenschlager R. New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. *Semin Liver Dis.* 2010; 30: 333–47.
- Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol.* 2009; 510: 33–53.
- El-Farrash M.A., Aly H.H., Watashi K., Hijikata M., Egawa H., Shimotohno K. *In vitro* infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 127–33.
- http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2011/202258Orig1s000ltr.pdf
- http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2011/201917Orig1s000ltr.pdf
- Asselah T, Marcellin P New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2011; 31: 68–77.
- McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, et al. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med.* 2010; 362: 1292–303.
- Ciesek S, Manns MP. Hepatitis in 2010: the dawn of a new era in HCV therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8: 69–71.
- Bühler S, Bartenschlager R. New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2012; 32: 9–16.
- Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M.B., Macioce, G., Hassan, H.J., Ponzetto, A., Clementi, M., Peschle, C., Carloni, G. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected *in vitro*. *Hepatology.* 1997; 26: 1328–37.
- Iacovacci, S., Sargiacomo, M., Parolini, I., Ponzetto, A., Peschle, C., Carloni, G. Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. *Res. Virol.* 1993; 144: 275–9.
- Lanford, R.E., Sureau, C., Jacob, J.R., White, R., Fuerst, T.R. Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology.* 1994; 202: 606–14.
- Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A., Keller, F. *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 2485–91.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2001; 52: 1–17.
- Sugiyama, K., Kato, N., Mizutani, T., Ikeda, M., Tanaka, T., Shimotohno, K. Genetic analysis of the hepatitis C virus (HCV) genome from HCV-infected human T cells. *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 329–36.
- El-Fakharany E. M., Abedelbaky N., Haroun B. M., Sánchez L., Redwan N. A., Redwan E. M. Anti-infectivity of camel polyclonal antibodies against hepatitis C virus in Huh7.5 hepatoma. *Virol J.* 2012; 9: 201.

21. Bartenschlager, R. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 9739-40.
22. Tariq H., Manzoor S., Parvaiz F., Javed F., Fatima K., Qadri I. An overview: *in vitro* models of HCV replication in different cell cultures. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 13-20.
23. Lewin B. The replicon. In: *Genes VIII.* Prentice-Hall, Inc. New Jersey, 2004; Capítulo 13. pág 354.
24. Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999; 285: 110-3.
25. Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K., Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol.* 2001; 75: 1252-64.
26. Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology.* 2003; 125: 1808-17.
27. Saeed M., Scheel T. K., Gottwein J. M., Marukian S., Dustin L. B., Bukh J., Rice C. M. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 5365-73.
28. Malcolm B. A., Liu R., Lahser F., Agrawal S., Belanger B., Butkiewicz N., et al. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polypeptide maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1013-20.
29. Perni R. B., Chandorkar G., Chaturvedi P. R., Courtney L. F., Decker C. J., Gates C. A., et al. VX-950: The discovery of an inhibitor of the hepatitis C virus NS3-4A protease and a potential hepatitis C virus therapeutic. 54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases Boston. October 24 - 28, 2003; *Hepatology.* 2003; 38: 624A. [abstract 972].
30. Lin C., Lin K., Luong Y. P., Rao B. G., Wei Y. Y., Brennan D. L., et al. *In vitro* resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem.* 2004; 279: 17508-14.
31. Sheng X. C., Appleby T., Butler T., Cai R., Chen X., Cho A., et al. Discovery of GS-9451: an acid inhibitor of the hepatitis C virus NS3/4A protease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22: 2629-34.
32. Murakami Y., Fukasawa M., Kaneko Y., Suzuki T., Wakita T., Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 2013; 15: 45-55.
33. Manvar D., Mishra M., Kumar S., Pandey V. N. Identification and evaluation of anti Hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *J Ethnopharmacol.* 2012; S0378-8741(12)00644-7.
34. Nag A., Robotham J. M., Tang H. Suppression of viral RNA binding and the assembly of infectious hepatitis C virus particles *in vitro* by cyclophilin inhibitors. *J Virol.* 2012; 86: 12616-24.
35. Chen M. H., Lee M. Y., Chuang J. J., Li Y. Z., Ning S. T., Chen J. C., Liu Y. W. Curcumin inhibits HCV replication by induction of heme oxygenase-1 and suppression of AKT. *Int J Mol Med.* 2012; 30: 1021-8.
36. Hebner C. M., Han B., Brendza K. M., Nash M., Sulfab M., Tian Y., et al. The HCV non-nucleoside inhibitor Tegoibuvir utilizes a novel mechanism of action to inhibit NS5B polymerase function. *PLoS One.* 2012; 7(6):e39163.
37. Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 2005; 309: 623-6.
38. Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M., Wakita, T. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 22371-6.
39. Heller, T. An *in vitro* model of hepatitis C virion production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102: 2579-83.
40. Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., Wakita, T. Non-hepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J. Virol.* 2005; 79: 592-6.
41. Miyamoto, M., Kato, T., Date, T., Mizokami, M., Wakita, T. Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a (JFH-1) and 1b (Con1 NK5.1). *Intervirology.* 2006; 49: 37-43.
42. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 2005; 11: 791-6.
43. Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., Chisari, F.V. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 9294-9.
44. Yi M., Ma Y., Yates J., Lemon S.M. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol.* 2007; 81: 629-38.
45. Pietschmann T., Kaul A., Koutsoudakis G., Shavinskaya A., Kallis S., Steinmann E., et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 7408-13.
46. Gottwein J.M., Scheel T.K., Jensen T.B., Lademann J.B., Prentoe J.C., Knudsen M.L., Hoegh A.M., Bukh J. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology.* 2009; 49: 364-77.
47. Li Y. P., Ramirez S., Gottwein J. M., Scheel T. K., Mikkelsen L., Purcell R. H., Bukh J. Robust full-length hepatitis C virus genotype 2a and 2b infectious cultures using mutations identified by a systematic approach applicable to patient strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: E1101-10.
48. Yi M., Villanueva R. A., Thomas D. L., Wakita T., Lemon S. M. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 2310-5.
49. Koutsoudakis G., Perez-Del-Pulgar S., Coto-Llerena M., Gonzalez P., Dragun J., Mensa L., Crespo G., Navasa M., Forns X. Cell culture replication of a genotype 1b hepatitis C virus isolate cloned from a patient who underwent liver transplantation. *PLoS ONE.* 2011; 6:e23587.
50. Sainz B. Jr, Chisari F. V. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol.* 2006; 80: 10253-7.

51. Khachatourian R., Arumugaswami V., Raychaudhuri S., Yeh G. K., Maloney E. M., Wang J., Dasgupta A., French S. W. Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle. *Virology*. 2012; 433: 346-55.
52. Liu H., Trinh T. L., Dong H., Keith R., Nelson D., Liu C. Iron Regulator Hepcidin Exhibits Antiviral Activity against Hepatitis C Virus. *PLoS One*. 2012; 7(10):e46631.
53. Asmal M., Seaman M., Lin W., Chung R. T., Letvin N. L., Geiben-Lynn R. Inhibition of HCV by the serpin antithrombin III. *Virology*. 2012; 9:226.
54. Yu X., Sainz B. Jr, Petukhov P. A., Uprichard S. L. Identification of hepatitis C virus inhibitors targeting different aspects of infection using a cell-based assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 6109-20.
55. Liu X., Huang Y., Cheng M., Pan L., Si Y., Li G., Niu Y., Zhao L., Zhao J., Li X., Chen Y., Yang W. Screening and rational design of HCV entry inhibitory peptides derived from GBV-A NS5A. *J Virol*. 2013; 87: 1649-57.
56. Cai Z., Zhang C., Chang K. S., Jiang J., Ahn B. C., Wakita T., Liang T. J., Luo G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol*. 2005; 79: 13963-73.
57. Hsu M., Zhang J., Flint M., Logvinoff C., Cheng-Mayer C., Rice C. M., McKeating J. A. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 7271-6.
58. Bartosch B., Dubuisson J., Cosset F.L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med*. 2003; 197: 633-42.
59. Albecka A., Montserret R., Krey T., Tarr A. W., Diesis E., Ball J. K., Descamps V., Duverlie G., Rey F., Penin F., Dubuisson J. Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*. 2011; 85: 1777-92.
60. Ashfaq U. A., Qasim M., Yousaf M. Z., Awan M. T., Jahan S. Inhibition of HCV 3a genotype entry through host CD81 and HCV E2 antibodies. *J Transl Med*. 2011; 9: 194.
61. Mazumdar B., Banerjee A., Meyer K., Ray R. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. *Hepatology*. 2011; 54: 1149-56.
62. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Morishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A. H., Whitt M. A., Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol*. 2007; 81: 8601-12.
63. Coburn G. A., Fisch D. N., Moorji S. M., de Muys J. M., Murga J. D., Paul D., Provancha K. P., Rotshteyn Y., Han A. Q., Qian D., Maddon P. J., Olson W. C. Novel small-molecule inhibitors of hepatitis C virus entry block viral spread and promote viral clearance in cell culture. *PLoS One*. 2012; 7(4):e35351.
64. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244: 359-62.